

Tables des matières

Résumé	II
Abstract	IV
Tables des matières	V
Liste des figures	VIII
Liste des abréviations	IX
Remerciements	XI
Avant-propos	XIII
Introduction	1
1. La dystrophie musculaire de Duchenne	1
1.1. Historique	1
1.2. Aspects cliniques et évolution de la maladie de Duchenne	1
1.3. Génétique de la dystrophie de Duchenne	4
1.4. La souris mdx et les modèles animaux de la DMD	5
2. Le muscle squelettique	6
2.1. Structure du muscle squelettique	6
2.2. Régénération musculaire	7
2.3. Les cellules satellites	7
3. Traitements et stratégies thérapeutiques	9
3.1. Thérapie pharmacologique	9
3.2. Thérapie génique sans transfert de gène : Le saut d'exon	10
3.3. Thérapie génique et livraison	11
3.3.1. Les vecteurs viraux	12
3.3.2. Les vecteurs non viraux	14
3.4. Thérapie cellulaire et greffe de myoblastes	16
3.5. Édition du génome	17
3.5.1. Méganucléase	17
3.5.2. Nucléases à doigt de Zinc (Zinc Finger Nucleases (ZFN))	18
3.5.3. Nucléases effectrices de type activateur de transcription (Transcription activator-like effector nucleases (TALENs))	19
3.5.4. Courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées (<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats, CRISPR</i>) cf Chapitre 4	21
4. Le système CRISPR/Cas9 et ses dérivés	22
4.1. Définition et mécanisme	22
4.2. Mutation de la Cas9	24
4.3. Modulation de l'expression des gènes	25
4.3.1. Répression de gène	25

4.3.2	Stimulation de gène	26
4.4	Les effets Hors cibles	27
5	La laminine	30
5.1	La lame basale	30
5.2	Les laminines	30
5.3	La laminine 111	33
5.3.1	Structure de la laminine 111	33
5.3.2	Gène LAMA1	35
5.3.3	Expression de la chaîne $\alpha 1$ de la laminine	36
5.3.4	Rôles biologiques de la LM111	37
5.4	Hypothèse et objectifs	39
6	Increased expression of laminin $\alpha 1$ chain by dCas9-VP160, a potential treatment of Duchenne Muscular Dystrophy	40
6.1	Introduction	40
6.2	Materials and Methods	42
6.2.1	Expression vector	42
6.2.2	Construction and oligonucleotides synthesis	43
6.2.3	Phosphorylation, formation of double-stranded oligonucleotides and ligation	43
6.2.4	Transformation of competent bacteria	43
6.2.5	Transfection of Px330 plasmids in C2C12 myoblasts	44
6.2.6	Transfection of plasmid PAC154 VP160 in murine C2C12 myoblasts and extraction of cells for mRNA and protein analysis	44
6.2.7	Surveyor enzyme test on PCR products	44
6.2.8	Sequencing	45
6.2.9	Plasmid electroporation in Rag/mdx mouse muscles	46
6.2.10	RT PCR	46
6.2.11	Immunocytochemistry on C2C12 transfected or not with puro pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression	48
6.2.12	Detection of LAMA1 by immunohistochemistry	48
6.2.13	Western Blot	49
6.3	Results	51
6.3.1	Testing of gRNAs targeting LAMA1 promoter	51
6.3.2	gRNAs in combination with dSpCas9-VP160-2A-PURO increased expression of the LAMA1 mRNA	52
6.3.3	Combinations of 2 or 3 gRNAs and dCas9-VP160 further increased the expression of the LAMA1 mRNA	53
6.3.4	Combinations of 2gRNAs and dCas9-P300 further increased the expression of the LAMA1 mRNA	56
6.3.5	Detection of LAMA1 protein by immunocytochemistry	56
6.3.6	Detection of LAMA1 protein by Western blot	57
6.3.7	Increase of LAMA1 expression in rag/mdx muscles.	58
6.4	Discussion and conclusion	60
6.5	Perspectives	63
	Bibliographie	64

Liste des Tableaux

Tableau 1 Récapitulatif de la distribution tissulaire des chaînes de laminine.....	32
Table 2 : Sequence primers and gene description	47



Liste des figures

Figure 1 Description clinique de la maladie de Duchenne.....	2
Figure 2 Représentation schématique du complexe de la dystrophine	3
Figure 3 Le gène de la dystrophine	4
Figure 4 Organisation du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique	6
Figure 5 Différentiation de la cellule satellite.....	8
Figure 6 Stratégie du saut d'exon.	11
Figure 7 Organes préférentiellement ciblés par les sérotypes d'AAV	14
Figure 8 Livraison d'un plasmide par les lipides cationiques.....	15
Figure 9 Représentation du principe de la transplantation de myoblastes.	17
Figure 10 Dimère de ZFNs fixé sur une séquence-cible de l'ADN. (Openi.nlm.nih.gov)	19
Figure 11 Structure schématisée d'un TALEN et son mode de reconnaissance de l'ADN.....	21
Figure 12 Structure de la protéine Cas9.	23
Figure 13 Illustration du système CRISPR/Cas9.	24
Figure 14 Les différentes utilisations de la Cas9.	25
Figure 15 Complexe d'une dCas9 avec VP64.	27
Figure 16 Structure tridimensionnelle de la lame basale avec ses composants majeurs.....	30
Figure 17 Isoformes et configurations des laminines.....	31
Figure 18 Structure de la LM111.	34
Figure 19 Polymérisation des laminines	35
Figure 20 Comportement des différentes sous-unités, et sécrétion.....	37
Figure 21 Schema of cloning vector pX330 with oligo design for inserting guide sequences	42
Figure 22 Surveyor enzyme test.....	45
Figure 23 Target sites of gRNAs in the promoter of the mouse laminin $\alpha 1$ gene.	51
Figure 24 Results of Surveyor enzyme assay.....	52
Figure 25 Increased expression of LAMA1 by dCas9-VP160 and individual gRNA 1 to 5.....	53
Figure 26 Synergic increased expression of LAMA1 by 2 or 3 gRNA with dCas9-VP160.....	55
Figure 27 Combinations of gRNA 3 and gRNA 4 with dCas9-P300.	56
Figure 28 Detection of laminin $\alpha 1$ protein by immunocytochemistry in C2C12 cells.	57
Figure 29 Western blot detection of LAMA1 in C2C12 cells.	58
Figure 30 Detection of laminin $\alpha 1$ protein <i>in vivo</i> in Tibialis anterior of rag/mdx mouse by immunohistochemistry and western blot.....	59

Liste des abréviations

AAV = Virus adéno-associé
Ac = Anticorps
ADN = acide déoxyribonucléique
ADNc = ADN complémentaire
ARN = acide ribonucléique
ARNm = ARN messenger
A.A = acide aminée
CDG = Complexe dystrophine glycoprotéine
CRISPR = clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DMD = dystrophie musculaire de Duchenne
hiPSCs = cellules souches pluripotentes humaines induites
iPSCs = cellules souches induites à la pluripotence
HBSS : Hank's Balanced
HRP = peroxydase de Raifort (horseradish peroxidase)
Kb = kilo base
Mb = méga base
KDa = kilo Dalton
MCK = créatine kinase, liée au muscle
Mdx = dystrophie musculaire liée au chromosome X (muscular dystrophy X-linked)
mg = milligramme
mm = millimètre
ml = millilitre
mM = milli molaire
LTR = longue région répétitive
ONA = oligonucléotide anti-sens
pb = paire de base
PBS = solution saline de tampon de phosphate
PCR = réaction en chaîne par polymérase
RT-PCR = Reverse transcriptase PCR
SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TAD = Transcription activation domain
TA = Tibialis antérieur
TALENs = Transcription activator-like effector nucleases
Tris-HCl = Tris (hydroxyméthyl) aminométhane hydrochloride
TM = Transplantation de myoblastes
 μ l = microlitre
 μ g = microgramme
 μ m = micromètre
V = volts

Le but de ces travaux vise à développer une thérapie potentiellement efficace pour lutter contre la Dystrophie Musculaire de Duchenne.

Remerciements

En 2014, fuyant ma terre natale, je suis venu me confronter au joul,
J'ai débuté par un stage à durée limitée, dans le laboratoire du Dr Jacques P Tremblay.

Dr Tremblay m'a offert la chance de travailler avec lui, et pas uniquement pour faire des chromatographies,

Malgré mon niveau scolaire, pas forcément exemplaire,

Il m'a généreusement accepté, dans un programme d'une chouette université.

C'est une opportunité qui a changé bien des choses dans ma vie, et pour cela je ne peux que lui dire
Merci.

Lui dire que, par le travail qu'il m'a confié, par l'équipe qu'il a formé, j'ai vécu une expérience qui restera encrée.

Sa disponibilité, son humour et sa patience, font qu'aujourd'hui j'ai du mal à tirer ma révérence.

Mais avec les armes que j'ai pu me construire par son enseignement, je peux partir à l'aventure en étant confiant !

Je remercie Joël Rousseau, mon pédagogue, mon exemple, mon poteau !

Alors que j'étais encore naïf du mode de vie Québécois, il m'a enseigné comment couper du bois.

Il m'a appris à conduire les chiens de traîneaux, puis à pêcher dans un cours d'eau.

Je te remercie vraiment pour tes qualités professionnelles, et d'avoir contribué autant à ce que mon aventure soit exceptionnelle.

Dans un ordre qui n'est pas alphabétique, je vais remercier tous mes acolytes :

Agudelo Steven Daniel, qui m'a fait accepter quelque chose d'essentiel

Je n'oublierai pas ce cadeau que tu m'as fait, de me payer un p'tit tour de poney.

Benjam'-Préjent- Duchêne, toutes ces journées à me déverser ta haine

Tu savais que c'est ce qui allait me faire avancer, et franchement...on s'est bien trippé !

J'espère qu'un jour dans une crêperie bretonne on se croisera, et que la femme de ta vie tu me présenteras.

Jean Paul Lyombe du Congo, tu m'as vu en détresse lors de la Cancéro

Tu m'as aidé à me canaliser et grâce à toi, de ce cours, j'ai pu triompher

Tu as laissé une trace indélébile avec ton entourloupette, qui consistait à faire subir à tes cellules la Jeanpaulette

J'attends avec impatience que tu publies dans Cell, ainsi je pourrai te dire 'ça c'est une bonne nouvelle'.

Dominique marathonnienne Ouellet, envers toi je me dois d'être honnête

J'ai toujours été en admiration, devant ton savoir et ton organisation

Tu as grandement contribué à ce que le labo tourne bien, et c'est une chance de t'avoir pour collègue au quotidien

La généreuse Cathy Gérard, qui m'a sorti d'un long cauchemar.
Alors que je n'avais plus de bureau pour travailler, elle s'est sacrifiée pour me prendre à ses côtés.
Elle m'a appris à cultiver une tomate cerise, que j'ai fini par laisser mourir par fainéantise.

Khadija Chérif mon amie du Maghreb, tu m'as enseigné des mots rigolos comme 'tekdeb'
Je te dois clairement ma réussite de Génome, et je regretterais vraiment notre binôme
Ta générosité, ton dynamisme et ta droiture, n'ont fait qu'accentuer ma passion pour ta culture.

Akhenaton Argaw Anteneh, avec ton self-control tu es arrivé
J'ai de suite vu en toi un frère des quartiers Ouest, tu étais le moteur de ma rédaction, sans conteste.
Ta blague du téléphone m'aura laissé des séquelles, et aura activé chez moi plusieurs facteurs transcriptionnels.

William Edouard de type Gravel, grâce à qui j'ai pu compléter le set du roi immortel
Ma culture Québécoise fut en expansion, le jour où tu m'as fait connaître Elvis Graton
Je t'associe aux Kawab et au FEQ VIP, mais aussi au gars avec qui j'ai le plus ri
Tu es mon exemple de par ta répartie, un jour je suis sûr que j'égalerais ton KI.

Je dois malheureusement être plus expéditif dans mes remerciements, sinon je ne rendrais jamais le mémoire à temps !

Je remercie donc Chantale et Antoine, vous êtes vraiment top tous les deux, et je vous souhaite tout le bonheur possible, je remercie également Daniel Skuk, tu m'as toujours passionné, car quoi que tu fasses, tu le réussis avec classe ! nan c'est vrai, tu es un brillant greffeur de myoblastes, capable de faire de la guitare tout en dansant le tango sur ton vélo et en chantant dans 56 langues différentes, c'est fort ! Je remercie Pierre Chapdelaine, aussi compétent que humble, c'est grâce à des personnes aussi simples et généreuses que toi, que je me vois continuer dans la recherche.

Un remerciement spécial à ma responsable de programme, Dr Josée Lavoie, votre approche de la pédagogie était ce qu'il y avait de meilleure pour moi, je vous suis extrêmement reconnaissant de la chance et la confiance que vous m'avez accordée.

Toujours dans mes responsables de formation, un grand Merci au Pr Elmostafa Bahraoui, jamais je n'oublierai le temps que vous avez passé à m'écouter.

Je remercie mes parents ainsi que mon frère, auxquels j'ai imposé des épreuves pas toujours évidentes lors de tout mon cursus scolaire, sans vous, je n'aurais pas pu aller au bout des choses, et je serai passé à côté de l'aventure exceptionnelle de Québec, entre autres. On ne choisit pas sa famille et rien que pour ça, j'estime avoir une chance extraordinaire de vous avoir autour de moi.

Enfin, je remercie Jérémy Gastines, Quentin Lucarne, Mael Zeulbi, Florian LaforgeDesâmes, Ken Kelu bisabu, Eric Jalpin, Patrick Cirotte, Marcel Poitras, Jean Marie Crépon et Simon Boulette.
Merci les amis !

Avant-propos

Les travaux présentés dans ce mémoire ont fait l'objet d'une publication, soumise à Molecular Therapy : Nucleic Acids (IF : 5.048) le 17 Juin 2016, et actuellement en attente de révision. J'ai fait toutes les expériences et je suis le principal auteur du manuscrit soumis.

Une autorisation de rédiger une partie du mémoire dans une langue autre que le Français a été signée par le Directeur de recherche Dr. J.P. Tremblay et par la directrice du programme Dr. J. Lavoie afin de pouvoir y intégrer le manuscrit.

Ce mémoire met en avant le développement d'une stratégie épigénétique dans l'espoir d'apporter un traitement curatif pour les patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Cette thérapie se base sur l'utilisation d'une technologie récente, une modification du système CRISPR/Cas9 qui nous permet de stimuler l'expression d'un gène codant pour une protéine, la chaîne $\alpha 1$ de laminine. Cette chaîne peut former un complexe avec les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ déjà présentes afin de former la protéine hétérotrimérique laminine 111. La laminine 111 a démontré plusieurs effets bénéfiques aussi bien dans la protection du sarcolemme, que dans la prévention des dommages causés par la transplantation de myoblastes. L'injection de la protéine laminine-111 a permis d'augmenter la résistance et la force du muscle dans des souris modèle de la DMD.

Le mémoire est scindé en deux parties, une introduction théorique en Français visant à situer le contexte du projet (Chapitre 1 à 5) et la présentation des travaux, en anglais, allant de l'introduction jusqu'à la discussion (Chapitre 6).

Introduction

1. La dystrophie musculaire de Duchenne

1.1. Historique

En 1868, Duchenne de Boulogne a décrit pour la première fois la maladie et sa description est fidèle à celle que nous pourrions faire à notre époque, « Paralyse pseudo-hypertrophique; début dans la première enfance, par la faiblesse des membres inférieurs; grossissement considérable, à l'âge de 7 ans, des muscles moteurs des membres inférieurs et des extenseurs de la colonne vertébro-lombaire; généralisation progressive de la paralysie et abolition complète de tous les mouvements, à 13 ans et demi; intelligence obtuse ; mort phthisique, à 15 ans »(Duchenne 1968; Pearce 2005).

Ce n'est que bien plus tard que le mode de transmission de la maladie a été décrit par Stephens et Tyler en 1951, puis par Walton et Nattrass en 1954, comme étant une maladie récessive liée au chromosome X en observant l'évolution de la maladie chez des familles atteintes. Enfin, en 1987, Kunkel a pu identifier le gène de la dystrophine sur le chromosome X (Kunkel et al. 1987).

1.2. Aspects cliniques et évolution de la maladie de Duchenne

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la dystrophie héréditaire la plus sévère, elle a une transmission récessive liée au chromosome X ; ce qui implique qu'elle touche majoritairement les garçons et que les mères de ces enfants atteints sont porteuses du gène de la maladie. L'incidence de la maladie est estimée à 1 naissance masculine sur 3500. Cliniquement, la maladie se caractérise par un affaiblissement de la ceinture pelvienne qui se traduit par une diminution progressive de la force musculaire débutant vers l'âge de 2 à 3 ans. À ce stade de l'enfance, les symptômes sont peu apparents, mais les signes cliniques sont présents. Progressivement, le jeune enfant développera une démarche pathologique et il est alors possible d'observer des pseudo-hypertrophies musculaires. Au stade juvénile, le patient aura recours au fauteuil roulant pour se déplacer, ses muscles étant incapables de fournir le support et la force pour le soutenir. Vers la fin de l'adolescence, l'apparition de problèmes respiratoires vont nécessiter l'utilisation d'un respirateur. L'espérance de vie des patients oscille entre 20 et 30 ans et la cause principale de décès est l'insuffisance au niveau respiratoire et cardiaque (E.Davies 2004).

La destruction progressive et diffuse des fibres musculaires entraîne le largage de marqueurs musculaires comme la créatine phosphokinase et la troponine dans le sang périphérique. A l'enfance et devant la présence des signes cliniques de la maladie et de l'augmentation du taux des enzymes musculaires, la biopsie musculaire permet de poser le diagnostic. Histologiquement, la maladie se traduit par une diminution progressive du nombre de fibres musculaires qui sont remplacées par du tissu conjonctif et graisseux. Dans des cas avancés de la maladie, les muscles des malades contiennent très peu de fibres musculaires. Le diagnostic de la maladie peut également se faire en prénatal par amniocentèse. La majorité des malades ont une délétion du gène de la dystrophine qui peut être diagnostiquée par PCR. Les mutations ponctuelles, quant à elles, sont diagnostiquées par le séquençage complet du gène.



Figure 1 Description clinique de la maladie de Duchenne. Cinétique de l'évolution des symptômes et l'apparition d'handicapes. (http://votresant.skyrock.com/photo.html?id_article=596283153)

Définition et fonction de la dystrophine

La dystrophine est une grosse protéine composée de 3,685 acides aminés pour un poids moléculaire de 427 KDa et une longueur de 125 nm. La dystrophine est plus abondante dans les muscles squelettiques et cardiaques, et elle est retrouvée en quantité bien moindre dans le cerveau. Cette protéine est située sur la partie interne de la membrane de la cellule musculaire. Elle est un composant du complexe glycoprotéique de la dystrophine (DGC). Ce complexe de macromolécules a comme rôle de relier la laminine de la matrice extra-cellulaire aux actines du cytosquelette à travers la membrane de la fibre musculaire. Le DGC est constituée de la

dystrophine, de dystroglycans (α et β), de sarcoglycans (α , β , γ et δ), de sarcospan, de syntrophines ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$; $\gamma 1$ - and $\gamma 2$ -syntrophines qui ont été identifiées dans les neurones) et les α -dystrobrevines. Chaque mutation dans l'une des protéines du complexe peut conduire à une dystrophie. La dystrophie de Duchenne est probablement la plus sévère parce qu'elle s'accompagne d'une absence de tout le complexe (figure 2) (Lapidos, Kakkar, and McNally 2004). La dystrophine est une protéine avant tout de structure, elle joue un rôle très critique dans le maintien de la stabilité de la fibre musculaire, en assurant la continuité entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Par son extrémité aminotermine (N), la dystrophine se fixe aux filaments d'actine γ du cytosquelette sous-membranaire, tandis que du côté carboxyterminal (C), elle s'attache au complexe de glycoprotéines transmembranaires. Cette liaison permet d'ancrer l'appareil contractile à la surface externe de la membrane cellulaire, ce qui est important pour assurer l'intégrité du cytosquelette de la fibre musculaire. L'extrémité carboxyterminale de la dystrophine interagit avec d'autres protéines (syntrophines, dystrobrevine) qui fixent une isoforme de la « nitric oxide synthase », diverses tyrosine-kinases et des canaux ioniques (Petrof 2002).

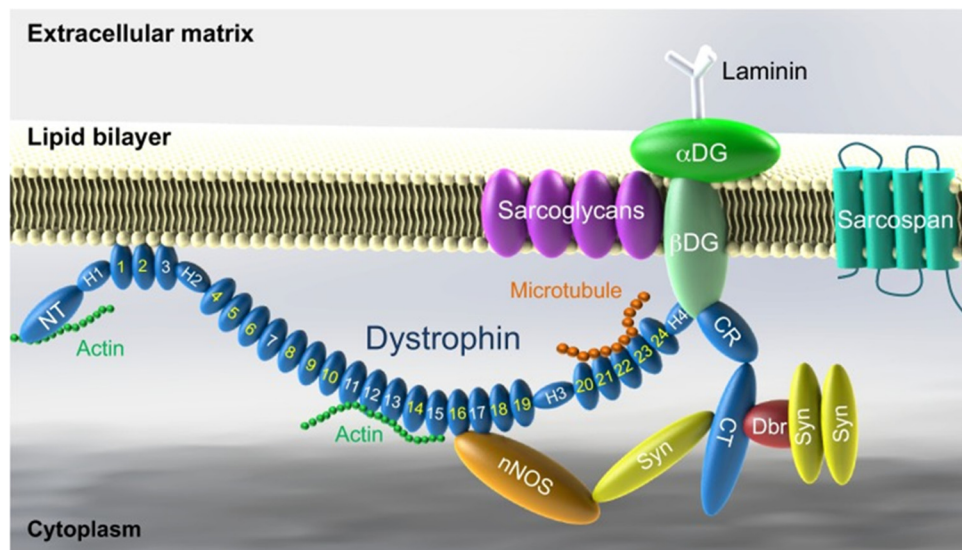


Figure 2 Représentation schématique du complexe de la dystrophine. La dystrophine est localisée au niveau du sarcolemme et est associée à un complexe transmembranaire qui, ensemble, est relié au cytosquelette au niveau de la lame basale. Figure adaptée de McGreevy JW, & al. Dis Model Mech. 8(3):195-213. 2015.

1.3.Génétique de la dystrophie de Duchenne

Le gène de la dystrophine est situé sur le bras court du chromosome X. Il est fait de 2.6 millions de paires de bases et de 79 exons, représentant ainsi l'un des gènes les plus longs connus. Seul 0,5% des paires de bases, qui, combinées les unes avec les autres, contiennent la séquence codante pour la dystrophine (Bieber and Hoffman 1990). L'ARNm pleine longueur transcrit à partir du site d'initiation de la transcription Dp427 (M) fait plus de 14 kb et permet la synthèse de l'isoforme musculaire pleine longueur de la protéine dystrophine (figure 3). Cette isoforme est exprimée en prédominance dans les muscles squelettiques et cardiaque, dans le cerveau ainsi que dans les cellules de Purkinje localisées dans le cervelet. Des isoformes plus courtes sont présentes dans la rétine et les cellules de Schwann (Coffey AJ 1992). Environ 60% des mutations dans le gène de la dystrophine sont de grandes insertions ou délétions génétiques tandis que 40 % sont des mutations ponctuelles. La plupart de ces mutations conduisent à un changement du cadre de lecture qui introduit un ou plusieurs codons « stop » prématurés, résultant en une absence de protéine fonctionnelle (Derek J. Blake 2002). Dans environ 1/3 des cas, il n'y a pas d'antécédents familiaux de dystrophie et l'anomalie génétique n'est pas retrouvée chez la mère, on peut envisager la possibilité d'une néomutation survenue dans la gamétogénèse chez la mère.

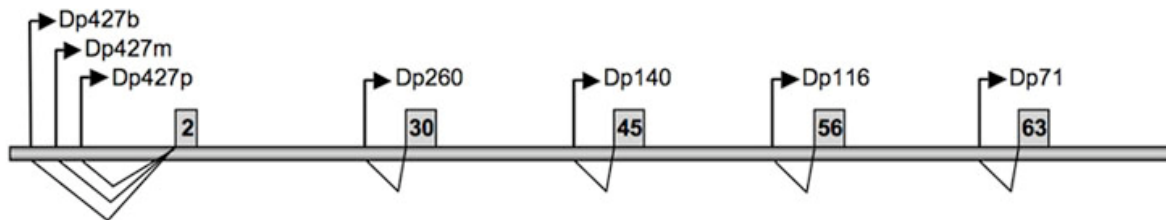


Figure 3 Le gène de la dystrophine. Le gène est composé de 2,5 Mb d'ADN et code pour sept isoformes de la dystrophine dont l'expression localisée dans des tissus bien spécifiques (Derek J. Blake 2002). L'ARNm de la dystrophine musculaire est transcrit à partir du site d'initiation Dp427(M).

1.4. La souris mdx et les modèles animaux de la DMD

La souris mdx (Muscular Dystrophy X-linked) est le modèle expérimental le plus utilisé actuellement pour l'étude de la DMD. En 1984 cette souris a été décrite, elle présente une élévation de créatine kinase plasmatique, ainsi que des lésions spécifiques de la DMD (Bulfield et al. 1984) ; ce qui fait de cette souris un candidat idéal pour l'étude de la maladie. Ce n'est que plus tard que l'on a démontré que cette souris n'exprime pas de dystrophine comme les patients DMD.

Le muscle de la souris mdx, comme les malades Duchenne, possède des propriétés contractiles altérées. En effet, les études physiologiques effectuées sur plusieurs muscles de la souris mdx montrent une diminution de la force musculaire et une augmentation de la fragilité des muscles mdx par rapport aux muscles d'une souris normale. Ces anomalies physiologiques sont liées à l'absence de la dystrophine dans les muscles des souris mdx (Brussee, Tardif, and Tremblay 1997). Cependant, même si la dystrophine est absente, les souris mdx ne présentent pas d'anomalies dégénératives aussi graves que les malades Duchenne, on ne voit effectivement pas d'atteintes des muscles respiratoires ni de cardiomyopathies, et encore moins l'infiltration des muscles par le tissu adipeux et fibreux comme on peut voir chez les malades atteints de la dystrophie de Duchenne.

La souris mdx n'est pas le seul modèle animal de la maladie ; en effet, un modèle encore plus proche de l'humain est disponible, c'est le chien dystrophique qui présente une évolution de la maladie très proche de celle de l'humain et qui constitue, sans doute, le meilleur modèle animal pour l'étude de la maladie. Les dystrophies chez les chats sont plus rares et les symptômes sont observés durant leur première ou leur deuxième année de vie. Les chats malades présentent un élargissement musculaire, une langue proéminente, une mobilité affectée et des signes de cardiomyopathie. Sur des coupes de muscles, on observe des amas de fibres musculaires nécrotiques et un faible marquage pour la dystrophine (Gaschen et al. 1992).

2. Le muscle squelettique

2.1. Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique se compose de plusieurs fibres musculaires qui représentent l'unité contractile du muscle. C'est le tissu conjonctif qui entoure les fibres musculaires qui confère de l'élasticité au muscle, et qui également permet d'accumuler de l'eau puis de servir de réservoir de facteurs de croissance impliqués dans la régénération et la croissance musculaire.

La fibre musculaire est entourée de la membrane basale qui est constituée de deux feuillets, la lamina *densa* et la lamina *lucida* (cf : chapitre 5). Cette membrane basale agit comme une armature pour la régénération des fibres musculaires après un stress. En effet, suite à la lésion d'une fibre musculaire, les couches adjacentes de la membrane basale ne sont pas détruites et les cellules satellites vont venir réparer la fibre musculaire sous la membrane basale.

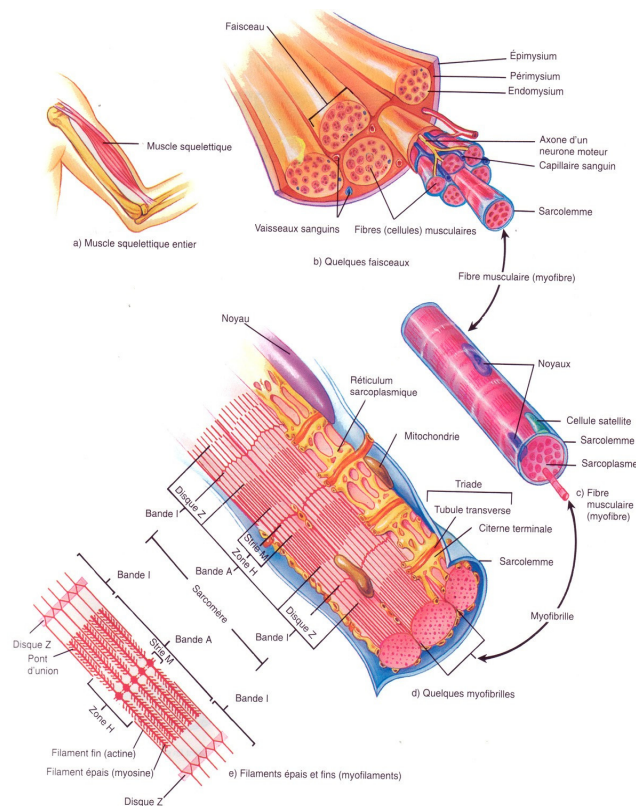


Figure 4 Organisation du muscle squelettique au niveau macroscopique et microscopique. (Tortora and Grabowski 1994)

2.2 Régénération musculaire

La fibre musculaire se régénère suite à des bris. Lorsqu'il est soumis à différents stress (mécanique, ischémique...), le muscle squelettique subit des dommages et les cellules musculaires entrent dans différents cycles de dégradation et de régénération. Le muscle squelettique se régénère de façon autonome et identique quel que soit le type de traumatisme en cause (Allbrook 1981). La régénération musculaire est un processus très efficace qui se fait tout le temps en deux phases (Grounds 1991). Une phase non-inflammatoire qui survient après la rupture de la membrane de la fibre musculaire et une phase de dégénérescence inflammatoire, qui se caractérise par l'envahissement du muscle par des cellules inflammatoires comme les neutrophiles qui sont les premiers à arriver suivis des macrophages. Le rôle de ces cellules est de phagocyter les débris cellulaires et de produire des facteurs chémoattractants nécessaires pour attirer les cellules satellites qui vont réparer la fibre musculaire (Bischoff and Heintz 1994). La position du noyau dans la fibre musculaire indique si celle-ci a été rénovée récemment. En effet, la centronucléation indique qu'une fibre musculaire est en pleine régénération et le retour du noyau vers la périphérie constitue la dernière étape de cette phase chez l'humain. Chez les patients atteints de la maladie de Duchenne, on peut voir beaucoup de fibres musculaires avec des noyaux centraux, ce qui témoigne du processus intense de régénération secondaire à l'augmentation de la fragilité musculaire

2.3 Les cellules satellites

Les cellules satellites sont des cellules souches mononuclées situées entre la lame basale et les cellules musculaires striées dans le tissu musculaire. Ces cellules sont généralement quiescentes, mais lors d'une lésion musculaire, ces cellules sont capables de proliférer, puis de se différencier en myoblastes (figure 5). Certaines cellules restent indifférenciées et reconstituent ainsi le stock de cellules satellites. On arrive à reconnaître les cellules satellites grâce à leur état de quiescence, elles ont peu d'organelles cellulaires et un noyau hétérochromatique. Les cellules satellites n'expriment pas la dystrophine, ce n'est qu'après la fusion qu'elles commencent à l'exprimer (Barnea et al.).

La densité des cellules satellites dans un muscle dépend de plusieurs facteurs. Les fibres

musculaires à contraction rapide contiennent moins de cellules satellites que ceux à contraction lente. Leur nombre et leur capacité proliférative diminuent également avec l'âge (Conboy and Rando 2005) (Lorenzon et al. 2004); ceci implique que les cellules satellites provenant d'un fœtus ont une capacité de prolifération deux à trois fois plus importante que celle de l'adulte.

La capacité de régénération des cellules satellites est plus importante chez la souris mdx comparativement à la souris normale ; ceci est expliqué par le fait que les muscles mdx subissent d'importants cycles de dégradation et régénération et que les cellules satellites sont constamment en prolifération pour assurer la réparation du muscle (Yang et al. 1992).

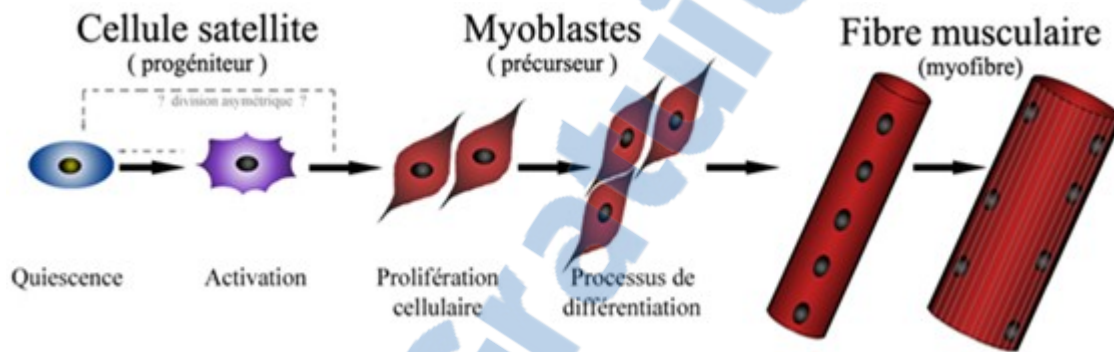


Figure 5 Différentiation de la cellule satellite, Les cellules du mésoderme se différencient en myoblastes ou en cellule satellites. Les myoblastes deviennent des myocytes avant de fusionner en myotubes et ainsi former une fibre musculaire. Les cellules satellites, une fois activée, vont proliférer et se différencier en myoblastes pour finalement former des myotubes. Elles peuvent également migrer dans le muscle entre les myotubes où elles attendent le moment opportun pour proliférer et se différencier.

3 Traitements et stratégies thérapeutiques

Il existe différentes thérapies ayant pour but, au mieux, de réduire certains symptômes de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) et d'apporter un certain confort au patient, comme la physiothérapie, qui permet aux enfants atteints de la DMD de maintenir une position correcte des pieds, par des étirements quotidiens de ces derniers ou par l'utilisation d'orthèses. La chirurgie quant à elle s'adresse principalement aux malades qui présentent des malformations de la colonne vertébrale comme des scoliozes, dues à l'affaiblissement de la charpente musculaire vertébrale. Ces traitements visent à maintenir une posture normale chez les malades. Lorsque la maladie évolue vers les difficultés cardiaques, la ventilation artificielle vient soulager les patients qui développent une faiblesse des muscles respiratoires, ce qui conduit à une insuffisance respiratoire qui constitue l'une des principales causes de décès chez les malades. Parmi les traitements non-curatifs, il y a également la thérapie pharmacologique. Mais avec l'apparition et le développement de la biologie moléculaire, de nouvelles stratégies, à viser thérapeutiques cette fois-ci, ont été développées.

3.1 Thérapie pharmacologique

Entre 1989 et 1993, l'équipe de Mendel a démontré que les corticostéroïdes tel que la Prednisone, ont un effet bénéfique pour les malades DMD (Mendell et al. 1989) (DeSilva et al. 1987). Après trois années de traitement, un ralentissement significatif de la progression de la maladie ainsi qu'une augmentation de leur masse musculaire ont été observés chez les patients. Initialement il a été supposé que l'effet anti-inflammatoire de la prednisone serait responsable de l'effet bénéfique observé, mais cette hypothèse fut réfutée lors de l'utilisation d'un autre anti-inflammatoire/immunosuppresseur, l'azathioprine, qui celui-ci n'a pas démontré les mêmes résultats (Fenichel and Florence 1991). Ainsi, le mécanisme engendrant l'effet positif du traitement à la prednisone reste encore inconnu. Plus récemment, une étude menée en double aveugle a permis de démontrer que l'utilisation du Déflazacort, un autre glucocorticoïde, chez des patients atteints de DMD, maintient les fonctions motrices au même niveau que lors de l'utilisation de la prednisone. De plus, l'utilisation du déflazacort chez ces patients a démontré des effets secondaires moindres que la prednisone (MD and G 2000), car en effet, les traitements à long terme aux glucocorticoïdes engendrent des effets secondaires tels le gain de poids, un déséquilibre hormonal et l'ostéoporose.

Hors mis les glucocorticoïdes, on retrouve l'Idébénone qui est une benzoquinone. Cette molécule présente des propriétés anti-oxydantes et améliore la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale (Buyse et al. 2011). Cela va engendrer une diminution du stress oxydatif connu pour être impliquée dans la physiopathologie de la DMD. Des résultats encourageants ont été observés chez la souris mdx et des essais cliniques de phase II suggéraient une amélioration de l'expiratoire maximal (Buyse et al. 2011), mais ces résultats sont à interpréter avec précaution du fait que le nombre de patients ne s'élevait qu'à 21.

3.2 Thérapie génique sans transfert de gène : Le saut d'exon

Cette technique consiste à synthétiser des oligonucléotides antisens de façon à être chimiquement protégés contre la dégradation enzymatique et être complémentaires à une séquence particulière. Ainsi, cet oligonucléotide se lie sur la séquence cible de l'ARN pré-messager, empêchant l'épissage d'un ou plusieurs exons. La protéine produite est tronquée, mais fonctionnelle. Les premiers essais cliniques faits avec deux types d'oligonucléotides antisens, le 2'-O-méthyl-phosphorothioate (2'OMe) et le morpholino phosphorodiamidate oligonucléotide (PMO), ont donné des résultats variables, allant jusqu'à 55 % de fibres positives pour la dystrophine chez un patient (Fairclough, Wood, and Davies 2013).

La compagnie GSK (GlaxoSmithKline) a abandonné un essai clinique en phase III, qui avait pourtant suscité beaucoup d'espoir pour cette stratégie. L'objectif fixé (améliorer la marche) était trop ambitieux et n'a pas été atteint. Il s'en suivi l'abandon de cet essai clinique. Malgré tout il se poursuit des essais cliniques sur cette stratégie mais en utilisant des oligonucléotides modifiés chimiquement différemment. (Goemans et al. 2011).

Afin d'obtenir une amélioration clinique significative, le taux de réexpression de la dystrophine doit être augmenté, d'autre part, le taux d'oligonucléotides antisens atteignant les cellules devrait lui aussi être augmenté impliquant un éventuel risque de toxicité, rénale entre autre, face à une thérapie qui devrait être administrée à long terme (Hoffman et al. 2011) (Nakamura and Takeda 2009).

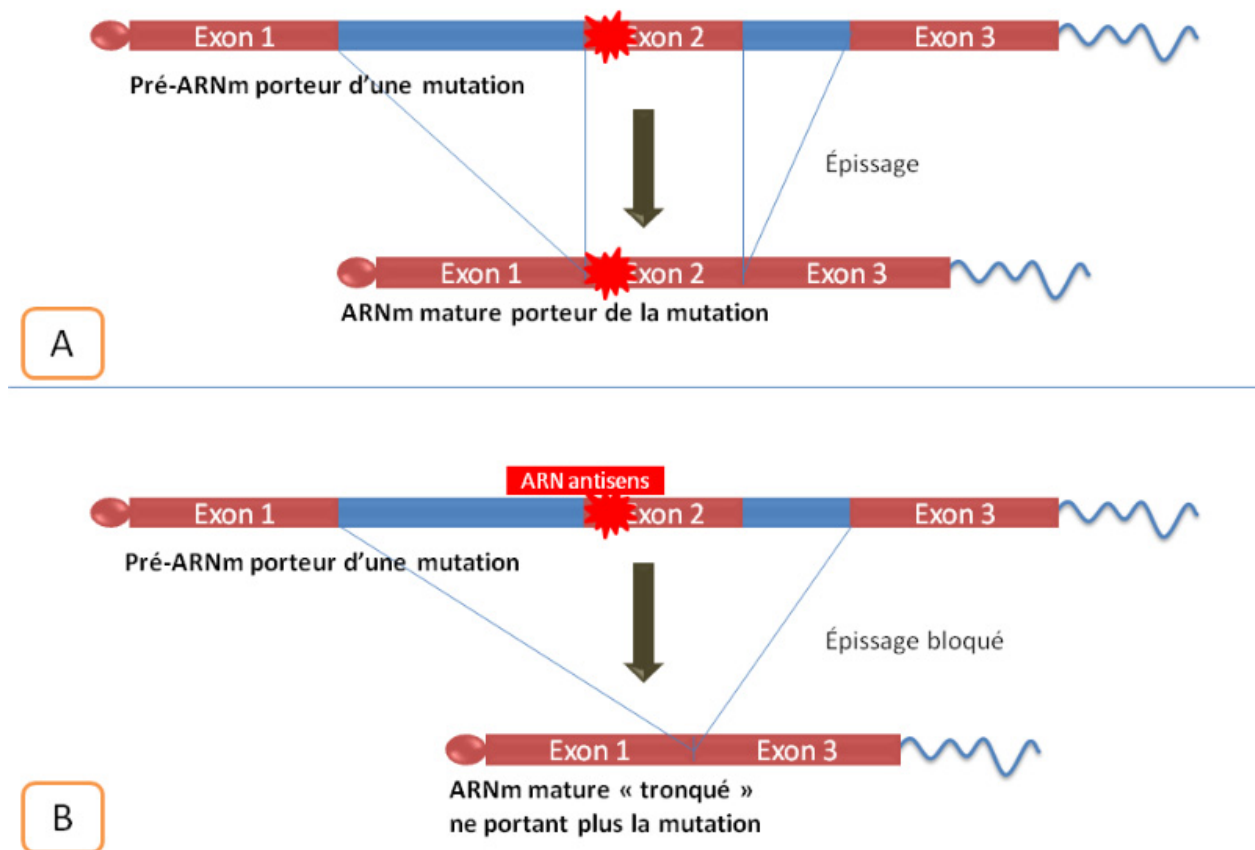


Figure 6 Stratégie du saut d'exon.

Dans ce cas, une mutation de l'exon 2 cause un changement du cadre de lecture (A). Pour rétablir ce cadre de lecture, un oligonucléotide est administré au patient afin de cibler l'ARN pre-messager au niveau de l'exon 2 et ainsi rétablir le cadre de lecture (B). (https://media.licdn.com/mpr/mpr/shrinknp_800_800)

3.3 Thérapie génique et livraison

La thérapie génique consiste à délivrer une copie du gène fonctionnel codant pour la dystrophine dans les cellules musculaires des malades atteints de la DMD, ces cellules vont pouvoir ensuite synthétiser de la dystrophine qui va être exprimée au niveau de la membrane cytoplasmique, et ainsi restaurer tout le complexe glycoprotéique associé. La thérapie reste difficile à appliquer dans le traitement de la DMD pour plusieurs raisons, tel qu'immunologique, le malade pourrait produire des anticorps contre les fibres qui expriment la dystrophine. Le deuxième problème rencontré concerne le fait de livrer dans les noyaux des cellules, un gène d'une taille de 2,4 Mb. De surcroît, le gène doit être délivré dans tous les muscles squelettiques et dans chaque fibre musculaire, lesquelles sont entourées de tissus conjonctifs. Des équipes ont cherché à remédier à ce problème en utilisant la micro et la mini-dystrophine (Scott et al. 2002).

La livraison de gène est un défi majeur en thérapie génique. Différentes méthodes de livraisons sont présentement à notre disposition telle que la livraison des plasmides par transfection des cellules, ou avec des vecteurs viraux pouvant être utilisés *in vitro* et *in vivo*. Les vecteurs viraux sont des outils de prédilection car certains de ces vecteurs sont capables d'infecter des cellules en division ou non. Malgré les succès de certains traitements de la DMD par thérapie génique dans des modèles animaux, les problèmes comme le rejet immunitaire, la courte durée d'expression du transgène et la toxicité doivent être résolus. Le choix de la méthode de livraison impose toujours certaines contraintes, ce qui freine le passage des thérapies vers l'essai clinique

3.3.1 Les vecteurs viraux



3.3.1.1 Adénovirus

Le génome normal du virus est de 36 Kb, ce qui fait que la dystrophine pleine longueur peut entrer facilement dans le vecteur. Avant l'infection, le virus doit reconnaître une protéine de surface nommée "Coxsackie and adenovirus receptor" (Quenneville et al. 2004), l'expression de cette protéine diminue lorsque la fibre musculaire passe au stade mature. Les adénovirus ont l'avantage de pouvoir transduire les cellules en division ou non, tout comme les lentivirus. De plus, une fois la cellule transduite par un adénovirus, l'ADN viral reste sous forme circulaire (épisode) dans le noyau, évitant ainsi d'éventuelle mutation dû à l'insertion. Toutefois les AV induisent une forte immunogénicité *in vivo*, et leur cytopathogénicité reste élevée (Swadling et al. 2016).

3.3.1.2 Rétrovirus : Lentivirus

Le lentivirus est une sous classe dérivée du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Ce virus ne peut pas contenir le gène complet de la dystrophine, puisque la longueur du gène qu'on peut y insérer ne doit pas dépasser 9 kb. Cependant, il présente certains avantages, il est capable d'infecter des cellules même quiescentes et reste ensuite quiescent dans les tissus en post mitose sans causer de réaction immunitaire. Les aspects moléculaires ne sont à ce jour pas totalement identifiés. Cependant on suppose que les lentivirus sont pourvus de signaux de localisation nucléaire (nls pour nuclear localisation signal) et sont donc capables d'un import nucléaire actif, tandis que les oncorétrovirus accèdent à la chromatine de façon passive grâce à la désorganisation de la membrane nucléaire qui se produit lors de la mitose (PHILIPPE 2007). Leur immunogénicité reste très faible. Une réaction immunitaire ciblée contre le vecteur de transfert de gène provoquerait une

chute du taux de transduction des cellules. Il existe néanmoins un inconvénient notable chez les lentivirus : faisant partie de la famille des rétrovirus, son cycle de réplication comprend une phase d'intégration chromosomique, ce qui rend le génome sujet aux mutations insertionnelles.

3.3.1.3 Virus adéno-associés

Les virus adéno-associés (AAV) peuvent infecter des cellules en division ou des cellules quiescentes comme les cellules musculaires, et ils peuvent incorporer le gène de façon stable. Cependant, la longueur maximale du gène qui peut y être inséré est de 4.7kb. L'utilisation des versions de la micro ou de la minidystrophine permet l'introduction du gène dans ce vecteur. Des mini-gènes de la dystrophine de moins de 4,2 kb ont pu être introduits dans le vecteur. Après l'injection intramusculaire du vecteur, les dystrophines tronquées produites sont retrouvées dans la membrane cellulaire des souris mdx. Des vecteurs AAVs recombinants injectés en intramusculaire peuvent donner des taux d'infection très élevés et une capacité à améliorer la pathologie jusqu'à 6 mois après l'administration (Wang, Li, and Xiao 2000).

Il existe plusieurs sérotypes d'AAV, et chaque sérotype possède un tropisme préférentiel d'infection bien que pas exclusif pour un organe ou un type cellulaire. En effet, l'AAV2 infecte de nombreux types cellulaires, mais est beaucoup moins efficace pour des cellules cibles intéressantes en thérapie génique comme le muscle, le foie ou les cellules hématopoïétiques. En revanche, l'AAV8 transduit préférentiellement le foie et le cœur ; l'AAV1 et l'AAV7 le muscle ; l'AAV5 la rétine ; et l'AAV9 et l'AAV10 le cerveau (Figure 7) (Gao et al. 2006) (Thomas 2005). L'équipe de Chamberlain a réussi à faire exprimer de la micro dystrophine dans le myocarde de souris mdx en faisant des injections en intracardiaque du vecteur AAV (Yue and Duan 2003). Liu et al. (Liu et al. 2005) ont démontré que l'expression de la microdystrophine chez les souris mdx en utilisant l'AAV, peut résulter d'une protection du muscle contre les contractions excentriques. Cet effet est significatif suite à l'expression de la dystrophine dans 30% des fibres.

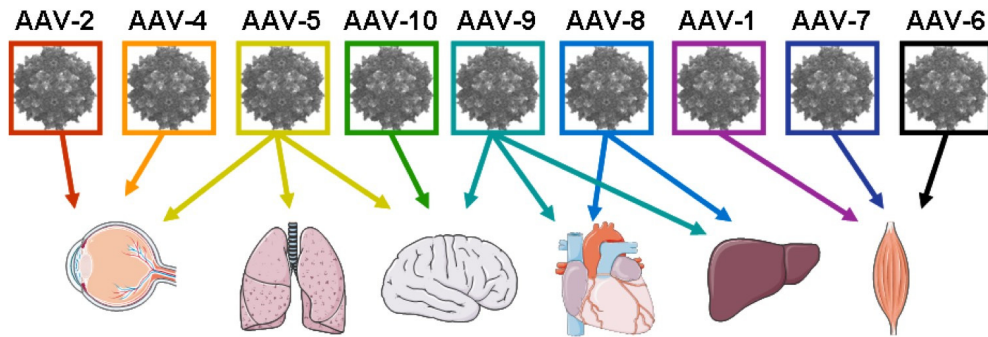


Figure 7 Organes préférentiellement ciblés par les sérotypes d'AAV On constate qu'un même sérotype pourra viser différents organes. Schéma inspiré de Arruda and Xiao, 2007.

3.3.2 Les vecteurs non viraux

3.3.2.1 Livraison des plasmides

L'utilisation des plasmides pour délivrer directement le gène de la dystrophine dans le muscle est une des options. Les plasmides peuvent être injectés directement en intramusculaire, en utilisant des adjuvants comme l'électroporation, les ultrasons, la co-injection d'enzymes comme les hyaluronidases (Rando 2007). Parmi toutes ces méthodes, l'électroporation paraît être la plus efficace, c'est est une technique qui utilise des pulsations électriques dans le but de déstabiliser la membrane cellulaire et causer des micropores dans lesquels l'ADN pourra passer. Cependant, elle entraîne un grand dommage pour le muscle. Les plasmides peuvent également être injectés en intra-artériel ; chez la souris mdx cette technique a donnée 1-5% de fibres dystrophine positives (Zhang et al. 2004). Par contre, l'expression du transgène est d'une durée limitée.

La livraison des plasmides peut se faire par lipofection, cela va impliquer l'utilisation de lipides cationiques (figure 8). Ceux-ci sont constitués de deux parties, une tête polaire chargée positivement et un corps qui lui est hydrophobe. L'ADN quant à lui est chargé négativement, il va donc se former un complexe entre la tête des lipides et l'ADN menant à l'encapsulation de ce dernier. Quand le complexe lipides/ADN arrive au niveau de la membrane cellulaire, le corps non-polaire peut fusionner avec la membrane et ainsi libérer le plasmide à l'intérieur de la cellule.

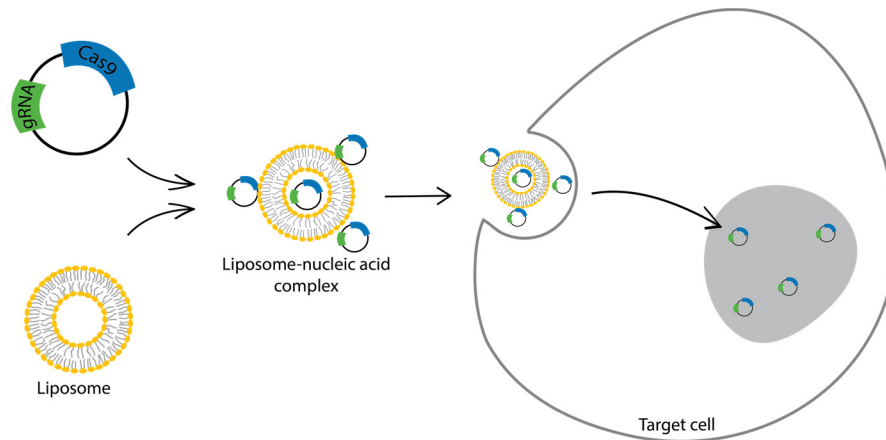


Figure 8 Livraison d'un plasmide par les lipides cationiques

Sur ce schéma, l'ADN est le plasmide codant pour un gRNA et une Cas9, il va se complexer avec le liposome, ce complexe pourra ensuite fusionner avec la membrane cellulaire, et le plasmide entrera dans la cellule.

3.3.2.2 Le chromosome artificiel humain (HAC)

En 2005, Le groupe du Dr Oshimura a effectué des travaux sur une stratégie qui repose sur la synthèse d'un chromosome humain artificiel. Les parties codantes du chromosome sont retirées et on garde les télomères ainsi que le centromère, puis on introduit dans ce chromosome le gène au complet, pas uniquement le cDNA, on retrouve le promoteur, les introns et les exons. L'inconvénient est que c'est une méthode relativement compliquée qui demande à cultiver beaucoup de cellules qui sont isolées afin de trouver laquelle a intégré le chromosome artificiel, et cela est assez complexe pour se rendre jusqu'à l'essai clinique.

Dans le cas du gène de la dystrophine, l'équipe du Dr. Oshimura a inséré une séquence loxP dans la région Xp21.2 du chromosome X humain (hChr.X) normal et par recombinaison homologe facilitée par la Cre, le gène de la dystrophine a été transféré dans le HAC. Ce HAC a ensuite été transféré par une technique appelée 'microcell mediated chromosome transfer' (MMCT) dans des cellules réceptrices hiMSC de souris (Hoshiya et al. 2009) mdx-iPS et DMD-iPS (Kazuki et al. 2010).

3.4 Thérapie cellulaire et greffe de myoblastes

Le principe général de cette thérapie est de transplanter des myoblastes dans les muscles dystrophiques, ces cellules vont pouvoir ensuite fusionner avec les fibres musculaires malades et apporter le noyau contenant une copie fonctionnel du gène de la dystrophine (Partridge 1991). Les myoblastes dérivent des cellules satellites présentes autour d'une fibre musculaire et dont le rôle est de réparer le muscle en cas de dommage. Le but de cette thérapie est de générer des fibres musculaires hybrides formées par la fusion des myoblastes normaux avec la fibre musculaire du patient. Cette fibre hybride va exprimer non seulement de la dystrophine mais contient également des noyaux normaux (Huard et al. 1993).

Plusieurs équipes ont tenté d'appliquer cette méthode dans le traitement de la maladie de Duchenne en faisant initialement des expériences sur les souris mdx. Ainsi, Partridge et ses collaborateurs ont démontré que la transplantation de myoblastes normaux chez les souris mdx conduit à l'expression de la dystrophine au niveau des fibres musculaires (Partridge et al. 1989). Ces chercheurs ont aussi démontré que l'élimination des cellules satellites de l'hôte par l'irradiation permet des meilleurs succès de greffe, puisque les fibres musculaires du receveur sont réparées exclusivement par les myoblastes du donneur (Morgan, Hoffman, and Partridge 1990). Le succès de la greffe a été mesuré, et l'est encore, par le nombre de fibres exprimant de la dystrophine qu'on arrive à identifier par immunohistochimie en utilisant un anticorps contre la dystrophine sur les coupes des muscles greffés.

Les faiblesses de cette stratégie impliquent la faible migration des myoblastes greffés (Torrente et al. 2000). Le rejet immunitaire spécifique des myoblastes allogéniques transplantés (Guérette et al. 1995) ainsi que la mort précoce d'une grande partie des cellules transplantées. En effet, des données de certaines études montrent que 70% à 80% des myoblastes meurent durant les 72 heures qui suivent la greffe (Guerette et al. 1997).

Par la suite, notre laboratoire a réalisé en 2005 un essai clinique de Phase I au cours duquel une greffe de myoblastes provenant d'un donneur sain haplocompatible a été faite chez neuf patients DMD immunosupprimés avec le Tacrolimus (Tremblay et al. 1993). Cet essai clinique a permis de détecter dans les muscles greffés la présence du gène normal de la dystrophine, l'expression de son ARNm et la présence de la protéine dystrophine normale.

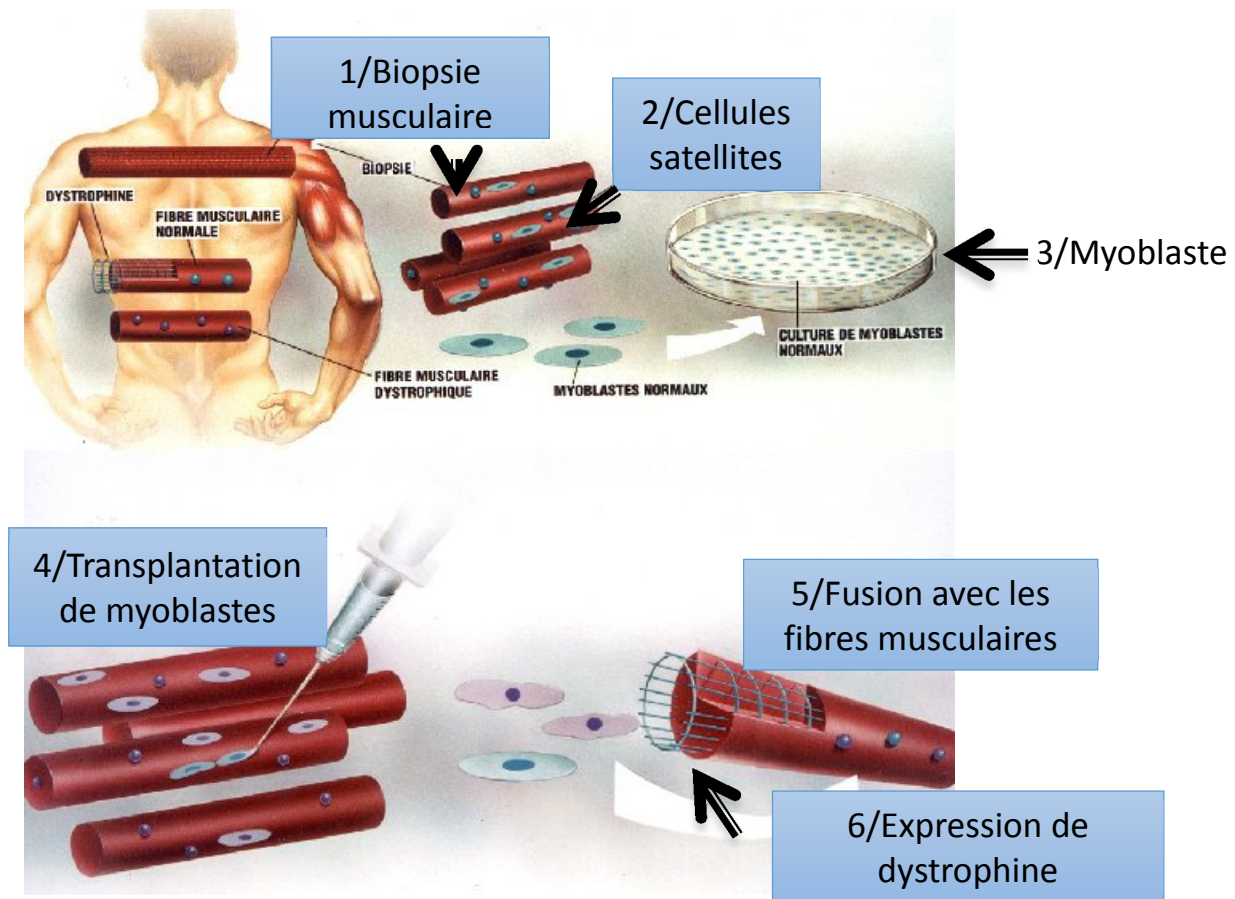


Figure 9 Représentation du principe de la transplantation de myoblastes.

(1) Biopsie musculaire d'un donneur sain (l'un des parents du patient), obtention des fibres musculaires dans le prélèvement. Accolés à ces fibres on retrouve des cellules satellites (2), ce sont des cellules souches capables de se proliférer. Mise en culture de ces cellules satellites, à partir d'une cellule satellite on peut obtenir 20 millions de myoblastes (3) en l'espace de 3 semaines. Dans leur noyau, ces cellules ont le gène normal de la dystrophine, lorsqu'on transplante (4) ces cellules, elles vont fusionner (5) avec les fibres musculaires du patient, et vont introduire noyau possédant le gène normal de la dystrophine (6). Adapté depuis (Labrecque et al. 1991)

3.5 Édition du génome

3.5.1 Méganucléase

Les méganucléases sont des endonucléases qui reconnaissent de larges séquences d'ADN supérieures à 12 pb (14-40 pb) au niveau desquelles elles peuvent générer des coupures double-brin. Les méganucléases agissent sous-forme de monomères (I-SceI) qui clivent des sites nonpalindromiques, ou sous forme d'homo-dimères (I-CreI) qui reconnaissent des séquences

palindromiques ou pseudo-palindromiques (Grizot et al. 2010) (Silva et al. 2011). Plusieurs études menées sur les cellules eucaryotes en culture et sur les modèles animaux (souris, poisson-zèbre) ont démontré que les méganucléases pouvaient générer des coupures double-brin au niveau des séquences-cibles de l'ADN et, par NHEJ ou par recombinaison homologue, modifier l'expression des gènes (Epinat et al. 2003) (Gouble et al. 2006) (Grosse et al. 2011).

Les méganucléases ont prouvé leur efficacité en rétablissant le cadre de lecture de la microdystrophine (Chapdelaine et al. 2010) mais lors des essais sur la protéine complète de la dystrophine, aucune mutation n'a pu être observée (Rousseau et al. 2011).

Mais les méganucléases spécifiques pour une séquence choisie sont difficiles à produire, la technologie manque de précision et il n'est pas évident de cibler les séquences voulues, de plus, des technologies plus simples à synthétiser et plus facile à optimiser sont apparues, tel que les nucléases à doigts de zinc, les TALENs et la technologie CRISPR

3.5.2 Nucléases à doigt de Zinc (Zinc Finger Nucleases (ZFN))

Les nucléases à doigts de zinc (ZFNs) sont des protéines hybrides produites à partir d'un gène chimérique formé par la fusion du gène codant la protéine à doigt de zinc (Zinc Finger Protein, ZFP) (Klug 2010) d'une part et le gène codant la région catalytique de l'enzyme de restriction FokI d'autre part (Kim, Cha, and Chandrasegaran 1996) (Kandavelou and Chandrasegaran 2009). Les ZFP appartiennent à la famille Cys2-His2 des protéines à doigt de zinc. Elles sont constituées de 25 acides aminés dont 10 forment le feuillet β antiparallèle (les acides aminés 1 à 10) et 12 l'hélice α (les acides aminés 12 à 24). Les quatre acides aminés (His 19, His 23, Cys 3 et Cys 6) fixent l'atome de zinc à l'hélice α et au feuillet β respectivement et stabilisent la structure de ZFP (Alberts et al. 2011). L'interaction avec l'ADN se fait au niveau de l'hélice α (Klug 2010). L'enzyme de restriction FokI est une protéine de 587 acides aminés produite par la bactérie *Flavobacterium okeanoikoites*. Elle comprend une extrémité N-terminale se liant à l'ADN et une extrémité C-terminale catalytique (Kim, Li, and Chandrasegaran 1994) (Bitinaite et al. 1998). Les ZFNs agissent sous forme des dimères antiparallèles gauche (G) et droite (D) séparés de 5 à 7 nucléotides lorsqu'elles sont liées à l'ADN (Doyon et al. 2011).

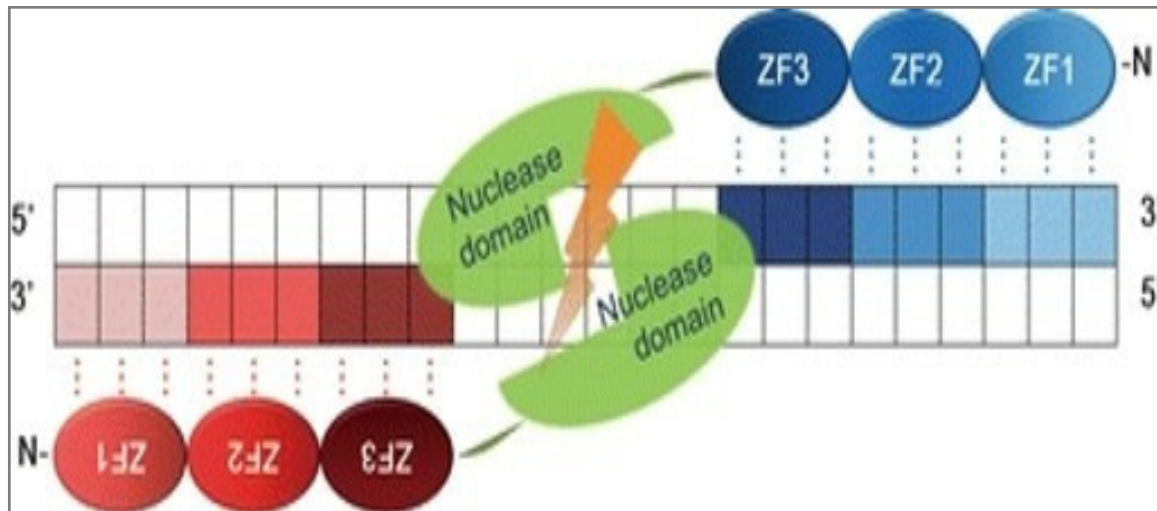


Figure 10 Dimère de ZFNs fixé sur une séquence-cible de l'ADN. (Openi.nlm.nih.gov)

3.5.3 Nucléases effectrices de type activateur de transcription (Transcription activator-like effector nucleases (TALENs))

Les TALEs ont été découverts chez une bactérie pathogène pour les plantes du genre *Xanthomonas*. Celle-ci utilise ces protéines de liaison à l'ADN pour reconnaître une séquence cible dans le noyau d'une cellule hôte et activer la transcription de gènes promouvant l'infection (Cermak et al. 2011; Carroll 2014). Les TALENs ont été générés par la fusion d'un domaine TALE avec le domaine catalytique de l'endonucléase FokI. Cet assemblage permet de produire des coupures double-brins spécifiques à une séquence donnée dans le génome pour stimuler les mécanismes de réparation de l'ADN (Ousterout et al. 2013). Le potentiel de cette technologie se trouve dans le fait que les TALENs pourraient cibler théoriquement n'importe quelle séquence d'ADN (Dupret and Angrand 2014; Joung and Sander 2013).

La figure 11 présente un schéma de la structure des TALENs et de leur mécanisme de liaison à l'ADN. Le domaine TALE est composé de 12 à 27 répétitions d'une séquence conservée d'environ 34 acides aminés dont seuls les 12^e et 13^e varient. Cette paire, que l'on nomme *repeat-variable di-residue* (RVD), est déterminée par le nucléotide cible et permettra la liaison à l'ADN. En effet, les RVDs HD, NI, NG et NN reconnaissent respectivement les nucléotides C, A, T et G (Cermak et al. 2011; Dupret and Angrand 2014; Carroll 2014). Plus récemment, les deux asparagines (NN) ont été remplacées par NH pour une meilleure spécificité (Joung and Sander 2013). Chaque répétition forme une boucle pour exposer les RVDs à l'ADN, permettant ainsi au TALEN de s'enrouler autour du double-brin (Carroll 2014).

Pour cibler une séquence d'ADN et générer une coupure double-brin, il faut deux TALENs qui reconnaissent respectivement la région en aval (brin 5'-3') et en amont (brin 3'-5') de la séquence à couper. Comme le montre la Figure 1b, les deux domaines nucléases doivent se dimériser pour former un complexe actif (Jia et al. 2014). La distance entre les deux séquences de reconnaissance des TALENs peut osciller entre 12 et 30 nucléotides, selon les auteurs, pour maximiser la dimérisation (Carroll 2014; Chen, Shan, and Gao 2014; Dupret and Angrand 2014). La cassure double-brin activera les mécanismes de jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) qui peuvent générer de courtes délétions ou insertions (Chen, Shan, and Gao 2014; Jia et al. 2014). C'est d'ailleurs ce qui a été utilisé pour rétablir le cadre de lecture du gène de la dystrophine dans les cellules de patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne (Ousterout et al. 2013). En effet, l'apparition de mutations dues au NHEJ dans une région non essentielle du gène muté permet la traduction d'une protéine fonctionnelle dans les cellules traitées.

Toujours dans le cadre de la DMD, les TALENs sont au cœur d'une stratégie visant à corriger des myoblastes d'un patient afin de lui ré-injecter ses propres cellules. Les hiPSCs (cellules souches humaines pluripotentes induites) utilisées expérimentalement sont générées à partir de fibroblastes provenant du patient. Ces fibroblastes sont reprogrammés à l'aide des facteurs de transcription tels Oct4, Sox2, KLF4 et l'oncogène c-myc (Yamanaka). La correction génétique s'effectue sur ces hiPSCs avec les TALENs, qui introduisent une coupure près de la séquence d'ADN comprenant un codon « Stop » prématuré pour rétablir le cadre de lecture du gène de la dystrophine. Les hiPSCs corrigés subissent ensuite une transduction avec des gènes viraux pour devenir des « myoblastes corrigés ». En plus d'être efficaces pour une transplantation autologue, les myoblastes corrigés sont capables de fusionner avec les myotubes du patient et d'exprimer une dystrophine fonctionnelle dans le muscle.

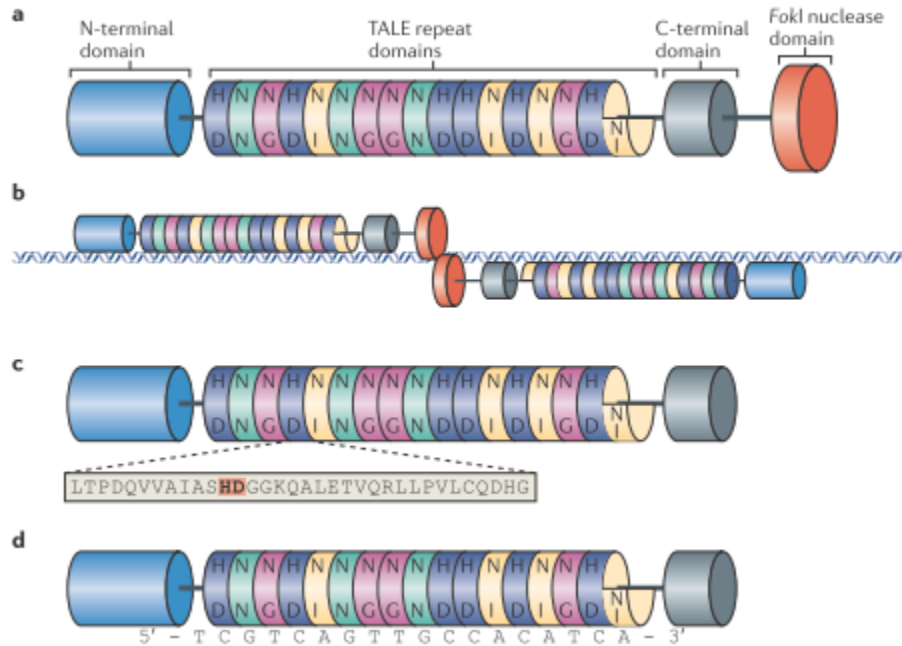


Figure 11 Structure schématisée d'un TALEN et son mode de reconnaissance de l'ADN

(a) Structure tertiaire d'un TALEN. Les RVDs sont assemblés un à la suite de l'autre pour former une hélice qui lie l'ADN. Les domaines amino-terminal et carboxy-terminal sont essentiels à la liaison à l'ADN. (b) Les domaines nucléases doivent se dimériser pour former une cassure double-brin. L'espacement nucléotidique entre les deux TALENs doit se situer autour de 12 à 20 nucléotides. (c) Chaque RVD est constitué d'une séquence conservée variant seulement au niveau des 12^e et 13^e acides aminés responsables de la reconnaissance spécifique d'un nucléotide. (d) Les domaines de répétitions reconnaissent chaque base de la séquence d'ADN cible à laquelle est associé un RVD.

3.5.4 Courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats, CRISPR*) cf **Chapitre 4**

4 Le système CRISPR/Cas9 et ses dérivés

4.1 Définition et mécanisme

Le système CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) est considéré comme une défense immunitaire adaptative utilisée par les bactéries et dont le but consiste à dégrader le matériel génétique provenant d'un bactériophage. Dans le génome bactérien, on y trouve de courts fragments d'ADN exogènes, les protospacers, qui sont insérés et séparés par des séquences répétées. Ces locus contiennent plusieurs gènes Cas (CRISPR-Associated) codants pour des endonucléases qui seront recrutées selon le type de système CRISPR, allant du type I à III. Dans le cadre de l'édition de gène, on s'intéressera plus particulièrement au type II, qui a la particularité de ne recruter qu'une seule endonucléase, la Cas9, qui est capable de faire des cassures double brins. En soit le système est composé de 3 éléments principaux :

- Le crARN (short CRISPR RNA) qui est composé d'un ARN provenant de la transcription de l'ADN sauvegardé dans le locus CRISPR ainsi que d'une partie d'une répétition.
- Le tracrARN (Trans-activating crRNAs) qui est un ARN présentant une complémentarité partielle avec la répétition.

La RNase III va permettre la maturation de ces ARN et former un complexe crARN/tracrARN capable d'interagir avec la Cas9. (Deltcheva et al. 2011)

- Cas9

La protéine Cas9 de 160 KDa est une endonucléase composée de deux lobes distincts.

Un lobe à activité nucléase, qui comprend les domaines RuvC et HNH pour le clivage de l'ADN ainsi qu'un domaine homologue à un domaine topoisomérase II et un domaine C-terminal. Les domaines RuvC vont cliver le brin ciblé, celui qui comporte le PAM alors que les domaines HNH coupent le brin complémentaire au protospacer. (Jinek et al. 2014)

Et un lobe de reconnaissance composé majoritairement d'hélices alpha, qui va interagir avec le motif adjacent de protospacer (PAM), une séquence de 3 nucléotides présente sur l'ADN cible. La structure forme une fente du côté interne assez grande pour permettre la liaison du complexe crARN/tracrARN ainsi que le brin complémentaire de l'ADN ciblé.

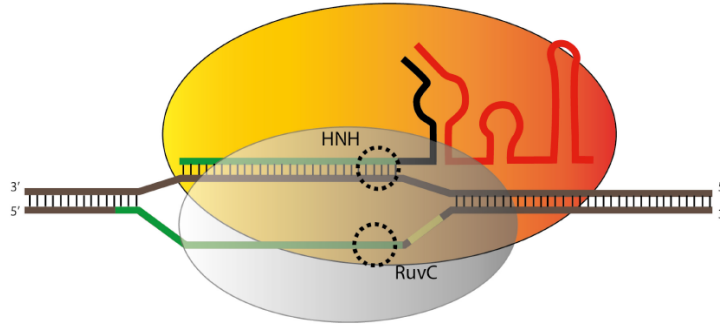


Figure 12 Structure de la protéine Cas9.

Les domaines à activité nucléase sont indiqués par les cercles en pointillés. L'ADN cible et le crRNA sont indiqués en vert. La séquence PAM est représentée en jaune. Le noir et rouge représentent respectivement la répétition et le tracrRNA mature. En gris on retrouve le lobe nucléase et en orange le lobe de reconnaissance.

Lors d'une infection à bactériophage, le matériel génétique de celui-ci est acquis et intégré dans le locus CRISPR (van der Oost et al. 2014) (Hsu, Lander, and Zhang 2014) de la bactérie, cela va générer un fragment spécifique de la séquence utilisée pour la résistance contre une future infection bactériophage. Ces fragments spécifiques d'une séquence sont convertis en crARNs. Le tracrARN, forme un complexe avec le crARN. Des chercheurs ont fusionné le tracrARN et le crARN pour former une seule molécule nommé ARNguide (ARNg). L'ARNg forme un complexe avec la nucléase Cas9 (van der Oost et al. 2014) (Hsu, Lander, and Zhang 2014; Nishimasu et al.). Une fois que l'ARNg se lie à la Cas9, la conformation de cette dernière change et crée un canal permettant la liaison de l'ADN (van der Oost et al. 2014) (Hsu, Lander, and Zhang 2014; Nishimasu et al.). Le complexe Cas9/ARNg va alors chercher sur l'ADN cible, un site PAM (5'-NGG) (Deltcheva et al. 2011; Deveau, Garneau, and Moineau 2010; Jinek et al. 2012), une fois trouvé, le PAM conduit au déroulement de l'ADN, et permet à l'ARNg de vérifier la complémentarité de l'ADN en amont du PAM. La reconnaissance du site PAM est impliquée dans l'activation des domaines HNH et RuvC nucléolytiques de la Cas9, qui entraînent des coupures double brin (DSB) dans l'ADN cible, conduisant à la dégradation de l'ADN (van der Oost et al. 2014; Hsu, Lander, and Zhang 2014; Jinek et al. 2012; Gasiunas et al. 2012). Si l'ARNg n'est pas complémentaire, alors la Cas9 se libère et recherche un autre site PAM (Hsu, Lander, and Zhang 2014). Les ruptures ciblées des brins du génome dans l'ADN peuvent être réparées via la voie de réparation des extrémités de jonction non homologues (NHEJ), qui entraîne des insertions ou des suppressions créant des erreurs, ou par la voie de réparation homologue dirigée (HDR) (Hsu, Lander, and Zhang 2014) (Mali et al. 2013) (Ran, Hsu, Wright, et al. 2013).

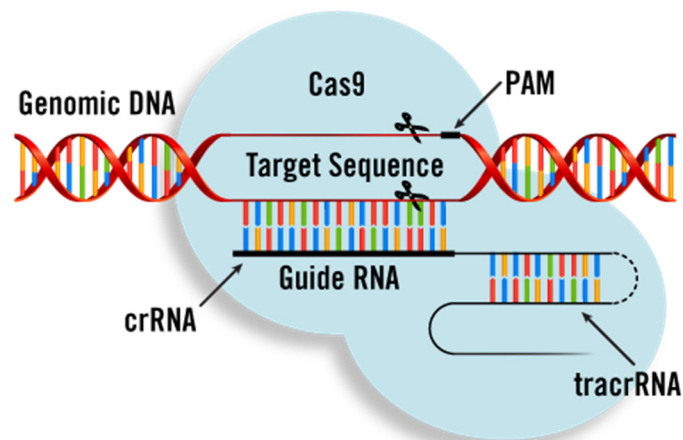


Figure 13 Illustration du système CRISPR/Cas9.

L'endonucléase Cas9 (en bleu) est conduite à l'ADN cible grâce à l'ARN guide, constitué lui-même de deux parties, le crRNA et le tracrRNA. Le crRNA et le tracrRNA ont été fusionnés (trait en pointillé) dans le but de former un unique ARN guide (sgRNA). La reconnaissance de la séquence ciblée par l'ARNg est permise par le protospacer adjacent motif (PAM). La coupure se produit sur les deux brins à 3 nucléotides en amont du PAM. Figure adaptée de <https://www.mirusbio.com/applications/genome-editing-using-crispr-cas>

4.2 Mutation de la Cas9

La mutagenèse dirigée permet l'inactivation des sites actifs de la Cas9 ainsi la protéine pourra être modifiée. Pour Cas9 de *S. pyogenes*, le site de coupure RuvC (coupure du brin proto-espaceur) est inactivé par la mutation aspartate #10 en alanine (D10A) et le site HNH (coupure du brin complémentaire) par la mutation histidine #840 en alanine (H840A) (Jinek et al. 2012). Le fait de pouvoir inactiver les sites séparément ou ensemble permet d'obtenir d'autres types d'édition. Dans le cas où seulement un des sites est inactif, Cas9 coupe seulement un des brins d'ADN (*nickase*) en fonction du site muté (Sapranaukas et al. 2011; Jinek et al. 2012). Les *Cas9-nickases* peuvent être utilisées afin d'augmenter les fréquences des HDR (homology directed reaire) ou les NHEJ (non homologous end joining) dans certaines régions des génomes qui sont plus réfractaires à l'édition (Cong et al. 2013; Mali et al. 2013). Lorsque les deux sites de coupure sont inactifs, on parle de deadCas9, ou deactivatedCas9 (dCas9), cette protéine peut reconnaître et lier la cible sans toutefois pouvoir la couper (Jinek et al. 2012). Ce détournement de la Cas9 a permis de développer plusieurs applications, comme la répression de la transcription par la liaison de dCas9 sur ou près des promoteurs procaryotes et eucaryotes (Bikard et al. 2013; Gilbert et al. 2013; Qi et al. 2013). Par la suite plusieurs applications similaires sont apparues comme la fusion d'activateurs ou de

répresseurs viraux et des modificateurs d'histones (Hsu, Lander, and Zhang 2014; Sander and Joung 2014)

La dCas9 peut être fusionnée à une protéine fluorescente verte (green fluorescent protein, GFP) ce qui favorise les applications d'imageries. Ainsi on a pu localiser *in vivo* des loci dans les génomes (Chen et al. 2013) mais aussi cela fut utilisé pour comprendre le processus de reconnaissance du PAM lors de l'interférence (Sternberg et al. 2014). Enfin, dCas9 a été utilisée pour déterminer les sites hors-cibles (*off-target*) observés avec le complexe Cas9:ARNg et surtout rencontrés dans les plus gros génomes .

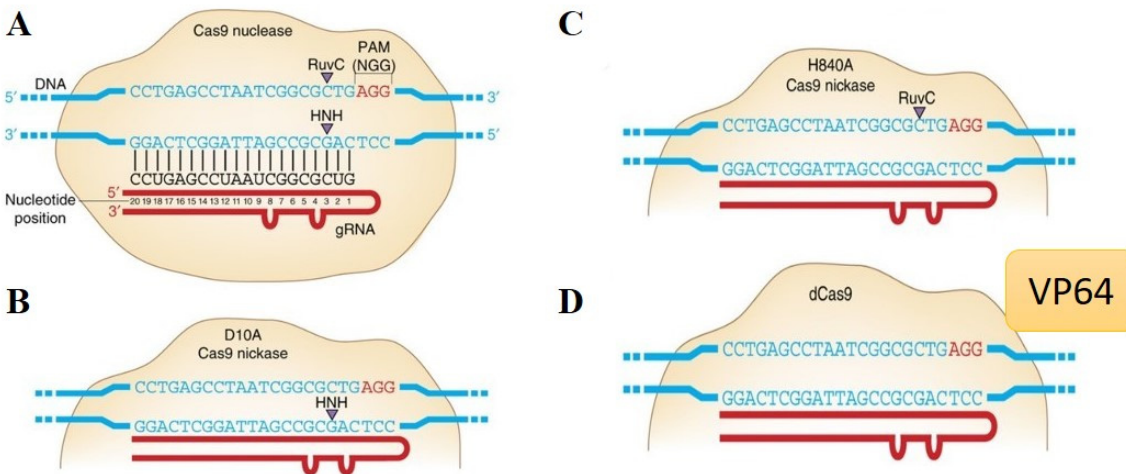


Figure 14 Les différentes utilisations de la Cas9.

(A) La nucléase Cas9 crée des cassures double brin sur la séquence ADN cible, reconnu par l'extrémité 5' de l'ARNg. La Cas9 conserve ses 2 domaines nucléase, RuvC et HNH (pointes de flèche noires). (B) Cas9 nickase, obtenue par la désactivation du domaine nucléase 'RuvC' avec une mutation D10A. Cette nickase clive un seul brin d'ADN, celui qui est complémentaire et reconnu par l'ARNg. (C) Cas9 nickase, obtenue par la désactivation du domaine nucléase 'HNH' avec une mutation H840A. Cette nickase clive seulement le brin d'ADN qui ne réagit pas avec l'ARNg. (D) DeactivatedCas9 ou DeadCas9 (dCas9), est la Cas9 catalytiquement inactive suite aux mutations D10A et H840A. Cette dCas9 peut être recrutée par un ARNg sans cliver le site d'ADN cible, elle peut être fusionnée à un domaine de stimulation de la transcription, tel que VP64. Figure inspirée de : CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes Jeffrey D Sander & J Keith Joung Nature Biotechnology 32,347–355(2014)doi:10.1038/nbt.2842

4.3 Modulation de l'expression des gènes

4.3.1 Répression de gène

Comme démontré ci-dessus il est possible de former une dCas9 dépourvue d'activité nucléase, et de l'utiliser pour diminuer l'expression d'un gène ciblé (Qi et al. 2013). L'attachement de l'ARN guide et de la dCas9 à l'ADN va bloquer l'élongation de l'ARN messenger, ainsi que l'attachement

de l'ARN polymérase et des facteurs de transcription. Il est également possible de fusionner la dCas9 avec un domaine Kruppel-associated suppression box (KRAB) (Gilbert et al. 2013), cela va permettre de modifier la chromatine afin de réprimer l'expression d'un gène plus précisément, le domaine KRAB provoque une inhibition spécifique des ARN polymérases II et III.

4.3.2 Stimulation de gène

Le système CRISPR/Cas9 peut être utilisé pour augmenter l'expression d'un gène en fusionnant la protéine non fonctionnelle dCas9 avec un activateur de la transcription.

Il existe plusieurs de ces domaines d'activation de la transcription ayant démontrés de bons résultats, parmi eux, il y a VP64 (Hu et al. 2014) (Perez-Pinera et al. 2013).

Des résultats encore meilleurs ont été obtenus en fusionnant la dCas9 avec une acétyltransférase afin de modifier les histones, il s'agit du facteur de stimulation P300 (Hilton et al. 2015).

4.3.2.1 VP16

La protéine virale VP16 est une phosphoprotéine structurale et régulatrice de 65 KDa issu de l'herpes simplex virus. VP16 est composé de deux domaines majeurs :

Le domaine «core» au centre de la protéine qui a pour rôle indirect la liaison à l'ADN après interaction avec deux protéines, Oct-1 et HCF. Ce complexe se réunit sur le promoteur du gène ciblé.

Le domaine TAD situé en C-terminal qui a pour rôle de recruter les nombreux facteurs de transcription pour activer le gène, tel que l'ARN polymérase II ainsi que les facteurs responsable de la re-modélisation de la chromatine. Cet activateur peut interagir avec de grands nombres des protéines, tel que la TATA-binding protéine (TBP), TFIIB et le complexe SAGA (Hall and Struhl 2002).

En utilisant la dCas9-VP64 (c'est-à-dire 4 fois VP16) avec un ARN guide ciblant le promoteur d'un gène, l'équipe de Maeder a réussi à augmenter l'expression de plusieurs gènes humains (Maeder et al. 2013). Le groupe de Jaenisch (Cheng et al. 2013), ainsi que celui de Gersbach (Perez-Pinera et al. 2013) ont également montré que l'utilisation de la dCas9-VP64 avec plusieurs ARN guides ciblant le même promoteur permettait d'obtenir un effet synergique sur l'expression d'un gène humain.

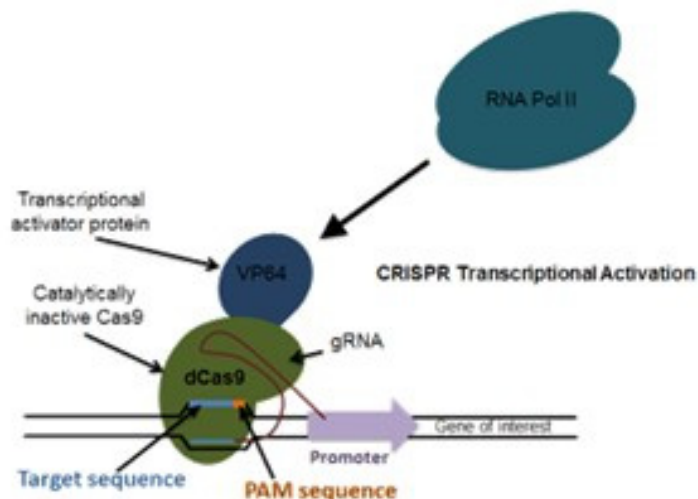


Figure 15 Complexe d'une dCas9 avec VP64.

Une dCas9 va pouvoir se fixer sur le promoteur d'un gène d'intérêt, ainsi VP64 va pouvoir recruter des facteurs de transcription et stimuler la transcription de ce gène. Figure adapté de <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/sb400081r>

4.3.2.2 P300

Le coactivateur transcriptionnelle P300 est une acétyltransférase qui catalyse l'acétylation de l'histone H3 lysine 27, cela implique un remodelage de la chromatine ainsi que l'instabilité du nucléosome. Il joue un rôle primordiale dans la régulation épigénétique en permettant d'activer et de stimuler la transcription des gènes (Ghosh and Varga 2007). Ainsi cette acétyltransférase (P300) peut être fusionnée à une dCas9, le gRNA va conduire la dCas9-P300 sur le promoteur du gène d'intérêt, et ainsi activer la transcription et l'expression du gène. (Hilton et al. 2015) (Hu et al. 2014).

4.4 Les effets hors cibles

L'une des grandes préoccupations autour de l'application du système CRISPR est le potentiel effet hors cible (off target) (Li, Qiu, et al. 2013; Sung et al. 2014). En réalité, l'hybridation entre l'ARN guide et l'ADN cible ne requiert pas une homologie nucléotidique de 100%, dans un contexte de système immunitaire bactérien, c'est un avantage certain qui fait de cette défense, une défense adaptative, permettant de mieux lutter contre les génomes viraux soumis aux variations, mais dans le cadre du détournement de CRISPR au service de la thérapie génique, c'est un problème qui

favorise les effets hors cible. Au fil du temps, la technologie s'est vue optimisée (Tan et al. 2014). Il existe plusieurs moyens de diminuer ces 'off target' mais également de vérifier leur présence :

- Vérifier la présence des effets hors cibles

La bio-informatique a pu donner naissance à des plateformes pouvant confronter les ARN guides dessinés, à des banques génomiques de différentes espèces, dans un but final de déterminer la probabilité de faire des hors cibles, tout en ayant connaissances des gènes susceptibles d'être altérés. Il est ainsi possible de quantifier l'ARNm pour ces gènes ci, afin d'observer ou non, une modulation. Le séquençage de seconde génération ou "séquençage à haut débit" permet d'obtenir toutes les séquences de tous les ARNm à un moment donné. Il est donc possible de confronter deux échantillons, l'un traité avec CRISPR/Cas9 et l'autre non. En revanche, les ARNm que l'on étudie avec le RNA-Seq sont matures et il se peut qu'un gène produise une grande quantité d'ARN, mais que ceux-ci soient rapidement dégradés avant leur maturation. Or, certains de ces ARN peuvent tout de même être réactifs, par exemple comme facteurs de transcription d'autres gènes. Les ARN immatures, peuvent être étudiés à l'aide d'autres technologies, comme le NET-Seq (Churchman and Weissman 2011).

- Choix de la séquence cible et optimisation de la synthèse de l'ARN guide

Le motif PAM de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), est de la forme NGG, ce qui signifie, qu'il y a 1 chance sur 16 de le rencontrer dans une séquence ADN. Cela offre plusieurs choix lors du design de l'ARN guide, mais en prenant certains facteurs en compte, certaines séquences nucléotidiques seront plus pertinentes que d'autres. La longueur des nucléotides complémentaires à la séquence cible est un premier facteur, on va préférer une séquence plus courte, de 18 à 20 nucléotides, plutôt que 24. Fu et al. (Fu et al. 2014) ont constaté que, dans plusieurs cas, des ARN guides légèrement tronqués (17 ou 18 nucléotides), en comparaison de la séquence standard de guidage de 20 nucléotides, présentent une meilleure spécificité. De surcroît, comme l'ont montré Farboud et Meyer, la présence de 2 guanines en amont du motif PAM augmente l'efficacité de la Cas9 (Farboud and Meyer 2015).

- La protéine Cas9

Il existe des Cas9 de provenances bactériennes différentes, par exemple la Cas9 du *Staphylococcus aureus* (SaCas9) (Ran et al. 2015), est une endonucléase capable de clivage double brin mais sa taille est moindre que la Cas9 du *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), ainsi l'espoir de trouver une Cas9 plus petite et avec des spécificités différentes est permis.

Il est possible de modifier la Cas9 comme cela est le cas concernant la eSpCas9 et la SpCas9-HF1, où des modifications d'acides aminés chargés positivement par des acides aminés neutres ont permis de diminuer grandement les effets hors cible (Slaymaker et al. 2015).

Le groupe de Joung (Tsai et al. 2014) a mis au point une nucléase Cas9 désactivée (dCas9) fusionnée avec la nucléase FokI, utilisée pour les protéines à doigts de zinc (ZFN) et les TALEN. L'avantage est qu'elle nécessite la formation d'un dimère pour couper les deux brins de l'ADN. Pour former un tel dimère il est nécessaire d'utiliser, avec la dCas9-FokI, deux ARN guides ciblant des séquences séparées de 13 à 17 nucléotides. Cette modification du système CRISPR/Cas permet de cibler avec précision un gène et réduit grandement les mutations hors cible.

Une autre méthode développée pour rendre le système CRISPR plus spécifique, consiste à muter l'un des deux domaines nucléase de la Cas9, créant ainsi une Cas9 nickase (nCas9) capable d'une coupure simple brin. L'idée est d'utiliser deux Cas9, dirigées par 2 ARN guides différents afin de cibler simultanément une paire de séquences situées à proximité l'une de l'autre sur des brins opposés de la cible. Cette approche qui nécessite deux coupures rapprochées augmente ainsi la spécificité de la méthode (Sung et al. 2014; Li, Teng, et al. 2013; Ran, Hsu, Lin, et al. 2013).

5 La laminine

5.1 La lame basale

La lame basale (LB) est une structure très organisée de la matrice extra cellulaire (MEC), ce sont deux réseaux indépendants qui la compose : celui des collagènes de type IV et celui des laminines, interconnectés entre eux par l'intermédiaire du perlécane et des nidogènes (**Figure 16**). La LB est un feuillet, qui souligne tous les épithéliums, les endothéliums ainsi que les cellules adipeuses, musculaires et nerveuses. Elle joue un rôle de soutien, mais également dans les processus cellulaires, tels que la morphogénèse, la prolifération, la migration, la différenciation, l'adhésion.

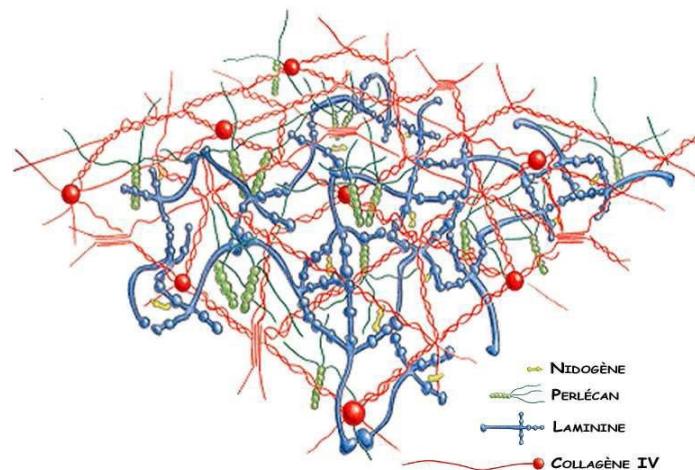


Figure 16 Structure tridimensionnelle de la lame basale avec ses composants majeurs.

Les laminines et les collagènes de type IV sont capables de s'auto-assembler en réseaux indépendants. Les nidogènes et le perlécane associent ces deux réseaux (Adapté de Molecular Biology of the Cell, 4th Edition).

Les molécules composant la LB sont sécrétées par les cellules environnantes. En microscopie électronique à transmission, il est possible de distinguer deux couches : la couche plus sombre, la *lamina densa*, qui confère à la LB une stabilité mécanique, et la couche plus claire, la *lamina lucida*, située à proximité du pôle basal des cellules.

5.2 Les laminines

Les laminines constituent une famille de protéines composée pour le moment de 15 membres (Durbeej 2010). Ce sont des hétérotrimères glycosylés résultant d'un assemblage d'une chaîne α , d'une chaîne β , et d'une chaîne γ . Les 5 chaînes α , 4 chaînes β (uniquement 3 chez la souris) et 3 chaînes γ ont été caractérisées : elles sont codées respectivement par des gènes $Lam\alpha 1$ à 5, $Lam\beta 1$ à 4 et $Lam\gamma 1$ à 3. Les laminines sont présentes dans toutes les LB avec une distribution variable en

trimère. Cela suggère une grande complexité d'interactions et d'assemblages des différentes chaînes.

Les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$ sont les plus exprimées et présentent une distribution quasi ubiquitaire, tandis que les chaînes α ont un profil d'expression plus tissu spécifique, apportant généralement la spécificité au trimère. La nomenclature des laminines est liée à la composition en chaînes, par exemple LM111, se forme de l'association des chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ (**figure 17**). Il n'y a donc pas une LB mais des lames basales qui diffèrent d'un épithélium à l'autre et d'un organe à l'autre suivant leur variation de composition en différentes isoformes de laminines mais également de collagène IV, que ce soit au cours du développement, à l'âge adulte ou dans des conditions pathologiques. Enfin il faut noter que l'importance des laminines au cours du développement est illustrée par les divers phénotypes des souris invalidées pour ces différents gènes souvent létaux ainsi que l'association de mutations de certaines chaînes de laminine avec des pathologies humaines. Ces données sont résumées dans le **tableau 1**

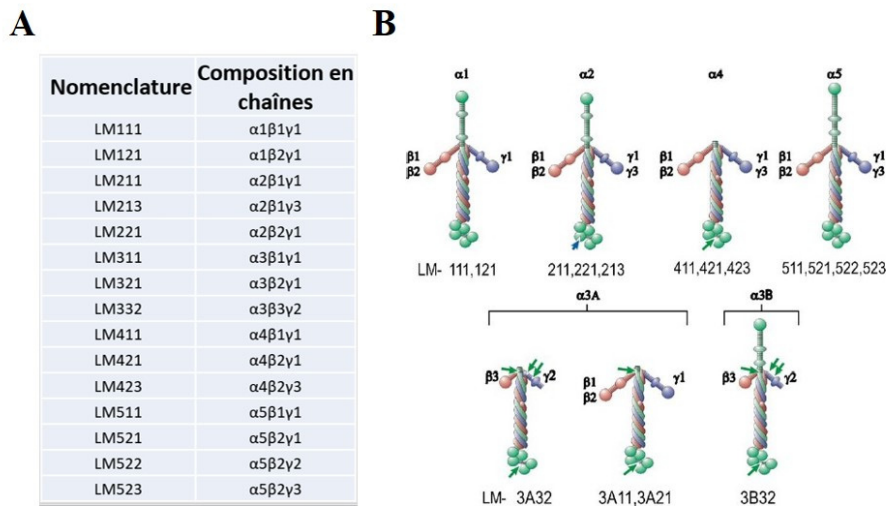


Figure 17 Isoformes et configurations des laminines.

Présentation de 15 isoformes de laminine (**A**) et ainsi que des différentes configurations (**B**) que peuvent adopter les laminines. Les flèches indiquent les sites de clivages connus par des enzymes donnant des fragments libres (flèche verte) ou restant associés à l'isoforme (Aumailley et al., 2005)

Sous-unité de laminine	Distribution tissulaire	Phénotype souris KO	Pathologie humaine associée
$\alpha 1$	embryon, membrane de Reichert, placenta, rein, glandes mammaires, ovaires, utérus, testicules, rétine, intestin, foie, poumons	létalité embryonnaire précoce	désordres cognitifs
$\alpha 2$	trophoblaste, muscles squelettique et cardiaque, nerfs périphériques, intestin, cerveau	létalité à 5 semaines de vie post-natale, dystrophies musculaires	dystrophie musculaire congénitale
$\alpha 3$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	létalité post-natale. Décollement de l'épiderme	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\alpha 4$	muscles squelettiques, muscles lisses, endothéliums, moelle osseuse	altérations des jonctions neuromusculaires : mouvements non coordonnés	cardiomyopathie
$\alpha 5$	reins, poumons, vaisseaux sanguins, moelle osseuse, muscles et nerfs, la plupart des LB sous-épithéliales (intestin, poumon...)	létalité embryonnaire vers E16,5. Défauts de placentation, défauts développementaux des poumons, des reins et de l'intestin. Syndactylie et excécéphalie.	non décrite
$\beta 1$	Ubiquitaire	létalité embryonnaire précoce	non décrite
$\beta 2$	glomérules rénaux, vaisseaux sanguins	létalité post-natale. Défauts d'ultrafiltration rénale et anomalie au niveau des jonctions neuromusculaires, dysplasie rétinienne	syndrome de Pierson
$\beta 3$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	/	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\gamma 1$	Ubiquitaire	létalité embryonnaire précoce	insuffisance ovarienne précoce
$\gamma 2$	peau et la plupart des LB sous-épithéliales	létalité à 5 jours de vie post-natale. Décollement de l'épiderme.	épidermolyse bulleuse jonctionnelle
$\gamma 3$	reins, poumons, appareil génital, nerfs, cerveau, rétine	dysplasie rétinienne	non décrite

Tableau 1 Récapitulatif de la distribution tissulaire des chaînes de laminine ainsi que du phénotype des souris invalidées pour la chaîne d'intérêt et l'implication éventuelle de cette chaîne dans une pathologie humaine (Adapté de Rozario and De Simone, 2010; Yurchenco and Patton, 2009) KO: souris "knock-out"

5.3 La laminine 111

5.3.1 Structure de la laminine 111

La laminine 111 (LM111) est la première laminine qui fut étudiée et isolée à partir de la matrice issue d'une tumeur murine EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) (Timpl et al. 1979). Elle est composée de trois chaînes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 1$ et elle présente une structure en croix, formée de quatre bras: un bras long et trois bras courts. Le bras long est formé par une hélice « coiled-coil » qui permet l'assemblage de trois chaînes (Figure 18). Les trois bras courts de la croix sont représentés par les parties NH₂-terminale des chaînes.

On retrouve différents domaines sur les chaînes de la laminine :

- Le domaine LN, situé dans la partie NH₂-terminale des chaînes α , β et γ , permet l'interaction avec les molécules de laminines voisines afin de former le réseau de polymères. Le domaine LN de la chaîne $\alpha 1$ présente ainsi deux sites de liaison aux intégrines: $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$.
- Le domaine LEa est riche en résidus cystéine et glycine. Il contient des répétitions du domaine EGF-like (Epidermal Growth Factor like motifs) que l'on retrouve comme son nom l'indique dans l'EGF, également dans la plupart molécules de l'ECM, et dans les récepteurs Notch1 à 4, au niveau des ligands de Notch : Dll1 à 4 et Jagged 1 et 2 (Fleming, Purcell, and Artavanis-Tsakonas 1997).
- Le domaine LEB comme le domaine LEa est aussi riche en résidus cystéine et glycine. Ces résidus s'organisent en multiples répétitions rappelant les motifs EGF (EGF-like repeats). Il a été démontré que certains de ces résidus cystéine peuvent former une structure ternaire en se liant au Zn. Pour conséquence le Zn permettrait une meilleure liaison au nidogène-1 et au perlécan lors de l'assemblage de la LB (Ancsin and Kisilevsky 1996).
- Le domaine L4 comprenant L4a et L4b diffère entre les chaînes de laminine. Le domaine L4b est commun aux chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de laminines et porte une séquence, dont la délétion sur la chaîne $\alpha 2$ entraîne des dystrophies musculaires congénitales (Allamand et al. 1997).

Les 5 domaines globulaires, appelés les domaines LG sont situés dans la partie COOH-terminale des chaînes α . Leur rôle est d'interagir avec les récepteurs membranaires comme les intégrines $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha7\beta1$ et encore α -dystroglycan.

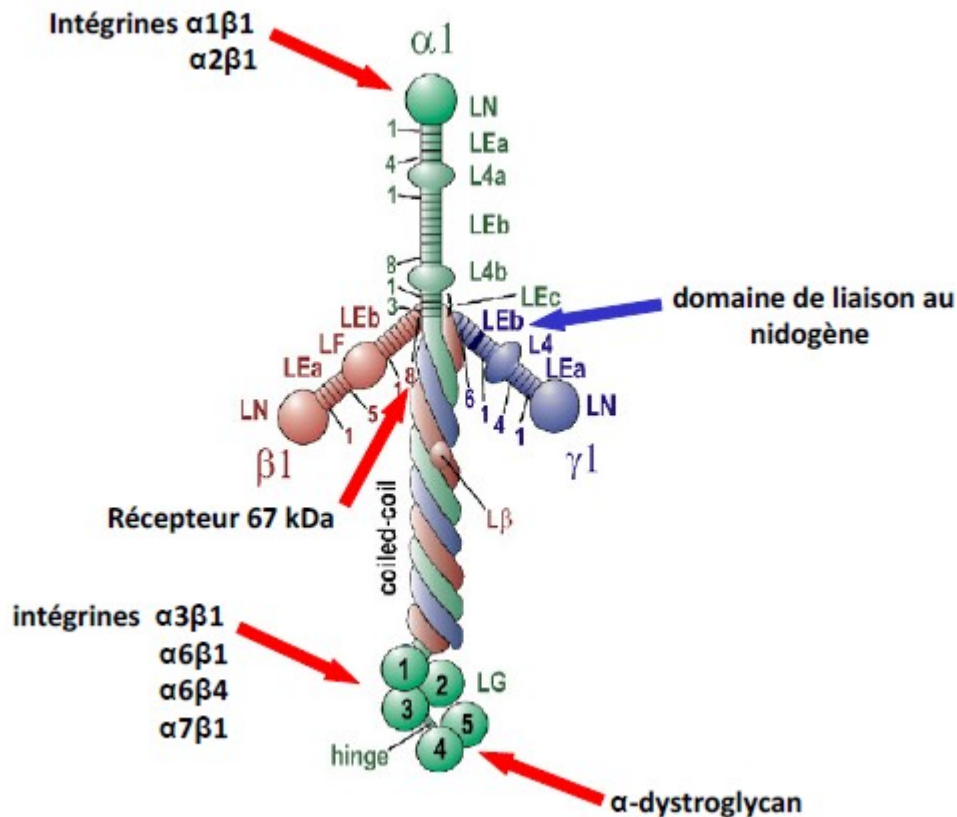


Figure 18 Structure de la LM111.

Les différents domaines sont représentés. Le domaine LLeb, spécifique aux chaînes β (ici $\beta1$) très riche en cystéine et glycine, présente une boucle en dehors de l'hélice. Le domaine LLeb sur la chaîne $\gamma1$, riche en cystéine est le domaine de liaison au nidogène-1 (indiqué par la flèche bleue). Les interactions avec les principaux récepteurs de la chaîne $\alpha1$ sont représentées avec les flèches rouges (Adapté d'Aumailley et al., 2005).

L'expression de la chaîne $\alpha1$ est nécessaire pour permettre la sécrétion du trimère LM111 dans le milieu extracellulaire. Ainsi sécrétées, les molécules de laminines s'associent en polymères en interagissant avec les récepteurs présents à la surface de la cellule et avec les autres composants de la MEC (Yurchenco et al. 1997).

Deux différentes études ont permis de modéliser le processus de polymérisation des laminines. La première étude, réalisée à partir de protéines natives purifiées, a montré que la polymérisation des laminines permet la formation d'un réseau et que l'interaction s'effectue entre domaines LN

d'une chaîne à l'autre selon plusieurs possibilités, telles que $\alpha \leftrightarrow \beta$, $\alpha \leftrightarrow \gamma$ et $\gamma \leftrightarrow \beta$ (Cheng et al. 1997) (Figure 19).

La deuxième étude, réalisée à partir de domaines LN purifiés, a confirmé la possibilité de ces interactions, mais a rajouté également une possibilité d'interaction entre les domaines LN de deux chaînes identiques $\alpha \leftrightarrow \alpha$ mais également entre chaînes α différentes, ce qui augmente la complexité structurelle de la LB (Odenthal et al. 2004).

Interaction des laminines par les domaines LN

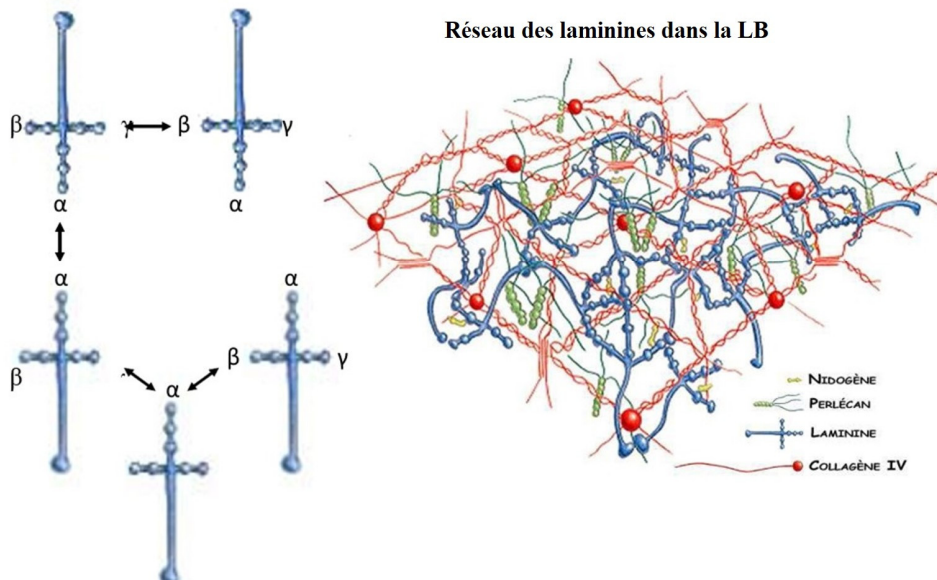


Figure 19 Polymérisation des laminines

Le processus de polymérisation des laminines s'effectue par les interactions des domaines LN (partie NH₂) de type α - α , α - β , α - γ , γ - β des laminines. Ces interactions aboutissent à la formation du réseau de laminines dans la LB (Adapté de Cheng et al., 1997; Odenthal et al., 2004 et de Molecular Biology of the Cell, 4th Edition).

5.3.2 Gène LAMA1

Le gène *LAMA1* humain est localisé sur le chromosome 18p11.3.1. Chez la souris, ce gène se trouve sur le chromosome 17. Certaines régions proximales du promoteur qui assurent la régulation de *LAMA1* sont conservées entre l'homme et la souris et ne contiennent pas de boîtes TATA et CCAAT. Le promoteur du gène *LAMA1* murin possède un motif très riche en résidus GC, permettant la liaison de facteurs de transcription, tels que Sp1 et SP3 (Niimi, Hayashi, and Sekiguchi 2003). Ce motif est crucial pour l'activité transcriptionnelle du promoteur. Cette région inclut également un élément de fixation pour les facteurs Krüppel-like, notamment KLF4 et KLF5 : KLF5 régule le promoteur d'une façon positive, tandis que KLF4 d'une façon négative (Piccinni

et al. 2004). Ces facteurs sont retrouvés également comme régulant le gène *LAMA1* humain (Niimi et al. 2006). D'autres régions régulatrices ont été identifiées dans le gène *LAMA1* murin, notamment une région enhancer située à environ -3300 bp du site d'initiation de la transcription et conférant une spécificité d'expression au niveau endodermique pariétal via la liaison des facteurs Sox7 et Sox17 (Niimi et al. 2004).

5.3.3 Expression de la chaîne $\alpha 1$ de la laminine

La chaîne $\alpha 1$ de laminine (LAMA1) est la première chaîne α exprimée, elle apparaît lors du développement chez la souris, dès le stade 16 cellules (Cooper and MacQueen 1983).

La LAMA1 est très abondante au cours du développement embryonnaire. Pratiquement tous les organes lors de leur développement vont exprimer à un moment donné cette chaîne de laminine (Sasaki et al. 2002). Chez l'adulte, la LAMA1 est exprimée dans quelques organes (le rein, le testicule, l'ovaire, la pie-mère, la prostate, la vessie, la glande mammaire et l'œil), (Falk et al. 1999). Dans certains organes, elle est très peu exprimée, comme par exemple, la base des cryptes de l'intestin grêle et du côlon proximal. Dans les lames basales vasculaires, on trouve abondamment les chaînes $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de laminine, la LAMA1 n'est pas du tout exprimée, excepté au niveau de la LB du parenchyme cérébral entourant les vaisseaux sanguins cérébraux. Cette LB participe à la barrière hémato-encéphalique du cerveau au même titre que la LB sous-endothéliale (Wu et al. 2009)

5.3.3.1 Formation et sécrétion de LM111

Lorsque la chaîne α est exprimée seule, il se trouve qu'elle est sécrétée sous forme de monomère. Concernant les chaînes β et γ , qu'elles soient exprimées seules ou ensembles, elles ne sont pas sécrétées et restent localisées dans la cellule. La chaîne β va former des dimères contrairement à la chaîne γ . Lorsque les deux chaînes ont été exprimées, il va se former un complexe, un dimère $\beta \gamma$. En l'absence de la chaîne β , la chaîne α ne pourra pas permettre à la chaîne γ d'être sécrétée, et en absence de chaîne γ , la chaîne α ne pourra pas permettre à la chaîne β d'être sécrétée. Cependant, si les chaînes β et γ ont été exprimés, les 3 chaînes vont pouvoir former un trimère qui, celui-ci, sera sécrété dans le milieu, accompagnée d'une diminution importante de la dégradation de la chaîne α (Ψυχρηενχο et al. 1997).

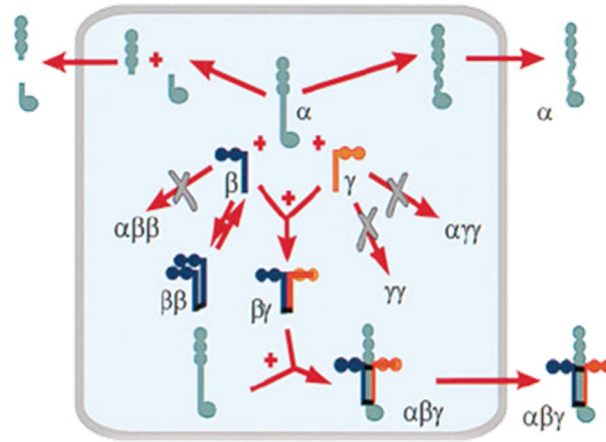


Figure 20 Comportement des différentes sous-unités, et sécrétion. La chaîne α est la seule pouvant être sécrétée seule, les chaînes β et γ auront besoin de former un trimère avec la chaîne α pour pouvoir être sécrétées. Source : Vol. 94, pp. 10189–10194 September 1997 Cell Biology.

5.3.4 Rôles biologiques de la LM111

5.3.4.1 LM111 et la différenciation

C'est par l'intermédiaire d'expériences réalisées en culture cellulaire qu'il a été possible de déceler l'implication de la LM111 dans la différenciation de différents types de cellules. L'utilisation d'un anticorps anti-LM111 en co-culture d'endoderme intestinal sur des fibroblastes entraîne une inhibition de la lactase, qui est un marqueur précoce de la différenciation intestinale (Simo et al. 1992). Les cellules épithéliales mammaires cultivées sur la LM111 subissent également une accélération de la différenciation, attestée par l'induction de l'expression de la protéine du lait, la β -caséine. De même, les cellules neuro-épithéliales de la rétine de poulet lorsqu'elles sont cultivées sur la LM111 se différencient en neurones, tandis que sur la LM211, elles sont conduites à la mort cellulaire (Frade, Martínez-Morales, and Rodríguez-Tébar 1996). Dans la lignée cellulaire intestinale Caco-2, la LM111 est capable de moduler l'expression du facteur de transcription Cdx-2 et d'induire une différenciation fonctionnelle de ces cellules se traduisant par un taux élevé de saccharase-isomaltase, considérée comme un marqueur final de différenciation entérocytaire (Turck et al. 2004). En culture, la LM111 stimule également la différenciation des cellules précurseurs pancréatiques aux cellules β (Jiang et al. 1999). Un phénomène intéressant a été observé, lors d'une expérience de culture de cellules Y79 de rétinoblastome déposées sur la LM111, où ces cellules s'attachent très fortement à la LM111, ce qui crée un environnement favorable à la morphogenèse cellulaire, conduisant à une différenciation avec projection d'axones (Campbell and Chader 1988).

5.3.4.2 LM111 et les fibres musculaires

Les travaux antérieurs dans le laboratoire ont mis en avant les effets bénéfiques de la LM111 chez la souris mdx et également dans un contexte de greffe de myoblastes. En injectant la LM111 humaine à des souris, nous avons pu montrer que cette protéine, augmente la résistance et la force dans les muscles déficients en dystrophine (Goudenege et al. 2010). Les souris mdx et les patients atteints de DMD voient leurs muscles soumis aux lésions induites par la contraction musculaire et cela induit des lésions significatives du sarcolemme. Nos résultats ont confirmé que l'injection en intramusculaire de la protéine laminin111 préserve très clairement le sarcolemme des bris et diminue la dégénérescence des myofibrilles. La laminin111 assure la présence de nouvelles liaisons mécaniques entre la matrice extracellulaire et le sarcolemme. Cela protège le sarcolemme des dommages induits par le stress lors de la contraction musculaire. Ainsi en présence de laminin111, il y a moins de fibres musculaires soumises au cycle dégénérescence / régénération. Par conséquent, il y a plus de fibres musculaires capables de contracter normalement, ce qui explique sans doute l'augmentation de la force que nous avons observée avec la laminin111. Mais ce n'est pas tout, l'injection de LM111 prévient des dommages causés par la transplantation de myoblastes, elle réduit la nécrose et la réponse inflammatoire puis améliore considérablement la migration des myoblastes dans un milieu sans sérum (Goudenege et al. 2010).

5.4 Hypothèse et objectifs

Dans le cadre de notre étude, la stratégie thérapeutique développée consiste à utiliser la technologie CRISPR dont la Cas9 fut mutée afin de perdre son activité nucléase, pour y attacher des facteurs de stimulation de la transcription visant à stimuler le promoteur du gène codant pour la sous unité $\alpha 1$ de la laminine. L'hypothèse de notre étude est que la synthèse de cette sous-unité $\alpha 1$ puisse permettre de former à nouveau le trimère $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ pour restaurer la laminine111, dans le but final de bénéficier des multiples propriétés de cette protéine dans un cadre de dystrophie musculaire de Duchenne.

L'objectif fixé est de rétablir et d'observer l'expression, *in vitro* puis *in vivo*, de la chaîne $\alpha 1$ de la laminine de souris. Pour atteindre cet objectif il faut :

- Identifier des sites à cibler dans le promoteur de Lam $\alpha 1$ pour construire les ARNg.
- Tester l'activité de ces ARNg en les incluant dans un plasmide contenant une Cas9 active.
- Inclure les ARNg efficaces dans un plasmide contenant le gène de la dCas9 fusionné avec un gène codant pour un facteur de stimulation de la transcription (VP160 ou P300).
- Transfecter des myoblastes murins (C2C12) avec ces constructions plasmidiques.
- Étudier la présence de l'ARNm de la chaîne $\alpha 1$ par RT-PCR
- Démontrer la présence de la protéine, laminine chaîne $\alpha 1$, par immunocytochimie et Western blot.
- Électroporer ces plasmides dans des muscles de souris rag/mdx.
- Démontrer la présence de la protéine, sous-unité $\alpha 1$, *in vivo*, par immunohistochimie et Western blot.

6 Increased expression of laminin α 1 chain by dCas9-VP160, a potential treatment of Duchenne Muscular Dystrophy

6.1 Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe recessive X-linked muscular dystrophy characterized by rapid muscle degeneration (Sussman 2002). DMD is due to a mutation of the dystrophin gene, leading to the absence of this protein (Hoffman, Brown, and Kunkel 1987). Dystrophin is thought to strengthen muscle cells by anchoring elements of the internal cytoskeleton (actin) to dystrophin complex present in the membrane (Watkins et al. 1988). β -dystroglycan, one of the dystrophin associated proteins, provides a mechanical link with the extracellular matrix (ECM) (Ervasti and Campbell 1993). This attachment stabilizes the membrane and protects the sarcolemma from the stresses during muscle contraction. In DMD patients, due to the absence of dystrophin, β -dystroglycan is absent from the muscle fiber membrane and the linkage between the contracting apparatus and the extracellular matrix is lost. This causes muscle fiber damage during contraction. The damaged muscle fibers are repaired by the proliferation of muscle specific stem cells, the satellite cells, located in a niche containing laminin and in close contact with the muscle fibers. Although several therapeutic avenues are under investigation, but there is currently no effective DMD treatment (Wagner, Lechtzin, and Judge 2007; Cossu and Sampaolesi 2007; Aurino and Nigro 2006; Welch et al. 2007; Wilton 2007; Wilton and Fletcher 2008).

The laminin family of glycoproteins is a major constituent of the ECM (Belkin and Stepp 2000; Durbeej 2010). The known laminin isoforms are formed by combinations of α , β , and γ chains. The trimeric protein complex binds to other molecules in the ECM and in the cell membrane. Laminins bind to integrin receptors, which are heterodimers composed of α and β subunits. Eighteen α subunits and eight β subunits can assemble in 24 different combinations that have overlapping binding specificity and cell-type-specific expression patterns (Hynes et al. 2002; Hynes 2002b, 2002a; Humphries, Byron, and Humphries 2006). Integrins are involved in mechanical linkage with the various cytoskeletal networks (Barczyk, Carracedo, and Gullberg 2009). The interactions of laminins with their integrin receptors induce modifications in the organization of the cytoskeleton, the phosphorylation of signaling proteins and activate signaling pathways (Chen and O'Connor 2005; Linton, Martin, and Reichardt 2007; Tzu and Marinkovich

2008; Yee, Weaver, and Hammer 2008; Legate et al. 2006; Millward-Sadler and Salter 2004; Zhu et al. 2007). The laminin/integrin interactions influence cell survival, proliferation, differentiation, adhesion and migration. Laminin $\alpha1\beta1\gamma1$ (Laminin-111) is the most widely studied isoform, it is expressed during embryonic development but absent in adult skeletal muscles, which however still express the $\beta1$ and the $\gamma1$ laminin chains. Laminin-111 binds to integrins $\alpha6\beta1$ and $\alpha7\beta1$ (Nishiuchi et al. 2006). The Burkin's group (Rooney et al. 2009; Rooney, Gурpur, and Burkin 2009; Rooney et al. 2006) showed that intramuscular (i.m.) injection of Lam111 protein complex into the mdx mouse model of DMD (Hoffman, Brown, and Kunkel 1987) increased expression of integrin $\alpha7\beta1$, stabilized the sarcolemma, restored serum creatine kinase to wild-type levels, and protected muscle from exercised-induced damages. Our research group has shown that i.m. injections of mouse Laminin-111 protected the mdx muscles during eccentric contractions and significantly increased the strength (Goudenege et al.) independently confirming the results published by Burkin's group (Rooney, Gурpur, and Burkin 2009). Laminin-111 makes links between the extra-cellular matrix and the integrin $\alpha7\beta1$ in the muscle fibers thus replacing in embryonic dystrophic muscles the links between the matrix and the membrane normally insured by the dystrophin complex. It is not clear whether the beneficial effects of Laminin-111 are due to the up-regulation of the integrin $\alpha7\beta1$ receptors and the consequent changes of intracellular signaling or to the new physical links between the Laminin-111 in the extra-cellular matrix and the integrin $\alpha7\beta1$ receptors in the muscle fiber membrane. Indeed, it has previously been shown that the absence of integrin $\alpha7$ in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to DMD (Guo et al. 2006). These results suggested that Laminin-111 is a potential therapeutic agent for DMD.

The normal embryonic muscle fiber membrane is thus attached to the ECM by two important protein complexes: the dystrophin complex (via β -dystroglycan) and the Laminin-111 complex (via integrin $\alpha7\beta1$ receptor). Since LAMA1 is expressed only during embryonic development, the links are insured only by the dystrophin complex in the normal adult muscles but are completely absent in the dystrophinopathies.

To be applicable to DMD patients, the positive results obtained in mdx require the GMP production of Laminin-111 protein and repeated administrations. Although the LAMA1 gene is expressed only during embryogenesis, the $\beta1$ and the $\gamma1$ chains are still expressed by adult human muscle fibers. Thus the production and injection of only LAMA1 would be sufficient but the GMP production of this large protein is difficult and repeated administration would be expensive. Thus

in the present project, we have developed an alternative to the repeated LAMA1 protein administration by inducing the expression of the endogenous LAMA1 gene. This was done by targeting the LAMA1 promoter with the new CRISPR technology, i.e., one or several gRNAs and a non-functional Cas9 (i.e., dCas9) coupled with the VP160 transcription activation domain. Large induction of LAMA1 expression was obtained *in vitro* in cultured mouse myoblasts and *in vivo* in mdx mouse muscles.

6.2 Materials and Methods

6.2.1 Expression vector

The plasmid px330-U6-Chimeric-HsPCas9 (Addgene plasmid # 42230) was used for expression of the gRNA and of Cas9. It contains two BbsI restriction sites for insertion of an oligonucleotide, which selects the target sequence of the gRNA. This gRNA is under the control of the U6 promoter. The plasmid pAC154-dual-dCas9-VP160-sgExpression (Addgene plasmid # 48240) was used for expression of the gRNA and dCas9-VP160. It contains two BbsI restriction sites for insertion of an oligonucleotide, which selects the target sequence of the gRNA. This gRNA is under the control of the U6 promoter. This plasmid was modified to include a gene encoding resistance to puromycin, the latter is separated from the gene encoding dCas9 via a sequence coding for the 2A peptide. There is a nuclear localization sequence (NLS) fused with the dCas9-VP160 gene.

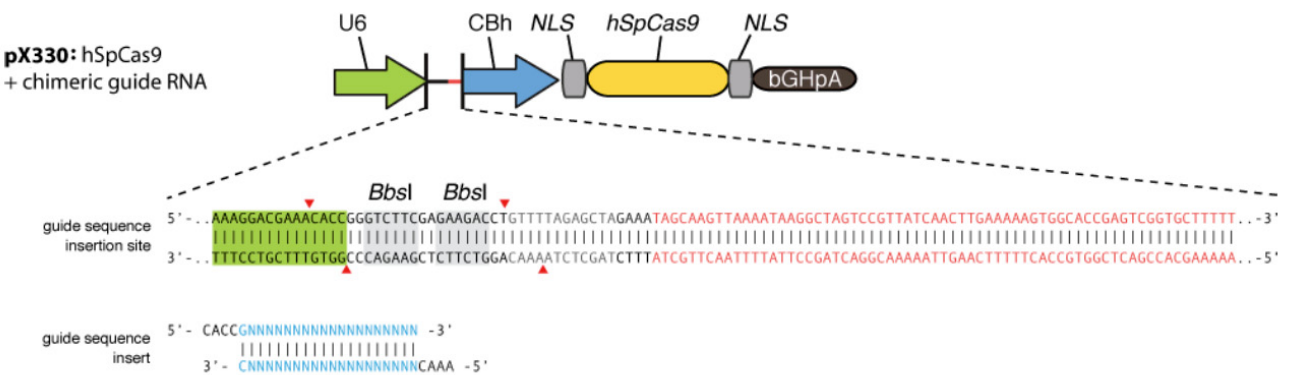


Figure 21 Schema of cloning vector pX330 with oligo design for inserting guide sequences. The pX330 vectors contains dual-expression cassettes for both the SaCas9 protein and the sgRNA. Digestion of the backbone with the restriction enzyme BbsI generates the complementary cloning overhangs to the annealed oligos. Note that a G–C base pair is added at the 5' end of the guide sequence for optimal U6 transcription. The oligos contain overhangs for ligation into the overhangs of Bbs I sites. The top and bottom

strand orientations are exactly identical to those of the genomic target but exclude the “NGG” PAM. Parts of this figure are adapted from Addgene (<https://www.addgene.org/42230/>)

6.2.2 Construction and oligonucleotides synthesis

The 20 nucleotide sequences, which will be targeted by the guide RNAs (gRNAs) in the LAMA1 promoter, were identified through the Leiden Muscular Dystrophy Pages Web Site (<http://www.dmd.nl/seqs/murefDMD.html>) (GenBank NM004006.1). Sequence analysis of LAMA1 promoter permitted to identify the Protospacer Adjacent Motif (PAM) in the sense and antisense strands. These PAMs are NGG for Cas9 of *Streptococcus pyogenes*. Oligonucleotides to target these sequences were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) to produce 7 ARNs targeting the mouse LAMA1 promoter.

6.2.3 Phosphorylation, formation of double-stranded oligonucleotides and ligation

Lyophilized oligonucleotides were obtained from IDT diluted in double distilled water to a final concentration of 1 µg/µl. The oligonucleotides were then phosphorylated using T4 PolyNucleotid Kinase (NEB, Ipswich, MA). The double-stranded oligonucleotide formation was carried out by rising the temperature from 37°C to 95°C during 5 min, followed by a progressive temperature reduction of 5 degrees every 30 sec until reaching 25°C. The PAC154-2A-puro plasmid was cut with BbsI (NEB, Ipswich, MA) and purified by gel extraction (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). A double-stranded oligonucleotide diluted 1 to 200 (5 ng of oligonucleotide) in double-distilled water was added to the purified pAC154 plasmid. The ligation was done with the Quickligase (NEB, Ipswich, MA) during incubation at 25°C for 25 min.

6.2.4 Transformation of competent bacteria

For transformation of DH5α competent bacteria (Invitrogen, Grand Island, NY), 50 ng of PAC154-2A-puro plasmid DNA were used, followed by a heat shock at 42°C for 45 seconds. The DH5α bacteria were then cultivated on LB agar (Lysogeny broth) medium with ampicillin. The second day, colonies were picked and inoculated in LB broth containing ampicillin. Plasmid DNA was extracted on the third day with the Miniprep Kit (Thermo Scientific, Inc, Lithuania) and assayed using a Nanodrop (Thermo Scientific, Logan, UT).

6.2.5 Transfection of Px330 plasmids in C2C12 myoblasts

To check the activity of each gRNA, Px330 plasmids encoding each gRNA were transfected in C2C12 murine myoblasts. The C2C12 cell line was grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Invitrogen, Grand Island, NY) containing 10% FBS (Fetal bovine serum) and antibiotics (penicillin / streptomycin). The 6-well plates containing 300000 cells per well (about 70-80% confluent) were transfected using 4 µg of plasmid DNA and 2 µl of Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) previously diluted in Opti-Mem (Invitrogen, Grand Island, NY). The plates were incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 48 hours. The successful transfection was evaluated by the cell survival after puromycin selection (2 µg/mL). 48 hours after transfection, the genomic DNA was extracted from the C2C12 cells with the phenol-chloroform method. LAMA1 promoter was amplified by PCR with the thermal cycler C1000 Touch BIO RAD (Hercules, CA). The amplification program was the following: 98°C for 1 min, 98°C for 10 sec, 58°C for 20 sec, 72°C for 1 min and 72°C for 5 min for a total of 35 cycles.

6.2.6 Transfection of plasmid PAC154 VP160 in murine C2C12 myoblasts and extraction of cells for mRNA and protein analysis

Pac154-2A-puro plasmids encoding each gRNA were transfected in mouse C2C12 myoblasts with the same procedure as for the Px330 plasmids. The plates were incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 48 hr. The transfection success was evaluated by cell survival after puromycin selection (2 µg/mL). Enrichment of transfected cells was performed during 15 days after transfection to have sufficient cell RNA to perform the RT-PCR. Cells were transfected with a plasmid PAC154-2A-puro not encoding any gRNA to obtain a negative control that has undergone the same stress as the treated cells. To extract the RNA, the cells were centrifuged to form a dry pellet, which was sent to the sequencing platform RT-PCR. For protein analysis, transfected cells were lysed directly in the well with 200 µl of lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM dithiothreitol [DTT], 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride [PMSF], 1% Sodium dodecyl sulfate [SDS]).

6.2.7 Surveyor enzyme test on PCR products

DNA was extracted from cells 48 hours after transfection and the LAMA1 promoter was PCR amplified. The amplicons were isolated, heated at 95°C to denature the DNA and slowly cooled at RT in the Bio-Rad thermocycler (Bio-Rad inc., Hercules, CA). to permit the re-annealing of the single stranded DNA chains. If the SpCas9/ gRNA complex had induced INDELS, miss-matched DNA double strands were formed. The re-annealed amplicons were then digested with the Surveyor/Cel1 enzyme (Integrated DNA Technologies inc., Coralville, IA) in a water bath at 37°C for one hr. This enzyme cuts miss-matched DNA strands. The digestion products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel in 1X TBE (Tris borate EDTA) at 100 V for 40 min.

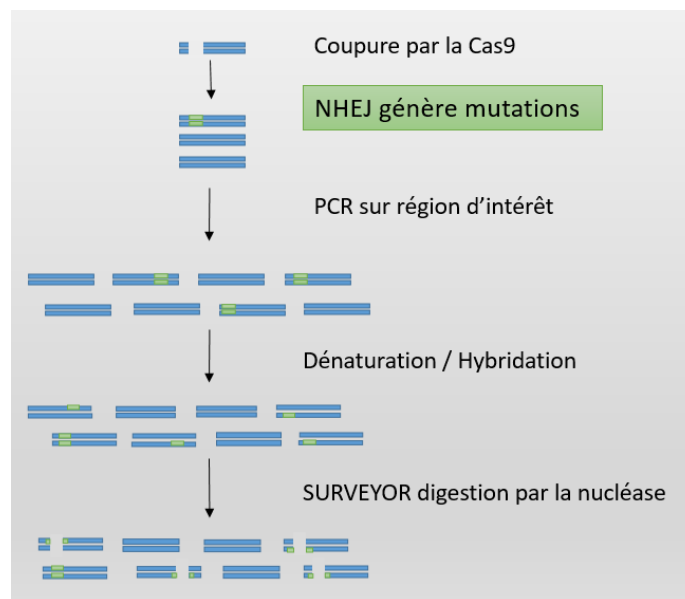


Figure 22 Surveyor enzyme test: After amplification of LAMA1 promoter, gene synthesis products are heat denatured and then slowly cooled down to form hetero-duplexes containing mismatches at the error sites. These hetero-duplexes are cleaved by the Surveyor nuclease at the sites flanking the mismatch bulges. Fragments are detected after the migration of this product on an agarose gel.

6.2.8 Sequencing

To verify that the oligonucleotides have been properly inserted into the plasmid px330-U6-Chimeric-HsPCas9 (plasmid Addgene # 42230) and plasmid PAC154-2A-PURO, these constructions were sent for Sanger sequencing to the Sequencing and Genotyping Platform Genomes CHUL / CHUQ using a common forward primer since both plasmids have the same backbone. The sequencing results were analyzed by the BLAST platform.

6.2.9 Plasmid electroporation in Rag/mdx mouse muscles

The Rag/mdx mice were housed in the animal facility of the Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec (CRCHUQ), in accordance with the ethics committee of the institution. They originated from a cross between mdx mice and immunodeficient Rag mice from the Jackson Laboratory. The Tibialis anterior (TA) muscles of Rag/mdx mice were surgically exposed and injected with 40 μ L of Tyrode saline containing 40 μ g PAC154 plasmids coding for dCas9-VP160 and either for gRNA3 or gRNA4. One muscle was injected with 40 μ g mixture of these two plasmids (20 μ g of each plasmid) and one control muscle was injected only with saline. The muscle was then electroporated using the ECM 830 Electro Square Porator (BTX Harvard apparatus inc., Holliston, MA) and the following parameters: 100V/cm muscle, 8 pulsations of 20 ms, and interval 1 sec. Two mice were used for each experimental condition. One mouse of each pair was sacrificed after 2 weeks and the other after 3 weeks.

6.2.10 RT PCR

Cells were homogenized in Qiazol buffer (Qiagen, Germantown, MD) and total RNA was extracted using the RNeasy microkit on-column DNase (Qiagen inc., Hilden, DE) treatment following the manufacturer's instructions. Total RNA was measured using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies inc., Wilmington, DE) and the RNA quality was analyzed on an Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies inc., Santa Clara, CA). First-strand cDNA was synthesized 2 μ g of RNA in a reaction containing 200 U of Superscript III Rnase H-RT (Invitrogen Life Technologies inc., Burlington, ON, Canada), 300 ng of oligo-dT18, 50 ng of random hexamers, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 500 μ M deoxynucleotides triphosphate, 5 mM dithiothreitol, and 40 U of Protector RNase inhibitor (Roche Diagnostics inc., Indianapolis, IN) in a final volume of 50 μ L. This mixture was incubated at 25°C for 10 min and at 50°C for 1 hr. A PCR purification kit (Qiagen inc., Hilden, DE) was used to purify cDNA. The primer pairs were designed using the GeneTool 2.0 software (Biotools Inc, Edmonton, AB, Canada) and their specificity was verified with a blast in the GenBank database. The primers were synthesized by IDT (Integrated DNA Technology inc., Coralville, IA) (Table 2). cDNA corresponding to 20 ng of total RNA was used to perform fluorescent-based Real Time PCR quantification using the LightCycler 480 (Roche Diagnostics inc., Mannheim, DE). The

LightCycler 480 SYBRGreen I Master mix (Roche Diagnostics inc., Indianapolis, IN) was used as described by the manufacturer. The conditions for PCR reactions were: 45 cycles, DMSO 2% denaturation at 95°C for 10 sec, annealing at 60°C for 10 sec, elongation and reading at 72°C for 14 sec. A melting curve was performed to assess non-specific signal. Calculation of the number of copies of each mRNA was performed according to Luu-The et al. (Luu-The et al. 2005) using second derivative method and a standard curve of a crossing point (Cp) value versus logarithm of the quantity. The standard curve was established using known amounts of purified PCR products (10, 102, 103, 104, 105 and 106 copies) and a LightCycler 480 v1.5 program provided by the manufacturer (Roche Diagnostics inc., Mannheim, DE). PCR amplification efficiency was verified. Normalization was performed using reference genes shown to have stable expression levels from embryonic life through adulthood in various tissues: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Quantitative Real-Time PCR measurements were performed by the CHU de Québec Research Center (CHUL) Gene Expression Platform, Quebec, Canada and were compliant with MIQE guidelines.

Table 2 : Sequence primers and gene description

Gene Symbol	Description	GenBank	size (pb)	Primer sequence 5'→3' S/AS
LAMA1	Mus musculus laminin, alpha 1 (Lama1)	NM_008480	95	TTCCCAGAGGTCTCCATCAATAAC /GCGCTTGCTTCCTTTACTACTCAG
Hprt1	Mus musculus hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	NM_013556	106	CAGGACTGAAAGACTTGCTCGAG AT/ CAGCAGGTCAGCAAAGAACTTAT AGC
GAPDH	Mus musculus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_008084	194	GGCTGCCCAGAACATCATCCCT/ ATGCCTGCTTCACCACCTTCTTG
ADNg Ctrl	Mus musculus chromosome 3 genomic contig, strain C57BL/6J (HSD3B1 intron)	NT_039239	209	CACCCCTTAAGAGACCCATGTT/ CCCTGCAGAGACCTTAGAAAAC
Promotor Lamα1	Mus musculus laminin, alpha 1 (Lama1) gRNA promotor	/	1261	GTTAAGGACCTGTGCTTAGAGA/ TCACCTGCTTTCTAGCTTAGTG
Promotor Lamα1	Mus musculus laminin, alpha 1 (Lama1) gRNA promotor	/	1602	GCATTACTGAGCCACAGTGGATT/ ACCTTGAGATCCAGGAGTACAGT

6.2.11 Immunocytochemistry on C2C12 transfected or not with puro pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression

C2C12 cells were transfected in a 24 well plate (50000 cells per well) with the pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression (Addgene plasmid #48240) coding for dCas9-VP160 and one gRNA. After puromycin selection and enrichment, cells were rinsed with Hank's Balanced Salts solution (HBSS; Gibco inc.). 500 μ L of 95% ethanol were added during 10 min at RT to fix the cells. Ethanol was removed and each well was washed with 1 ml PBS for 10 min at RT with stirring. The sites of non-specific interactions were then blocked with 1 ml of blocking solution (10% goat serum, Gibco) in PBS for 1 hr at RT with stirring. A mouse mAb against LAMA1 (MAB4656, R&D system inc.) was added to each well at a final concentration of 15 μ g/mL overnight at 4°C. The antibody was diluted in 1% goat serum and 100 μ l was added to each well. The next day, three 10 min washes with stirring using 1 ml of PBS were done to remove the excess antibody. Thereafter, 10 μ g/mL of secondary antibody were used for one hour at RT, i.e., a goat antibody against rat immunoglobulin G (IgG) coupled with Alexa Fluor 456®, (Molecular Probes) diluted 1: 200 in PBS containing 1% goat serum. Two other 10 min PBS washes were then done with stirring for at RT. During the third wash, Hoechst 33258 (Sigma Aldrich) was added to PBS (1: 10,000) for nuclear staining.

6.2.12 Detection of LAMA1 by immunohistochemistry

2 or 3 weeks after electroporation, the mice were anesthetized with isoflurane and euthanized by cervical dislocation. The muscles were dissected out and embedded in Cryomatrix Shandon (Thermo Electron inc., Ottawa, ON, Canada) and frozen in liquid nitrogen. 12 μ m transverse cryo-sections were placed on gelatinized slides and stored at -20 °C. The sections were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min, washed with 1X PBS for 5 min and permeabilized 10 min with PBS containing 0.15% Triton X100. Non-specific interactions were blocked with PBS 10% fetal bovine serum (Gibco inc.) for 1 hr at room temperature with slow stirring. The sections were incubated overnight at 4°C with a mouse mAb against LAMA1 (MAB4656, R&D System inc., Minneapolis, MN) at a concentration of 20 μ g/ml diluted in the blocking solution. The sections were washed, 3 times with 1X PBS for 5 min. and incubated in the dark during 1 hr with secondary antibody

coupled with Alexa Fluor 456® (Molecular Probes inc., Waltham, MA) at a concentration of 10 µg/ml. The sections were washed with PBS 3 times and covered with PBS / Glycerol 50/50 solution and a coverslip for fluorescence microscopy observation.

6.2.13 Western Blot

After 15 - 20 days under puromycin selection, the transfected cells were lysed with 200 µl of lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM dithiothreitol [DTT], 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride [PMSF], Sodium dodecyl sulfate 1% [SDS]). 600 µl of cold methanol were added to 200 µl of cell lysate. 200 µl of chloroform and 500 µl of distilled water were also added to the mixture. This solution was stirred with a vortex before centrifugation during 3 minutes at 13000 revolutions per min (rpm). The upper and lower phases were removed and 800 µl of methanol were added to wash the proteins again. The mixture was stirred with a vortex and centrifuged again for 5 min. The supernatant was completely removed and the protein pellet was concentrated for 10 min using the Savant Speed Vac Concentrator (Thermo Scientific, Waltham, MA). These concentrated proteins were then resuspended in 50 µl of loading buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 10% glycerol). Proteins were subsequently dosed by the colorimetric method bicinchoninic acid (BCA; Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. Thereafter, 1% 2-mercaptoethanol and 0.025% bromophenol blue were added to the protein solution. The proteins were then boiled for 5 min, placed on ice for 2 min before centrifugation at 13200 rpm for 3 min. 15 µg of each protein solution was placed on SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, gel concentration of 4% and 6% separation gel). Migration at 70 V for 15 min and 100 V for 150 min, was carried out in running buffer (50 mM Tris, 0.2 M glycine and 0.1% SDS). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) at 20 V at 4°C overnight using a transfer buffer (50 mM Tris, 0.2 M Glycine, 0.1% SDS and 20% methanol). This was subsequently incubated 1 hr at RT in a blocking solution (0.1% phosphate buffer solution (PBS), 0.05% Tween20 (Lab Mat, Quebec, CA), and 5% skimmed milk powder) to block non-specific interaction sites. Afterwards, the membrane was incubated overnight at 4°C with a rat antibody (monoclonal Mouse Laminin α1 Mab4656, R&D system inc.) directed against mouse LAMA1 ((15 µg / ml diluted 1: 200 in blocking solution) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The membrane was washed 3 times for 10 min with agitation in the washing solution (0.1% PBS and 0.05% of Tween20) to

remove the excess or loosely bound antibody following nonspecific binding. Rabbit immunoglobulin anti-rat coupled with horseradish peroxidase (HRP; Dako, Carpinteria, California, USA), diluted 1: 1,000 in blocking solution, was incubated on the membrane for 1 hr at RT with stirring. Another series of 3 washes were done before soaking the membrane for 4 min in a solution to induce chemiluminescence (ECL Western Clarity substrate, Bio-Rad, USA). The result was visualized by exposing the membrane for 28 min to a autoradiographic HyBlot CL film (Denville Scientific inc., South Plainfield, NJ).

6.3 Results

6.3.1 Testing of gRNAs targeting LAMA1 promoter

Seven gRNAs targeting the mouse LAMA1 promoter were designed (Figure 23). Plasmids pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 coding for one of these gRNAs and the SpCas9 gene were transfected in C2C12 mouse myoblasts. The sgRNAs correctly accessing the promoter induced a DNA double strand break (DSB), which was spontaneously repaired by Non Homologous End Joining (NHEJ). This is an imperfect repair system that results in micro-insertions or micro-deletions (i.e., INDELS). As shown in figure 24, the seven gRNAs induced cuts in the amplicons indicating that they were able to effectively target the LAMA1 promoter. The gRNA3 produced the best results.

```
CTAAACACAAGCAGGTAAGACAGGCCTGAGCTTACTTCTGCTCTCCACAGGAGCTCTCTAACTGCCCTCTTAGAGAA
AATCACAGACATGAATGAATGTTCTTTACGATGCCCTATGCATGTATCTAATATAAGCAAGGCAGTTATTTAGATGCAAA
AACATTTGTGATGTTCTAAATGTTAAACGCTTGAGTAATTAATTTAGATGCTTACTTTACCCCTCATCACTCACTTGCCATCT
AGGTATTCATTTAATATTAAGTAGTTAAGAACATCTGACTTTAACCTTTAGTGATGTTGAGTGGCATTACTGAGCCAC
AGTGGATTTCCTCCCGTGTGTGATAATTTTCGCTGTGCTAACTACCCACCACATGCATACTCAGTGACGCAGAGGTCAA
GAGAGGGTGTGTATCCTTGGAACTAGAGTTACAGAAGCTTGTGAGCCTGAATTGAGCCCTGATCTCTGCAAGAACAGCA
CGTGCTTAAGCCCTAAACCCTCTCTGACGCCCCCCCCGCTACCTGTTTAAAGGGCCAAACGGTACAGTGTGTTTTG
TACTTCTGTAAACAAATAATAGCCAATCTCTCATTAGAATTTACTCATTACGTTGTTAAGGACCTGTGCTTAGAGAAAC
CGGAAATGGTAGAGTTTTCAAAGTGATTTAGACAACTGAACAAAAATGACCTCTCTATGAAAGAGAAAAACGGCACA
GGGCATCTGTGGAAACGTCATGGTGTCTGTGCATAGTGTGGAAATGCGTTATGAATACGTTTGCGAGGAAACTAAACTAA
AACTTTCTCAGGTTTAAACGAGTTTTTCAAAATGAGCGTTGAGAGTGGAGACTACCTTATACTTAAGTCCCAGCAACC
GTCTGAGCTTCCCTAGGCAAAAAAGCTACCCATTTCTGAAGGGGGCTGGCAAAACAACAAATGAAAAACACAGCCACC
CAAAACAAAACCACTGAGAGTGTCTGTGACGAAACAGACAGGATATAGGGTCCCGCAAGATGGAGTGTGACCTGACTA
TATTTCTACAGCTGGGATTTGGCCAAGACTGCACAGTTCACAGGCAGAAAAGGGTCAACAGGGCAAACTACTTTCTGG
AATCCACCCTCCAGGGCCAGGCTTAACAGAAACCTGCTTCTCCCGCCCTGTCTCTCCACCTTCTCCCTATTGGACCCTG
AATGCTCACCCCACTGGAGTGGAGGGTCAAGTACCACCCAGGAGAGGCACCCCGCCACCACCAGGGGCGAGAACA
GATCCCTTGGGAAGAGACCCCTAGGAAGGACTCCGCACGGCGGGGCTCCCTGGAGGACAGACTGGGCGCAGCGG
GGCGCTTTGGGGAGGTCCTGGTAGGACAGGGGCGGGGCGGGCCAGGACAGGCGGGGGTGTGTCGAAGGCGCTG
CGCACCAGGCCAGGTCGAGCTGGGAAGAGCACACTCGCGCAGTGCCTGTGAGCGAGCACGGGCGAGACCTTCCCAGG
AGCGCAGGGAGCGGCGGCAACAATGCGCGGCAGCGGCAGGGAGCCGCTCTGCTGCTCTGGTCTCTGGCCTCGGTGCTCT
GGTACCGTGCGGAGCCAGCAGAGAGTGAGTCCGCGGCGGGAACCCGCTGACCTCCGACTGGCAGCGGGAGC
GTGCGGGCGCAGGGGACAAAGCGCGGCTCGGGGCTGTGGATGGGCGCACGCCCTGGCGCAGCGCGGACCTGCTG
CGGGCCGACGGGGTGCAGGACTCCAGCGGAAGCCGCTCCCTGAGGACGCTGGTCTCCCTGGAGCTTAGGCTC
TGGTTTCTCTGACTCTAGGGGTACCTGCTTTCTAGCTTAGTGGACCTTGAGATCCAGGAGTACAGTGGGTGGCGAGA
GTGGCGTGTCCGGCACGTGAGAAGGGACACTGACTCCGTACCCAACGCTGAGTGGTGTGCGGACTGGCCGGAGACCGCC
GGGTTGGTGAATGTATGCAGCGCTCCCGCAATGAATGGGAACGGAGTCTCTGGCATTCACTTCAATGCTCTGTGTGCA
GAGAGAGACCATGGAAGGAGAAAGCGGCTCTCTGGGCACTAGCATCCAGGGTGTCTAGCGGGAAAAAGACTGAT
```

gRNA7
gRNA1
gRNA2
gRNA3
gRNA4
gRNA5
gRNA6

Figure 23 Target sites of gRNAs in the promoter of the mouse laminin α 1 gene.

The figure illustrates part of the sequence of the LAMA1 promoter. The start signal (ATG) is over-lighted in yellow. The positions of two pairs of primers are over-lighted in gray and in brown. The first pair produces a 1261 bp amplicon and the second pair a 1602 bp amplicon. The positions of 6 different gRNA target sequences are over-lighted in various colors. The PAM sequence is underlined. The positions of two transcription factors (KLF4 and SP1) are also over-lighted respectively in green and in light blue. These two sites are partially overlapped respectively the gRNA4 and gRNA5 target sites.

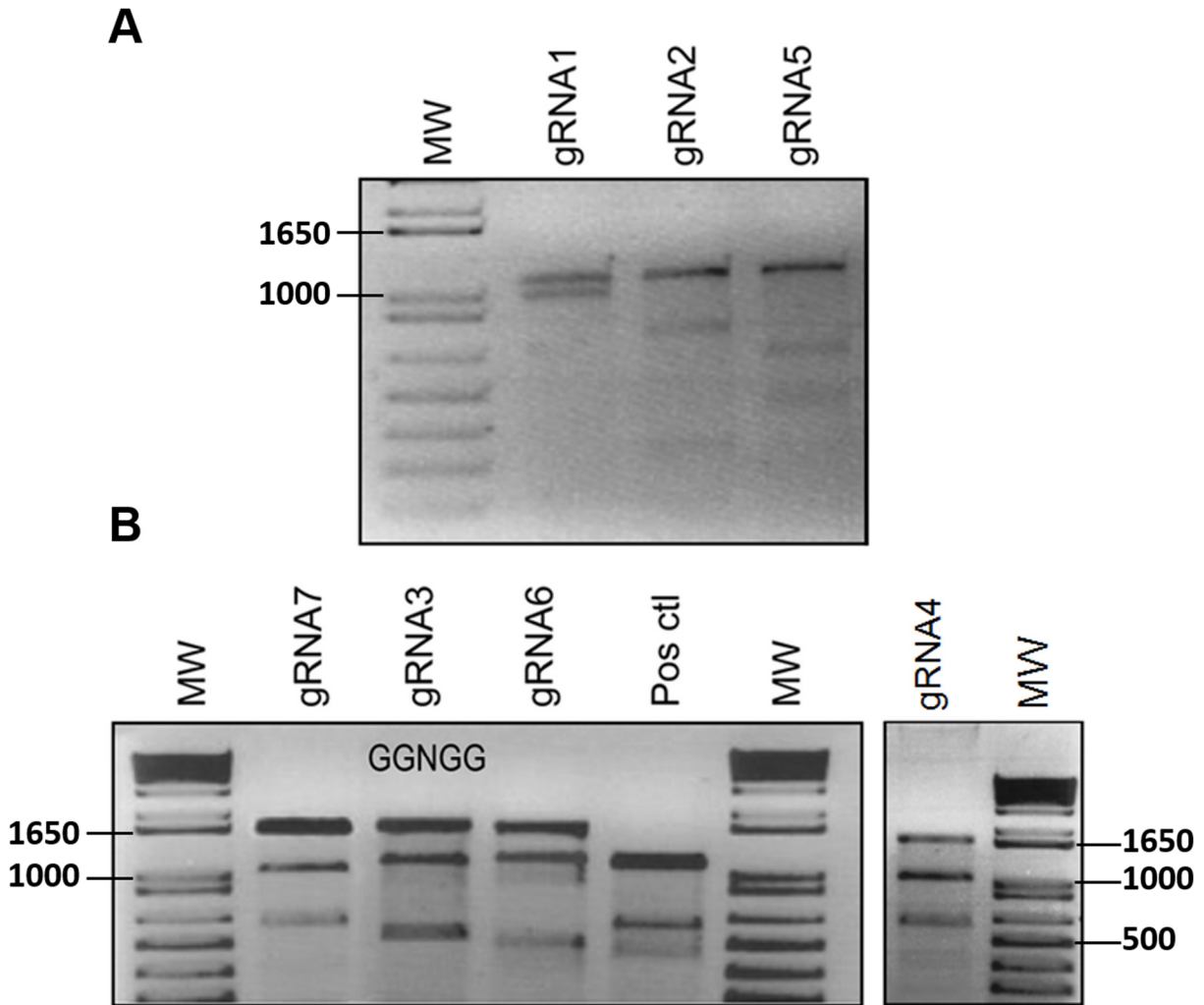


Figure 24 Results of Surveyor enzyme assay.

The plasmids coding for SpCas9 and each of the 7 gRNAs were transfected in C2C12 cells. 48 hours later, the DNA was extracted from the cells and amplified with either primer set #1 (in A producing a 1261 bp amplicon) or primer set #2 (in B producing a 1602 bp amplicon). Two additional bands were detected by gel electrophoresis following digestion of the amplicons with the Surveyor enzyme (CeiI) indicating that all gRNAs were able to access the LAMA1 promoter and had induced INDELS. The positive control is a mixture of amplicons containing a mismatch so that they are cut by the Surveyor enzyme.

6.3.2 gRNAs in combination with dSpCas9-VP160-2A-PURO increased expression of the LAMA1 mRNA

Five gRNAs were then individually inserted in the plasmid pAC154-dual-dCas9VP160-sg Expression (pAC154) coding for dCas9-VP160, a 2A peptide, a puromycin resistance gene and a gRNA. One μ g of each of these 5 plasmids was transfected in C2C12 myoblasts. Following

puromycin selection, LAMA1, HPRT and GAPDH mRNAs were quantified 3 days later by qRT-PCR. LAMA1 mRNA was not detected in the negative control cells transfected with pAC154 not containing a gRNA. However, between 3000 and 16000 copies of LAMA1 mRNA per μg of total RNA were detected in the cells transfected with pAC154 coding for one gRNA (Figure 25). The results of LAMA1 mRNAs were also normalized with the HPRT mRNAs (Figure 25A) and the GAPDH mRNA (Figure 25B). The LAMA1 mRNAs were up to 1.2% of the HPRT mRNAs and up to 0.023% of the GAPDH mRNAs. With all methods of presenting the results, gRNAs 3 and 4 produced the highest increases of the LAMA1 mRNA.

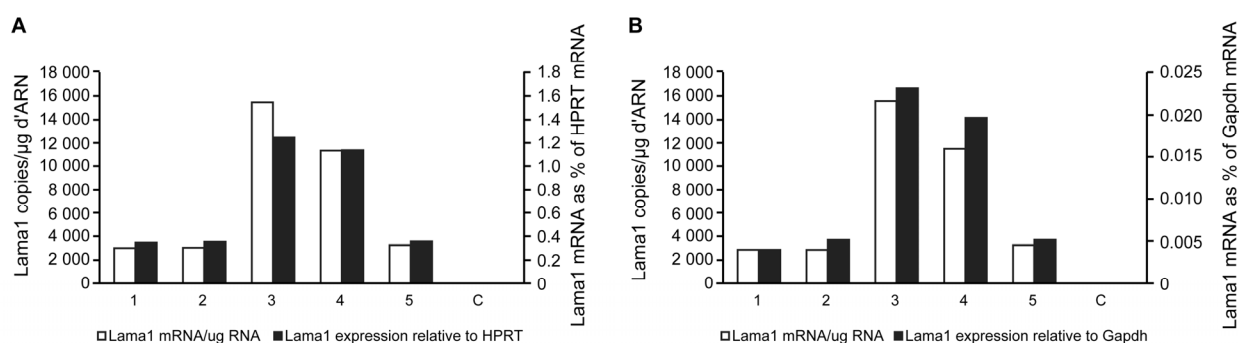


Figure 25 Increased expression of LAMA1 by dCas9-VP160 and individual gRNA 1 to 5.

C2C12 cells were transfected with 5 different pAC154 each coding for dCas9-VP160 and for a gRNA (i.e., gRNAs 1 to 5). The control cells (C) were transfected with a plasmid coding for eGFP. The LAMA1 mRNA was quantified by qRT-PCR and expressed either as the number of copies per μg of total RNA (left axis and white bars) or normalized with HPRT mRNA (A right axis black bars) or GAPDH mRNA (B right axis black bar).

6.3.3 Combinations of 2 or 3 gRNAs and dCas9-VP160 further increased the expression of the LAMA1 mRNA

C2C12 cells were transfected with 2 or 3 pAC154 plasmids (equal amount of each plasmid for a total of 4 μg) coding for different gRNAs and dCas9-VP160. As in the previous experiment, the LAMA1 mRNA was quantified by qRT-PCR and the results were normalized with the HPRT and the GAPDH mRNAs. The combinations of 2 or 3 gRNAs produced higher increased of LAMA1 expression than a single gRNA (between 8000 to 80000 copies per μg of total RNA) (Figure 26 A to D). Demonstrating an important synergic effect when 2 or 3 gRNA are binding to the LAMA1 promoter. These synergic effects were also clearly detected when the results were normalized relative to HPRT mRNAs (Figure 26 A, C and E) and relative to GAPDH mRNAs (Figure 26 B,

D and F). The LAMA1 mRNA was not detected in the negative control cells transfected with pAC154 plasmid containing the dCas9VP160 but not coding for a gRNA.

The increase of LAMA1 mRNA was further improved by transfecting 2 µg of each pAC154 plasmid with a new agent called TransfeX, instead of using Lipofectamine 2000. With the combination of gRNA3 and gRNA4 300000 mRNA were detected per µg of total RNA (Figure 26 E and F). This is 22% of the HPRT mRNA and 0.7% of the GAPDH mRNA. The LAMA1 mRNA was not detected in the negative control cells transfected with pAC154 plasmid containing the dCas9VP160 but not coding for a gRNA.

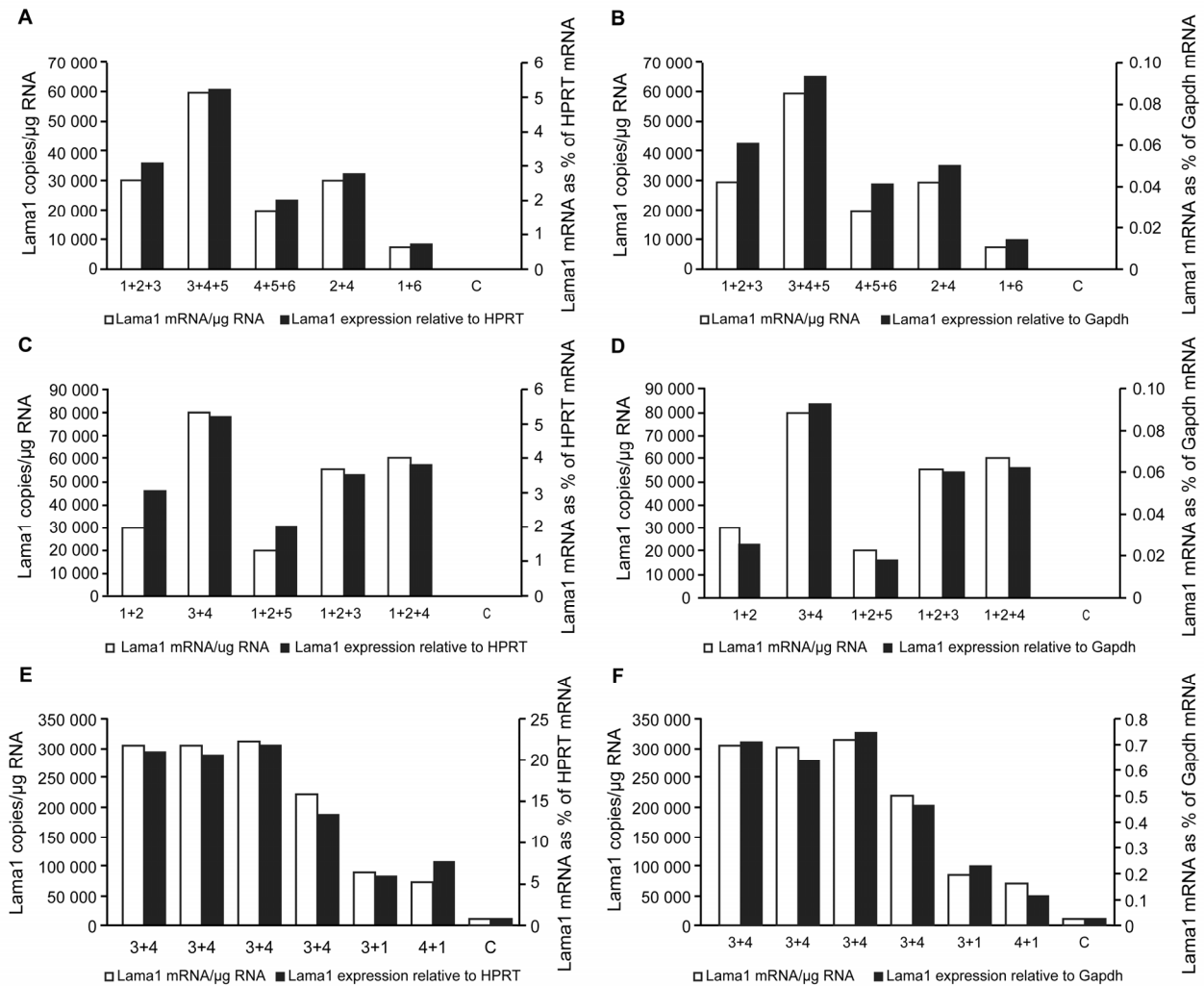


Figure 26 Synergic increased expression of LAMA1 by 2 or 3 gRNA with dCas9-VP160.

The C2C12 cells were transfected using Lipofectamine (A to D) or TransfeX (E and F) with 2 or 3 plasmids pAC154 each coding for dCas9-VP160 and for a gRNA. The control cells (C) were transfected with a pAC154 plasmid containing the dCas9VP160 but not coding for a gRNA. The LAMA1 mRNA was quantified by qRT-PCR and expressed either as the number of copies per μg of total RNA (left axis and white bars) or normalized with HPRT mRNA (A, C and E right axis black bars) or Gapdh mRNA (B, D and F right axis black bar). Each bar represents the result of an independent experiment. The combination of gRNA3 and gRNA4 produced the best induction of LAMA1 expression. In the best situation, there were 300000 copies of LAMA1 mRNA per μg of total RNA, i.e., 22% of the HPRT mRNA and 0.7% of the GAPDH mRNA. The LAMA1 mRNA was not detected in the negative control cells.

6.3.4 Combinations of 2gRNAs and dCas9-P300 further increased the expression of the LAMA1 mRNA

C2C12 cells were transfected with 2 pAC154 plasmids (2 μg of each plasmid) coding for 2 different gRNAs and dCas9-P300 using the optimized protocol with TransfeX. The LAMA1 mRNA was quantified by qRT-PCR and the results were normalized with the HPRT and the GAPDH mRNAs. As in the previous experiment the combination of gRNA 3 and gRNA 4 produced higher increased of LAMA1 expression than a single gRNA, but the increased of LAMA1 with P300 was less than the increased of LAMA1 with VP160. dCas9 VP160 produced the highest increase of the LAMA1 mRNA with 300 000 copies per μg of total RNA while 200000 copies per μg of total RNA when we used dCas9-P300 (Figure 27).

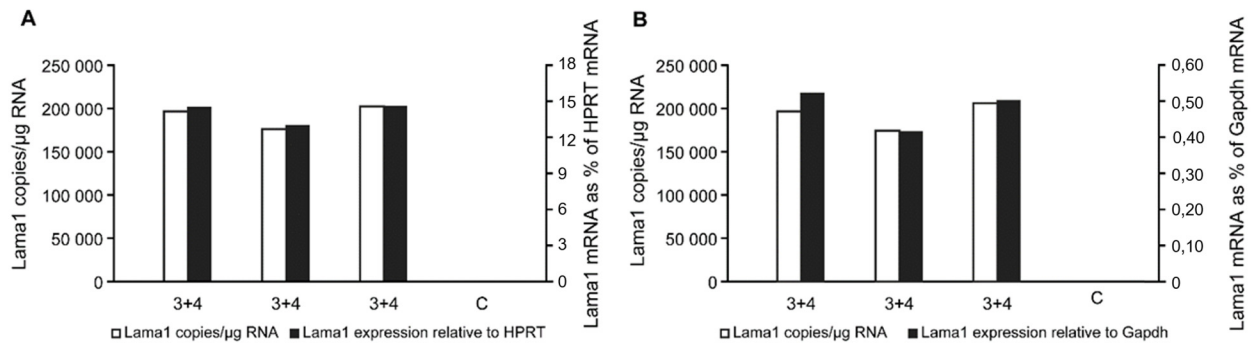


Figure 27 Combinations of gRNA 3 and gRNA 4 with dCas9-P300 further increased the expression of the LAMA1 mRNA.

The C2C12 cells were transfected with TransfeX with 2 plasmids coding for dCas9-P300 and for gRNA3 and gRNA4. The control cells (C) were transfected with a pAC154 plasmid containing the dCas9VP160 but not coding for a gRNA. The LAMA1 mRNA was quantified by qRT-PCR and expressed either as the number of copies per μg of total RNA (left axis and white bars) or normalized with HPRT mRNA (A right axis black bars) or GAPDH mRNA (B right axis black bar). The figure illustrates 3 independent replications of the experiment.

6.3.5 Detection of LAMA1 protein by immunocytochemistry

C2C12 cells were transfected with Lipofectamine 2000 with 2 μg of pAC154 plasmid coding either for gRNA1, gRNA3 and gRNA4 or for a combination of gRNA3 and gRNA4. The laminin $\alpha 1$ protein was detected by immunocytochemistry with all gRNAs but was higher with the combination of gRNA 3 and gRNA4 (Figure 28). No fluorescence was observed in the control cells, which were transfected with the empty pAC154 plasmid.

Immunocytochemistry

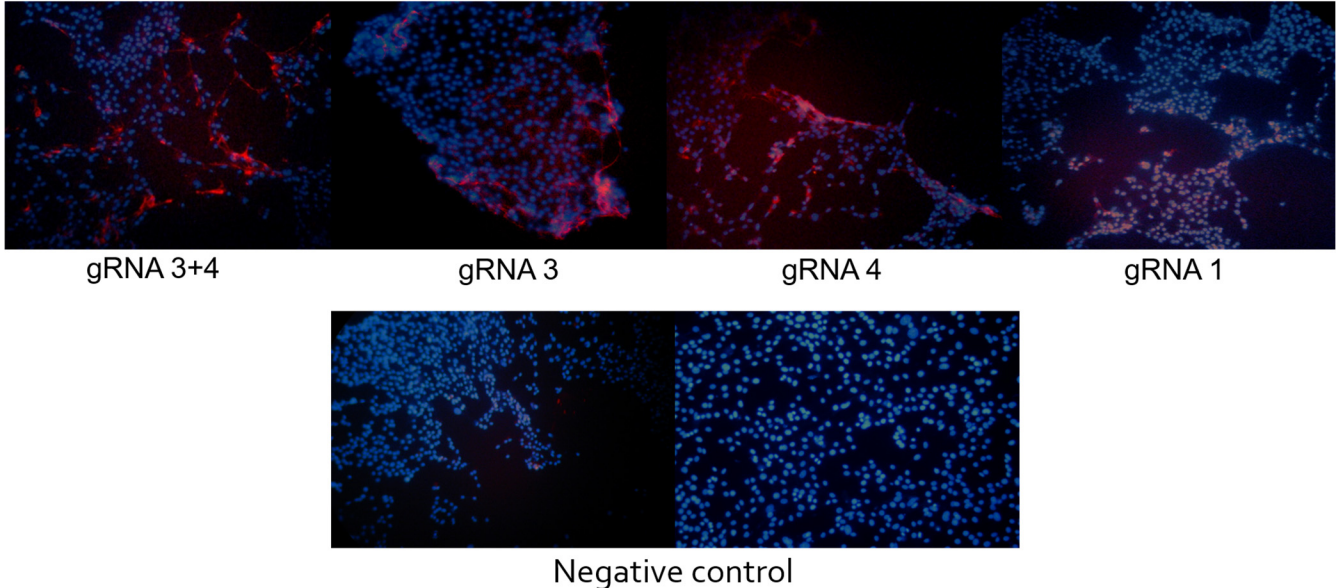
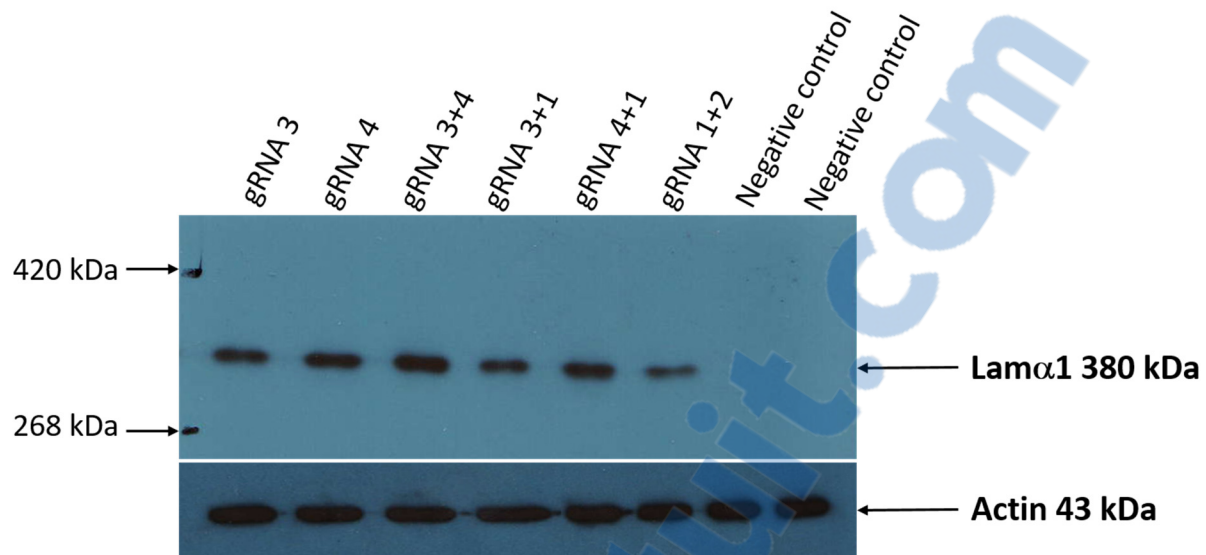


Figure 28 Detection of laminin a1 protein by immunocytochemistry in C2C12 cells.

C2C12 cells were transfected with pAC154 coding for dCas9-VP160-2A-puro and a gRNA. The cells were selected with puromycin, expanded during 7 days and fixed with ethanol 95%. The LAMA1 expression was detected by immunofluorescence (red label). The nuclei were stained with Hoechst 33258. The negative control cells were transfected with a plasmid pAC154 not coding for a gRNA.

6.3.6 Detection of LAMA1 protein by Western blot

C2C12 cells were also transfected with 1, 2 or 3 plasmids coding for gRNAs. The total amount of plasmid was kept constant at 4 μ g. The cells were selected with puromycin and proliferated during 3 weeks before protein extraction. The LAMA1 protein was detected by Western blot more strongly in the cells treated with the gRNA3 and gRNA4 (Figure 29). Since LAMA1 is not expressed in the negative controls, it is impossible to indicate by how many folds its expression was increased. Quantification of the western blot and normalization relative to GAPDH protein indicated that the smallest increase was obtained with the combination of gRNA1 and gRNA2. gRNA3 or gRNA4 alone increased the LAMA1 expression respectively 4 and 4.9 times more than the combination of gRNA1 and gRNA2. Finally the best increased was obtained with the combination of gRNA3 and gRNA4, which increased LAMA1 by 5.6 folds relative to the combination of gRNA1 and gRNA2.



	#	IDV	AREA	Lama1/Gapdh
Gapdh	1n	52920	1400	/
gRNA 3	2n	21168	1400	0,4
gRNA 4	3n	25854	1400	0,49
gRNA 3+4	4n	29657	1400	0,56
gRNA 3+1	5n	13256	1400	0,25
gRNA 4+1	6n	18654	1400	0,35
gRNA 1+2	7n	5543	1400	0,1
Neg control	8n	0	1400	0
Neg control	9n	0	1400	0

Figure 29 Western blot detection of LAMA1 in C2C12 cells.

C2C12 cells were transfected with pAC154 coding for dCas9-VP160 and one or two gRNAs. Proteins were extracted 18 days later and LAMA1 was detected by western blot. The best induction of the LAMA1 protein was observed in the cells transfected with gRNA3 and gRNA4. No LAMA1 expression was detected in the negative control cells transfected either with pAC154 not coding for a gRNA or a plasmid coding for eGFP.

6.3.7 Increase of LAMA1 expression in rag/mdx muscles.

Anterior tibialis rag/mdx muscles of 4 mdx/rag mice (4 months old) were electroporated with a total of 40 μ g of pAC154 plasmids coding for one or two gRNAs. The negative control muscles were subjected to the same treatment but with a pAC154 plasmid not containing a gRNA and the dCas9-VP160 gene. The muscles were removed 2 weeks later and heterogeneous distributions of LAMA1 protein were detected by immunohistochemistry and western blot in the muscles treated with a gRNA. The most intense immune-labeling was obtained with a combination of 2 plasmids, one coding for gRNA3 and the other for gRNA4 (Figure 30). Only background staining was detected in the control muscles. By western blot we detect a very low level of LAMA1 protein in

the negative control. On the other hand, the treated muscles by dCas9, shows a significant increase of the LAMA1 protein.

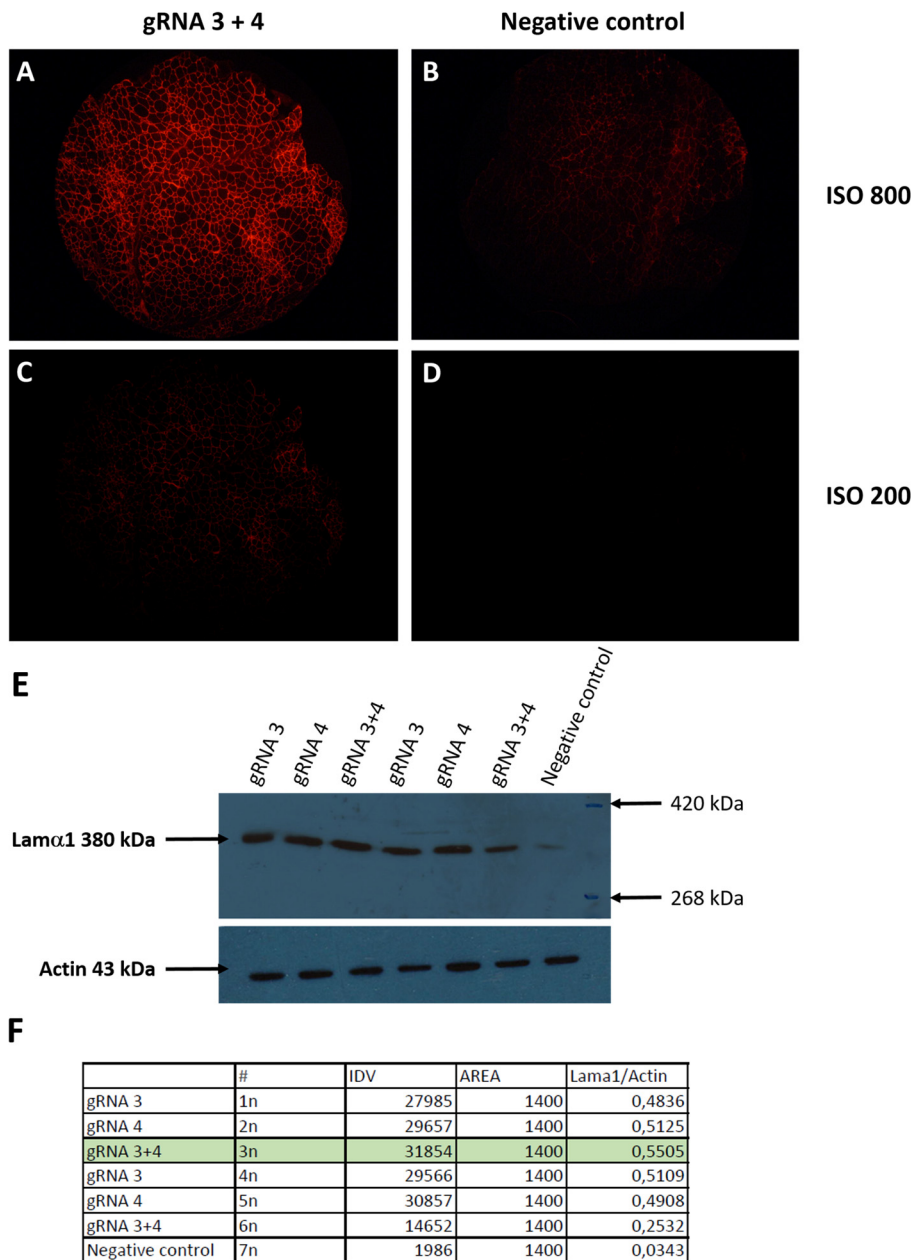


Figure 30 Detection of laminin α 1 protein *in vivo* in Tibialis anterior of rag/mdx mouse by immunohistochemistry and western blot.

The muscles of Rag/mdx mice were injected with plasmids coding for dCas9-VP160 and for gRNA 3 and gRNA 4 and electroporated. The control muscles were injected with saline and electroporated with the same parameters. Muscles were collected 2 weeks later and LAMA1 protein was detected by immunohistochemistry in cryostat sections of the muscles electroporated with dCas9-VP160 and both gRNAs (A and C) The staining appeared non-uniform at ISO 200 (C). In the muscle control (B and D), only background staining was detected at ISO 800 (B) and no staining at ISO 200 (D). The western blot (E) indicates a 16 folds increase of LAMA1 protein with gRNA 3 and gRNA 4 compared to negative control (F).

6.4 Discussion and conclusion

The CRISPR technology is revolutionizing molecular biology and permits to develop new therapies based on genome editing or modification the expression of a specific gene. In the present article, we have been able to strongly induce the expression of the silent LAMA1 gene with 1 to 3 gRNAs and the dCas9 coupled with the VP160 Transcription Activation Domain (TAD), as previously reported for other genes (Konermann et al. 2015).

The gRNA3 produced the best induction of LAMA1 expression. This may be because it targets a sequence ending with GG located just before the NGG PAM. Indeed, such a target sequence ending with GG has been previously reported to be more effective (Farboud and Meyer 2015). The gRNA4 also produced a large increase of the LAMA1 expression. This gRNA binds to a nucleotide sequence close to the binding site of Klf4. The Klf4 factor inhibits the expression of the LAMA1 gene (Piccinni et al. 2004). The binding of the gRNA4 may thus inhibit the inhibitory action of Klf4. Thus it is not surprising that gRNA3 and gRNA4 produced synergic effects because they act on different sites through different mechanisms.

It is possible that the gRNAs targeting the promoter of the LAMA1 gene may also affect the expression of other genes. Possible off-target of the best gRNA (i.e., gRNA3 and gRNA4) were identified with the Benchling software (<https://benchling.com/editor>). None of the possible off-targets were located in promoters. These potential off-target effects may be further reduced by using shorted gRNAs (Fu et al. 2014) or the modified eSpCas9, containing 4 mutated amino acids to reduce non-specific binding (Slaymaker et al. 2015). A non-functional (dead) version of eSpCas9 (deSpCas9) would have to be tested, Using this deSpCas9-VP160 potential modifications of the expression of all genes could be investigated using the RNA-Seq technique (Pepke, Wold, and Mortazavi 2009). For an eventual therapeutic application, the deSpCas9-VP160 and the gRNAs should be delivered systemically to all skeletal muscles using an AAV vector. To limit LAMA1 expression only to skeletal muscles, the promoter of deSpCas9-VP160 should be muscle specific.

Laminin $\alpha 1$ (LAMA1) is not expressed in adult muscles but lamimin $\alpha 2$, laminin $\beta 1$ and laminin $\gamma 1$ still are still expressed (www.genecards.org/) forming laminin-211. The induction of the LAMA1 expression in adult muscles should also permit the formation of the laminin-111 complex. The expression of $\alpha 1$ will thus change the equilibrium between the different types of laminin

chains. May be more $\beta 1$ and $\gamma 1$ chain will be produced to compensate. This will require further studies.

Different possible DMD treatments have been investigated. Most of them are aiming to restore the expression of the dystrophin gene. In the present article, we are presenting a different potential therapeutic strategy that could by itself reduce the damages induced to the muscle fibers during contractions and thus on the long-term prevent the progressive muscle weakness characteristic of this disease.

The laminin-111 complex is secreted and participates to the formation of the extracellular matrix. This complex binds with integrin $\alpha 7\beta 1$ present in the muscle fiber membrane. This thus forms a link between the sarcolemma and the extracellular matrix. Dystrophin forms a complex in the sarcolemma with dystroglycans and sarcoglycans. This complex forms links with proteins of the extracellular matrix. This link between the sarcolemma and the extracellular matrix normally protects the muscle fiber membrane during contraction. This protection is missing in the DMD patients because the dystrophin complex does not form in the sarcolemma in the absence of dystrophin. The formation of interactions between laminin-111 and the integrin $\alpha 7\beta 1$ would partially compensate for the absence of the dystrophin complex. However, Gawlik et al. (Gawlik, Oliveira, and Durbeej 2011) have shown that transgenic over-expression of the mouse LAMA1 does not prevent disease progression in mdx mice. The main difference between the between laminin-111 protein delivery versus LAMA1 transcription in muscle is that the delivery of the protein only permits a transient effect whereas the CRISPR/dCas9 system permits a sustained LAMA1 expression without treatment repetition. The results of Gawlik et al., (Gawlik, Oliveira, and Durbeej 2011) are surprising in the light of articles by Burkin's group (Rooney, Gurple, and Burkin 2009; Rooney et al. 2009) and our group (Goudenege et al. 2010) that reported beneficial effects in mdx mice of delivering laminin-111. These discrepancies require further investigation. However, LAMA1 increase also improved $\alpha 7$ integrin congenital myopathy and the viability of a mouse model of merosin deficient congenital muscular dystrophy (Rooney et al. 2012) (Van Ry et al. 2014). Thus up-regulation of LAMA1 may have beneficial effects for other muscular diseases than DMD and it is thus worth continuing investigation.

Our group also showed that laminin-111 significantly improved the success of myoblast transplantation by improving myoblast proliferation and migration *in vitro* (Goudenege et al. 2010). Similarly, Zou et al. (Zou et al. 2014) demonstrated that laminin-111 increased muscle cell quantity

and function following eccentric exercise. Thus in follow-up studies, we will investigate whether the increase of LAMA1 by the CRISPR/Cas9 technology also improves myoblast transplantation. In conclusion, the increased expression of laminin $\alpha 1$ will permit to links this component of the extracellular matrix with the integrin $\alpha 7\beta 1$ receptor in the muscle fibers. This will replace to some extent the links between the matrix proteins and the dystrophin complex, which is absent in DMD patients. Thus in future experiments, we will verify whether LAMA1 induction with the CRISPR/Cas9 technology is therapeutic by itself and improve the success of myoblast transplantation.

6.5 Perspectives

La stratégie CRISPR/dCas9-VP160 a permis de produire la chaîne $\alpha 1$ de la laminine-111. La suite logique serait de démontrer que cette chaîne $\alpha 1$ est capable de former un complexe trimérique avec les chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$, et que cette protéine nouvellement formée, la laminine-111, est sécrétée en dehors de la cellule puis être fonctionnelle.

J'ai pu commencer la synthèse d'un plasmide nécessaire à la construction d'un AAV, codant pour l'ARN guide et la dCas-VP160. En injectant cet AAV dans la voie systémique d'un modèle murin dystrophique (la souris mdx), la livraison du système sera plus efficace que l'utilisation du plasmide.

On sait que l'injection directe de la protéine permet d'augmenter le niveau d'intégrine $\alpha 7\beta 1$, ce qui protège le sarcolemme d'éventuels bris, aussi bien causés par la contraction musculaire que par l'injection de myoblastes lors de greffes.

Il serait facile de quantifier la protéine intégrine $\alpha 7\beta 1$ et de comparer ce résultat avec un muscle de souris n'ayant pas été traité en utilisant la technique western blot appliquée directement sur les lames contenant les coupes de muscles de souris traitées avec cet AAV.

Pour analyser l'éventuelle la protection du sarcolemme, ces mêmes souris mdx, injectées avec le AAV codant pour l'ARN guide et la dCas-VP160 pourraient être confrontée à une étude comportemental, en effet, on pourrait faire nager ces souris, puis soumettre leurs muscles à la coloration Evan blue. C'est un test de viabilité basé sur la pénétration du colorant dans les fibres endommagées, et ainsi comparer la présence de colorant bleu entre les muscles de souris traitées et ceux qui ne l'ont pas été.

L'injection de Laminine-111 a montré *in vitro* une grande augmentation de la mobilité des myoblastes initialement immobiles, l'intérêt d'induire une mobilité réside dans la possibilité d'augmenter considérablement les succès de greffes de myoblastes. Dans un contexte de thérapie cellulaire où l'on utilise des myoblastes corrigés du patient lui-même, ces derniers pourraient migrer au-delà du site d'injection et ainsi augmenter le succès de la greffe.

L'observation de tous ces effets bénéfiques fait de la laminine-111 une candidate intéressante dans le cadre d'une stratégie thérapeutique pour la Dystrophie musculaire de Duchenne.

Bibliographie

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2011. 'Biologie moléculaire de la cellule.' in, *Medecine sciences publications* (Paris).
- Allamand, Valérie, Yoshihide Sunada, Mustafa A. M. Salih, Volker Straub, O. Ozo, M. H. S. Al-Turaiki, Maksood Akbar, Timo Kolo, Holly Colognato, Xu Zhang, Lydia M. Sorokin, Peter D. Yurchenco, Karl Tryggvason, and Kevin P. Campbell. 1997. 'Mild Congenital Muscular Dystrophy in Two Patients with an Internally Deleted Laminin α 2-Chain', *Human molecular genetics*, 6: 747-52.
- Allbrook, David. 1981. 'Skeletal muscle regeneration', *Muscle & nerve*, 4: 234-45.
- Ancsin, John B., and Robert Kisilevsky. 1996. 'Laminin Interactions Important for Basement Membrane Assembly Are Promoted by Zinc and Implicate Laminin Zinc Finger-like Sequences', *Journal of Biological Chemistry*, 271: 6845-51.
- Aurino, S., and V. Nigro. 2006. 'Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy', *Acta Myol*, 25: 5-12.
- Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg. 2009. 'Integrins', *Cell Tissue Res*, 339: 269-80.
- Barnea, Efrat, Dorit Zuk, Rabi Simantov, Uri Nudel, and David Yaffe. 'Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells', *Neuron*, 5: 881-88.
- Belkin, A. M., and M. A. Stepp. 2000. 'Integrins as receptors for laminins', *Microsc Res Tech*, 51: 280-301.
- Bieber, F. R., and E. P. Hoffman. 1990. 'Duchenne and Becker muscular dystrophies: genetics, prenatal diagnosis, and future prospects', *Clin Perinatol*, 17: 845-65.
- Bikard, D., W. Jiang, P. Samai, A. Hochschild, F. Zhang, and L. A. Marraffini. 2013. 'Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system', *Nucleic Acids Res*.
- Bischoff, R., and C. Heintz. 1994. 'Enhancement of skeletal muscle regeneration', *Dev Dyn*, 201: 41-54.
- Bitinaite, J., D. A. Wah, A. K. Aggarwal, and I. Schildkraut. 1998. 'FokI dimerization is required for DNA cleavage', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 10570-5.
- Brussee, V., F. Tardif, and J. P. Tremblay. 1997. 'Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice', *Neuromuscul Disord*, 7: 487-92.
- Bulfield, G., W. G. Siller, P. A. Wight, and K. J. Moore. 1984. 'X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 1189-92.
- Buyse, G. M., N. Goemans, M. van den Hauwe, D. Thijs, I. J. de Groot, U. Schara, B. Ceulemans, T. Meier, and L. Mertens. 2011. 'Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: results from a 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial', *Neuromuscul Disord*, 21: 396-405.
- Campbell, M. A., and G. J. Chader. 1988. 'Effects of laminin on attachment, growth and differentiation of cultured Y-79 retinoblastoma cells', *Investigative ophthalmology & visual science*, 29: 1517-22.
- Carroll, D. 2014. 'Genome Engineering with Targetable Nucleases', *Annu Rev Biochem*.

- Cermak, T., E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somania, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2011. 'Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting', *Nucleic Acids Res*, 39: e82.
- Chapdelaine, P., C. Pichavant, J. Rousseau, F. Paques, and J. P. Tremblay. 2010. 'Meganucleases can restore the reading frame of a mutated dystrophin', *Gene Ther*, 17: 846-58.
- Chen, B., L. A. Gilbert, B. A. Cimini, J. Schnitzbauer, W. Zhang, G. W. Li, J. Park, E. H. Blackburn, J. S. Weissman, L. S. Qi, and B. Huang. 2013. 'Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system', *Cell*, 155: 1479-91.
- Chen, K., Q. Shan, and C. Gao. 2014. 'An efficient TALEN mutagenesis system in rice', *Methods*.
- Chen, M., and K. L. O'Connor. 2005. 'Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells', *Oncogene*, 24: 5125-30.
- Cheng, A. W., H. Wang, H. Yang, L. Shi, Y. Katz, T. W. Theunissen, S. Rangarajan, C. S. Shivalila, D. B. Dadon, and R. Jaenisch. 2013. 'Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system', *Cell Res*, 23: 1163-71.
- Cheng, Yi-Shan, Marie-France Champlaud, Robert E. Burgeson, M. Peter Marinkovich, and Peter D. Yurchenco. 1997. 'Self-assembly of Laminin Isoforms', *Journal of Biological Chemistry*, 272: 31525-32.
- Churchman, L. Stirling, and Jonathan S. Weissman. 2011. 'Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution', *Nature*, 469: 368-73.
- Coffey AJ, Roberts RG, Green ED, Cole CG, Butler R, Anand R, Giannelli F, Bentley DR. 1992. 'Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach.', *Genomics*, 12: 474-84.
- Conboy, Irina M., and Thomas A. Rando. 2005. 'Aging, Stem Cells and Tissue Regeneration: Lessons from Muscle', *Cell Cycle*, 4: 407-10.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. 'Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems', *Science*, 339: 819-23.
- Cooper, Ashley R., and Hilary A. MacQueen. 1983. 'Subunits of laminin are differentially synthesized in mouse eggs and early embryos', *Developmental Biology*, 96: 467-71.
- Cossu, G., and M. Sampaolesi. 2007. 'New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials', *Trends Mol Med*, 13: 520-6.
- Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier. 2011. 'CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III', *Nature*, 471: 602-7.
- Derek J. Blake, Andrew Weir, Sarah E. Newey and Kay E. Davies. 2002. 'Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle', *Physiological Reviews*, 82: 291-329.
- DeSilva, S., D. B. Drachman, D. Mellits, and R. W. Kuncl. 1987. 'Prednisone treatment in duchenne muscular dystrophy: Long-term benefit', *Archives of Neurology*, 44: 818-22.
- Deveau, H el ene, Josiane E. Garneau, and Sylvain Moineau. 2010. 'CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions', *Annual Review of Microbiology*, 64: 475-93.

- Doyon, Y., T. D. Vo, M. C. Mendel, S. G. Greenberg, J. Wang, D. F. Xia, J. C. Miller, F. D. Urnov, P. D. Gregory, and M. C. Holmes. 2011. 'Enhancing zinc-finger-nuclease activity with improved obligate heterodimeric architectures', *Nat Methods*, 8: 74-9.
- Dupret, B., and P. O. Angrand. 2014. '[Targeted genome modifications using TALEN]', *Med Sci (Paris)*, 30: 186-93.
- Durbeej, M. 2010. 'Laminins', *Cell Tissue Res*, 339: 259-68.
- E.Davies, Kristen J. Novak & Kay. 2004. 'Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment', *European Molecular Biology Organization*, 5: 872-76.
- Epinat, J. C., S. Arnould, P. Chames, P. Rochaix, D. Desfontaines, C. Puzin, A. Patin, A. Zanghellini, F. Paques, and E. Lacroix. 2003. 'A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells', *Nucleic Acids Res*, 31: 2952-62.
- Ervasti, J. M., and K. P. Campbell. 1993. 'Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy', *Mol Cell Biol Hum Dis Ser*, 3: 139-66.
- Fairclough, Rebecca J., Matthew J. Wood, and Kay E. Davies. 2013. 'Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches', *Nat Rev Genet*, 14: 373-78.
- Falk, Mats, Maria Ferletta, Erik Forsberg, and Peter Ekblom. 1999. 'Restricted distribution of laminin $\alpha 1$ chain in normal adult mouse tissues', *Matrix Biology*, 18: 557-68.
- Farboud, B., and B. J. Meyer. 2015. 'Dramatic enhancement of genome editing by CRISPR/Cas9 through improved guide RNA design', *Genetics*, 199: 959-71.
- Fenichel, G.M., and JM Florence. 1991. 'Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy', *Neurology*, 41: 1874-77.
- Fleming, Robert J., Karen Purcell, and Spyros Artavanis-Tsakonas. 1997. 'The NOTCH receptor and its ligands', *Trends in cell biology*, 7: 437-41.
- Frade, José M., Juan R. Martínez-Morales, and Alfredo Rodríguez-Tébar. 1996. 'Laminin-1 Selectively Stimulates Neuron Generation from Cultured Retinal Neuroepithelial Cells', *Experimental Cell Research*, 222: 140-49.
- Fu, Y., J. D. Sander, D. Reyon, V. M. Cascio, and J. K. Joung. 2014. 'Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs', *Nat Biotechnol*.
- Gao, Guangping, You Lu, Roberto Calcedo, Rebecca L. Grant, Peter Bell, Lili Wang, Joanita Figueredo, Martin Lock, and James M. Wilson. 2006. 'Biology of AAV Serotype Vectors in Liver-Directed Gene Transfer to Nonhuman Primates', *Mol Ther*, 13: 77-87.
- Gaschen, F. P., E. P. Hoffman, J. R. Gorospe, E. W. Uhl, D. F. Senior, G. H. d Cardinet, and L. K. Pearce. 1992. 'Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats', *J Neurol Sci*, 110: 149-59.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2012. 'Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2579-86.
- Gawlik, K. I., B. M. Oliveira, and M. Durbeej. 2011. 'Transgenic expression of Laminin alpha1 chain does not prevent muscle disease in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy', *Am J Pathol*, 178: 1728-37.
- Ghosh, Asish K., and John Varga. 2007. 'The transcriptional coactivator and acetyltransferase p300 in fibroblast biology and fibrosis', *Journal of Cellular Physiology*, 213: 663-71.

- Gilbert, L. A., M. H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G. A. Brar, S. E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E. H. Whitehead, J. A. Doudna, W. A. Lim, J. S. Weissman, and L. S. Qi. 2013. 'CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes', *Cell*, 154: 442-51.
- Goemans, N. M., M. Tulinius, J. T. van den Akker, B. E. Burm, P. F. Ekhardt, N. Heuvelmans, T. Holling, A. A. Janson, G. J. Platenburg, J. A. Sipkens, J. M. Sitsen, A. Aartsma-Rus, G. J. van Ommen, G. Buyse, N. Darin, J. J. Verschuuren, G. V. Campion, S. J. de Kimpe, and J. C. van Deutekom. 2011. 'Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy', *N Engl J Med*, 364: 1513-22.
- Gouble, Agnès, Julianne Smith, Sylvia Bruneau, Christophe Perez, Valérie Guyot, Jean-Pierre Cabaniols, Sophie Leduc, Laurence Fiette, Patrick Avé, Béatrice Micheau, Philippe Duchateau, and Frédéric Paques. 2006. 'Efficient in toto targeted recombination in mouse liver by meganuclease-induced double-strand break', *The journal of gene medicine*, 8: 616-22.
- Goudenege, S., Y. Lamarre, N. Dumont, J. Rousseau, J. Frenette, D. Skuk, and J. P. Tremblay. 'Laminin-111: a potential therapeutic agent for Duchenne muscular dystrophy', *Mol Ther*, 18: 2155-63.
- . 2010. 'Laminin-111: a potential therapeutic agent for Duchenne muscular dystrophy', *Mol Ther*, 18: 2155-63.
- Grizot, S., J. C. Epinat, S. Thomas, A. Duclert, S. Rolland, F. Paques, and P. Duchateau. 2010. 'Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds', *Nucleic Acids Res*, 38: 2006-18.
- Grosse, S., N. Huot, C. Mahiet, S. Arnould, S. Barradeau, D. L. Clerre, I. Chion-Sotinel, C. Jacquemarcq, B. Chapellier, A. Ergani, C. Desseaux, F. Cedrone, E. Conseiller, F. Paques, M. Labetoulle, and J. Smith. 2011. 'Meganuclease-mediated Inhibition of HSV1 Infection in Cultured Cells', *Mol Ther*, 19: 694-702.
- Grounds, M. D. 1991. 'Towards Understanding Skeletal Muscle Regeneration', *Pathology - Research and Practice*, 187: 1-22.
- Guérette, B., I. Asselin, J.T. Vilquin, R. Roy, and J.P. Tremblay. 1995. 'Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice', *Muscle Nerve*, 18: 39-51.
- Guerette, B., K. Wood, R. Roy, and J. P. Tremblay. 1997. 'Efficient myoblast transplantation in mice immunosuppressed with monoclonal antibodies and CTLA4 Ig', *Transplant Proc*, 29: 1932-4.
- Guo, C., M. Willem, A. Werner, G. Raivich, M. Emerson, L. Neyses, and U. Mayer. 2006. 'Absence of alpha 7 integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy', *Hum Mol Genet*, 15: 989-98.
- Hall, Daniel B., and Kevin Struhl. 2002. 'The VP16 Activation Domain Interacts with Multiple Transcriptional Components as Determined by Protein-Protein Cross-linking in Vivo', *Journal of Biological Chemistry*, 277: 46043-50.
- Hilton, I. B., A. M. D'Ippolito, C. M. Vockley, P. I. Thakore, G. E. Crawford, T. E. Reddy, and C. A. Gersbach. 2015. 'Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers', *Nat Biotechnol*.
- Hoffman, E. P., A. Bronson, A. A. Levin, S. Takeda, T. Yokota, A. R. Baudy, and E. M. Connor. 2011. 'Restoring dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy muscle progress in exon skipping and stop codon read through', *Am J Pathol*, 179: 12-22.
- Hoffman, E. P., R. H. Brown, Jr., and L. M. Kunkel. 1987. 'Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus', *Cell*, 51: 919-28.

- Hoshiya, H., Y. Kazuki, S. Abe, M. Takiguchi, N. Kajitani, Y. Watanabe, T. Yoshino, Y. Shirayoshi, K. Higaki, G. Messina, G. Cossu, and M. Oshimura. 2009. 'A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene', *Mol Ther*, 17: 309-17.
- Hsu, P. D., E. S. Lander, and F. Zhang. 2014. 'Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering', *Cell*, 157: 1262-78.
- Hu, J., Y. Lei, W. K. Wong, S. Liu, K. C. Lee, X. He, W. You, R. Zhou, J. T. Guo, X. Chen, X. Peng, H. Sun, H. Huang, H. Zhao, and B. Feng. 2014. 'Direct activation of human and mouse Oct4 genes using engineered TALE and Cas9 transcription factors', *Nucleic Acids Res*, 42: 4375-90.
- Huard, J., G. Tremblay, S. Verreault, C. Labrecque, and J. P. Tremblay. 1993. 'Utilization of an antibody specific for human dystrophin to follow myoblast transplantation in nude mice', *Cell Transplant*, 2: 113-8.
- Humphries, J. D., A. Byron, and M. J. Humphries. 2006. 'Integrin ligands at a glance', *J Cell Sci*, 119: 3901-3.
- Hynes, R. O. 2002a. 'Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines', *Cell*, 110: 673-87.
- . 2002b. 'A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis', *Nat Med*, 8: 918-21.
- Hynes, R. O., J. C. Lively, J. H. McCarty, D. Taverna, S. E. Francis, K. Hodivala-Dilke, and Q. Xiao. 2002. 'The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 67: 143-53.
- Jia, J., Y. Jin, T. Bian, D. Wu, L. Yang, N. Terada, W. Wu, and S. Jin. 2014. 'Bacterial Delivery of TALEN Proteins for Human Genome Editing', *PLoS One*, 9: e91547.
- Jiang, F X, D S Cram, H J DeAizpurua, and L C Harrison. 1999. 'Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells', *Diabetes*, 48: 722-30.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. 'A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity', *Science*, 337: 816-21.
- Jinek, M., F. Jiang, D. W. Taylor, S. H. Sternberg, E. Kaya, E. Ma, C. Anders, M. Hauer, K. Zhou, S. Lin, M. Kaplan, A. T. Iavarone, E. Charpentier, E. Nogales, and J. A. Doudna. 2014. 'Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation', *Science*, 343: 1247997.
- Joung, J. K., and J. D. Sander. 2013. 'TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 49-55.
- Kandavelou, K., and S. Chandrasegaran. 2009. 'Custom-designed molecular scissors for site-specific manipulation of the plant and mammalian genomes', *Methods Mol Biol*, 544: 617-36.
- Kazuki, Y., M. Hiratsuka, M. Takiguchi, M. Osaki, N. Kajitani, H. Hoshiya, K. Hiramatsu, T. Yoshino, K. Kazuki, C. Ishihara, S. Takehara, K. Higaki, M. Nakagawa, K. Takahashi, S. Yamanaka, and M. Oshimura. 2010. 'Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy', *Mol Ther*, 18: 386-93.
- Kim, Y G, L Li, and S Chandrasegaran. 1994. 'Insertion and deletion mutants of FokI restriction endonuclease', *Journal of Biological Chemistry*, 269: 31978-82.
- Kim, Y. G., J. Cha, and S. Chandrasegaran. 1996. 'Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 1156-60.
- Klug, A. 2010. 'The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation', *Annu Rev Biochem*, 79: 213-31.

- Konermann, S., M. D. Brigham, A. E. Trevino, J. Joung, O. O. Abudayyeh, C. Barcena, P. D. Hsu, N. Habib, J. S. Gootenberg, H. Nishimasu, O. Nureki, and F. Zhang. 2015. 'Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex', *Nature*, 517: 583-8.
- Kunkel, L. M., A. P. Monaco, E. Hoffman, M. Koenig, C. Feener, and C. Bertelson. 1987. 'Molecular studies of progressive muscular dystrophy (Duchenne)', *Enzyme*, 38: 72-5.
- Lapidos, Karen A., Rahul Kakkar, and Elizabeth M. McNally. 2004. 'The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma', *Circulation research*, 94: 1023-31.
- Legate, K. R., E. Montanez, O. Kudlacek, and R. Fassler. 2006. 'ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 20-31.
- Li, D., Z. Qiu, Y. Shao, Y. Chen, Y. Guan, M. Liu, Y. Li, N. Gao, L. Wang, X. Lu, Y. Zhao, and M. Liu. 2013. 'Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system', *Nat Biotechnol*, 31: 681-3.
- Li, W., F. Teng, T. Li, and Q. Zhou. 2013. 'Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems', *Nat Biotechnol*, 31: 684-6.
- Linton, J. M., G. R. Martin, and L. F. Reichardt. 2007. 'The ECM protein nephronectin promotes kidney development via integrin alpha8beta1-mediated stimulation of Gdnf expression', *Development*, 134: 2501-9.
- Liu, M., Y. Yue, S. Q. Harper, R. W. Grange, J. S. Chamberlain, and D. Duan. 2005. 'Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury', *Mol Ther*, 11: 245-56.
- Lorenzon, Paola, Elena Bandi, Francesca de Guarrini, Tiziana Pietrangelo, Ralf Schäfer, Margit Zweyer, Anton Wernig, and Fabio Ruzzier. 2004. 'Ageing affects the differentiation potential of human myoblasts', *Experimental gerontology*, 39: 1545-54.
- Luu-The, V., N. Paquet, E. Calvo, and J. Cumps. 2005. 'Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction', *Biotechniques*, 38: 287-93.
- Maeder, M. L., S. J. Linder, V. M. Cascio, Y. Fu, Q. H. Ho, and J. K. Joung. 2013. 'CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes', *Nat Methods*.
- Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, and G. M. Church. 2013. 'RNA-guided human genome engineering via Cas9', *Science*, 339: 823-6.
- MD, Bonifati, and Ruzza G. 2000. 'A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy', *Muscle Nerve*, 23: 1344-7.
- Mendell, J.R., R.T. Moxley, R.C. Griggs, M.H. Brooke, G.M. Fenichel, J.P. Miller, W. King, L. Signore, S. Pandya, J. Florence, J. Schierbecker, J. Robison, K. Kaiser, S. Mandel, C. Arfken, and B. Gilder 1989. 'Randomized, Double-Blind Six-Month Trial of Prednisone in Duchenne's Muscular Dystrophy', *New England Journal of Medicine*, 320: 1592-97.
- Millward-Sadler, S. J., and D. M. Salter. 2004. 'Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction', *Ann Biomed Eng*, 32: 435-46.
- Morgan, J. E., E. P. Hoffman, and T. A. Partridge. 1990. 'Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse', *J Cell Biol*, 111: 2437-49.
- Nakamura, A., and S. Takeda. 2009. 'Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy', *Neuropathology*, 29: 494-501.

- Niimi, Tomoaki, Yoshitaka Hayashi, Sugiko Futaki, and Kiyotoshi Sekiguchi. 2004. 'SOX7 and SOX17 Regulate the Parietal Endoderm-specific Enhancer Activity of Mouse Laminin α 1 Gene', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 38055-61.
- Niimi, Tomoaki, Yoshitaka Hayashi, and Kiyotoshi Sekiguchi. 2003. 'Identification of an Upstream Enhancer in the Mouse Laminin α 1 Gene Defining Its High Level of Expression in Parietal Endoderm Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 278: 9332-38.
- Niimi, Tomoaki, Yoshitaka Hayashi, Kiyotoshi Sekiguchi, and Yasuo Kitagawa. 2006. 'The Sp family of transcription factors regulates the human laminin α 1 gene in JAR choriocarcinoma cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1759: 573-79.
- Nishimasu, Hiroshi, F. Ann Ran, Patrick D Hsu, Silvana Konermann, Soraya I Shehata, Naoshi Dohmae, Ryuichiro Ishitani, Feng Zhang, and Osamu Nureki. 'Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA', *Cell*, 156: 935-49.
- Nishiuchi, R., J. Takagi, M. Hayashi, H. Ido, Y. Yagi, N. Sanzen, T. Tsuji, M. Yamada, and K. Sekiguchi. 2006. 'Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant α 3 β 1, α 6 β 1, α 7 β 1 and α 6 β 4 integrins', *Matrix Biol*, 25: 189-97.
- Odenthal, Uwe, Sebastian Haehn, Patrick Tunggal, Barbara Merkl, Dietmar Schomburg, Christian Frie, Mats Paulsson, and Neil Smyth. 2004. 'Molecular Analysis of Laminin N-terminal Domains Mediating Self-interactions', *Journal of Biological Chemistry*, 279: 44504-12.
- Ousterout, D. G., P. Perez-Pinera, P. I. Thakore, A. M. Kabadi, M. T. Brown, X. Qin, O. Fedrigo, V. Mouly, J. P. Tremblay, and C. A. Gersbach. 2013. 'Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients', *Mol Ther*, 21: 1718-26.
- Partridge, T. A. 1991. 'Invited review: myoblast transfer: a possible therapy for inherited myopathies?', *Muscle Nerve*, 14: 197-212.
- Partridge, T. A., J. E. Morgan, G. R. Coulton, E. P. Hoffman, and L. M. Kunkel. 1989. 'Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts', *Nature*, 337: 176-9.
- Pepke, S., B. Wold, and A. Mortazavi. 2009. 'Computation for ChIP-seq and RNA-seq studies', *Nat Methods*, 6: S22-32.
- Perez-Pinera, P., D. D. Kocak, C. M. Vockley, A. F. Adler, A. M. Kabadi, L. R. Polstein, P. I. Thakore, K. A. Glass, D. G. Ousterout, K. W. Leong, F. Guilak, G. E. Crawford, T. E. Reddy, and C. A. Gersbach. 2013. 'RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors', *Nat Methods*.
- Petrof, B. J. 2002. 'Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex', *Am J Phys Med Rehabil*, 81: S162-74.
- PHILIPPE, S. 2007. 'Développement de vecteurs lentiviraux non-intégratifs en vue du transfert de gènes dans le système nerveux central', Paris VII.
- Piccinni, S. A., A. L. Bolcato-Bellemin, A. Klein, V. W. Yang, M. Keding, P. Simon-Assmann, and O. Lefebvre. 2004. 'Kruppel-like factors regulate the Lamal gene encoding the laminin α 1 chain', *J Biol Chem*, 279: 9103-14.
- Qi, L. S., M. H. Larson, L. A. Gilbert, J. A. Doudna, J. S. Weissman, A. P. Arkin, and W. A. Lim. 2013. 'Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression', *Cell*, 152: 1173-83.

- Quenneville, S. P., P. Chapdelaine, J. Rousseau, J. Beaulieu, N. J. Caron, D. Skuk, P. Mills, E. C. Olivares, M. P. Calos, and J. P. Tremblay. 2004. 'Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phiC31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts', *Mol Ther*, 10: 679-87.
- Ran, F. A., L. Cong, W. X. Yan, D. A. Scott, J. S. Gootenberg, A. J. Kriz, B. Zetsche, O. Shalem, X. Wu, K. S. Makarova, E. V. Koonin, P. A. Sharp, and F. Zhang. 2015. 'In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9', *Nature*, 520: 186-91.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, C. Y. Lin, J. S. Gootenberg, S. Konermann, A. E. Trevino, D. A. Scott, A. Inoue, S. Matoba, Y. Zhang, and F. Zhang. 2013. 'Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity', *Cell*, 154: 1380-9.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang. 2013. 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nat Protoc*, 8: 2281-308.
- Rando, T. A. 2007. 'Non-viral gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges', *Biochim Biophys Acta*, 1772: 263-71.
- Rooney, J. E., P. B. Guppur, and D. J. Burkin. 2009. 'Laminin-111 protein therapy prevents muscle disease in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 7991-6.
- Rooney, J. E., P. B. Guppur, Z. Yablonka-Reuveni, and D. J. Burkin. 2009. 'Laminin-111 restores regenerative capacity in a mouse model for alpha7 integrin congenital myopathy', *Am J Pathol*, 174: 256-64.
- Rooney, J. E., J. R. Knapp, B. L. Hodges, R. D. Wuebbles, and D. J. Burkin. 2012. 'Laminin-111 protein therapy reduces muscle pathology and improves viability of a mouse model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy', *Am J Pathol*, 180: 1593-602.
- Rooney, J. E., J. V. Welser, M. A. Dechert, N. L. Flintoff-Dye, S. J. Kaufman, and D. J. Burkin. 2006. 'Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and alpha7 integrin', *J Cell Sci*, 119: 2185-95.
- Rousseau, J., P. Chapdelaine, S. Boisvert, L. P. Almeida, J. Corbeil, A. Montpetit, and J. P. Tremblay. 2011. 'Endonucleases: tools to correct the dystrophin gene', *J Gene Med*, 13: 522-37.
- Sander, J. D., and J. K. Joung. 2014. 'CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes', *Nat Biotechnol*, 32: 347-55.
- Sapranaukas, R., G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2011. 'The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli', *Nucleic Acids Res*, 39: 9275-82.
- Sasaki, Takako, Richard Giltay, Ulrika Talts, Rupert Timpl, and Jan F. Talts. 2002. 'Expression and Distribution of Laminin α 1 and α 2 Chains in Embryonic and Adult Mouse Tissues: An Immunochemical Approach', *Experimental Cell Research*, 275: 185-99.
- Scott, Jeannine M., Sheng Li, Scott Q. Harper, Robert Welikson, Daniel Bourque, Christiana DelloRusso, Stephen D. Hauschka, and Jeffrey S. Chamberlain. 2002. 'Viral vectors for gene transfer of micro-, mini-, or full-length dystrophin', *Neuromuscular Disorders*, 12: S23-S29.
- Silva, George, Laurent Poirot, Roman Galetto, Julianne Smith, Guillermo Montoya, Philippe Duchateau, and Frédéric Pâques. 2011. 'Meganucleases and Other Tools for Targeted Genome Engineering: Perspectives and Challenges for Gene Therapy', *Current gene therapy*, 11: 11-27.

- Simo, P., P. Simon-Assmann, C. Arnold, and M. Kedinger. 1992. 'Mesenchyme-mediated effect of dexamethasone on laminin in cocultures of embryonic gut epithelial cells and mesenchyme-derived cells', *Journal of cell science*, 101: 161-71.
- Slaymaker, I. M., L. Gao, B. Zetsche, D. A. Scott, W. X. Yan, and F. Zhang. 2015. 'Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity', *Science*.
- Sternberg, Samuel H., Sy Redding, Martin Jinek, Eric C. Greene, and Jennifer A. Doudna. 2014. 'DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9', *Nature*, 507: 62-67.
- Sung, Y. H., J. M. Kim, H. T. Kim, J. Lee, J. Jeon, Y. Jin, J. H. Choi, Y. H. Ban, S. J. Ha, C. H. Kim, H. W. Lee, and J. S. Kim. 2014. 'Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases', *Genome Res*, 24: 125-31.
- Sussman, M. 2002. 'Duchenne muscular dystrophy', *J Am Acad Orthop Surg*, 10: 138-51.
- Swadling, Leo, John Halliday, Christabel Kelly, Anthony Brown, Stefania Capone, M. Ansari, David Bonsall, Rachel Richardson, Felicity Hartnell, Jane Collier, Virginia Ammendola, Mariarosaria Del Sorbo, Annette Von Delft, Cinzia Traboni, Adrian Hill, Stefano Colloca, Alfredo Nicosia, Riccardo Cortese, Paul Klenerman, Antonella Folgori, and Eleanor Barnes. 2016. 'Highly-Immunogenic Virally-Vectored T-cell Vaccines Cannot Overcome Subversion of the T-cell Response by HCV during Chronic Infection', *Vaccines*, 4: 27.
- Tan, E. P., Y. Li, M. D. Velasco-Herrera, K. Yusa, and A. Bradley. 2014. 'Off-target assessment of CRISPR-cas9 guiding RNAs in human iPS and mouse ES cells', *Genesis*.
- Thomas, J. McCown. 2005. 'Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in the CNS', *Current gene therapy*, 5: 333-38.
- Timpl, R, H Rohde, P G Robey, S I Rennard, J M Foidart, and G R Martin. 1979. 'Laminin--a glycoprotein from basement membranes', *Journal of Biological Chemistry*, 254: 9933-37.
- Torrente, Y., E. El Fahime, N. J. Caron, N. Bresolin, and J. P. Tremblay. 2000. 'Intramuscular migration of myoblasts transplanted after muscle pretreatment with metalloproteinases', *Cell Transplant*, 9: 539-49.
- Tortora, G.J, and S. R. Grabowski. 1994. *Principes d'anatomie et de physiologie*.
- Tremblay, J. P., F. Malouin, R. Roy, J. Huard, J. P. Bouchard, A. Satoh, and C. L. Richards. 1993. 'Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy', *Cell Transplant*, 2: 99-112.
- Tsai, S. Q., N. Wyvekens, C. Khayter, J. A. Foden, V. Thapar, D. Reyon, M. J. Goodwin, M. J. Aryee, and J. K. Joung. 2014. 'Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing', *Nat Biotechnol*.
- Turck, Natacha, Sophie Richert, Patrick Gendry, Jeanne Stutzmann, Michèle Kedinger, Emmanuelle Leize, Patricia Simon-Assmann, Alain Van Dorselaer, and Jean-François Launay. 2004. 'Proteomic analysis of nuclear proteins from proliferative and differentiated human colonic intestinal epithelial cells', *Proteomics*, 4: 93-105.
- Tzu, J., and M. P. Marinkovich. 2008. 'Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins', *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 199-214.
- van der Oost, John, Edze R. Westra, Ryan N. Jackson, and Blake Wiedenheft. 2014. 'Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems', *Nat Rev Micro*, 12: 479-92.
- Van Ry, P. M., P. Minogue, B. L. Hodges, and D. J. Burkin. 2014. 'Laminin-111 improves muscle repair in a mouse model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy', *Hum Mol Genet*, 23: 383-96.
- Wagner, Kathryn R., Noah Lechtzin, and Daniel P. Judge. 2007. 'Current treatment of adult Duchenne muscular dystrophy', *Biochimica et biophysica acta*, 1772: 229-37.

- Wang, B., J. Li, and X. Xiao. 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.
- Watkins, S. C., E. P. Hoffman, H. S. Slayter, and L. M. Kunkel. 1988. 'Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres', *Nature*, 333: 863-6.
- Welch, E. M., E. R. Barton, J. Zhuo, Y. Tomizawa, W. J. Friesen, P. Trifillis, S. Paushkin, M. Patel, C. R. Trotta, S. Hwang, R. G. Wilde, G. Karp, J. Takasugi, G. Chen, S. Jones, H. Ren, Y. C. Moon, D. Corson, A. A. Turpoff, J. A. Campbell, M. M. Conn, A. Khan, N. G. Almstead, J. Hedrick, A. Mollin, N. Risher, M. Weetall, S. Yeh, A. A. Branstrom, J. M. Colacino, J. Babiak, W. D. Ju, S. Hirawat, V. J. Northcutt, L. L. Miller, P. Spatrick, F. He, M. Kawana, H. Feng, A. Jacobson, S. W. Peltz, and H. L. Sweeney. 2007. 'PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations', *Nature*, 447: 87-91.
- Wilton, S. 2007. 'PTC124, nonsense mutations and Duchenne muscular dystrophy', *Neuromuscul Disord*, 17: 719-20.
- Wilton, S. D., and S. Fletcher. 2008. 'Exon skipping and Duchenne muscular dystrophy: Hope, hype and how feasible?', *Neurol India*, 56: 254-62.
- Wu, Chuan, Fredrik Ivars, Per Anderson, Rupert Hallmann, Dietmar Vestweber, Per Nilsson, Horst Robenek, Karl Tryggvason, Jian Song, Eva Korpos, Karin Loser, Stefan Beissert, Elisabeth Georges-Labouesse, and Lydia M. Sorokin. 2009. 'Endothelial basement membrane laminin [alpha]5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain', *Nat Med*, 15: 519-27.
- Yamanaka, Shinya. 'Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future', *Cell stem cell*, 10: 678-84.
- Yang, Jie, Miriam Seelig, Sylvia Rayner, and Dale E. Bredesen. 1992. 'Increasing the proliferative capacity of muscular dystrophy myoblasts', *Muscle & nerve*, 15: 941-48.
- Yee, K. L., V. M. Weaver, and D. A. Hammer. 2008. 'Integrin-mediated signalling through the MAP-kinase pathway', *IET Syst Biol*, 2: 8-15.
- Yue, Y., and D. Duan. 2003. 'Double strand interaction is the predominant pathway for intermolecular recombination of adeno-associated viral genomes', *Virology*, 313: 1-7.
- Yurchenco, Peter D., Yong Quan, Holly Colognato, Todd Mathus, David Harrison, Yoshihiko Yamada, and Julian J. O'Rear. 1997. 'The α chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its β - and γ -chain partners', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 10189-94.
- Zhang, Goufeng, James J. Ludtke, Christine Thioudellet, Patricia Kleinpeter, Michael Antoniou, Hans Herweijer, Serge Braun, and Jon A. Wolff. 2004. 'Intraarterial Delivery of Naked Plasmid DNA Expressing Full-Length Mouse Dystrophin in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy', *Human Gene Therapy*, 15: 770-82.
- Zhu, C. Q., S. N. Popova, E. R. Brown, D. Barsyte-Lovejoy, R. Navab, W. Shih, M. Li, M. Lu, I. Jurisica, L. Z. Penn, D. Gullberg, and M. S. Tsao. 2007. 'Integrin alpha 11 regulates IGF2 expression in fibroblasts to enhance tumorigenicity of human non-small-cell lung cancer cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 11754-9.
- Zou, K., M. De Lisio, H. D. Huntsman, Y. Pincu, Z. Mahmassani, M. Miller, D. Olatunbosun, T. Jensen, and M. D. Boppart. 2014. 'Laminin-111 improves skeletal muscle stem cell quantity and function following eccentric exercise', *Stem Cells Transl Med*, 3: 1013-22.