

Creation et caractérisation d'une souris transgénique Dmd^{EGFP} pour l'étude de l'expression de la dystrophine

Mina Petkova

La dystrophine est une protéine cytoplasmique qui lie physiquement le cytosquelette à la matrice extracellulaire par le biais du complexe dystrophine-protéines associées (DAPC), assurant ainsi la stabilité du sarcolemme. Des mutations dans le gène *DMD* codant pour la dystrophine, conduisant à l'absence de la protéine, sont à l'origine de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) qui est une maladie liée au chromosome X. La DMD est caractérisée par une atrophie et fibrose musculaire progressive, affectant les fonctions musculaires squelettiques et cardiaques. Les fonctions cognitives, visuelles et gastro-intestinales peuvent aussi être atteintes à différents niveaux. Pour mes travaux de thèse, j'ai généré et caractérisé un nouveau modèle de souris transgéniques rapportrices, dénommé Dmd^{EGFP} , qui exprime une protéine dystrophine endogène fusionnée avec la protéine fluorescente EGFP. La protéine dystrophine est liée dans sa région C-terminale qui est présente dans la majorité des isoformes.

A ce jour, il n'existe aucune souris rapportrice pour la dystrophine et le marquage de la dystrophine doit se faire de manière indirecte par le biais d'anticorps. Pour la construction du vecteur de ciblage génique, la séquence codante pour FLAG-EGFP a été insérée après le dernier exon 79 du gène *Dmd* murin en respectant son cadre de lecture et dans lequel le codon de terminaison était enlevé. En aval de la séquence EGFP, une cassette ayant une séquence codante d'un gène de résistance à la *néomycine*, lui-même flanqué de sites *loxP*, était insérée afin de sélectionner les cellules ES. La recombinaison homologe dans le locus *Dmd* du chromosome X était vérifiée par la technique du Southern blot et les cellules ES étaient injectées dans des blastocystes. Après la transmission germinale, des animaux Dmd^{EGFP} de la génération F1 étaient croisés avec des souris exprimant la Cre recombinase dans le but d'enlever la cassette *néomycine*. Le génotypage des souris était effectué par PCR.

Une expression forte et naturelle de l'EGFP était observée dans les muscles squelettiques, lisses, le cœur, le cerveau et l'œil, ce qui suggère un étiquetage correct de tous les isoformes de la dystrophine. La fluorescence de l'EGFP co-localisait exactement avec la dystrophine dans tous les

sites. Dans le muscle squelettique, la dystrophine ainsi que d'autres protéines de la DAPC étaient exprimées dans des quantités normales et dans la bonne localisation subsarcolemmale. De plus, l'architecture du tissu musculaire squelettique était normale, suggérant que la fonction de la protéine de fusion dystrophine-EGFP était maintenue. Par ailleurs, *in vitro*, l'EGFP est également exprimée dans les fibres musculaires isolées, ainsi que dans les myotubes dérivés des cellules satellites. Par conséquent, cette nouvelle souris rapportrice de la dystrophine devient un outil important pour la visualisation directe et *in vivo* de l'expression de la dystrophine. De plus, le modèle peut être utilisé pour étudier la dystrophine ré-expression *in vivo* ou *ex vivo* après différents protocoles de thérapie génique qui visent à le rétablissement du cadre de lecture ouvert de la dystrophine ou en fibres révertantes d'origine naturelle.