

ECOLE DOCTORALE : DES GENOMES AUX ORGANISMES

UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE

Boulevard François Mitterrand, Evry

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Mention biologie cellulaire et moléculaire

**EVALUATION DE TROIS APPROCHES DE THERAPIE
GENIQUE POUR LE TRAITEMENT DES
DYSFERLINOPATHIES :
MINIPROTEINE, COMPENSATION ET *TRANS*-EPISSAGE**

Présentée par

François MONJARET

GENETHON CNRS UMR8587 LAMBE
Laboratoire Dystrophies Musculaires Progressives

Soutenue publiquement le 11 decembre 2012

devant les membres du jury composé de :

Président : Pr. Francis QUETIER

Rapporteur : Dr. Philippe MOULIER

Rapporteur : Pr. François Jérôme AUTHIER

Examineur : Dr. Eric ALLEMAND

Directeur de thèse : Dr. Isabelle RICHARD

Co-Directeur de thèse : Dr Karine CHARTON

Remerciements

A toutes les personnes ayant permis l'aboutissement de ce travail...

Mes remerciements les plus officiels et respectueux, mais également les plus sincères, vont à ma directrice de thèse, le Dr Isabelle RICHARD, ténor s'il en est des chercheurs dévoués à l'ADN et aux patients (ou plutôt, aux patients et à l'ADN). Elle représente certainement l'idéal de l'encadrante : investie, légitime, dure mais juste, prévoyante, présente, et une véritable envie de transmettre. Je lui dis ici toute ma gratitude pour la confiance et la liberté encadrée dont j'ai bénéficiées, et la remercie de m'avoir fait progresser dans mon métier.

Mes remerciements les plus chaleureux vont également au Dr Karine CHARTON, co-directrice de cette thèse. Aucun mot ne pourra me permettre d'exprimer toute la reconnaissance que je lui porte pour ma survie dans cette aventure. Merci à son optimisme absolument inébranlable, son enthousiasme sans borne, sa patience sans faille, son efficacité redoutable...et ses Chartonades !

Je remercie la JainFoundation ainsi que Généthon pour avoir financé et soutenu ce projet.

J'adresse mes remerciements au Pr Francis Quetier, pour avoir accepté de présider, dans la pure tradition de la DDC, le jury de ma soutenance de thèse. Je remercie également le Dr Philippe MOULIER et le Pr François Jérôme AUTHIER de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ce manuscrit. J'associe à ces remerciements le Dr Eric ALLEMAND pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury.

Un merci tout spécial à celui qui a tout déclenché : « tu sais, la thèse, ce n'est qu'un moyen de valider des acquis ». Salutations à toi Marc BARTOLI, tu avais juste oublié de me parler des quelques centaines (milliers ?) d'heures qui allaient avec !

Merci à Jérôme POUPIOT, ma plus belle découverte personnelle faite dans cette contrée parisienne. Nous avons partagé la science et le sport, dans les bons comme les mauvais moments. Je ne doute pas de voir un jour vieillir nos enfants ensemble.

Un grand Bravo/Merci/Encore aux piliers de l'équipe DDC (qui a dit matriarche ?) Nathalie Bourg-Alibert, Carinne Roudaut, Sylvie Marchand et Laurence Suel-Pétat. La patience, l'implication, le professionnalisme mais aussi l'incomparable relationnel dont vous faites part ont été un ravissement du quotidien durant ces années de labeur. Vous êtes la réussite de Généthon : actives dans l'organisation du Téléthon, efficaces dans l'utilisation des fonds qu'il génère. Merci pour vos ENORMES coups de pouces techniques et théoriques.

Un remerciement particulier à Pierre KLEIN, qui m'a accompagné durant son stage de M2 sur ce projet. Un échange mutuel qui a été, pour moi, très enrichissant. Merci également à Yasmine RABAHI de m'avoir apporté son soutien durant quelques mois.

Merci à mes acolytes de rang social Evelyne Gicquel, Marina Pryadkina et Cécile Patissier ; bonne chance dans votre projet de thèse. Merci également aux anciens, William Lostal et Shabahang-Soheili Tayebbeh 'Shabi', de m'avoir ouvert la voie...

Je tiens à remercier également ceux qui partagent ou ont partagé le quotidien de l'équipe quelques semaines, mois ou années : Azeddine B, Jean-Baptiste B, Luu N, Nathalie D, Raphaël DCI, Florence LR, Jennifer B, Morgane A, Mélanie R, Hélène D, Zakia T, Natacha M, Delphine P, Lucie P, Vincent LC, Aurélien N, Jean Pascal LP...

Vient ici la partie moins glorifiante mais pourtant tout aussi sincère des remerciements groupés. Si votre nom est dans cette liste, c'est que je souhaite réellement vous témoigner ma gratitude. Merci donc à Karim G, Lionel G, Séverine C, Laetitia WV, David F, Fedor S, David I, Jérôme D, Jeremy D, Madeleine Z, Fleur M et Chloé AT (les apprenties chercheuses) Fanny C, Guillaume D, Lilian S, Daniel S, Martial DC les sympathiques écornifleurs de la salle café, au café de Maggy et Bailla, aux gardiens « ouvreurs de porte » du WE...

Je tiens à remercier tous les membres de l'animalerie, de l'expérimentation animale et du service d'histologie, ainsi que ceux du séquençage, de la production de vecteurs, de l'imagerie et de l'informatique.

Merci à ma famille pour son soutien et ses encouragements, sa présence discrète mais rassurante.

La dernière place, comme dans toute bonne publication, revient à l'élément clef et moteur de mon existence, ma chère et tendre Marianne. La distance et les soirées de travail n'ont pas eu d'emprise sur l'amour que je te porte. Merci d'être la chaque jours de ma vie.

A mes grands parents, piliers de ma conscience

A mes parents, piliers de mon équilibre

A mes sœurs, piliers de ma liberté

A Marianne,

mon amour...

Sommaire

Table Des Figures.....	7
Liste des Tableaux.....	11
Abréviations.....	13
PREAMBULE.....	19
INTRODUCTION.....	21
I. LE MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE : ANATOMIE ET PATHOLOGIES.....	23
A. Biologie du muscle strié squelettique chez l'Homme	23
1. Organisation du muscle strié squelettique	23
2. Les structures membraneuses dans le muscle strié squelettique.....	27
3. Processus dans le muscle liés à l'activité des membranes.....	32
B. Pathologies du muscle	38
1. Les dystrophies musculaires des ceintures.....	39
2. Les myopathies distales	42
C. LGMD2B/2L et MM/MMD3 : des tableaux cliniques proches, des origines différentes.....	43
1. Les dysferlinopathies : un coupable, plusieurs maladies	43
2. Les anoctaminopathies liées à ANO5 : un autre coupable, les « mêmes » maladies	48
II. BIOLOGIE DE LA DYSFERLINE.....	53
A. Les ferlines	53
1. La famille des ferlines	53
2. Domaines caractéristiques des ferlines	53
3. Classification et description des Ferlines	56
B. Le gène DYSF et la protéine dysferline.....	57
1. Les messagers de DYSF :	57
2. La protéine dysferline	59
3. Localisation tissulaire et cellulaire de la Dysferline	61
4. Les fonctions de la dysferline	63
5. Protéines interagissant avec la dysferline	67
C. Modèles cellulaires et modèles animaux associés aux dysferlinopathies	68
1. Lignées cellulaires déficientes en dysferline:	68
2. Modèles vertébrés	69
III. BIOLOGIE DE L'ANOCTAMINE 5.....	71
A. Le groupe des Anoctamines	71
B. Fonction des anoctamines.....	74
C. Données actuelles sur ANO5	75

1. Gène et isoformes.....	75
2. Localisation et fonction	75
IV. THERAPIES DES DYSFERLINOPATHIES.....	77
A. Approche thérapeutique par molécules chimiques.....	77
1. Pharmacopée visant les symptômes :	77
2. Pharmacopée visant à restaurer une dysferline fonctionnelle :	78
B. Thérapie génique conventionnelle des Dysferlinopathies.....	78
C. Thérapie par surexpression d'une protéine compensatrice.....	81
D. Thérapie ciblant les ARNs	81
1. Biologie des ARN	81
2. L'épissage, une étape clef dans le remodelage de l'information	83
3. L'ARN, cible en thérapie génique	88
4. Le <i>trans</i> -épissage.....	88
V. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE LA THESE :	96

RESULTATS.....	99
-----------------------	-----------

PARTIE I : Compensation de l'absence de dysferline par une forme courte identifiée dans le cerveau.

I. CONTEXTE ET RATIONNEL DE L'ETUDE.....	101
II. STRATEGIE	102
III. RESULTATS.....	102
A. Clonage de la « BrainDysferlin » et production d'un AAVr.....	102
1. Identification de la séquence « BrainDysferlin ».....	102
2. Clonage et production d'un AAV8r-BrainDysferlin.....	103
B. L'AAV8r-BrainDysferlin est correctement exprimé après injection en IM dans la souris	104
C. L'AAV8r-BrainDysferlin présente un effet toxique à une dose seuil.....	105
D. Evaluation du potentiel thérapeutique de l'AAV8r-BrainDysferlin sur les souris Bla/J.....	106
1. La BrainDysferlin ne modifie pas l'index de centronucléation des muscles Bla/J.....	107
2. La BrainDysferline restaure la résistance au stress du muscle Bla/J traité.....	109
E. La séquence de la forme BrainDysferlin est erronée	112
IV. CONCLUSION	114

PARTIE II: Compensation de l'absence de dysferline par surexpression d'ANO5.

I. CONTEXTE ET RATIONNEL DE L'ETUDE.....	117
II. STRATEGIE	117
III. RESULTATS.....	118
A. Mise au point d'outils de détection de l'anoctamine 5	118
1. Validation des PCRq de l'anoctamine 5 humaine et murine.	118
2. Synthèse et validation d'un anticorps Anti-ANO5	118
B. Analyse de l'expression d'ANO5 chez la souris C57Bl6 et Bla/J	119

1.	ANO5 est majoritairement exprimée dans le muscle squelettique	119
2.	ANO5 est sous exprimée dans le modèle BLA/J	120
C.	Analyse de l'expression d'ANO5 chez l'Homme et construction du vecteur AAVr	121
1.	L'isoforme majoritaire anoctamine 5 dans le muscle humain est la forme entière	121
2.	Clonage de l'anoctamine 5 et production d'un AAV8r	122
D.	Evaluation du potentiel thérapeutique de l'AAV8r-hANO5	123
1.	L'AAV8r-hANO5 ne présente pas d'effet toxique aux doses et âges considérés	123
2.	L'AAV8r-hANO5 ne corrige pas le phénotype BLA/J	125
IV.	CONCLUSION	128

PARTIE III : Modification de l'ARN messager dysferline par *trans*-épissage.

I.	CONTEXTE ET RATIONNEL DE L'ETUDE.....	133
II.	STRATEGIE	134
III.	RESULTATS.....	135
A.	Détermination d'outils pertinents pour l'étude	135
1.	Modèles cellulaires humains et murins	135
2.	Optimisation des capacités d'introduction d'ADN exogène dans chaque modèle cellulaire	137
3.	Modèles murins	139
B.	Design et construction des RTM et du minigène	140
1.	Construction des RTM	140
2.	Minigène	142
3.	Outils de détection	142
C.	Evaluation du <i>trans</i> -épissage sur le minigène	143
1.	Le minigène et le RTM sont correctement transcrits, et produisent une molécule chimérique	143
2.	L'analyse par WB révèle un profil d'expression protéique complexe, dû en partie à l'expression du RTM seul.	145
D.	Validation expérimentale des résultats de <i>trans</i> -épissage	148
1.	Analyse au niveau nucléaire	149
2.	Analyse au niveau protéique	154
E.	L'utilisation de nouveaux RTM valide la possibilité de <i>trans</i> -épissage sur le minigène au niveau ARN et protéine	156
1.	Un RTM avec une séquence codante différente du minigène permet de visualiser une protéine résultant du <i>trans</i> -épissage	156
2.	Les artéfacts de RT-PCR persistent avec le RTM-OptiDysf	158
3.	Le <i>trans</i> -épissage du minigène est confirmée par un autre RTM	159
F.	Evaluation du <i>trans</i> -épissage sur la dysferline endogène	160
1.	Le <i>trans</i> -épissage de la dysferline endogène est possible	160
2.	La recherche de la protéine résultant du <i>trans</i> -épissage TS endogène révèle des évènements non attendus	161
IV.	CONCLUSION	163

DISCUSSION.....165

I.	THERAPIES GENIQUES COMPENSATRICES PAR AAVR	167
A.	Compensation avec une miniforme	167
1.	Origine de la séquence BrainDysferlin	167
2.	Intérêts/inconvénients d'une miniforme	168
B.	Compensation par une tierce protéine	169

C.	La toxicité des transgènes	170
1.	La toxicité de l'isoforme BrainDysferlin	170
2.	La non toxicité de l'anoctamine 5	171
D.	Choisir la bonne cible thérapeutique	172
E.	Enseignements sur les fonctions de la dysferline et de l'Anoctamine 5	173
1.	« L'autre » fonction de la dysferline.....	173
2.	L'anoctamine 5 dans la réparation membranaire	175
II.	THERAPIE GENIQUE PAR CHIRURGIE DES ARN VIA SMART	176
A.	Questions soulevées sur les techniques de mise en évidence de l'ARN <i>trans</i> -épissé.....	177
1.	Les PCR sur plasmide	178
2.	Les contrôles plus complexes	178
B.	Pertinence du modèle minigène.....	180
C.	L'expression du RTM seul	182
1.	Le RTM est un transgène comme les autres.....	182
2.	Le <i>cis</i> épissage du RTM crée des ORF imprévisibles	183
3.	L'expression du RTM en tant que transgène limite l'intérêt du <i>trans</i> -épissage.....	185
D.	Perspectives thérapeutiques pour les dysferlinopathies.....	185
1.	Améliorer l'efficacité du <i>trans</i> -épissage.....	185
2.	Envisager d'autres possibilités thérapeutiques pour les dysferlinopathies.....	187
III.	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	189

MATERIEL ET METHODE.....191

Fiche technique n° 1 : Constructions plasmidiques.....	193
Fiche technique n° 2 : Mutagénèse dirigée.....	195
Fiche technique n° 3 : Production de vecteur AAVr et lentivirus.....	196
Fiche technique n° 4 : Culture cellulaire et Méthodes de transfection, nucléofection et transduction.....	202
Fiche technique n° 5 : Extraction d'ARN et Transcription Inverse	206
Fiche technique n° 6 : PCR et PCR quantitative en temps réel	209
Fiche technique n° 7 : Extraction de protéine, WesternBlot et immunoprécipitation	211
Fiche technique n° 8 : Expérimentation animale.....	215
Fiche technique n° 9 : Méthode d'analyse par Large Strain Injury (LSI)	217
Fiche technique n° 10 : Test de réparation membranaire sur fibres isolées	220
Fiche technique n° 11 : Logiciels de Bioinformatique	222
Fiche technique n° 12 : Analyses statistiques	223
Fiche technique n° 13 : Marquages histologiques, Immunomarquages et Imagerie	224

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES.....	227
-----------------------	-----

ANNEXES.....245

I. ANNEXE I : PROTEINES IMPLIQUEES DANS LES LGMD.....246

A.	Les formes autosomiques dominantes des LGMD.....	246
B.	Les formes autosomiques récessives des LGMD	246

II. ANNEXE II : LES PROTEINES DE LA FAMILLE DES FERLINES.....249

A.	La myoferline.....	249
----	--------------------	-----

B.	L'otoferline.....	250
C.	Fer1-L4, Fer1-L5 et Fer1-L6.....	251
III.	ANNEXE III : LES PROTEINES PARTENAIRES DE LA DYSFERLINE.....	253
A.	AHNAK.....	253
B.	Calpaine3.....	253
C.	Annexines A1 et A2.....	254
D.	L'alpha tubuline.....	255
E.	HDAC6.....	256
F.	Cavéoline-3.....	256
G.	Mitsugumine 53.....	257
H.	DHPR.....	258
I.	Affixine.....	259
J.	Myoferline.....	259
K.	Partenaires potentiels.....	259
IV.	ANNEXE IV : LES MODELES MURINS DEFICIENTS EN DYSFERLINE.	263
A.	Les souris SJL/J :.....	263
B.	Les souris Dysf -/- (Delta ex45) de R.Brown :.....	264
C.	Les souris A/J et Bla/J :.....	264
D.	Les souris B6.129-Dysf ^{tm1Kcam} /J (lignée Dysf-/- Campbell) :.....	265
V.	ANNEXE V : PRINCIPALES PREUVES DE PRINCIPE ETABLIES PAR TRANS- EPISSAGE :	267
A.	Amyotrophie spinale : Preuves de principe établies par 3'TS.....	267
B.	Démence frontotemporale avec syndrome parkinsonien : Preuve de principe établie par 3'TS.....	268
C.	Mucoviscidose : Preuve de principe établie par 3'TS et 5'TS.....	268
D.	Épidermolyse bulleuse récessive liée à COL7A1 : 3'TS et DbITS.....	269
E.	Épidermolyse bulleuse récessive liée à PLEC1 : 5'TS.....	270
F.	Épidermolyse bulleuse dominante : 5'TS.....	271
G.	β-thalassémie : 5'TS.....	272
H.	Hémophilie de type A : 3'TS.....	272
I.	Hyperimmunoglobulinémie liée à l'X : 3'TS.....	273
J.	Dystrophie Musculaire de Duchenne : Double TS.....	273
VI.	ANNEXE VI : LISTE DES OLIGONUCLEOTIDES UTILISES DANS CE RAPPORT	275
	ARTICLES.....	281

Table Des Figures

Figure 1 : Composition générale du muscle strié squelettique.	24
Figure 2 : Organisation de la fibre musculaire, de la myofibrille et du sarcomère.	26
Figure 3 : Interaction du muscle avec le système nerveux et le système sanguin.	27
Figure 4 : Observation en microscopie électronique, et représentation schématique des triades.	29
Figure 5 : L'interaction entre DHPR et Ryr permet la libération massive de Ca^{2+} dans le cytoplasme.	30
Figure 6 : Observation microscopique des enlargeosomes.	31
Figure 7 : Evènements spatiaux et temporels conduisant à la fusion des myoblastes.	33
Figure 8 : Les vésicules GLUT4 dans l'homéostasie du glucose.	34
Figure 9 : Recyclage du récepteur à la transferrine.	35
Figure 10 : Réparation de la bicouche phospholipidique.	36
Figure 11 : Processus possibles de réparation d'une lésion membranaire	37
Figure 12 : Elimination de la lésion membranaire par endocytose.	38
Figure 13 : Localisation et nombre de cas rapportés pour chaque mutation pathogène connue de la dysferline.	46
Figure 14 : Mutations connues de l'anoctamine 5	51
Figure 15 : Les deux types de domaines C2.	54
Figure 16 : Le domaine Dysf : structure en tandem et structure 3D.	55
Figure 17 : Comparaison des différents domaines conservés de la famille des ferlines chez l'Homme.	56
Figure 18 : Localisation de l'exon 1 alternatif inclus dans les transcrits résultant de l'activité du promoteur DYSF-v1.	57
Figure 19 : Phase de lecture des exons de DYSF et positionnement des 4 éléments alternatifs.	58
Figure 20 : Schématisation de la dysferline ancrée à la membrane.	60
Figure 21 : Représentation d'un homodimère créé par l'association de deux dysferlines.	61
Figure 22 : Localisation de la dysferline dans différents types cellulaires.	63
Figure 23 : Schématisation du rôle de la dysferline dans le transport vésiculaire en réponse à un stress mécanique.	65

Figure 24 : Réseau d'interactions de la dysferline.....	68
Figure 25 : Représentation schématique des anoctamines présentes chez les vertébrés.....	73
Figure 26 : Topologie des anoctamines.	74
Figure 27 : Les isoformes ANO5 murines dans le muscle et le cerveau.....	75
Figure 28 : Localisation cellulaire d'ANO5.	76
Figure 29 : Schéma des cassettes portant les deux fragments du messager de la dysferline.	80
Figure 30 : Consensus des SD, BP et SA chez l'Homme.....	84
Figure 31 : ISE, ESE et protéines SR activent le splicéosome	84
Figure 32 : listes des 12 protéines SR connues et site de reconnaissance de SRSF1.....	85
Figure 33 : ISS, ESS et protéines hnRNP inhibent le splicéosome	86
Figure 34 : Cycle d'assemblage/désassemblage du splicéosome lors de l'épissage d'un intron.....	87
Figure 35 : Le <i>trans</i> -épissage chez le trypanosome.	89
Figure 36 : Utilisation des ribozymes de type I en thérapie génique.....	91
Figure 37 : Le <i>trans</i> -épissage thérapeutique utilisant l'endonucléase de <i>M. jannaschii</i>	92
Figure 38 : Composition d'un RTM.	93
Figure 39 : Les différents SMaRT.	94
Figure 40: séquence du variant décrit dans le brevet.....	103
Figure 41: carte du plasmide pEGFP-BrainDysferlin et expression en HER911.	104
Figure 42: WB de détection de la BrainDysferlin dans des broyats de muscles de souris. .	105
Figure 43: analyse histologique des muscles de souris C57Bl6 injectés ou non avec l'AAV8r- BrainDysferlin.....	106
Figure 44: Analyse histologique des coupes musculaires de souris et index de centronucléation.....	108
Figure 45: HPS de LA de souris trois jours après LSI	110
Figure 46 : analyse de la fragilité membranaire après traitement LSI.....	111
Figure 47 : surface relative des fibres positives au bleu evans	111
Figure 48: amorces et RT-PCRs spécifiques de la BrainDysferlin.	113
Figure 49: analyse de l'expression de la dysferline par RT-PCR dans le cerveau et le muscle humain.....	114
Figure 50 : marquage IHF d'ANO5 sur cryosection de TA de souris	119
Figure 51 : analyse par RT-PCRq de l'expression d'ANO5 dans différents tissus de souris	120
Figure 52 : analyse quantitative de l'expression d'ANO5 dans les souris BLA/J à 4 mois...	121

Figure 53 : analyse RT-PCR des transcrits ANO5 dans différents muscles humains	122
Figure 54 : carte de la cassette AAV du plasmide pAAV-hANO5.....	123
Figure 55 : quantification de l'expression d'ANO5h dans le muscle et le cœur après injection d'AAV.....	124
Figure 56 : histologie du muscle et du cœur de souris C57Bl6 traitées avec l'AAV8r-hANO5 en IV.....	125
Figure 57 : HPS et indice de centronucléation des souris BLA/J surexprimant l'anocamine 5.....	126
Figure 58 : surface relative des fibres positives au bleu evans après LSI	127
Figure 59 : analyse de la réparation membranaire par suivi de l'entrée de fluorescence dans la fibre lésée.....	128
Figure 60 : stratégies pour le <i>trans</i> -épissage de la dysferline.....	135
Figure 61 : étude de l'expression de la dysferline dans les modèles cellulaires utilisés pour l'étude.....	136
Figure 62 : efficacité de transfection des cellules HT1080 par le Fugene HD.....	138
Figure 63 : comparaison des méthodes de nucléofection et transduction lentivirale sur les myoblastes	139
Figure 64 : carte schématique des RTMs construits.....	141
Figure 65 : les différents BD des RTM-hDysf et RTM-mDysf.....	141
Figure 66 : carte du minigène.....	142
Figure 67 : outils de détection des ARN et des protéines	143
Figure 68 : RT-PCR mettant en évidence l'expression du minigène, du RT, et de la molécule chimérique d'intérêt.....	144
Figure 69 : séquençage du produit d'amplification de la PCR détectant le <i>trans</i> -épissage .	145
Figure 70 : PCR de contrôle de la non recombinaison des plasmides minigène et RTM.....	145
Figure 71 : profil d'expression protéique du <i>trans</i> -épissage sur minigène en cellules HER911.....	147
Figure 72 : comparaison du niveau d'expression de la protéine à 32kDa	148
Figure 73 : séquençage de l'amplicon correspondant à l'ARN chimérique attendu avec le RTM1h-Δ4ATG.....	150
Figure 74 : analyse par RT-PCR des ARN résultant de l'utilisation des RTM non-fonctionnels.	150
Figure 75 : PCR sur les ADNs plasmidiques ayant passés 48 h dans les cellules transfectés	152

Figure 76 : analyse des capacités d'erreurs induites par l'étape de transcription inverse et la polymérase.....	153
Figure 77 : profil d'expression protéique des RTM1h aux ORF mutées.....	155
Figure 78 : profil protéique des RTM non-fonctionnels co-transfectés avec le minigène ...	156
Figure 79 : analyse par WB du RTM-OptiDysf.....	158
Figure 80 : analyse par RT-PCR du RTM-OptiDysf.....	159
Figure 81 : <i>trans</i> -épissage du minigène par le RTM5-hDysf-d4ATG	160
Figure 82 : profil protéique après IP Flag des cellules HT1080 transfectées par le RTM1hDysf	162
Figure 83 : représentation schématique de la dysferline et des miniformes Minidysferline et BrainDysferlin.....	171
Figure 84 : Test de l'activité d'ANO5 en tant que scramblase.....	176
Figure 85 : liste des différents artéfacts possibles durant la recherche de l'ARN <i>trans</i> -épissé	177
Figure 86 : création d'un artéfact par appariement du minigène et du RTM durant la PCR	180
Figure 87 : l'épissage en cis des RTM1-hDysf et RTM-OptiDysf crée des protéines de tailles différentes	184

Liste Des Tableaux

Table 1 : Tableau des huit LGMD1 à transmission autosomique dominante et des gènes ou locus associés.....	40
Table 2 : Tableau des dix-sept LGMD2 à transmission autosomique récessive et des gènes ou locus associés.....	41
Table 3 : Registre des 21 myopathies distales répertoriées à ce jour.....	42
Table 4 : Les sept mutations considérées comme ayant un effet fondateur dans des populations géographiquement ou religieusement isolées (UMD/dysf).....	47
Table 5 : Principales mutations récurrentes de la dysferline.....	47
Table 6 : Numéros et mutations portées par les quatre lignées de myoblastes humains immortalisées existantes.....	69
Table 7 : Les lignées murines déficientes en dysferline.....	69
Table 8 : Les anoctamines chez l'Homme.....	71
Table 9 : Principales publications montrant des corrections par SMaRT de gènes impliqués dans des maladies génétiques.....	95
Table 10 : liste des ORF potentielles pour le minigène et le RTM.....	147
Table 11 : contrôles mis en place pour la validation d'un évènement de <i>trans</i> -épissage	151

Abréviations

AA : Acides Aminés
AAV : Virus associé aux adénovirus (Adeno-Associated Virus)
AAVr : Virus associé aux adénovirus recombinant
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNg : Acide DésoxyriboNucléique génomique
AON : Oligonucléotides antisens (Antisense Oligonucleotide)
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARNpm : ARN pré-messenger
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert
ATP: Adénosine-TriPhosphate
bp : paire de bases
BE : Bleu Evans
Ca²⁺ : Ion calcium
CaCC : Canal chlore dépendant du calcium
CCP : Clathrin-Coated Pits
CDS : sequence codante de l'AND (Coding DNA Sequence)
CK : Creatine Kinase
CMD : Dystrophie musculaire congénitale (Congenital Muscular Dystrophy)
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : CytoMegalo Virus
CNF : CentroNucleation Factor
CoAA : (intro p82/87)
Da : Dalton
DHPR : Récepteur à la dihydropyridine (DiHydroPyridine Receptor)
DFNB : Deafness autosomal recessive
DMAT : Myopathie distale avec atteinte du tibialis antérieur (Distal Myopathy with Anterior Tibial onset)
DMD : Duchenne Muscular Dystrophy
DMEM : Dubelcco's Modifies Eagle Medium
DTT : Di-ThioTreitol
DYSF : Dysferline
EBD : Evans Blue Dye
EDL : Extensorum Digitorum Longus
EGFR : Récepteur au facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor)
ESE : Exonic Splicing Enhancer
ESS : Exonic Splicing Silencer

Etn : Elément transposable
FDB : Flexor Digitorum Brevis
FKRP : FuKutin Related Protein
GDD : Dysplasie gnatho-diaphysaire (GnathoDiaphyseal Dysplasia)
GFP : Green Fluorescent Protein
GST : Glutathione S Transférase
GTP : Guanosine TriPhosphate
h : heure
HPS : Hématoxyline-Phloxine-Safran
IHC : ImmunoHistoChimie
IM : IntraMusculaire
IntS : Intron Synthétique
IP : ImmunoPrécipitation
IR : Récepteur à l'insuline (Insuline Receptor)
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ISE : Intronic Splicing Enhancer
ISS : Intronic Splicing Silencer
ITR : Inverted Terminal Repeat
IV : IntraVeineuse
kb : kilobases
kDa : kiloDalton
kg : kilogramme
LGMD : Limb Girdle Muscular Dystrophy
LSI : Large Strain Injury
MAC : Complexe d'attaque membranaire (Membrane Attack Complex)
MD : Myopathie Distale
ml : millilitre
mM : milliMolaire
MM : Myopathie de Miyoshi
MOPS : MOmorphino PropaneSulfonic acid
NLS : Nuclear Localization Signal
nm : nanomètre
NMD : Nonsense Mediated Decay
ng : nanogramme
nt : nucléotide
ORF :Open Reading Frame
pAAV : plasmid AAV
PB : Point de Branchement
PBS : Phosphate Buffer Saline
PD : Proximo-Distal
PCR : Polymerase Chain Reaction
PCRq : PCR quantitative
QUA : Quadriceps
Rep : Replicase
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
rpm : Rotation Par Minute

RS : Réticulum Sarcoplasmique
RSj : Réticulum Sarcoplasmique de jonction
RT : Transcription Inverse (Reverse Transcription)
RTM : Molécule ARN de *trans*-épissage (RNA-*Trans*-splicing Molecule)
Ryr : Ryanodine receptor
SA : Site Accepteur
SD : Site Donneur
S.E.M : Erreur standard de la moyenne (Standard Error of the Mean)
SMaRT : Spliceosome Mediated RNA *Trans*-splicing
SVF Sérum de Veau Foetal
SNP : Single Nucleotide Polymorphisme
TA : Tibialis Anterior
TGFR : transforming growthfactor receptor
TTBS : Tween Tris Buffered Saline
UTR: UnTranslated Region
vg : génomes viraux (viral genome)
WB : Western Blot
WPRE : Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element
WT: Wild Type
µm : micromètre

PREAMBULE

Les études décrites dans ce rapport s'inscrivent dans le projet de recherche de l'équipe « Dystrophies musculaires progressives » du laboratoire Généthon. Ce groupe de recherche travaille à la mise en place de stratégies thérapeutiques pour les dystrophies des ceintures de type récessives (LGMD2), des maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence musculaire conduisant à une altération et à une perte des fonctions locomotrices. Plusieurs axes de recherche sont explorés par l'équipe afin d'identifier des cibles d'intérêt pour proposer des traitements comme l'amélioration du diagnostic, l'analyse de la physiopathologie, l'analyse protéomique et les interactomes, l'analyse des profils miRNA et épigénétiques ou encore l'étude des modèles murins. Depuis près de 15 ans, la dysferline, impliquée dans la LGMD2B et la Myopathie de Miyoshi, fait partie des protéines d'intérêt étudiées par cette équipe.

Le travail de thèse rapporté dans le présent document a eu pour objectif de proposer et d'évaluer le potentiel de solutions thérapeutiques nouvelles pour les maladies génétiques liées à une déficience en dysferline. Trois voies thérapeutiques ont été explorées : (1) la compensation par une isoforme courte naturelle ; (2) la compensation par une tierce protéine ; et (3) la thérapie génique par chirurgie de l'ARN. La première partie de l'introduction s'attache à replacer l'objectif thérapeutique dans son contexte biologique et médical. Elle présente le muscle strié squelettique et ses pathologies, et en particulier les dystrophies musculaires des ceintures et les myopathies distales. Les myopathies liées aux gènes DYSF et ANO5 y seront particulièrement détaillées. Les seconde et troisième parties de l'introduction présentent respectivement les données connues sur la dysferline et les anoctamines (gène, ARN, protéine et fonction). Enfin, la quatrième partie regroupe les informations nécessaires à la compréhension et la critique de l'approche thérapeutique par chirurgie des ARN. Elle présentera en particulier le *trans*-épissage, sujet majeur développé dans le cadre de cette thèse.

INTRODUCTION |

I. Le muscle strié squelettique : anatomie et pathologies

Il existe 2 types de muscles : les muscles **lisses** et les muscles **striés**, ces derniers regroupant le muscle **cardiaque** et les muscles **squelettiques**. Les muscles lisses et le muscle cardiaque partagent la caractéristique d'être soumis à un contrôle involontaire par le système nerveux autonome (ou parasymphatique), alors que les muscles squelettiques sont sous le contrôle du système nerveux central. Le corps humain est constitué de près de **650 muscles squelettiques**, responsables du contrôle de sa locomotion et de sa respiration. La masse totale de ces tissus représente généralement 30 à 40% de la masse totale du corps. Seuls les muscles striés squelettiques abordés dans ce mémoire feront l'objet d'une présentation détaillée.

A. Biologie du muscle strié squelettique chez l'Homme

Le muscle strié squelettique assure la génération de mouvements grâce à des caractéristiques particulières : la contractilité, l'excitabilité, l'élasticité et la tonicité. Il joue également un rôle primordial dans le contrôle du **métabolisme** en permettant le maintien de l'homéostasie glucidique et en constituant une source d'acides aminés en cas de carence vitale.

1. Organisation du muscle strié squelettique

Organisation générale

Le muscle squelettique est composé d'un ensemble de populations cellulaires, et en particulier des **fibres musculaires**. Ces fibres musculaires sont regroupées en faisceaux, eux même regroupés pour former un muscle (**Figure 1**). C'est cette organisation en grandes unités parallèles qui permet au muscle de se **contracter**.

L'épimysium est le tissu conjonctif fibreux qui enveloppe l'ensemble du muscle. Il permet le maintien et la protection du muscle lors de la contraction. Il est également impliqué dans le lien qui unit le muscle à l'ossature : ses extrémités forment les tendons qui assurent l'ancrage du tissu musculaire au squelette osseux. Le muscle est ensuite séparé en faisceaux par le **périmysium**. Ce dernier permet la structuration du muscle et intervient comme l'épimysium dans l'ancrage du muscle à l'ossature. Il enveloppe entre 10 et 100 fibres musculaires, chacune d'entre elles étant délimitée par une gaine conjonctive : t **l'endomysium**. Les fibres musculaires constituent un syncytium formé par la fusion de myoblastes. Chaque fibre musculaire possède donc plusieurs noyaux. Chez l'Homme, une

fibres matures peuvent avoir un diamètre de 10 à 100 μm et atteindre jusqu'à 30 cm de long.

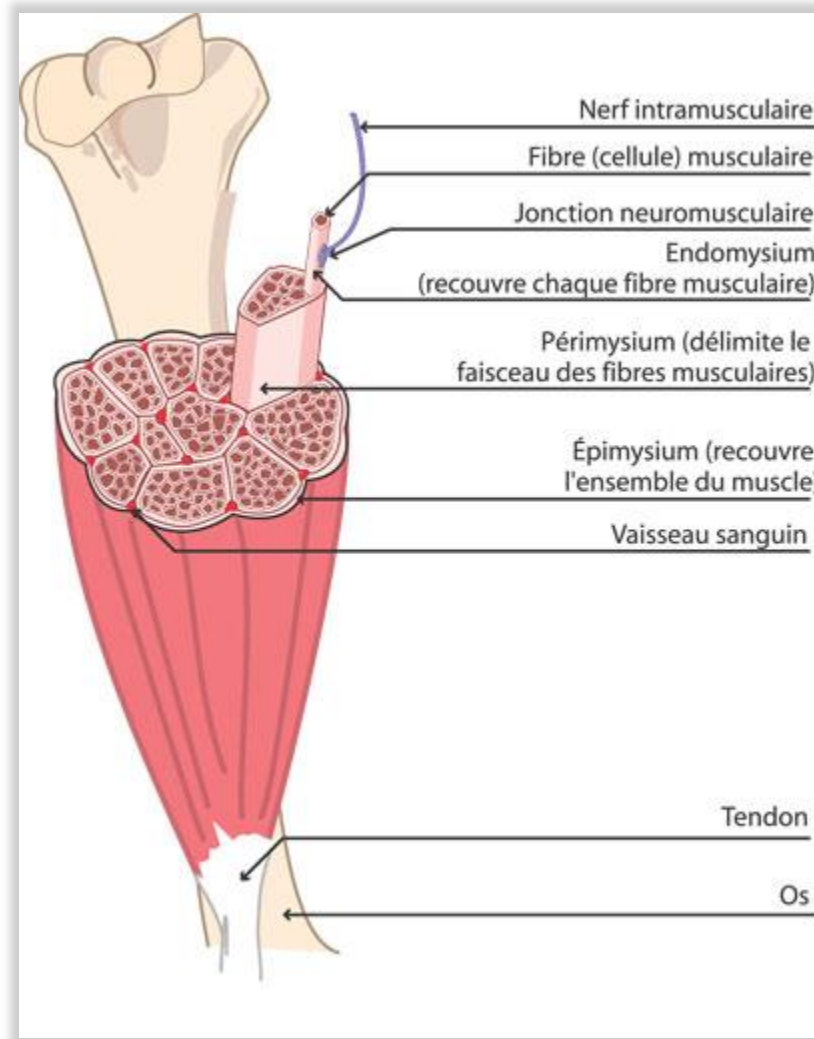


Figure 1 : Composition générale du muscle strié squelettique.

Représentation schématique d'un muscle (Image issue de www.musclepedia.org). La particularité du tissu musculaire est la similarité de structuration qui peut être retrouvée à plusieurs échelles d'observation. Ainsi, que ce soit au niveau des faisceaux composant le muscle, d'une cellule composant ce faisceau ou même d'une molécule constituant cette cellule, une même structure y est retrouvée : un « fagot » de grandes unités longitudinales parallèles.

Au cours du développement, la majorité des cellules myogéniques se différencie en myoblastes, qui fusionnent en myotubes et mûrissent en fibres musculaires. Toutefois, une sous-population de ces cellules myogéniques reste quiescente et demeure en l'état à la surface des fibres musculaires. Ces cellules appelées **cellules satellites** interviennent dans le processus de réparation et de régénération du muscle. Les cellules satellites quiescentes sont localisées dans un dédoublement de la lame basale.

Organisation des fibres musculaires et de l'unité contractile

Les fibres musculaires sont délimitées par leur membrane plasmique, **le sarcolemme**, et une lame basale, l'endomysium. Cette matrice extracellulaire est essentiellement constituée de collagène. Elle assure la stabilité de la fibre musculaire et la cohésion du tissu musculaire par ses connexions avec les fibres musculaires voisines. Les fibres musculaires présentent quatre caractéristiques notables : le sarcolemme est invaginé à de multiples endroits de la cellule, le cytoplasme est extrêmement réduit, les noyaux sont exclus à la périphérie de la cellule, et enfin le réticulum endoplasmique lisse est très développé et spécialisé en un organite appelé **réticulum sarcoplasmique** (Figure 2).

Chaque fibre musculaire contient des dizaines de **myofibrilles**, elles-mêmes composées de **sarcomères** (Figure 2). Les sarcomères résultent de l'agencement de nombreuses protéines aux capacités contractiles, sensibles et structurales qui composent quatre types différents de filaments : les filaments épais de myosine, les filaments fins d'actine, les filaments de titine et enfin les filaments de nébuline. Leur composition protéique crée une alternance régulière de disques sombres et de disques clairs, observée en microscopie électronique.

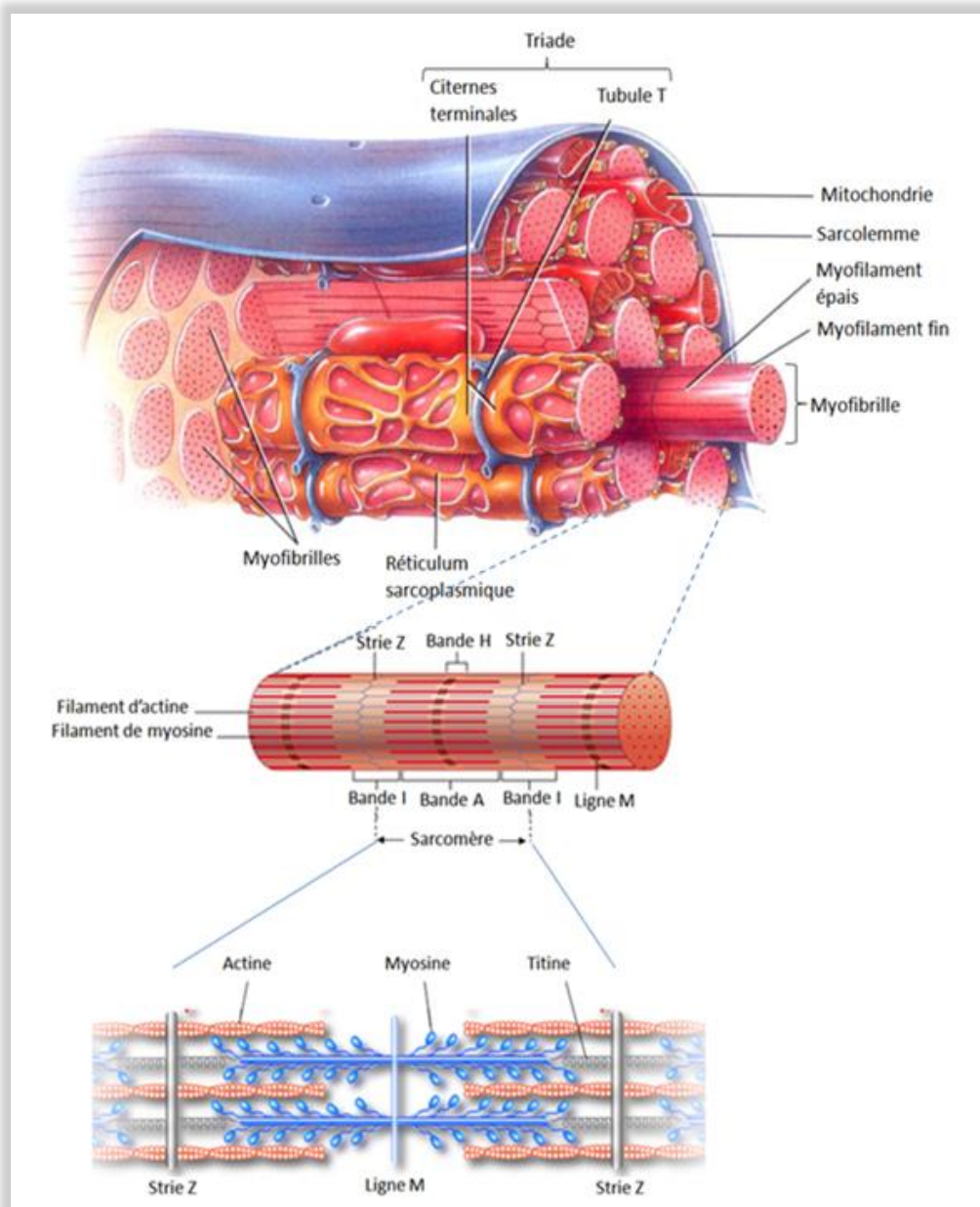


Figure 2 : Organisation de la fibre musculaire, de la myofibrille et du sarcomère.

La fibre musculaire, délimitée par le sarcolemme, contient des dizaines de myofibrilles. Chaque myofibrille est un enchaînement de sarcomères, composés de différents types de filaments. Leur répartition crée une alternance régulière de disques sombres et de disques clairs : les disques sombres forment la bande A qui est divisée en deux par une bande plus claire, la bande H, centrée par la ligne M. Les disques clairs forment la bande I, également divisée en deux par une bande sombre, la strie Z.

Les muscles squelettiques sont parcourus par un réseau de **nerfs** et de **vaisseaux sanguins** permettant leur stimulation et leur irrigation (**Figure 3**). Les vaisseaux permettent d'apporter au muscle l'oxygène nécessaire à la génération d'énergie et d'évacuer les résidus moléculaires issus du travail musculaire. Les nerfs sont responsables de l'excitation du

muscle et de ses capacités de proprioception. Un **motoneurone** projette un axone qui, au voisinage des fibres musculaires, se divise en plusieurs branches et entre en contact avec la membrane cellulaire au niveau d'une synapse spécifique appelée **plaque motrice** terminale ou jonction neuromusculaire.



Figure 3 : Interaction du muscle avec le système nerveux et le système sanguin.

Image en microscopie électronique colorisée d'une plaque motrice sur une fibre musculaire et du capillaire sanguin présent à proximité. Chaque fibre musculaire n'est innervée que par un seul motoneurone (d'après Tortora *et al.* 1994, colorisée par Tortora and Grabowski, 2001).

D'autres cellules sont également présentes dans le muscle, telles que des cellules du système immunitaire (lymphocytes et macrophages), du tissu adipeux (adipocytes) ou du tissu conjonctif (fibroblastes). Toutes participent à l'organisation du tissu musculaire.

2. Les structures membraneuses dans le muscle strié squelettique

Le sarcolemme forme le réseau de tubules transverses.

Le sarcolemme s'invagine tout au long de la surface des fibres en une organisation appelée **tubule transverse** (tubules-T) en raison du réseau de canaux que ces structures forment jusqu'au centre de la fibre, perpendiculairement aux myofibrilles (**Figure 2**). Elles permettent la conduite rapide du potentiel d'action transmis par le motoneurone jusqu'au centre de la fibre, en réduisant au maximum la distance extracellulaire/intracellulaire. Ce dispositif permet l'excitation presque simultanée de toutes les parties de la fibre à partir d'une unique plaque motrice terminale. Le réseau n'est pas constitué au hasard et deux tubules-T sont systématiquement retrouvés de part et d'autre du disque Z des sarcomères, au niveau de la jonction des bandes A et I.

Le réticulum sarcoplasmique

Le **réticulum sarcoplasmique** (RS) est un compartiment intracellulaire du système endomembranaire correspondant au réticulum endoplasmique lisse dans les autres cellules (pour revue voir (Sorrentino 2011)). Il est délimité par une bicouche lipidique. Dans la fibre musculaire, le RS est spécialisé dans l'**homéostasie des ions calcium** (Ca^{2+}) et le contrôle du cycle contraction / relâchement du sarcomère. Il assure en effet le stockage, la libération et la récupération du calcium lors de la contraction musculaire. Le RS est organisé en un réseau tridimensionnel qui enveloppe chaque myofibrille, à la façon d'un manchon de dentelle. Ce réseau est constitué de deux parties distinctes mais liées : le **réticulum sarcoplasmique longitudinal** et les **citernes terminales** (Figure 2).

Le réticulum sarcoplasmique longitudinal est un fin réseau de tubules membranaires reliant les citernes terminales et assurant la recapture des ions Ca^{2+} . Il est présent sur la bande I et sur la bande A du sarcomère.

Les citernes terminales entourent complètement et de façon homogène chaque myofibrille au niveau des jonctions A-I. Les citernes terminales sont principalement impliquées dans le stockage et la libération du calcium. Comme les autres réticulum endoplasmiques lisses, le RS participe également à la formation de **vésicules** de transit avec l'appareil de Golgi, à la synthèse de phospholipides et à la synthèse d'hormones stéroïdes.

Les triades, interaction des tubules-T et du RS.

Les **triades** sont des structures résultant de l'association de deux citernes terminales du RS et d'un tubule-T. Une triade est présente à chacune des jonctions des zones A et I du sarcomère (Figure 4). Il y a donc deux triades pour un sarcomère. Leur rôle est de transformer l'onde de dépolarisation membranaire induite par l'influx nerveux en un relargage du calcium contenu dans les citernes terminales du RS, afin de provoquer la contraction musculaire. La triade joue donc un rôle central dans la contraction musculaire en permettant l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium des fibres musculaires, en réponse à une stimulation nerveuse. Cette fonction des triades de « senseur de dépolarisation/relargage de Ca^{2+} » repose sur une interaction physique entre des composants des tubules-T et des composants des citernes terminales. La zone de membrane du RS faisant face au tubule-T est nommée **réticulum sarcoplasmique de jonction** (RSj).

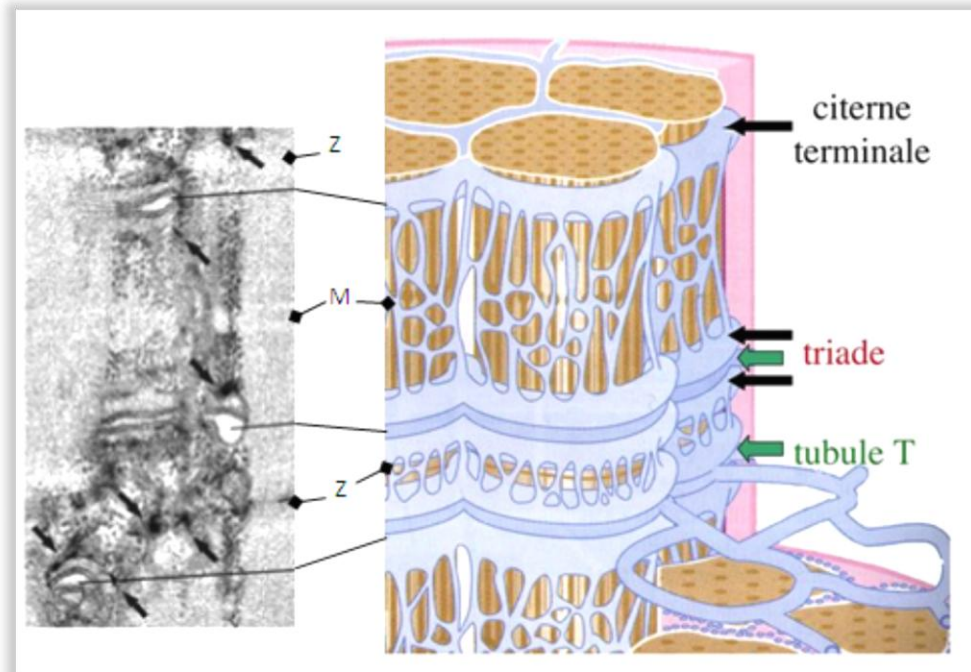


Figure 4 : Observation en microscopie électronique, et représentation schématique des triades.

Les flèches sur la microscopie électronique pointent le RSj, riche en complexe RyR-DHPR. Le schéma montre l'organisation de deux triades, chacune à l'extrémité d'un sarcomère différent. Z : disque z ; M : ligne M. (Adapté de (Kaisto and Metsikko 2003)).

Au niveau du RSj, les tubules-T sont riches en récepteurs à la dihydropyridine (**DiHydroPyridine Receptor, DHPR**) et le RS compte de nombreux canaux calciques « récepteur à la ryanodine » (**Ryanodine receptor, Ryr**). Le DHPR est un canal calcique voltage dépendant classé dans les canaux de type L (pour Late). Ryr est un canal formé par un homotétramère présentant une très forte perméabilité au calcium. Une région du complexe DHPR interagit directement avec le complexe Ryr1 (Rios, Ma et al. 1991). Cette interaction permet la réunion des capacités de sensibilité au potentiel membranaire et de canal calcique (**Figure 5**).

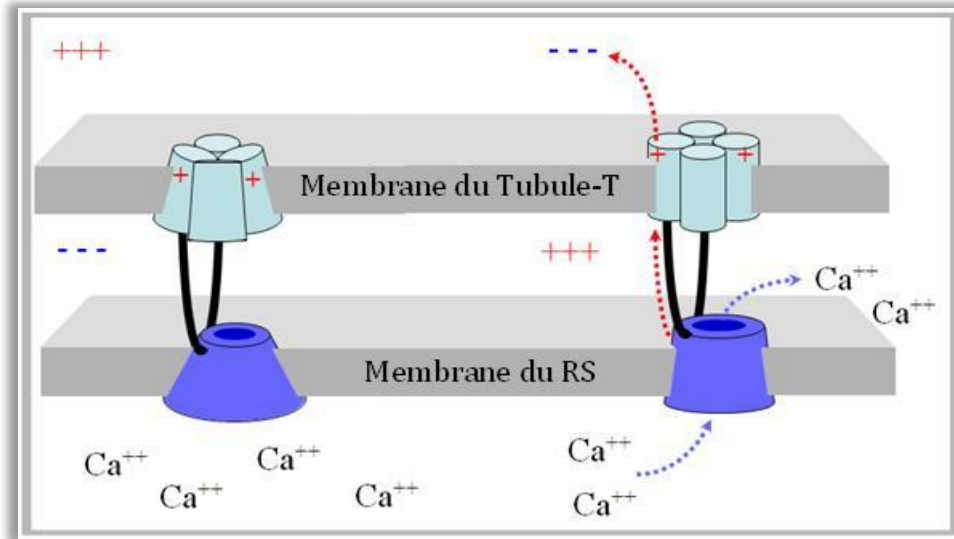


Figure 5 : L'interaction entre DHPR et Ryr permet la libération massive de Ca^{2+} dans le cytoplasme.

L'inversion de la polarité de la membrane, provoquée par le déplacement du potentiel d'action musculaire, modifie la conformation du DHPR (tétramère bleu clair), qui entraîne l'ouverture du canal Ryr (bleu foncé) et la libération du calcium contenu dans la citerne terminale dans le cytosol de la fibre musculaire.

Les vésicules remarquables dans le muscle strié squelettique

Dans les cellules musculaires, les fortes contraintes mécaniques ainsi que l'activité métabolique, les interactions avec le système nerveux, la présence de nombreux récepteurs à la membrane, ou encore la forte structuration de leur membrane induisent la coexistence de nombreux types de vésicules.

- Les cavéoles

Les **cavéoles** sont des sous-compartiments de la membrane plasmique, riches en cholestérol et sphingolipides, qui prennent l'aspect d'invaginations vésiculaires de 50 à 100 nm de diamètre (Lisanti, Scherer et al. 1994). Elles sont dues à la polymérisation d'une protéine, la cavéoline (Fra, Williamson et al. 1995). Elles sont présentes dans de nombreux types cellulaires mais plus abondamment dans le muscle strié (Parton 1996). D'un point de vue fonctionnel, les cavéoles sont essentielles pour le cloisonnement et la concentration de différentes classes de **molécules de signalisation** (comme les récepteurs et non-récepteurs aux tyrosines kinases, l'oxyde nitrique synthase endothéliale, ou les petites GTPases). Elles interfèrent sur l'activation de nombreuses protéines et oncoprotéines (Couet, Belanger et al. 2001; Serra and Scotlandi 2009). Elles sont également décrites dans le transport de **récepteurs activés**, comme le récepteur au facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor receptor, EGFR) ou le récepteur au facteur de croissance de transformation (transforming growthfactor receptor, TGFR) (Di Guglielmo, Le

Roy et al. 2003; Sigismund, Woelk et al. 2005). Notons que ces vésicules circulent exclusivement de la membrane **vers l'intérieur** de la cellule.

- Les enlargeosomes

Les **enlargeosomes** correspondent à une classe de vésicules subissant une **exocytose** rapide (de l'ordre de la centaine de milliseconde) dépendante du calcium (Cocucci, Racchetti et al. 2004). Les enlargeosomes sont distincts des endosomes, et des lysosomes (Cerny, Feng et al. 2004). Ils sont formés d'une bicouche lipidique créant des vésicules de 50 à 300 nm de diamètre, situées le plus souvent sous la membrane plasmique (Cocucci, Racchetti et al. 2004) (Figure 6). Ils sont caractérisés par la présence d'**AHNAK**, une protéine retrouvée dans la lumière de ces vésicules (Borgonovo, Cocucci et al. 2002). Deux mécanismes d'exocytose des enlargeosomes ont été décrits : un mécanisme lent médié par les protéines **SNARE et VAMP** (Cocucci, Racchetti et al. 2008), et une activation plus rapide dépendante de **Rac1** (Racchetti, Lorusso et al. 2010). Une autre protéine présente à la surface des vésicules, l'annexine 2, est nécessaire à l'exocytose des enlargeosomes (Lorusso, Covino et al. 2006).

Ces vésicules relativement grosses sont suspectées de jouer un rôle dans la **réparation** de larges lésions car elles sont observées à la membrane lorsque cette dernière est perforée (Cocucci, Racchetti et al. 2007; Cocucci, Racchetti et al. 2008; Racchetti, Lorusso et al. 2010). Elles fourniraient le matériel membranaire nécessaire à combler ces lésions (Benaud, Gentil et al. 2004). Elles sont aussi décrites comme intervenant dans la formation des tubules-T, la croissance des neurites (axone et dendrite) (Schulte, Racchetti et al. 2010) et la formation en étoile des astrocytes (Racchetti, D'Alessandro et al. 2012).

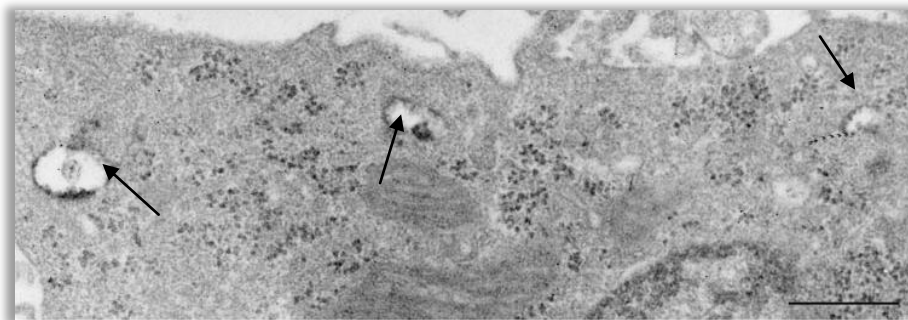


Figure 6 : Observation microscopique des enlargeosomes.

Révélation par ImmunoHistoChimie (IHC) de Ahnak sur des cellules PC12-27. Ahnak est un marqueur spécifique des endosomes. Trois vésicules, de 100 à 300 nm de diamètre, sont détectées sous la membrane plasmique à 1-1,5 µm de distance les unes des autres. Barre : 0,2 µm (adapté de (Cocucci, Racchetti et al. 2004)).

- Autres vésicules

De nombreuses autres structures vésiculaires sont retrouvées dans la cellule musculaire. Citons les lysosomes, les endosomes, les phagosomes et autophagosomes, ou encore les peroxysomes. Elles tiennent dans le muscle le même rôle que dans les autres types cellulaires.

3. Processus dans le muscle liés à l'activité des membranes

De nombreux événements cellulaires sont dépendants de la **biologie des membranes**. C'est particulièrement vrai pour les cellules du muscle strié squelettique qui présentent un métabolisme et un développement particuliers, et subissent de fortes contraintes mécaniques.

Structuration des fibres musculaires

La structuration des fibres musculaires a lieu lors du développement du muscle ou de sa régénération suite à une destruction partielle ou totale des fibres musculaires. Elle fait intervenir des mécanismes de **fusion des membranes** des myoblastes pour constituer les cellules multinucléées, précurseurs des nouvelles fibres musculaires. Les myoblastes, issus des cellules somitiques ou des cellules satellites, se multiplient sous l'influence de facteurs de croissance. Puis sous l'intervention de protéines du cycle cellulaire (Zhang, Wong et al. 1999), les myoblastes stoppent leur multiplication, migrent et s'alignent les uns par rapport aux autres. Lorsque plusieurs myoblastes sont alignés, la réorganisation de l'actine sous-membranaire permet la formation de **pores de fusion** au niveau des membranes plasmiques se faisant face (**Figure 7**). Ces pores s'agrandissent et conduisent à la fusion de ces cellules pour former un syncytium plurinucléé : le myotube (pour revue voir (Duan and Gallagher 2009; Rochlin, Yu et al. 2010)).

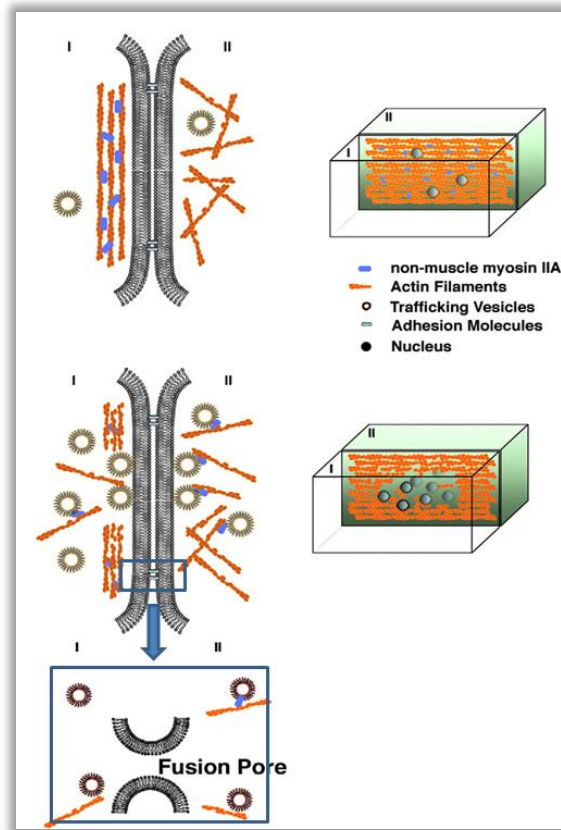


Figure 7 : Evènements spatiaux et temporels conduisant à la fusion des myoblastes.

Deux myoblastes (I et II) migrent l'un vers l'autre. Lorsqu'ils sont à proximité, un réseau d'actine et de myosine IIA se crée tout au long de la zone de contact. Cette structure permet le recrutement de protéines et de vésicules qui assurent la fusion des deux membranes, en créant des pores de fusion qui s'agrandissent et finissent par se rejoindre (adapté de (Duan and Gallagher 2009)).

Régulation de l'activité métabolique

Le **trafic vésiculaire** joue un rôle prépondérant dans de nombreux évènements dans la cellule musculaire. Il intervient en particulier dans le **métabolisme énergétique**. Un exemple de cette régulation est le contrôle de l'homéostasie du glucose qui fait intervenir des vésicules spécialisées dans le déplacement des transporteurs de **glucose** (GLucose Transporter, GLUT), et en particulier de GLUT4. Cette protéine est spécifique du muscle squelettique et cardiaque où elle représente plus de 90 % de la totalité des transporteurs de glucose (Holman, Kozka et al. 1990). Il s'agit d'un transporteur rapide, spécifique au glucose, régulé par l'**insuline**. Cette régulation ne se fait pas directement sur GLUT4 mais via son récepteur (Insuline Receptor, IR) qui contrôle la translocation à la membrane de vésicules contenant GLUT4 (**Figure 8**). Au niveau basal d'une cellule du muscle squelettique, il a été démontré que 99% des transporteurs de glucose GLUT4 sont séquestrés à l'intérieur

de vésicules et non à la membrane (Slot, Geuze et al. 1991). Une fois ancré à la membrane, GLUT4 permet l'entrée de glucose, grâce au gradient de concentration existant entre les compartiments extracellulaire et intracellulaire.

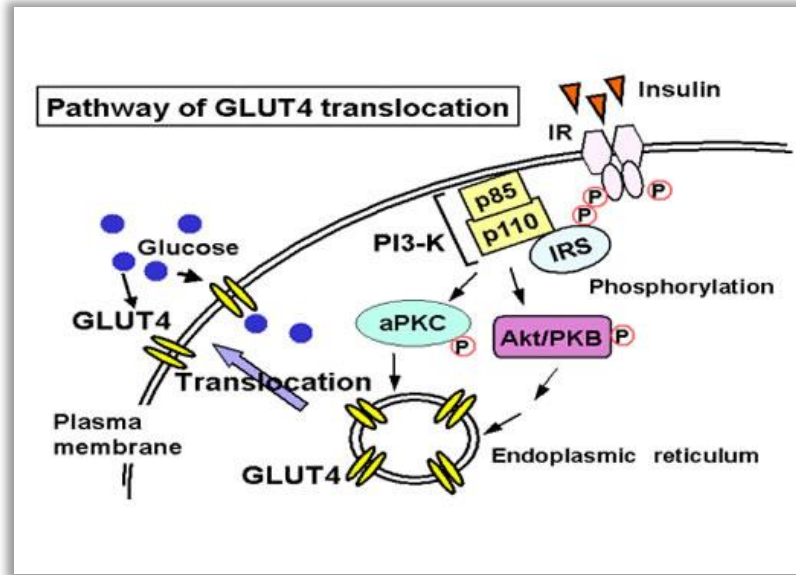


Figure 8 : Les vésicules GLUT4 dans l'homéostasie du glucose.

L'activation de l'IR par l'insuline provoque une cascade de phosphorylation conduisant à la translocation à la membrane de vésicules charriant GLUT4. Une fois à la membrane, ce transporteur de glucose permet l'entrée de sucre dans la fibre (figure université de Kobe, www.ans.kobe-u.ac.jp).

Mobilité des récepteurs à la membrane

De nombreux échanges concernant des récepteurs impliquant des membranes ont lieu entre la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires. L'apport de **récepteurs** à la membrane, la **translocation** de récepteurs activés, et/ou le **recyclage** de ces récepteurs sont assurés par le déplacement, l'exocytose et l'endocytose de vésicules.

En particulier, la voie d'internalisation via la **clathrine** (clathrin-coated pits ou CCP) est responsable de l'internalisation de plusieurs récepteurs membranaires présents à la surface des cellules musculaires, comme celui de **l'insuline**, de **l'EGF** ou de la **transferrine**. Cette internalisation peut être suivie d'un recyclage comme dans le cas du récepteur à la transferrine (**Figure 9**).

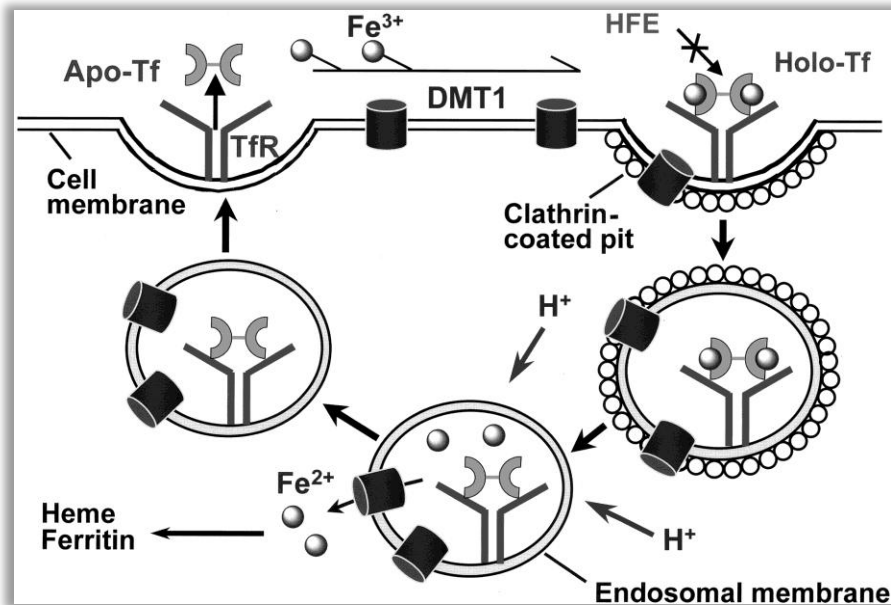


Figure 9 : Recyclage du récepteur à la transferrine.

Le complexe **transferrine-récepteur** est internalisé dans des vésicules enrobées de clathrine. Peu de temps après l'invagination, les CCP (Clathrin Coated Pit) fusionnent avec les endosomes dont le pH acide permet la dissociation du fer et de la transferrine. L'apotransferrine retourne alors à la membrane plasmique, encore liée à son récepteur. Lorsque le complexe ligand-récepteur atteint la membrane et que la vésicule le contenant est exocytée, l'apotransferrine se dissocie de son récepteur de par leur faible affinité à un pH neutre. Le récepteur est immédiatement prêt pour un nouveau cycle d'internalisation, tandis que l'apotransferrine est renvoyée dans la circulation où elle peut se recharger en fer (pour revue voir (Dautry-Varsat 1986)) (Qian, Li et al. 2002).

Réparation membranaire

Lors des cycles de contraction/relâchement du muscle, les cellules du muscle subissent de très fortes **contraintes mécaniques** altérant l'intégrité de leur membrane. Ces lésions de la membrane peuvent affecter la fonctionnalité et la survie des cellules musculaires. Trois mécanismes de **réparation membranaire** sont considérés à ce jour pour la réparation de ces lésions. L'un est passif et repose sur la capacité physique d'une bicouche de phospholipides à maintenir sa structure ; les deux autres mettent en jeu des processus actifs de réparation de la membrane, faisant intervenir soit l'exocytose soit l'endocytose. L'exocytose permet le colmatage de la brèche, alors que l'endocytose vise à son absorption.

- Réparation passive par réassemblage de la bicouche phospholipidique.

Dans le cas de lésions de **petite taille** de la membrane plasmique (diamètre inférieur à 0,2 μm dans le cas du sarcolemme), une **auto-fermeture** de la lésion a été décrite (De Mello 1973) (McNeil 2002). Cette réparation repose sur des principes uniquement **physiques** que sont les forces de tension et les forces hydrophobes/hydrophiles (**Figure 10**). Deux

éléments s'opposent à ce réassemblage : l'adhésion des têtes phospholipidiques au cytosquelette et la fluidité membranaire limitée (tension membranaire).

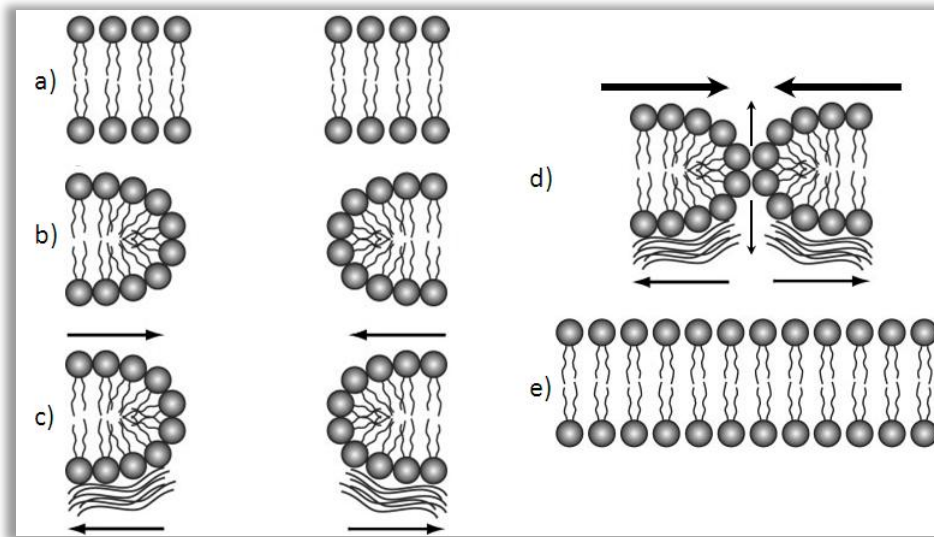


Figure 10 : Réparation de la bicouche phospholipidique.

Juste après la lésion (diamètre inférieur à $0,2\ \mu\text{m}$) (a) les phospholipides se réorganisent pour « cacher » leur zone hydrophobe exposée au cytoplasme et au milieu extracellulaire (b). Deux forces opposées s'appliquent alors à la membrane : des forces de tension de surface, et des liens avec le cytosquelette (c). Si la tension de surface est suffisante, les bords de la lésion se rapprochent (d) jusqu'à fusionner (e). (Adapté de (McNeil and Steinhardt 2003)).

- Réparation active par exocytose de vésicules.

Dans le cas de lésions plus **importantes** ($> 1\ \mu\text{m}$), un processus **actif** de réparation de la membrane consommant de l'énergie et des **ressources cellulaires** est déclenché par l'entrée de calcium dans la cellule. Il met en jeu l'exocytose de différentes vésicules servant aussi bien de « bouchon » que de fournisseur de matière première.

Plusieurs types cellulaires sont aptes à survivre à une large lésion membranaire, parmi lesquels peuvent être cités les cellules musculaires, les neurones, mais également les oocytes et les œufs d'oursins (Casademont, Carpenter et al. 1988; Krause, Fishman et al. 1994; Terasaki, Miyake et al. 1997). Dans tous les cas, ces cellules ont la capacité de reformer une grande quantité de membrane pour combler la brèche. Pour cela, des vésicules s'accumulent au point de lésion avant de fusionner entre elles afin de créer une **rustine**. Ce mécanisme est très rapide : dès les premières secondes suivant une lésion, il y a une grande abondance de larges vésicules au niveau de la lésion (Miyake and McNeil, 1995). La résultante est la création d'un patch provisoire ayant l'effet d'un bouchon devant la lésion (Figure 11a-D). Le patch fusionnerait ensuite directement avec la membrane

plasmique (**Figure 11a**). Cette fusion aurait lieu exactement à la manière d'une exocytose classique, la totalité du matériel membranaire constituant le patch se retrouvant inclus à la membrane. Dans une autre hypothèse, une partie du matériel membranaire du patch et une portion de la cellule lésée sont éliminées par exocytose (**Figure 11b**). Une fois la membrane reconstituée, le réseau sous-cortical serait reformé par polymérisation des microfilaments d'actine pour reconstituer définitivement une nouvelle enveloppe cellulaire.

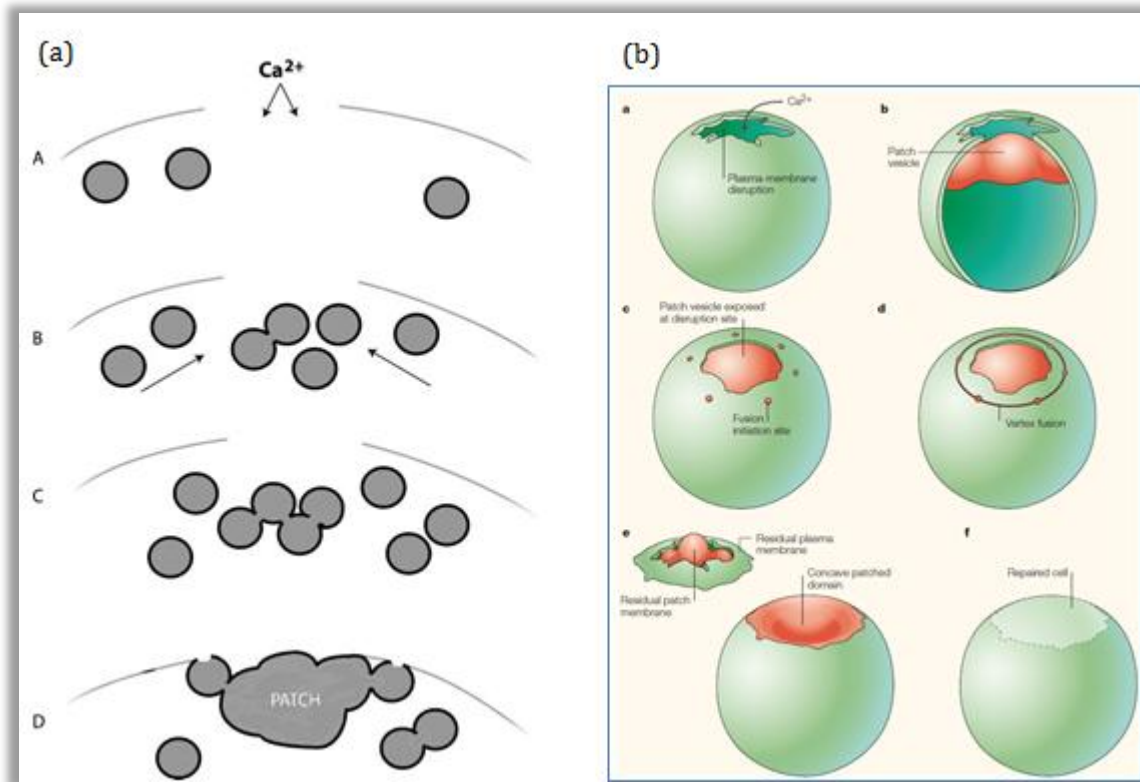


Figure 11 : Processus possibles de réparation d'une lésion membranaire

(a) L'entrée de calcium déstabilise ou détruit le réseau sous-cortical de microfilaments d'actine et permet la mobilité des vésicules sous membranaires vers le site de la lésion. Lorsqu'une certaine densité de vésicules est atteinte, elles commencent à fusionner et forment une vésicule géante bouchant le trou dans la membrane. (McNeil and Steinhardt 2003). (b) La fusion en vortex provoquant l'élimination d'une partie de la membrane est une autre hypothèse (McNeil and Kirchhausen 2005).

- Réparation active par endocytose de la brèche.

Une autre possibilité de réparation de la lésion de la membrane plasmique fait état de l'élimination de la lésion au lieu de sa réparation. Cette élimination se ferait par **endocytose de la lésion** (**Figure 12**). En effet, des vésicules endocytotiques ou des invaginations de la membrane plasmique ont régulièrement été observées suite à une lésion (Eddleman, Godell et al. 1995; Ballinger, Blanchette et al. 1997; Togo, Alderton et al.

1999). De plus, Idone et ses collaborateurs ont montré que des cellules étaient capables de revenir à un état membranaire stable après traitement avec des streptolysines-O (SLO), des protéines impliquées dans la formation de pores stables (Idone, Tam et al. 2008). L'utilisation des protéines formant des pores stables élimine la possibilité d'une « réparation de la lésion » par un mécanisme passif ou par exocytose.

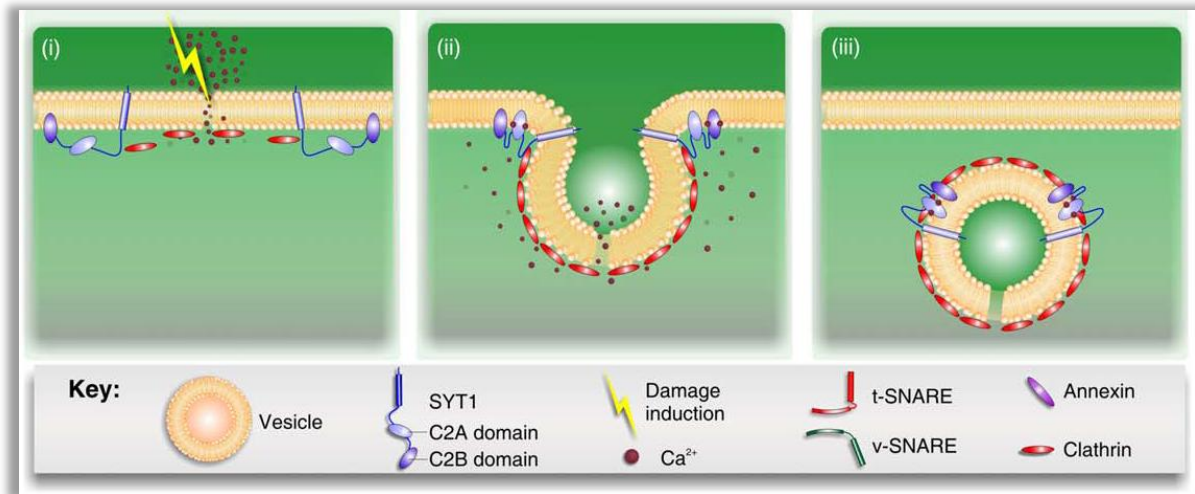


Figure 12 : Elimination de la lésion membranaire par endocytose.

Dans ce modèle, l'apparition d'une lésion (i) provoque, par l'intermédiaire d'une entrée de calcium, l'activation des protéines membranaires et sous membranaires responsables de l'endocytose (ii). Elles se structurent autour de la région la plus riche en calcium et provoquent l'invagination puis l'endocytose de la membrane, reconstituant ainsi une membrane intègre (iii) (Adapté de (Schapire, Valpuesta et al. 2009)).

B. Pathologies du muscle

Les **maladies neuromusculaires** sont des pathologies ayant une incidence sur le développement, le maintien et le fonctionnement du muscle. Elles peuvent être liées aussi bien à une atteinte directe du tissu musculaire qu'à une atteinte indirecte par l'intermédiaire d'une altération des tissus nerveux.

Parmi les maladies neuromusculaires, les pathologies dues à un défaut direct de la fibre musculaire sont nommées **myopathies**. Elles forment un groupe hétérogène composé à l'heure actuelle d'une centaine de maladies distinctes. Ces maladies sont regroupées dans des classes que sont les dystrophies musculaires progressives, les dystrophies musculaires congénitales, les myopathies distales, les myopathies à excès de filaments, les syndromes myotoniques, les paralysies périodiques et les myopathies métaboliques. Elles sont diagnostiquées par examen clinique et contrôle de plusieurs paramètres physiologiques grâce à différents tests : la mesure du taux sérique de la créatine kinase (CK), l'examen

électrophysiologique du muscle, l'imagerie musculaire (par scanner ou IRM), le test d'effort, la biopsie musculaire avec recherche de protéine manquante et l'étude moléculaire de l'ADN. D'autres tests comme une échocardiographie, des épreuves fonctionnelles respiratoires et l'analyse du contexte inflammatoire et endocrinien peuvent également être utilisés.

Les dystrophies musculaires progressives incluent les dystrophies de Duchenne et de Becker, les dystrophies des ceintures (**LGMD, pour Limb Girdle Muscular Dystrophy**), les dystrophies musculaires distales (ou **myopathie distale, MD**), la dystrophie facio-scapulo-humérale, la dystrophie musculaire oculopharyngée, et la dystrophie d'Emery-Dreifuss.

Les deux groupes incluant les pathologies ayant fait l'objet de mon travail de thèse sont présentés ci-dessous : les LGMD et les MD.

1. Les dystrophies musculaires des ceintures

Les **dystrophies des ceintures** regroupent les pathologies affectant prioritairement les muscles des ceintures scapulaire et pelvienne. A ce jour, 26 formes ont été caractérisées par l'identification du défaut génétique responsable de la maladie. La prévalence de toutes les LGMD réunies est estimée à 5 à 6 personnes sur 1 million. Deux groupes sont définis à l'intérieur même des LGMD, suivant leur mode de transmission génétique. Les formes **dominantes** sont nommées LGMD1 et les formes **récessives** LGMD2. Dans chaque groupe, une lettre capitale ajoutée à cette nomenclature permet la distinction des différentes formes (LGMD1A-H et LGMD2A-Q). Elle est attribuée en fonction de la chronologie d'identification des maladies. Les formes autosomiques dominantes sont moins nombreuses et plus rares que les formes autosomiques récessives.

Les formes autosomiques dominantes des LGMD

Huit différentes **LGMD1** sont aujourd'hui répertoriées (**Table 1**). Pour cinq d'entre elles, les gènes et protéines impliqués dans la pathologie ont été identifiés, pour les autres, seul le locus est connu. Elles sont souvent associées à une sévérité modérée mais peuvent induire une anomalie du muscle cardiaque et des problèmes respiratoires. Des troubles de déglutition et de la phonation ont également été rapportés. Des informations sur les maladies et les gènes impliqués sont disponibles en annexe I.

Pathologie	Gène	Locus	Protéine	n° OMIM	Référence
LGMD1A	MYOT	5q31	Myotiline	#159000	(Hauser, Horrigan et al. 2000)
LGMD1B	LMNA	1q11-21	Lamine A/C	#159001	(Muchir, Bonne et al. 2000)
LGMD1C	CAV3	3p25	Cavéoline-3	#607801	(Minetti, Sotgia et al. 1998)
LGMD1D (=CMD1F)	DES	2q35	desmin	#601419	(Greenberg, Salajegheh et al. 2012)
LGMD1E	DNAJB6	7q36	Inconnue	#603511	(Harms, Sommerville et al. 2012)
LGMD1F	Inconnu	7q32	Inconnue	%60842	(Palenzuela, Andreu et al. 2003)
LGMD1G	Inconnu	4p21	Inconnue	%609115	(Starling, Kok et al. 2004)
LGMD1H	Inconnu	3p23-p25	Inconnue	%613530	(Bisceglia, Zoccolella et al. 2010)

Table 1 : Tableau des huit LGMD1 à transmission autosomique dominante et des gènes ou locus associés.

Les formes autosomiques récessives des LGMD

Les LGMD récessives forment un groupe de maladies plus vaste que celui des formes dominantes, avec 17 **LGMD2** distinctes répertoriées (**Table 2**). Quatre mécanismes physiopathologiques peuvent être distingués parmi ces maladies : (i) une instabilité de la membrane plasmique, (ii) des défauts de réparation membranaire, (iii) une sénescence des cellules satellites et (iv) une déstructuration du sarcomère. Des informations sur les maladies et les gènes impliqués sont disponibles en annexe I.

Pathologie	Gène	Locus	Protéine	n°OMIM	Référence
LGMD2A : Calpainopathie	CAPN3	15q15.1- q21.1	Calpaïne 3	#253600	(Richard, Broux et al. 1995)
LGMD2B : Dysferlinopathie	DYSF	2p13.3- p13.1	Dysferline	#253601	(Bashir, Britton et al. 1998)
LGMD2C : γ-sarcoglycanopathie	SGCG	13q12	γ-sarcoglycane	#253700	(Noguchi, McNally et al. 1995)
LGMD2D : α-sarcoglycanopathie	SGCA	17q12- q21.33	α-sarcoglycane	#608099	(Roberds, Leturcq et al. 1994)
LGMD2E : β-sarcoglycanopathie	SGCB	4q12	β-sarcoglycane	#604286	(Lim, Duclos et al. 1995)
LGMD2F : δ-sarcoglycanopathie	SGCD	5q33	δ-sarcoglycane	#601287	(Nigro, de Sa Moreira et al. 1996)
LGMD2G : Téléthoinopathie	TCAP	17q12	Telethonine	#601954	(Moreira, Wiltshire et al. 2000)
LGMD2H	TRIM32	9q33.2	Tripartite motif protein 32	#254110	(Frosk, Weiler et al. 2002)
LGMD2I	FKRP	19q13.33	Fukutin-related protein	#607155	(Brockington, Yuva et al. 2001)
LGMD2J : Titinopathie	TTN	2q31	Titine	#608807	(Udd 1992)
LGMD2K	POMT1	9q34.1	Protéine O-mannosyl-transférase 1	#609308	(Balci, Uyanik et al. 2005)
LGMD2L	ANO5	11p13.12	Anoctamine 5	#611307	(Bolduc, Marlow et al. 2010)
LGMD2M	FKTN	9q31	Fukutine	#611588	(Godfrey, Escolar et al. 2006)
LGMD2N	POMT2	14q24.3	Protéine O-mannosyl-transférase 2	#613158	(Godfrey, Clement et al. 2007)
LGMD2O	POMGN T1	1p34-p33	Protéine O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransférase 1	#613157	(Clement, Godfrey et al. 2008)
LGMD2P	ND	ND	ND	ND	ND
LGMD2Q	PLEC1	8q24.3	plectin	#613723	(Gundesli, Talim et al. 2010)

Table 2 : Tableau des dix-sept LGMD2 à transmission autosomique récessive et des gènes ou locus associés.

ND : non déterminé

2. Les myopathies distales

Le terme de **myopathies distales** (MD) regroupe des pathologies affectant les muscles distaux des membres supérieurs et/ou inférieurs. De la même manière que pour les LGMD, certaines MD sont transmises de façon **autosomique dominante** (15 maladies dominantes répertoriées à ce jour) alors que 6 le sont de façon **autosomique récessive** (Table 3) (Udd 2012). En général, les formes dominantes sont d'expression tardive (apparition après 40 ans), alors que les formes récessives débutent plus précocement (souvent avant 25 ans). Les manifestations de ces maladies vont d'une simple fatigabilité jusqu'à une possible perte de la marche. D'autres symptômes comme une faiblesse des muscles des cordes vocales et/ou du pharynx, entraînant des difficultés de phonation (en particulier pour la myopathie distale en matrine 3), sont également observés.

	Pathologie	Gène	Protéine	OMIM
dominante	Tibial muscular dystrophy (TMD, Udd myopathy)	TTN	titine	#600334
	Desminopathy	DES	Desmine	
	Distal myotilinopathy	TTID	myotiline	#609200
	ZASPopathy (Markesbery-Griggs)	LDB3	ZASP	#609452
	Alpha-B crystallin mutated distal myopathy	CRYAB	B-crystalline	
	Distal ABD-filaminopathy	FLNC	Filamine-C	
	VCP-mutated distal myopathy	VCP	VCP	
	Laing distal myopathy	MYH7	Beta-MyHHC	
	KLHL9 mutated distal myopathy	KLHL9	KLHL9	
	Matrin3 distal myopathy (VCPDM, MPD2)	MATR3	Matrine3	#606070
	Welander distal myopathy	2p13	nd	%604454
	MPD3	8p22-q11	nd	%610099
	Italian 19p13-linked distal myopathy	19p13	nd	
	US-Polish family	nd	nd	
	Oculopharyngeal distal myopathy, OPDM	14q11	nd	#164300
recessive	Distal nebulin myopathy	NEB	Nbuline	
	Miyoshi myopathy (MM)	DYSF	Dysferline	
	MMD3	ANO5	Anoctamine-5	
	Distal myopathy with rimmed vacuoles (DMRV)	GNE	GNE	
	Oculopharyngeal distal myopathy, OPDM	14q11	nd	#164300
Calf myopathy non-DYSF/ANO5	nd	nd		

Table 3 : Registre des 21 myopathies distales répertoriées à ce jour.

nd : non déterminé

C. LGMD2B/2L et MM/MMD3 : des tableaux cliniques proches, des origines différentes

1. Les dysferlinopathies : un coupable, plusieurs maladies

Le travail conjoint de plusieurs équipes, mené dans les années 90, a permis d'identifier le gène responsable d'une des LGMD à transmission récessive, la **LGMD2B**. Les premiers travaux publiés rapportent son positionnement par des études de liaison sur le chromosome 2p13 (Bashir, Strachan et al. 1994; Passos-Bueno, Bashir et al. 1995; Bashir, 1996 #393)}. De façon intéressante, deux autres équipes montrèrent la même année que ce locus était impliqué dans une autre pathologie : la **myopathie de Miyoshi (MM)**, une MD (Bejaoui, Hirabayashi et al. 1995; Weiler, Greenberg et al. 1996). Des études par clonage positionnel ont alors permis d'identifier le gène responsable de ces deux pathologies : le gène **DYSF** (Bashir, Britton et al. 1998; Liu, Aoki et al. 1998). Ce nom lui a été attribué en raison de l'implication de la protéine produite dans des pathologies dystrophiques et de sa forte homologie avec la protéine Fer1- de chez *C.elegans* (Bashir, Britton et al. 1998). Toutes les pathologies liées à un dysfonctionnement ou une absence de la protéine dysferline sont regroupées sous l'appellation « **dysferlinopathies** ». Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur ces pathologies.

Les présentations cliniques principales

Les **dysferlinopathies** représentent une part de plus en plus importante des myopathies diagnostiquées chez l'adulte. Plus de 150 patients en France et 600 à travers le monde ont été répertoriés, avec des concentrations particulièrement marquées au Maghreb et au Moyen-Orient (références : base UMD-DYSF (Blandin et al) et site web « Jain Foundation »).

Les dysferlinopathies ont la particularité de regrouper **plusieurs tableaux cliniques**, sans pour autant qu'une corrélation génotype-phénotype n'ait été identifiée. La **myopathie de Miyoshi** et la **LGMD2B** représentent la très grande majorité des patients présentant une déficience en dysferline, les autres étant classées dans des tableaux cliniques rares. Ces pathologies partagent de nombreuses similarités, comme un taux très élevé de CK sérique, l'âge d'apparition des symptômes (début de l'âge adulte) et la progression lente de la pathologie, conduisant au terme de plusieurs années à la perte de la marche. Elles sont en revanche très différentes suivant les groupes de muscles affectés. De façon notable, avant l'apparition des symptômes certains malades présentent de très bonnes capacités sportives. Ce caractère n'est pas retrouvé pour les autres dystrophies, à l'exception des maladies liées

à ANO5 (Mahjneh, Marconi et al. 2001; Nagaraju, Rawat et al. 2008; Bushby 2009; Klinge, Aboumoussa et al. 2010). Une autre caractéristique commune à ces deux groupes de maladie est la présence possible de dépôts amyloïdes sous le sarcolemme, dans l'espace interstitiel des fibres musculaires, et dans les vaisseaux sanguins (Spuler, Carl et al. 2008; Rosales, Gastier-Foster et al. 2010).

Une atteinte cardiaque ou respiratoire est très exceptionnelle dans les dysferlinopathies, à la différence de beaucoup d'autres myopathies (Wenzel, Geier et al. 2007). Cependant, des investigations cardiologiques approfondies (par IRM) rapportent une fréquence assez élevée de faibles anomalies, à la fois dans le modèle murin et pour des patients LGMD2B (Choi, Park et al. 2010; Rosales, Moser et al. 2011).

- La dystrophie des ceintures de type 2B (LGMD2B)

La **LGMD2B** (OMIM #253601) apparaît habituellement à l'adolescence ou chez le jeune adulte. Elle débute par une faiblesse musculaire des jambes entraînant des difficultés pour courir, monter les escaliers ou se relever du sol. Elle est caractérisée par une atrophie des muscles des **ceintures pelviennes et scapulaires**, avec une progression lente de la fonte musculaire. Les muscles pelviens sont les plus affectés, en particulier le quadriceps et le psoas. Au niveau scapulaire, le biceps est le plus touché, le deltoïde pouvant être à l'inverse hypertrophié. Ces atteintes peuvent être asymétriques. Les rares diminutions modérées de la capacité vitale respiratoire observées, essentiellement dans la LGMD2B, sont imputées au confinement du patient en fauteuil roulant.

- La myopathie de Miyoshi (MM)

La **MM** (#OMIM 254130), décrite en 1986 (Miyoshi, Kawai et al. 1986), est la plus fréquente des myopathies distales. Elle se transmet selon le mode autosomique récessif, tout comme la LGMD2B. Elle débute vers l'âge de 20 ans et se caractérise par une atteinte préférentielle de la **loge postérieure de mollets** (muscles gastrocnémiens et soléaires). A l'inverse des autres myopathies distales, l'élévation des CK est très marquée. Elle touche aussi les muscles des avant-bras, induisant une diminution de la préhension, les petits muscles de la main sont toutefois épargnés. La progression de cette pathologie est lente, et peut s'étendre aux cuisses et aux muscles glutéaux conduisant essentiellement à des difficultés lors de la montée de marches, la posture debout ou encore la marche à plat. Une faiblesse éventuelle des muscles de la ceinture scapulaire a été rapportée (Mahjneh, Marconi et al. 2001), indiquant que la MM peut évoluer vers une myopathie de type proximo-distale.

- Tableaux cliniques rares de dysferlinopathies

Plusieurs cas de patients ayant une déficience en dysferline et présentant des symptômes aussi bien proximaux que distaux ont été restitués (Nguyen, Bassez et al. 2007). Ils forment un sous-groupe appelé **proximo-distal** (PD). Cette présentation clinique résulte soit d'une évolution d'une MM vers une atteinte proximale, soit d'une LGMD2B dont l'atteinte évolue pour gagner la partie distale des membres inférieurs (Nguyen, Bassez et al. 2007).

La **myopathie distale avec atteinte du tibialis antérieur** (DMAT) (OMIM #606768) possède des caractéristiques très proches de la MM, mais dans ce cas le muscle *tibialis antérieur* est affecté en premier, la faiblesse musculaire s'étendant ensuite à toute la loge postérieure (Illa, Serrano-Munuera et al. 2001). Il s'agit d'un phénotype rare.

Certains patients ne correspondant à aucun tableau clinique présenté ci-dessus font l'objet de terminologie spécifique. Ils peuvent être classés comme ayant un **trouble pseudo-métabolique** avec intolérance à l'effort, myalgies et crampes, ou un **syndrome scapulo-péronéaux** avec une faiblesse initiale des muscles de la ceinture scapulaire et des muscles distaux des jambes. Enfin, certains patients asymptomatiques mais présentant un fort taux de CK sont classés dans le groupe des **hyperCKémies isolées**. Plus récemment, un phénotype de type **dystrophie musculaire congénitale** (CMD, congenital muscular dystrophy) a également été décrit dans une famille, avec des patients présentant une faiblesse proximale des membres inférieurs et des muscles fléchisseurs du cou, dès la naissance (Paradas, Gonzalez-Quereda et al. 2009).

Mutations rapportées dans les Dysferlinopathies

- Mutations pathologiques, mutations silencieuses

Quelques **400** modifications de séquence sont aujourd'hui répertoriées sur le gène DYSF, sur les bases de données UMD-DYSF (www.umd.be/DYSF) et «Leiden Muscular Dystrophy» (www.dmd.nl), dont **266** ayant été rapportées comme **pathogènes**. Les mutations pathologiques sont réparties tout au long de la séquence de la dysferline, sans qu'aucun « hot spot » n'ait été identifié (**Figure 13**). Aucune corrélation des zones mutées avec le phénotype observé n'a également été constatée. Les zones où aucune mutation pathologique n'a encore été rapportée sont rares et courtes, laissant présager que peu de parties de la dysferline ne sont subsidiaires.

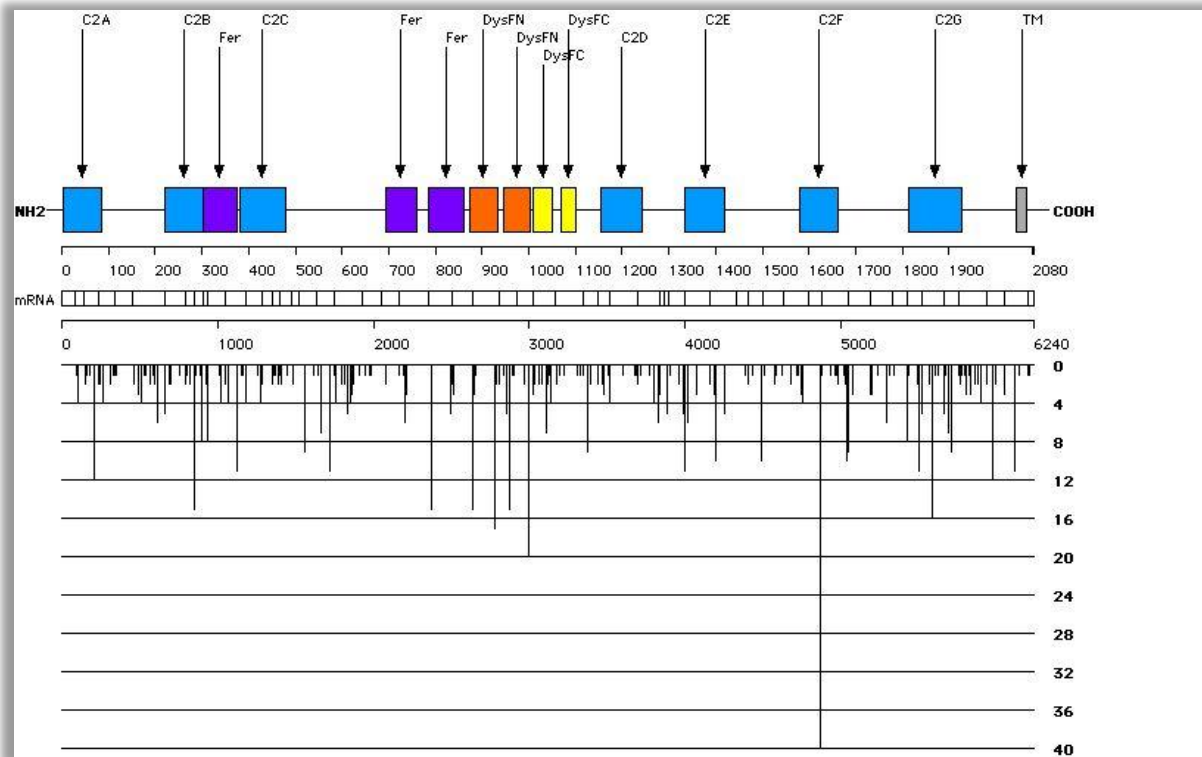


Figure 13 : Localisation et nombre de cas rapportés pour chaque mutation pathogène connue de la dysferline.

La localisation et le nombre des mutations répertoriées sont présentés par l'histogramme en bas de la figure. Chaque mutation est localisable sur l'ARNm et sur la protéine dysferline. Les domaines caractéristiques de cette dernière sont représentés par des blocs colorés (source : www.umd.be/DYSF).

Tous les types de mutation sont présents sur DYSF. Les **mutations ponctuelles** en représentent la moitié (50%), par l'addition des mutations faux-sens (33%) et non-sens (17%). Il est intéressant de noter que pour la plupart des mutations ponctuelles, la protéine dysferline est **totalelement absente**, révélant son élimination précoce par un des systèmes de dégradation de la cellule. Les mutations par insertion ou délétion représentent 28% des mutations totales, avec une large part pour les délétions provoquant un décalage du cadre de lecture (17%) et les insertions ayant le même effet (10%). Un nombre non négligeable de mutations au niveau des introns est également répertorié (15%). Les 7% restants sont des mutations complexes dites « indels », résultant d'évènements concomitants d'insertion et de délétion. En plus des mutations représentées sur la **Figure 13**, cinq délétions complexes ou d'une grande partie de DYSF ont été rapportées.

- Mutations avec effets fondateurs, mutations récurrentes

Parmi toutes les mutations observées, **sept** sont aujourd'hui considérées comme ayant un **effet fondateur** dans une population donnée de malades (**Table 4**).

Geographic/ethnic origin	Mutation	Evaluated carrier frequency	Reference
Portuguese	c.1180_1180+7delAGTGCGTG (r.1054_1284del, p.Glu353_Leu429del)	Unknown	Vernengo et al., 2011
Native canadian	c.2372C>G (p.Pro791Arg)	Unknown	#3: Weiler et al., 1999
Caucasian jewish	c.2779delG (p.Ala927LeufsX21)	4%	#39: Leshinsky-Silver et al., 2007
Italian	c.2875C>T (p.Arg959Trp)	Unknown	#16: Cagliani et al., 2003
Libanese jewish	c.4872_4876delinsCCCC (p.Glu1624AspfsX9)	10%	#6: Argov et al., 2000
Portuguese	c.5492G>A (exon skipping)	Unknown	#59 Santos et al. 2010
Spanish population (region of Sueca)	c.5713C>T (p.Arg1905X)	2%	#27: Vilchez et al., 2005

Table 4 : Les sept mutations considérées comme ayant un effet fondateur dans des populations géographiquement ou religieusement isolées (UMD/dysf).

Davantage de mutations sont considérées comme **récurrentes**, c'est-à-dire qu'elles se retrouvent dans au moins trois populations non liées. Le répertoire fourni par la base de données UMD/dysf permet d'identifier 51 mutations de ce type. Parmi celles-ci, **cinq** sont particulièrement répandues (**Table 5**).

Mutation ADN	Mutation protéique	Nombre d'occurrences	Nombre de patients
c.4872_4876delinsCCCC	p.Glu1624AspfsX9	17	40
c.2997G>T	p.Trp999Cys	16	20
c.2779delG	p.Ala927LeufsX21	14	17
c.IVS8+1delG (c.855+1delG)	défaut de splicing	12	15
c.5979dup	p.Glu1994ArgfsX3	12	15

Table 5 : Principales mutations récurrentes de la dysferline.

- Corrélation génotype - phénotype

La comparaison de la distribution des mutations tout au long du gène DYSF et le type de mutations homozygotes retrouvées dans les deux principaux groupes cliniques (LGMD2B et MM) ne révèle aucune différence significative : une même mutation peut engendrer plusieurs phénotypes (Blandin, Beroud et al. 2012). C'est le cas pour toutes les mutations répertoriées dans la **Table 5** : par exemple, la mutation c.4872_4876delinsCCCC conduit chez les personnes porteuses à trois phénotypes différents (7 LGMD2B, 8MM, 1PD, 1 non répertorié) et la mutation c.2779delG en provoque six (3LGMD2B, 4MM, 1PD,

1 hyperCKmie, 1 pseudométabolique, 2 non répertoriés). Cette constatation est aussi vraie au sein d'une même famille. Ainsi, Weiler a montré que 14 patients d'une même famille et portant la même mutation étaient inclus soit dans la LGMD2B soit dans la MM (Weiler, Bashir et al. 1999). D'autres cas identiques ont été rapportés dans d'autres grandes familles consanguines, comme dans une famille russe comptant 12 malades, 9 LGMD et 3 MM (Illarioshkin, Ivanova-Smolenskaya et al. 2000).

2. Les anoctaminopathies liées à ANO5 : un autre coupable, les « mêmes » maladies

Comme pour les dysferlinopathies, l'identification du gène responsable de la **LGMD2L** s'est faite en deux étapes : l'identification d'une zone candidate par des études de liaison sur patients, puis l'analyse par séquençage des gènes présents dans cette zone. Une étude des SNPs sur une cohorte de patients a permis de déterminer le locus 11p12-p13 comme étant lié à la LGMD2L (Jarry, Rioux et al. 2007). Une nouvelle étude des SNP, mais avec des outils différents, identifia un locus sensiblement différent au précédent, situé au 11p14.3-p15 (Bolduc, Marlow et al. 2010). Des mutations au niveau du gène **ANO5/TMEM16E/GDD1** ont alors été détectées par séquençage systématique des exons et des régions de jonction exonique des 11 gènes présents au niveau de cet intervalle (Bolduc, Marlow et al. 2010). Des mutations sur ce gène peuvent également conduire à une **myopathie distale de Miyoshi de type 3** (MMD3) (Bolduc, Marlow et al. 2010). Ce gène était également déjà connu pour son implication dans une autre maladie dominante associée à des mutations dans un résidu cystéine spécifique : la **dysplasie gnatho-diaphysaire** (GnathoDiaphyseal Dysplasia, GDD1) (Tsutsumi, Kamata et al. 2004). Toutes ces pathologies ont été regroupées sous le terme d'**anoctaminopathie** (Bolduc, Marlow et al. 2010) (Neuromuscular Translational Research Conference 2010, Oxford).

Depuis l'identification du gène responsable des LGMD2L et MMD3, de nombreux patients en attente de diagnostic ont été identifiés comme porteurs de mutations dans le gène ANO5. Ces mutations représentent dorénavant une part importante des LGMD et des myopathies distales (Hicks, Sarkozy et al. 2011; Milone, Liewluck et al. 2011; Bouquet, Cossee et al. 2012; Magri, Bo et al. 2012; Penttila, Palmio et al. 2012; Schessl, Kress et al. 2012).

Les présentations cliniques principales

La récente identification d'ANO5 comme responsable des LGMD2L et MMD3 s'ajoute à son implication dans la GDD1.

- La dystrophie des ceintures de type 2L (LGMD2L)

Les premiers symptômes de la **LGMD2L** (OMIM #611307) apparaissent à l'âge adulte (entre 20 et 55 ans), avec comme caractéristiques principales un taux de **CK élevé** et une myalgie. Il est rapporté que les patients peuvent présenter une bonne performance physique avant l'apparition des premiers symptômes (Bolduc, Marlow et al. 2010). L'atteinte des muscles des **extrémités inférieures** est plus importante comparativement à celle des muscles supérieures, et il y a souvent une **asymétrie** de l'atteinte. Le quadriceps, le biceps brachii, les ischiojambiers, et l'adducteur magnus sont souvent atrophiés, le psoas affaibli (Jarry, Rioux et al. 2007; Bolduc, Marlow et al. 2010; Hicks, Sarkozy et al. 2011). Il n'y a pas d'atteinte cardiaque. La constance du phénotype observé est aujourd'hui discutée avec des études contradictoires qui concluent à son homogénéité (Hicks, Sarkozy et al. 2011) ou à une variabilité phénotypique, visible de façon inter- mais aussi intrafamiliale (Bolduc, Marlow et al. 2010). Récemment, une nouvelle caractéristique a été associée à la LGMD2L : un dépôt amyloïdes a été détecté dans les vaisseaux sanguin d'une patiente ANO5 (Milone, Liewluck et al. 2012). Comme souvent rencontré pour les LGMD, certains patients peuvent aussi être asymptomatiques.

- La myopathie distale de Miyoshi de type 3 (MMD3)

La **MMD3** (OMIM 613319) apparaît souvent de façon plus tardive que la LGMD2L. L'âge d'apparition varie en effet de 39 à 51 ans selon les cas rapportés. Le premier symptôme est l'incapacité de se tenir sur la pointe des pieds, en raison de la **faiblesse musculaire asymétrique distale** des membres inférieurs. Il est accompagné d'une difficulté à courir. Le premier muscle touché est le *gastrocnemius* (Mahjneh, Jaiswal et al. 2010). Il y a également hypertrophie de l'*extensor digitorum brevis*. A l'instar de la LGMD2L, l'imagerie par résonance magnétique a montré une asymétrie de l'atteinte chez certains patients (Jarry, Rioux et al. 2007).

La progression des deux maladies, LGMD2L et MMD3, fait se chevaucher à terme les symptômes, créant un phénotype mixte incluant les atteintes majeures des deux pathologies.

- La dysplasie gnatho-diaphysaire (GDD)

Une mutation unique sur ANO5 conduit à un phénotype de type « maladie des os de verre ». La substitution de la cystéine 356 par un autre acide aminé (arginine et glycine sont décrits à ce jour) provoque systématiquement une **GDD** (Tsutsumi, Kamata et al. 2004). Cette

mutation est **dominante**. Ce trouble affectant le squelette est caractérisé par une grande **fragilité de tous les os** du squelette ainsi qu'une hypertrophie et des infections récurrentes de l'os de la mâchoire. Les jambes des patients sont arquées, de même que les os des avant-bras.

Mutations rapportées sur ANO5

À ce jour, **41** modifications de séquences sont répertoriées sur la base de données de variations génétiques Leiden (Leiden Open Variation Database, LOVD, <http://LOVD.nl/ANO5>) (**Figure 14**) (Tsutsumi, Kamata et al. 2004; Jaiswal, Marlow et al. 2007; Jarry, Rioux et al. 2007; Bolduc, Marlow et al. 2010; Mahjneh, Jaiswal et al. 2010; Roginsky, Ivanov et al. 2010; Deschauer, Joshi et al. 2011; Hicks, Sarkozy et al. 2011; Milone, Liewluck et al. 2011; Magri, Bo et al. 2012; Penisson-Besnier, Saint-Andre et al. 2012). Parmi elles, **21** sont des mutations pathologiques : 7 peuvent conduire à un phénotype MMD3, 7 à une LGMD2L, 2 à la GDD. Les 10 dernières sont rapportées pour des patients dont le diagnostic n'est pas connu. Certaines mutations conduisent ainsi à au moins deux profils pathologiques. Il n'y a donc pas de corrélation génotype - phénotype. Les **substitutions et duplications** sont largement majoritaires, représentant respectivement 43,5 et 48,2% des mutations répertoriées. Les mutations décrites sont reportées sur la séquence protéique d'ANO5 sur la **Figure 14**.

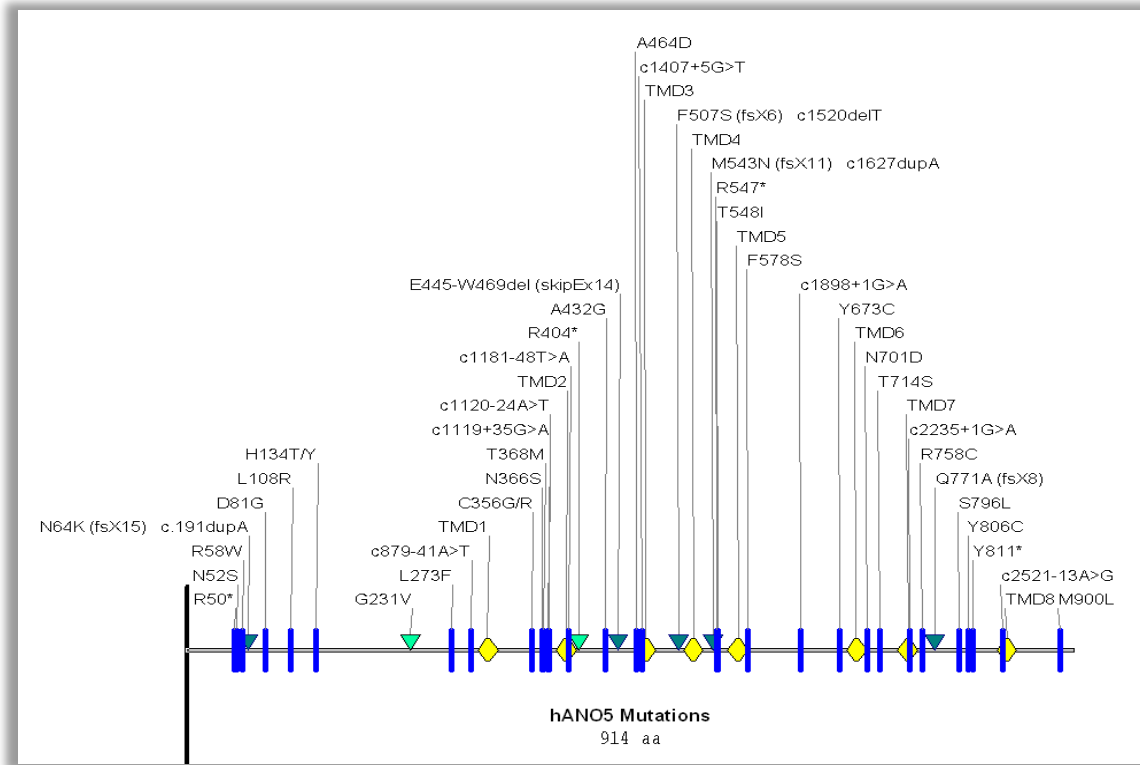


Figure 14 : Mutations connues de l’anoctamine 5

Répartition des mutations connues d’ANO5 sur sa séquence protéique annotée des 8 domaines *trans*-membranaires prédits (losanges jaunes).

La mutation **c.191dupA**, majoritaire parmi les mutations actuellement décrites, correspondrait à un **effet fondateur** dans la population européenne, en particulier dans le nord du Royaume-Uni (Hicks, Sarkozy et al. 2011). Dans cette population, la prévalence de cette mutation est estimée à 0,27/100 000 (Hicks, Sarkozy et al. 2011). La mutation **c.2272C_T**, très présente en Finlande, pourrait également être une mutation fondatrice (Bolduc, Marlow et al. 2010). Il est intéressant de noter qu’une récente étude fait état du faible nombre de mutations ANO5 découvertes sur une cohorte de patients italiens (Magri, Bo et al. 2012). Cette particularité impose une grande **prudence** dans l’estimation globale d’une prévalence des mutations ANO5 dans l’état actuel des connaissances, cette dernière pouvant fluctuer selon la population étudiée.

Plusieurs études soulignent une atteinte préférentielle des hommes, quelle que soit la pathologie regardée. Ainsi, seul 5 des 32 cas étudiés par Hicks se réfèrent à des femmes (15,6%) et 3 sur 12 pour l’étude de Bolduc (25%) (Bolduc, Marlow et al. 2010; Hicks, Sarkozy et al. 2011). Dans la base de données de Leiden, l’absence d’information sur un trop grand nombre de patients empêche toute conclusion ; le nombre absolu de patients

rapportés peut toutefois être informatif : 71 hommes pour 18 femmes. Cette distorsion de ratio n'empêche toutefois pas de trouver des femmes atteintes pour chacune des pathologies ANO5.

II. Biologie de la Dysferline

A. Les ferlines

La dysferline fait partie de la famille des **ferlines**. Cette dénomination vient de la similarité des protéines constituant cette famille avec FER1, une protéine impliquée dans la spermatogenèse chez *Caenorhabditis elegans*. FER1 joue un rôle prépondérant dans ce processus, en permettant la fusion de vésicules appelées organites membraneux avec la membrane plasmique des spermatides (Achanzar and Ward 1997).

1. La famille des ferlines

La famille des ferlines compte actuellement **6 protéines** chez les mammifères, nommées de **Fer1-L1 à Fer1-L6** pour Fer1-Like, puis l'ordre de leur identification. Trois ferlines ont été plus largement étudiées et bénéficient d'un nom qui leur est propre : **dysferline** pour Fer1-L1 (Bashir, Britton et al. 1998; Liu, Aoki et al. 1998), **otoferline** pour Fer1-L2 (Yasunaga, Grati et al. 1999), et **myoferline** pour Fer1-L3 (Davis, Delmonte et al. 2000) pour sa ressemblance à la dysferline et son expression dans les tissus musculaires. Les ferlines sont des protéines dont la taille varie entre 200 et 240 kDa environ. Elles sont caractérisées par la présence de 5 à 7 **domaines C2** tout au long de leur séquence peptidique et un **domaine transmembranaire** dans leur partie C-terminale. Elles peuvent également porter des **domaines spécifiques Dysf et Fer**.

2. Domaines caractéristiques des ferlines

Domaines C2

Un domaine C2 est un motif de liaison d'environ 130 acides aminés de longueur, initialement identifié sur la protéine kinase C (Coussens, Parker et al. 1986). Il a la propriété de former aussi bien des interactions avec des **protéines** qu'avec des **membranes** phospho-lipidiques. Ces interactions peuvent être **calcium-dépendantes**, ce qui implique une forte régulation de l'activité des ferlines par cet ion (Nalefski and Falke 1996). Des domaines C2 dont l'activité est indépendante du calcium ont également été décrits (Pepio, Fan et al. 1998). La liaison aux membranes est induite par la disposition des acides aminés hydrophiles et hydrophobes dans la séquence. Une face du domaine C2 est ainsi très hydrophobe, et la liaison d'ion calcium renforcerait cette caractéristique. **Deux types** de domaines C2 peuvent être distingués selon leur structure secondaire (**Figure 15**) (Nalefski

and Falke 1996). L'implication de cette différence topologique au niveau fonctionnel reste toutefois inconnue.

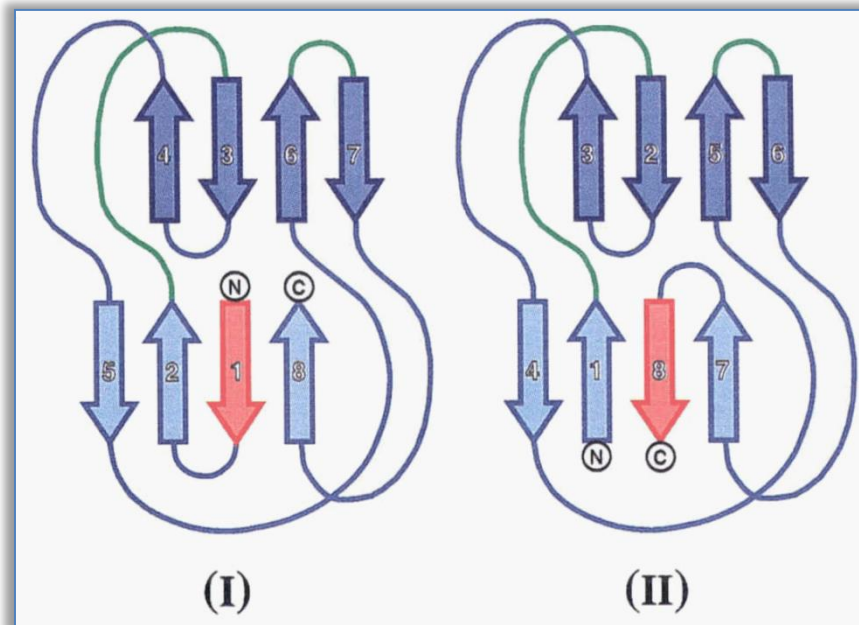


Figure 15 : Les deux types de domaines C2.

Un domaine C2 est composé de 8 brins β dont l'enchaînement permet de le classer en type 1 ou type 2. Le type 1 ou 2 est défini selon la présence ou non dans le même feuillet des brins β n°1 et n°2. Cette différence n'affecte ni la structure secondaire ni la structure tertiaire. Trois boucles formées par les repliements des brins β portent des résidus fortement conservés entre les espèces et sont impliquées dans la liaison aux ions calcium. Ces trois boucles sont celles que l'on trouve sur les parties supérieures des schémas. (Figure tirée de (Nalefski and Falke 1996)).

A l'heure actuelle, des domaines C2 ont été identifiés sur près de 300 protéines chez l'Homme. Toutefois, le nombre de domaines C2 est limité à 2 sur la majorité de ces protéines. Seules les ferlines, les synaptotagmines-like (extended synaptotagmin-like, E-Syts) (Min, Chang et al. 2007; Groer, Haslbeck et al. 2008) et les protéines riches en domaines C2 et transmembranaires MCTPs (pour « multiple C2 domain and transmembrane region proteins ») (Shin, Han et al. 2005) présentent un nombre élevé de domaines C2.

Domaines Dysf et Fer

Les logiciels de prédiction de domaines, notamment Pfam et SMART (<http://pfam.sanger.ac.uk/> et <http://smart.embl-heidelberg.de/>), prédisent également deux autres domaines, appelés **Dysf** et **Fer**, comme présents sur les ferlines bien que de façon non systématique (Figure 17). Leur rôle reste largement méconnu à l'heure actuelle.

Le domaine **Dysf** prédit par SMART est divisé en **deux sous-domaines** : DysfN (correspondant à la partie N-ter du domaine) et DysfC (partie C-ter du domaine). Cette distinction est apportée en raison de l'imbrication de deux domaines Dysf l'un dans l'autre sur la dysferline, la myoferline et Fer1-L5, créant donc une répétition de deux domaines DysfN suivis de deux domaines DysfC (Figure 16a). Une étude par résonance magnétique nucléaire (RMN) menée par l'équipe de Keep (Patel, Harris et al. 2008) décrit la topologie du domaine Dysf comme étant une structure composée de 2 longs brins β orientés en antiparallèle, liés par de multiples brins β très courts (Figure 16b).

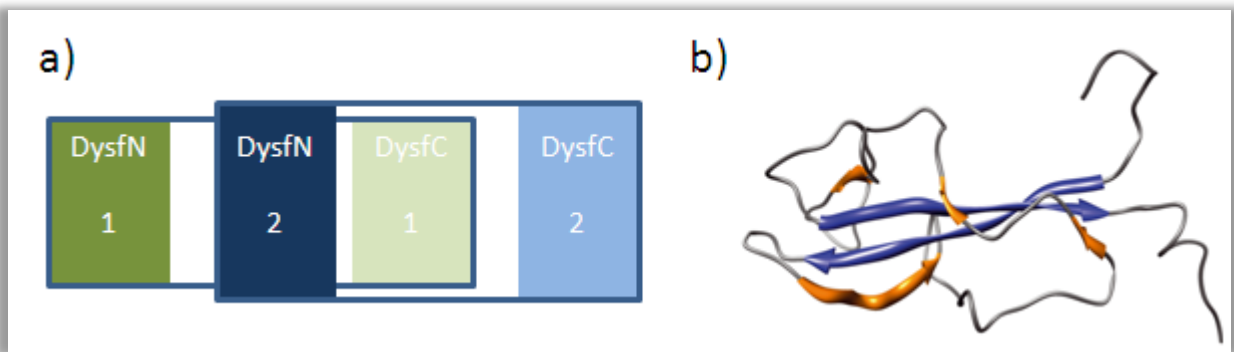


Figure 16 : Le domaine Dysf : structure en tandem et structure 3D.

a) Schématisation des deux domaines Dysf se chevauchant, présents sur la Dysferline, Myoferline et Fer1-L5. Chaque domaine Dysf est divisé en un domaine DysfN et un domaine DysfC. Leur imbrication forme une répétition DysfN DysfN DysfC DysfC.

b) Représentation tridimensionnelle d'un domaine Dysf après analyse RMN de la Myoferline. La structure correspond aux domaines DysfN 2 et DysfC 1 représentés en (a). Les 2 longs brins β orientés en antiparallèle représentés en bleu sont codés l'un par DysfN et l'autre par DysfC. Les extrémités Cter et Nter libres permettent d'envisager un repliement à l'identique du domaine DysfN 1 et DysfC 2. En orange sont représentés les multiples brins β très courts (Figure issue de (Lek, Evesson et al. 2012)).

Trois domaines **Fer** sont potentiellement présents sur les ferlines : **FerA** et **FerB** sont situés entre le domaine C2C et le premier domaine DysfN, tandis que **FerI** est situé entre le C2B et C2C. Les domaines FerA et FerB sont des motifs présentant une structure secondaire conservée. FerA est ainsi composé de 66 acides aminés organisés en deux hélices α , et FerB compte 76 acides aminés qui forment trois brins β . Une récente revue menée par l'équipe de Cooper (Lek, Lek et al. 2010) souligne, par l'étude phylogénétique des ferlines au cours de l'évolution, que la présence de FerA semble être liée à la présence des domaines Dysf et suggère une relation fonctionnelle entre ces motifs.

3. Classification et description des Ferlines

Une comparaison des domaines répartis sur chacune des 6 ferlines permet de les classer en **deux groupes**. Le premier groupe (dit de Type 1) est caractérisé par la présence d'un domaine Dysf. Il comprend la dysferline, la myoferline et Fer1-L5. Le deuxième groupe (Type 2) réunit les autres ferlines (otoferline, Fer1-L4 et Fer1-L6) qui sont donc toutes dépourvues de domaine Dysf (Figure 17). Il est intéressant de noter que si la plupart des vertébrés possèdent les 6 ferlines, une grande majorité des invertébrés ne possèdent eux qu'une ferline de chaque type, suggérant une fonction bien spécifique du domaine Dysf (Lek, Lek et al. 2010).

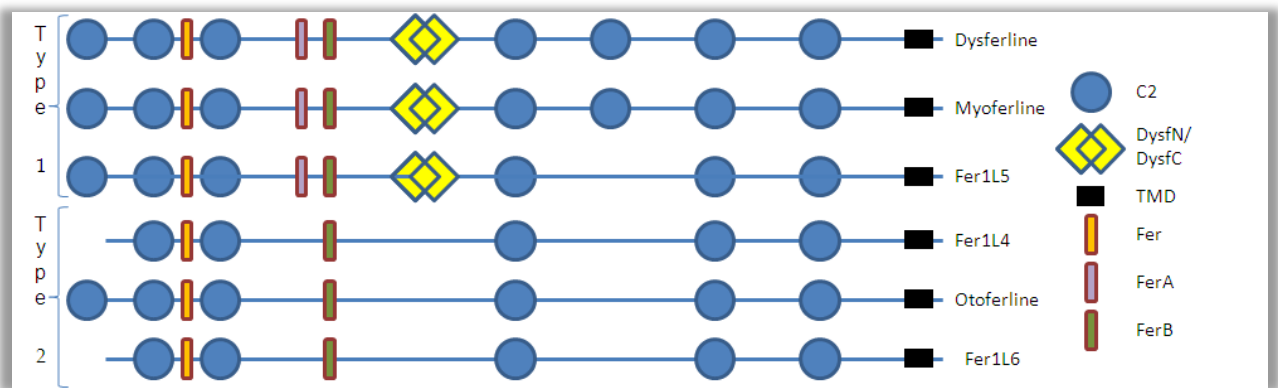


Figure 17 : Comparaison des différents domaines conservés de la famille des ferlines chez l'Homme.

Toutes les ferlines contiennent au moins cinq domaines C2, avec trois zones très conservées : le triptyque C2B-Fer1-C2C; le domaine C2D et deux domaines C2 adjacents au domaine transmembranaire.

La **dysferline** est la plus documentée des ferlines. Je la décrirai en détail dans la sous partie suivante en raison de sa place prépondérante dans mon sujet de thèse. La **myoferline** est une protéine de 230 kDa, qui, comme la dysferline, contient un domaine transmembranaire carboxy-terminal et sept domaines C2. Elle est homologue à 56% (et similaire à 72%) avec la dysferline. Elle n'est associée à aucune pathologie humaine. L'**otoferline**, d'une taille relativement équivalente (227 kDa) ne compte que six domaines C2 (absence du domaine C2E identifié sur la dysferline), et possède les motifs FerI et FerB, mais pas le domaine FerA ni les domaines Dysf. L'otoferline est impliquée dans la forme de surdité autosomique récessive DFNB9 (OMIM : 601071) qui fait partie des 20 DFNB répertoriées à ce jour (DFN pour Deafness, B pour autosomale récessive). **Fer1-L4, Fer1-L5 et Fer1-L6** sont très peu documentées. Elles ont été identifiées sur la base de leur ressemblance avec la DYSF, MYOF et OTOF par l'analyse du génome humain. Des informations complémentaires sur ces protéines sont présentées dans l'annexe II.

B. Le gène *DYSF* et la protéine dysferline

Le gène *DYSF* (Entrez Gene ID: 8291) est situé sur le locus **2p13** du génome humain, où il couvre une région de **233 kb** environ. Ce gène est composé de façon canonique de **55 exons** mais l'étude de sa transcription a révélé l'existence d'un certain nombre de variants.

1. Les messagers de *DYSF* :

La transcription du gène *DYSF* est contrôlée par deux promoteurs: le promoteur *DYSF* (GenBank accession number AF075575) et le promoteur alternatif *DYSF-v1* (GenBank accession number DQ267935) (Pramono, Lai et al. 2006). L'utilisation d'un promoteur ou de l'autre a pour conséquence de modifier l'exon 1 inclus dans les transcrits produits, mais pas le reste de la séquence (**Figure 18**). La courte séquence codante (88 pb pour *Dysf* et 91 pb pour *Dysf-v1*) des exons 1 est très différente, de même que les séquences régulatrices des 5'UTR. Notons ici qu'un transcrit de 3,8 kb a été observé dans le cerveau par northern blot à partir d'une sonde située dans le 3'UTR de la dysferline (Bashir, Britton et al. 1998 ; Liu, Aoki et al. 1998). Ce transcrit a été décrit dans un brevet déposé en 2004 (US Patent 6673909) comme étant composé des exons 31 à 55 du gène *DYSF* et possédant à son extrémité 5' une séquence de 482 acides nucléiques qui lui est spécifique. Les 72 dernières bases de cette séquence additionnelle sont codantes et en phase avec l'exon 31. Le transcrit spécifique au cerveau permettrait la synthèse d'une protéine de 988 AA dont les 24 premiers sont spécifiques à cette isoforme.

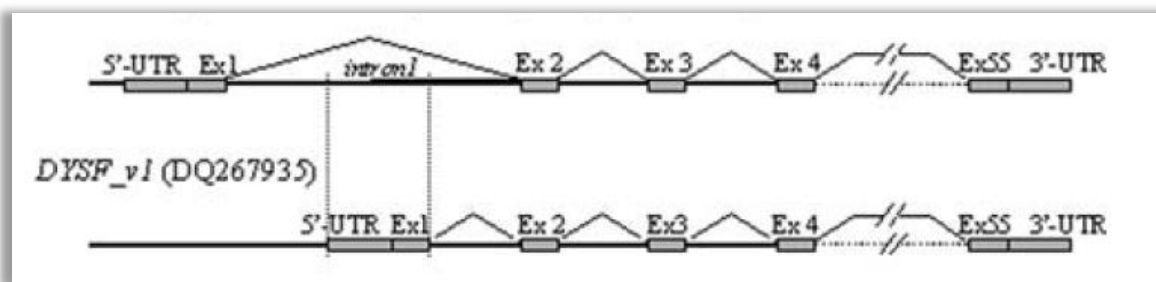


Figure 18 : Localisation de l'exon 1 alternatif inclus dans les transcrits résultant de l'activité du promoteur *DYSF-v1*.

L'exon 1 alternatif inclus dans les transcrits exprimés par le promoteur *DYSF-v1* se trouve au niveau de l'intron 1 du gène *DYSF* canonique (issue de (Pramono, Lai et al. 2006)).

Trois éléments alternatifs ont été décrits à ce jour sur les transcrits issus des deux promoteurs. Les deux premiers résultent de l'inclusion **d'exons alternatifs** présents dans les introns 5 et 40, nommés respectivement exons **5a** et **40a**, et le troisième de **l'exclusion** de l'exon 17 (Pramono, Tan et al. 2009). Pour chacun des transcrits issus de l'activité de

DYSF et *DYSF-v1*, toutes les combinaisons des trois éléments alternatifs ont été décrites à l'exception de la combinaison incluant l'exon 5a, 17 et 40a, ce qui porte à 14 le nombre de variants transcriptionnels du gène *DYSF*.

Les **14 variants** *DYSF* codent chacun une isoforme de la dysferline d'environ 240 kDa. En effet, aucun des 4 éléments alternatifs ne modifie le cadre de lecture total de l'ARN messager (**Figure 19**). De plus, les trois exons alternatifs 5a, 17 et 40a codent des séquences peptidiques en dehors des domaines structuraux prédits, leur inclusion ou exclusion ne modifie donc pas les domaines conservés de la dysferline (Pramono, Tan et al. 2009). Les protéines produites par les transcrits issus de *DYSF-v1*, nommées *DYSF var-v1* à 7 présentent une séquence en N-ter légèrement modifiée (20 AA) par rapport à l'utilisation de l'exon 1 classique (*DYSF var-1* à 7), n'affectant pas la présence du C2A.

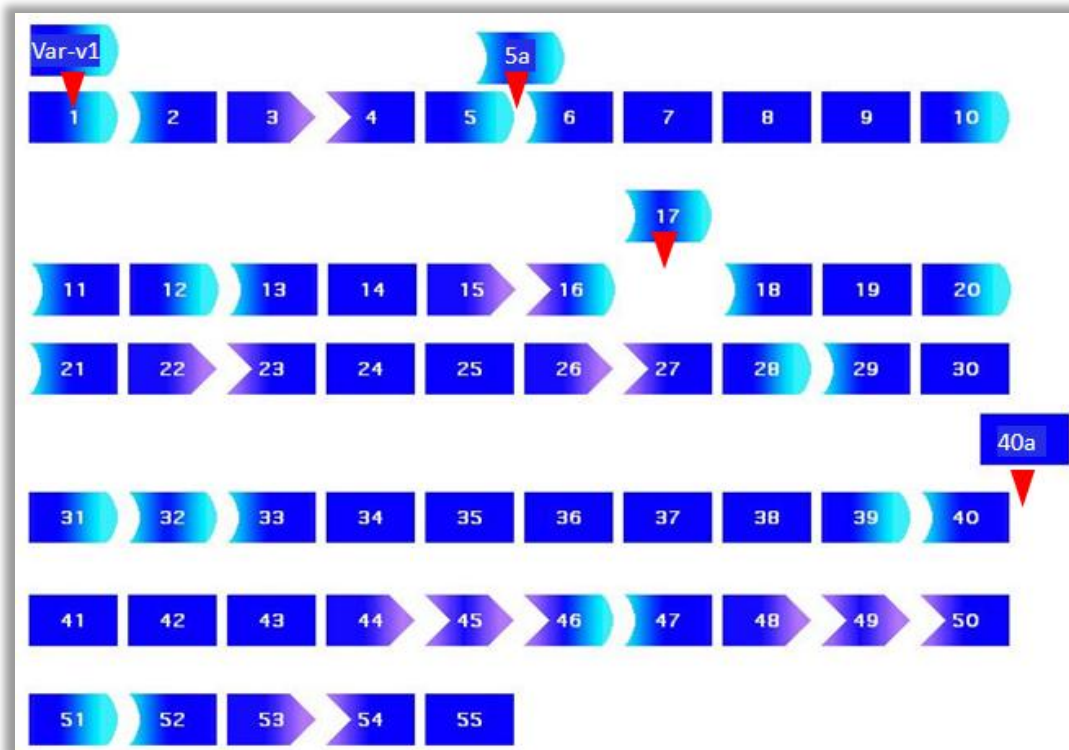


Figure 19 : Phase de lecture des exons de *DYSF* et positionnement des 4 éléments alternatifs.

Représentation schématique des phases de lecture de chacun des exons de *DYSF*, adaptée d'après le code utilisé par la base de données UMD Dysf (www.umd.be/DYSF/). Les 4 éléments alternatifs identifiés pour la dysferline ne modifient pas le cadre de lecture total de la séquence codante.

Le gène *DYSF* est exprimé de façon **ubiquitaire** au niveau ARN chez l'Homme (Anderson, Davison et al. 1999). Un travail mené par l'équipe de Woon Chee Yee en 2009 (Pramono,

Tan et al. 2009) a évalué le niveau d'expression des 14 variants dans le tissu musculaire et le sang. Il en ressort que le transcrite le plus présent dans le muscle est composé de 55 exons (exon1, Δexon5a, exon17, Δexon40a) (73%), soit un ARNm de 6914 b référencé dans les bases de données sous le terme variant 8 (NM_003494.3). Dans le sang en revanche, le variant majoritaire (44%) inclut l'exon5a et exclut le 17 (exon1, exon5a, Δexon17, Δexon40a). De façon intéressante, les variants ne possédant pas l'exon 17 sont généralement exprimés à des stades précoces de la différenciation des cellules myogéniques. Ils constituent également les transcrits prédominants dans les tissus du système nerveux périphérique mature (Salani, Lucchiari et al. 2004).

2. La protéine dysferline

Caractéristiques de la dysferline

La **dysferline** (NM_003494) est définie comme étant la protéine résultant de la traduction du transcrite musculaire majoritaire du gène DYSF, le **variant 8**, défini plus haut. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de **type 2** (partie C-terminale extracellulaire) composée de 2080 acides aminés chez l'Homme (2099 chez la souris (NP_001071162.1)). La protéine complète a une masse moléculaire de **237 kDa**. Comme décrit plus haut, elle est caractérisée par sept domaines C2 (C2A à C2G) et tous les domaines rapportés pour les ferlines : les trois domaines Fer (FerI, FerA et FerB) et les deux domaines Dysf positionnés en quinconce.

Les domaines C2A, C2B et C2E de la dysferline sont des domaines C2 de type 1, alors que les quatre autres sont de type 2. Le domaine C2A de la dysferline se lie aux phospholipides de manière Ca^{2+} dépendante (Davis, Doherty et al. 2002; Therrien, Di Fulvio et al. 2009) alors que les autres domaines sont beaucoup moins sensibles, voire insensibles, à cet ion (Therrien, Di Fulvio et al. 2009). Chaque domaine C2 est structurellement plus divergent avec les autres domaines C2 de la dysferline qu'avec le domaine analogue d'une autre ferline (Han and Campbell 2007; Jimenez and Bashir 2007). La dysferline porte également plusieurs séquences signal de localisation nucléaire (NLS), cependant aucune étude n'a pour l'heure démontré son rôle dans le noyau, ni même sa présence dans cette structure. Le domaine transmembranaire en C-ter permet l'insertion de la dysferline à la membrane, et place la quasi-intégralité de la dysferline à l'intérieur du cytosol (**Figure 20**). La localisation membranaire est d'ailleurs due au seul domaine transmembranaire, et les domaines C2, Fer et Dysf n'y joue aucun rôle (Klinge, Laval et al. 2007; Roostalu and Strahle 2012).

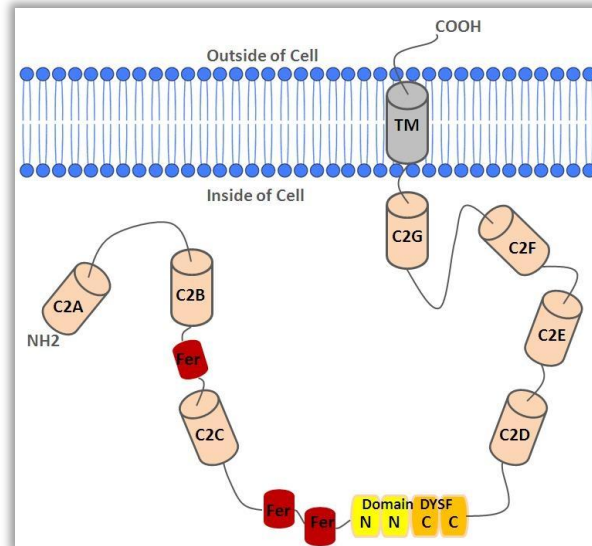


Figure 20 : Schématisation de la dysferline ancrée à la membrane.

Représentation de la dysferline ancrée à la membrane par sa région transmembranaire. Les 7 domaines C2 sont indiqués en brun, les domaines Fer1, A et B en rouge, et les domaines Dysf N et Dysf C respectivement en jaune et orange. La partie C terminale de la protéine présente dans le compartiment extracellulaire ne comporte qu'une vingtaine d'acides aminés.

Structure quaternaire

Récemment, l'équipe de Han (Xu, Pallikkuth et al. 2011) a montré que la dysferline s'associait en **homodimère** dans la cellule. Les analyses conduites aussi bien *in cellulo* qu'*in vitro* leur ont permis d'établir l'hypothèse que le domaine transmembranaire et tous les domaines C2, à l'exception du C2A, sont capables de s'associer avec leur homologue sur une autre dysferline (Figure 21). Le C2A restant libre, il serait responsable de la liaison calcium dépendante de la dysferline ainsi multimérisée à la membrane. Cette étude est la seule à rapporter cette structure en dimère ; sans être controversée, cette observation n'a jamais été confirmée.

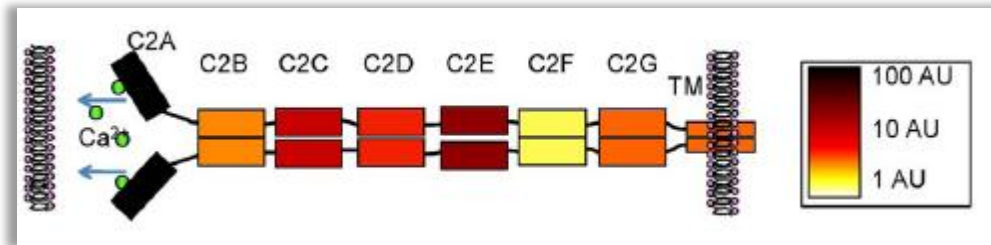


Figure 21 : Représentation d'un homodimère créé par l'association de deux dysferlines.

Le domaine transmembranaire et tous les domaines C2, à l'exception du C2A, sont capables de s'associer avec leur homologue sur une autre molécule. L'échelle de couleur symbolise la force de cette interaction en unité arbitraire. Le dimère créé laisse la capacité des domaines C2A à se fixer à une membrane ou à d'autres protéines (Image tirée de (Xu, Pallikkuth et al. 2011)).

3. Localisation tissulaire et cellulaire de la Dysferline

Biodistribution de la dysferline

Chez l'adulte, la protéine dysferline est retrouvée majoritairement dans trois tissus : le **muscle squelettique**, les **cellules immunitaires** et le **placenta** (Ho, Gallardo et al. 2002; Vandre, Ackerman et al. 2007). Toutefois, elle a été décrite comme exprimée de façon ubiquitaire chez le rat (Anderson, Davison et al. 1999), et de plus en plus de travaux la décrivent dans différents tissus chez l'Homme, comme dans les **cellules endothéliales vasculaires** (Leung, Uto kaparch et al. 2011) et les cellules du **placenta** (Vandre, Ackerman et al. 2007). Elle a également été détectée dans les **glomérules du rein** où elle jouerait un rôle dans la perméabilité nécessaire à l'échange entre le système sanguin et le système urinaire. Elle est en effet présente dans les podocytes, des cellules responsables de la création des fentes de filtration du filtre glomérulaire assurant la rétention des protéines sanguines mais laissant passer les déchets métaboliques (Izzedine, Brocheriou et al. 2006).

Localisation subcellulaire de la dysferline

La dysferline est présente à la **membrane** des fibres musculaires. L'immunomarquage de la dysferline sur des coupes de muscles montre en effet un fort signal au niveau du **sarcolemme** (Anderson, Davison et al. 1999) (**Figure 22a**). Un travail spécifique d'optimisation du marquage de la dysferline sur des coupes transversales de muscle permet d'observer, en plus de ce marquage du sarcolemme, un **marquage réticulé du cytoplasme**. Le même marquage sur des coupes longitudinales montre un profil strié à la façon des sarcomères (Roche, Ru et al. 2011) (**Figure 22b et c**). Ces marquages suggèrent une présence de la dysferline au niveau du **réticulum sarcoplasmique** et corroborent les

données montrant que la dysferline est associée au réseau de **tubules-T** (Ampong, Imamura et al. 2005; Klinge, Laval et al. 2007; Waddell, Lemckert et al. 2011). En effet, la dysferline colocalise et coprécipite avec DHP, présent uniquement dans les tubules-T. La dysferline est également décrite dans des **vésicules** présentes sous le sarcolemme (Bansal and Campbell 2004; Cenacchi, Fanin et al. 2005). Elle colocalise dans ces vésicules avec la protéine LAMP2 qui est un marqueur spécifique des **lysosomes** (Demonbreun, Fahrenbach et al. 2011). Elle colocalise également avec des vésicules portant Ahnak, la protéine caractéristique des **enlargeosomes**. Dans des cultures de cellules musculaires, la dysferline présente une localisation similaire à celle déterminée *in vivo*. La dysferline est fortement exprimée dans les myotubes différenciés, mais elle est également détectable dans les myoblastes humains (Davis, Doherty et al. 2002; Doherty, Cave et al. 2005). Un marquage de la dysferline sur des myotubes de C2C12 montre une présence à la membrane ainsi qu'une légère distribution intracellulaire avec un profil réticulé (Belanto, Diaz-Perez et al. 2010; Humphrey, Mekhedov et al. 2012). Le suivi *in cellulo* dans des cellules COS-7 d'une dysferline fusionnée à la GFP révèle, comme attendu, une distribution ponctuée intracellulaire, enrichie autour des régions périnucléaires, avec une migration des structures marquées à la membrane (Leung, Utokaparch et al. 2011).

La **demi-vie** de la dysferline est estimée entre 4 et 6 heures (Evesson, Peat et al. 2010) avec un maintien à la membrane plasmique d'environ 3h. Il semblerait que le domaine Dysf joue un rôle dans la stabilité de la dysferline (Patel, Harris et al. 2008). D'autres travaux ont montré que le triptyque C2-FerI-C2, par sa fonction ou sa structure, joue un rôle important dans la localisation et la stabilité de la dysferline. Des mutations dans le C2C ou FerI conduisent effectivement à une réduction par 2,5 de la quantité de dysferline localisée à la membrane (Evesson, Peat et al. 2010). Cette même étude attribue cette baisse à une redirection vers le système endolytique des dysferlines mutées.

Dans les cellules immunitaires, la dysferline est exprimée à la **membrane des monocytes** (Ho, Gallardo et al. 2002; Wein, Krahn et al. 2010; Gallardo, de Luna et al. 2011; Meznaric, Gonzalez-Quereda et al. 2011), et particulièrement au niveau des CD14+ (**Figure 22d**). Dans le troisième tissu historiquement présenté comme exprimant la dysferline, le placenta, la dysferline est présente de façon exclusive dans les **syncytiotrophoblastes**, essentiellement au niveau de la membrane plasmique apicale (**Figure 22e** (Vandre, Ackerman et al. 2007; Robinson, Vandre et al. 2009)).

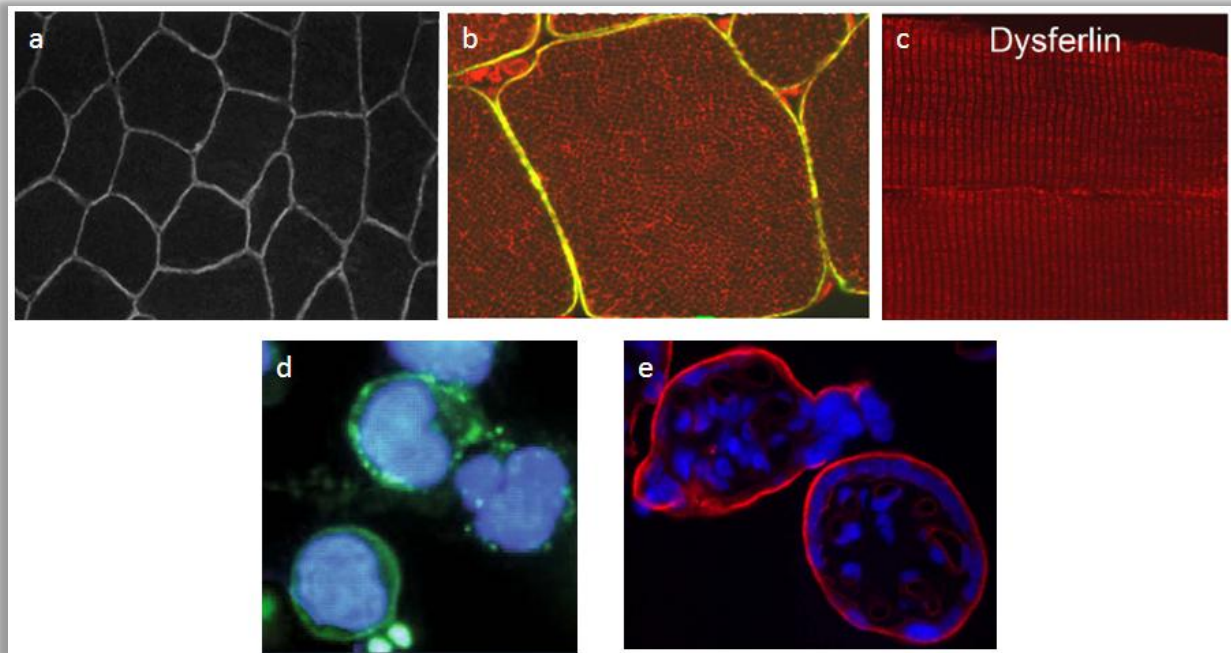


Figure 22 : Localisation de la dysferline dans différents types cellulaires.

a) marquage par immunohistofluorescence (IHF) de la dysferline sur des coupes de muscle humain normal (Anderson, Davison et al. 1999). La dysferline marque le contour des fibres, au niveau du sarcolemme. b et c) l'optimisation de ces mêmes marquages permet de révéler un marquage du réticulum sarcoplasmique en plus d'un marquage du sarcolemme (comarquage avec la dystrophine en vert). Sur une coupe longitudinale, un profil sarcomérique est visible et correspond au réseau des tubules transverses (Roche, Ru et al. 2011). d) l'immunomarquage de la dysferline sur des monocytes CD14+ révèle sa présence à la membrane de ces cellules (Wein, Krahn et al. 2010). e) l'immunomarquage de la dysferline sur des syncytiotrophoblastes indique là aussi sa présence à la membrane de ces cellules, et particulièrement à leur partie apicale (Robinson, Vandre et al. 2009).

4. Les fonctions de la dysferline

Implication dans l'intégrité et la réparation des membranes

L'**observation** chez des patients déficients en dysferline d'une **accumulation de vésicules** à la membrane a suggéré un rôle de la dysferline soit dans le transport, soit dans la fusion de ces vésicules à la membrane plasmique. Cette accumulation a été observée par microscopie électronique sur des biopsies de patients atteints de Myopathie de Miyoshi (Piccolo, Moore et al. 2000) et de LGMD2B (Selcen, Stilling et al. 2001). Plus précisément, les défauts constatés dans les cellules où la dysferline est absente sont des discontinuités de la membrane plasmique, un remplacement fréquent du sarcolemme par une ou plusieurs couches de petites vésicules, des altérations dans la lame basale (épaississement ou duplication), la présence de plis de membrane à la surface des cellules, une accumulation de vacuoles subsarcolemmales et une accumulation de réticulum endoplasmique rugueux à certains endroits de la cellule.

L'implication directe de la dysferline dans le processus de **réparation membranaire** a été montrée par l'équipe de K. Campbell grâce à l'observation d'une différence dans la capacité de réparation d'une lésion entre une cellule saine et une cellule déficiente en dysferline (Bansal, Miyake et al. 2003). Les lésions lors de ces expériences ont été réalisées par un **laser** qui crée un trou unique dans la membrane. Pour les cellules saines, la réparation est **rapide**, de l'ordre de quelques minutes, et est dépendante du **calcium**. *In vivo*, la présence de la dysferline dans les tubules-T est tout à fait en accord avec cette fonction de réparation membranaire. En effet, les invaginations membranaires que représentent les tubules-T sont particulièrement vulnérables aux mouvements impliqués par la contraction des cellules musculaires. (Takekura, Fujinami et al. 2001). La sensibilité de ces structures aux microlésions expliquerait leur besoin en dysferline pour les réparer.

Implication dans le trafic vésiculaire

La dysferline est impliquée dans le **trafic** de nombreuses molécules dans la cellule. A chaque fois, c'est *via* la régulation du trafic vésiculaire que ce contrôle est exercé. Ainsi, en contrôlant des vésicules contenant la protéine membranaire 2 associée aux lysosomes (lysosomal -associated membrane protein 2, LAMP2), la dysferline est indirectement liée à l'activité de ces derniers dans la **réparation** membranaire (Demonbreun, Fahrenbach et al. 2011). L'accumulation de transferrine dans les myoblastes de souris dysferline déficientes reflète aussi un trafic vésiculaire anormal. La dysferline a également été décrite comme intervenant dans le trafic et le recyclage de **IGF1-R**, contrôlant par là-même la **croissance** du muscle (Demonbreun, Fahrenbach et al. 2011). Présente dans les cellules endothéliales, elle influence aussi l'**adhésion** cellulaire par la régulation du trafic des vésicules contenant PECAM-1 (platelet endothelial cellular adhesion molecule-1) (Sharma, Yu et al. 2010). De façon intéressante, la dysferline a également été décrite comme colocalisant avec GLUT4, un acteur des vésicules spécialisées dans le déplacement du glucose, l'impliquant ainsi dans la régulation de l'activité métabolique (Piccolo, Moore et al. 2000).

En outre, il a été montré que la dysferline est associée au phénomène de **bourgeonnement** de la membrane plasmique, observé *in vitro* en réponse à un choc hypotonique dans des cultures de myotubes de souris. Ce phénomène de bourgeonnement, provoqué par la dissociation de la membrane plasmique du cytosquelette, nécessite l'apport de matériel membranaire par la fusion rapide de vésicules avec la membrane.

Dans les fibres musculaires normales, le processus faisant intervenir la dysferline dans son double rôle de **trafic vésiculaire** et de **réparation membranaire** peut être **schématisé** comme présenté dans la **Figure 23**. (a) La dysferline est localisée à la membrane plasmique, dans le réseau de tubules transverse, dans des vésicules portant plusieurs de ses partenaires et dans les enlargeosomes. La lésion du sarcolemme provoque l'entrée non contrôlée massive de calcium et de molécules oxydatives, qui provoque la migration de vésicules et d'enlargeosomes vers le site de rupture grâce à MG-53 et à la tubuline. (b) L'endocytose de vésicules au niveau du tubule transverse entraîne son rétrécissement local, permettant à la fois de diminuer les forces de tensions exercées au niveau de la lésion et empêchant temporairement la contraction en limitant l'activabilité du DHPR. (c) Les complexes protéiques associés à la dysferline induisent l'accumulation et la fusion de vésicules à la membrane créant ainsi un patch riche en annexines, permettant à la fois de limiter l'entrée de calcium et la sortie de molécules pro-inflammatoires. La fermeture de la lésion se fait par réduction de la tension et/ou par fusion des différentes membranes en place.

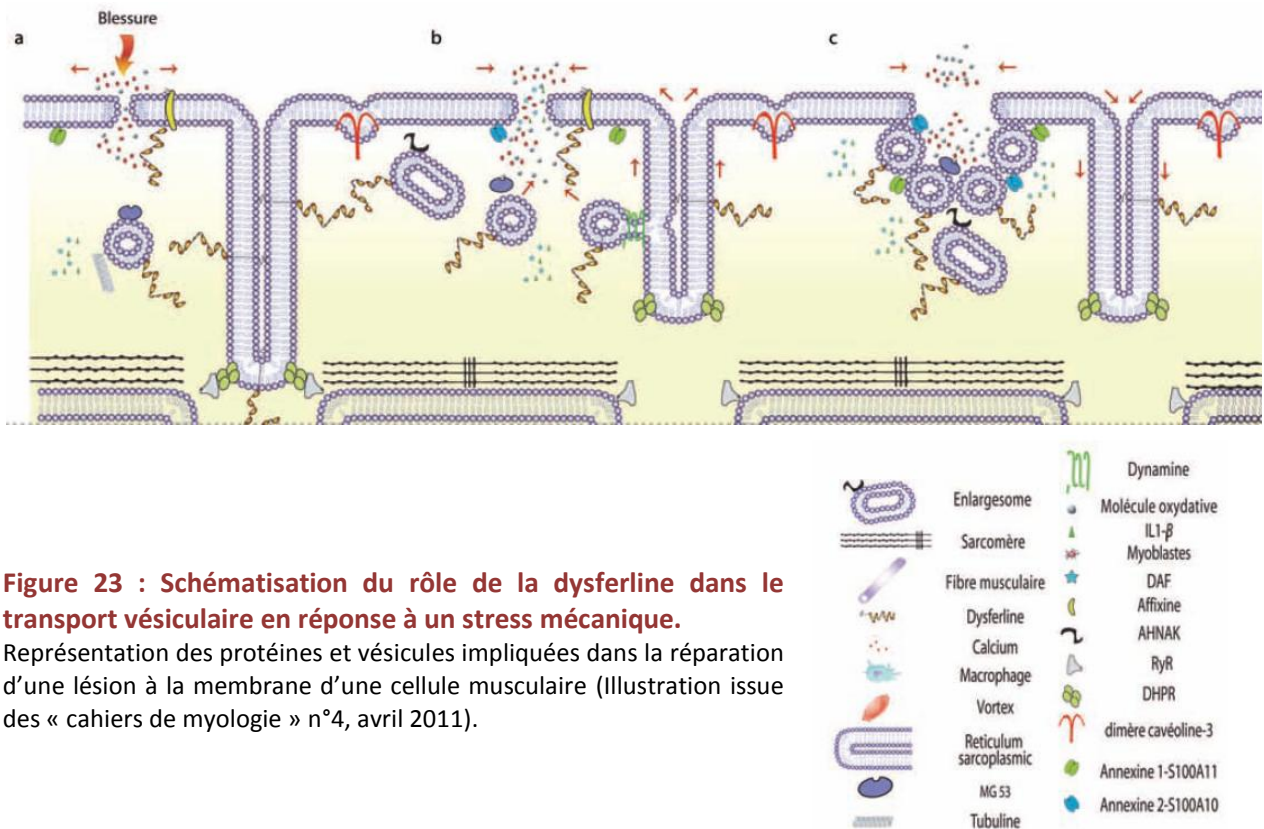


Figure 23 : Schématisation du rôle de la dysferline dans le transport vésiculaire en réponse à un stress mécanique.

Représentation des protéines et vésicules impliquées dans la réparation d'une lésion à la membrane d'une cellule musculaire (Illustration issue des « cahiers de myologie » n°4, avril 2011).

Implication dans la fusion des myoblastes

Des divergences existent dans la littérature quant à l'implication de la dysferline dans le potentiel des myoblastes à fusionner et à se différencier en myotubes. Plusieurs études ont rapporté que les myoblastes déficients en dysferline ne montraient **pas d'altération** à fusionner par rapport à des myoblastes sains. Ils sont également capables d'activer les voies myogéniques, suggérant que la dysferline ne joue un rôle ni dans les étapes de formation, ni dans les étapes de maturation des myotubes (Davis, Doherty et al. 2002; Doherty, Cave et al. 2005; Klinge, Laval et al. 2007; Demonbreun, Fahrenbach et al. 2011; Posey, Demonbreun et al. 2011). De plus, l'âge d'apparition des symptômes liés à l'absence de dysferline suggère une bonne capacité des cellules à fusionner et à se différencier lors du développement. De façon contradictoire, d'autres études ont rapporté une **différenciation réduite** ou retardée des myoblastes déficients en dysferline (Belanto, Diaz-Perez et al. 2010; Demonbreun, Fahrenbach et al. 2011).

Implication dans le système immunitaire

Les dysferlinopathies sont souvent associées à l'apparition **d'infiltrats inflammatoires** musculaires marqués (Selcen, Stilling et al. 2001; Confalonieri, Oliva et al. 2003). Une expression anormale du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I a été observée dans des fibres en **régénération**, proche des foyers de cellules immunitaires dans les biopsies de patients (Confalonieri, Oliva et al. 2003). De façon notable, les infiltrats inflammatoires autour des vaisseaux sanguins sont principalement composés de **macrophages** alors que les infiltrats présents dans l'endomysium ont été caractérisés comme étant majoritairement des cellules de l'immunité **CD4 + et CD8 +**. Une réaction locale à éosinophiles pourrait constituer un des premiers stades du processus pathologique, même si elle semble ne pas être spécifique aux dysferlinopathies (Krahn, Beroud et al. 2009).

De plus, il a été rapporté que l'activité des **macrophages**, exprimant habituellement la dysferline, était **plus élevée** en absence de dysferline (Nagaraju, Rawat et al. 2008). Cette étude pose l'hypothèse que chez les patients présentant une déficience en dysferline, le processus de phagocytose est plus **agressif** que la normale, provoquant l'amplification générale de la réaction inflammatoire. Une autre hypothèse où le **complément** est identifié comme un acteur clé de la pathogenèse de cette maladie est également proposée (Wenzel, Zabojszcza et al. 2005; Han, Frett et al. 2010). Les principales composantes du complément modifiées dans le cas des dysferlinopathies sont la protéine **C3-convertase** et le **C5b**, qui

initie la voie d'attaque membranaire et crée le complexe d'attaque membranaire (MAC). L'expression des facteurs du complément est augmentée dans le muscle squelettique de la souris déficiente en dysferline, et l'extinction du facteur C3 du complément améliore son phénotype. Plus précisément, le dépôt du MAC à la surface des fibres musculaires joue un rôle fondamental dans les lésions musculaires liées aux dysferlinopathies (Wenzel, Zabojszcza et al. 2005).

5. Protéines interagissant avec la dysferline

De nombreuses protéines interagissant avec la dysferline ont été identifiées. AHNAK (Huang, Laval et al. 2007), les annexines A1 (Lennon, Kho et al. 2003) et A2 (Gerke and Moss 2002), HDAC6 (Di Fulvio, Azakir et al. 2011), l'alpha tubuline (Azakir, Di Fulvio et al. 2010) et la calpaïne 3 (Huang, 2005 #264) interagissent sur la partie N-ter de la dysferline, alors que l'affixine (Matsuda, Kameyama et al. 2005), DHPR (Ampong, Imamura et al. 2005) et MG53 (Waddell, Lemckert et al. 2011) interagissent en C-ter ; la cavéoline-3 (Matsuda, Hayashi et al. 2001) quant à elle présenterait de multiples points d'interactions. Les sites de fixation de ces partenaires se trouvent sur toute la dysferline, aussi bien sur des domaines caractéristiques tels que les domaines Dysf ou C2 (pour cavéoline-3 et HDAC6 respectivement) qu'en dehors (pour l'affixine par exemple). Ces partenaires placent la dysferline dans différentes localisations subcellulaires : le cytosquelette (via l'alpha tubuline, HDAC6), le compartiment vésiculaire (avec l'Annexine A1 et A2, la Cavéoline-3 et MG53), la membrane plasmique (par AHNAK et l'affixine) et les tubules transverses (avec le DHPR). Un descriptif détaillé de chaque partenaire est présenté en annexe III. Un nombre encore plus important de partenaires potentiels a été identifié par des analyses à grande échelle des bases de données de séquences et de la littérature (de Morree, Hensbergen et al. 2010; Cacciottolo, Belcastro et al. 2011; Leung, Utokaparch et al. 2011; van Haagen, t Hoen et al. 2011). Certains partenaires ont été validés par des analyses physiques, comme la vinculine (de Morree, Hensbergen et al. 2010), la moésine (Cacciottolo, Belcastro et al. 2011), et PTRF (Cacciottolo, Belcastro et al. 2011), d'autres doivent encore être confirmés par des tests expérimentaux.

Le réseau des 14 protéines partenaires de la dysferline actuellement connues est représenté sur la **Figure 24**.

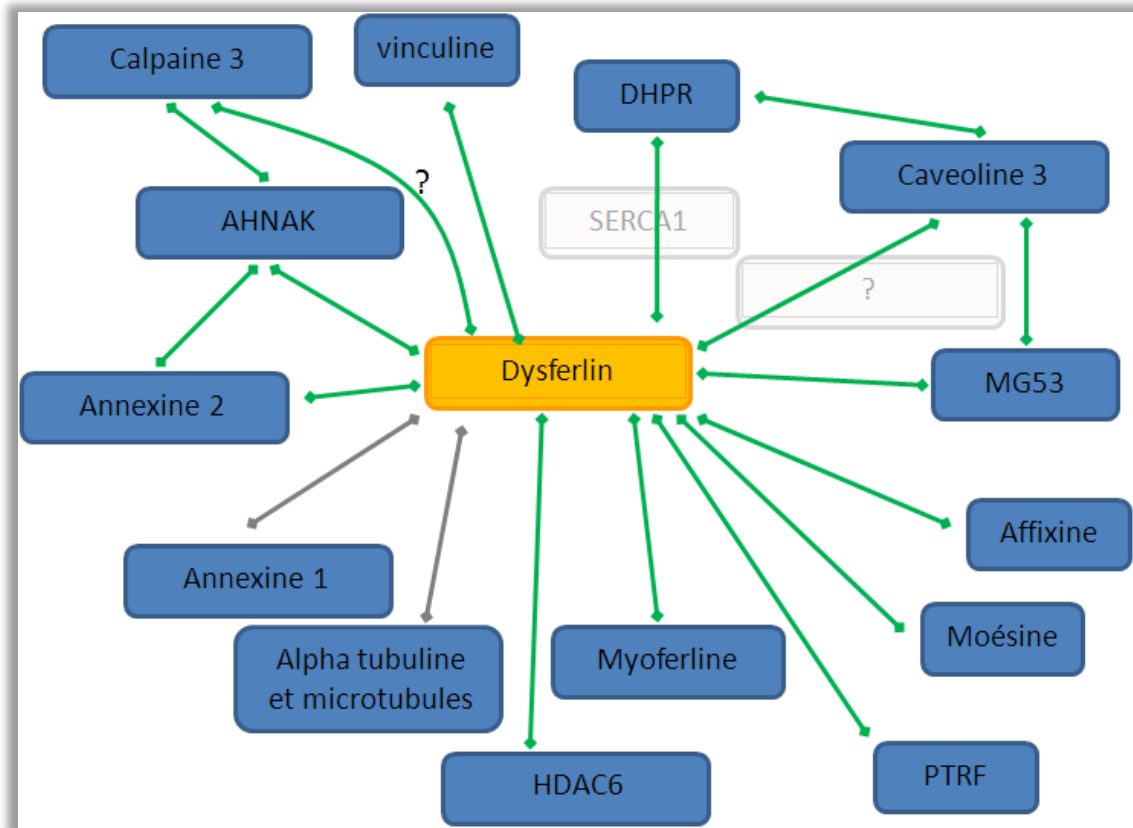


Figure 24 : Réseau d'interactions de la dysferline.

Représentation des protéines identifiées comme interagissant avec la dysferline. Les liens en gris indiquent une liaison calcium dépendante. L'interaction dysferline-DHPN pourrait se faire *via* SERCA1, une protéine du RS responsable du transfert actif de calcium. La cavéoline 3 pourrait interagir de la même façon avec la dysferline, *via* un partenaire non identifié.

C. Modèles cellulaires et modèles animaux associés aux dysferlinopathies

1. Lignées cellulaires déficientes en dysferline:

Plusieurs modèles de lignées stables déficientes en dysferline ont été générés. La lignée **GREG** a été établie à partir de cellules myogéniques des souris A/J décrites plus bas (Humphrey, Mekhedov et al. 2012). Ces cellules, où la protéine dysferline est indétectable, montrent une bonne capacité de différenciation en myotubes et une expression de myoferline normale. Leur capacité de réparation d'une lésion membranaire est en revanche affectée de façon hétérogène. Une autre lignée murine, dérivée des C2C12, a été établie par un knock-down de la dysferline grâce à des ARN en épingle à cheveux (small hairpin RNA, shRNA). Elle présente une expression résiduelle d'environ 10% de la quantité normale de dysferline, et une capacité de fusion réduite (Belanto, Diaz-Perez et al. 2010).

Quatre **lignées cellulaires stables** ont été établies à partir de myoblastes primaires humains déficients en dysferline (**Table 6**). Les myoblastes ont été isolés à partir de biopsie du *vastus lateralis* (partie du quadriceps) de quatre patients portant chacun des mutations différentes (Philippi, Bigot et al. 2012). Leur immortalisation a été assurée par les transgènes Cdk4 et hTERT apportés par un vecteur rétroviral. Les lignées DYSF1 et 2 expriment la dysferline complète dans une proportion largement moindre que leur contrôle sain ; les lignées DYSF3 et 4 n'expriment pas du tout la dysferline. Les capacités de différenciation et incapacités de réparation membranaire suite à une lésion au laser sont conservées sur les 4 lignées immortalisées (Philippi, Bigot et al. 2012).

Lignée	Exon/ intron	Etat	Changement nucléotidique	Changement au niveau ARNm	Changement protéique
DYSF1	38	homozygote	c.4022T>C	r.4022u>c	p.L1341P
DYSF2	8i 9	hétérozygote	c.855+1delG c.895G>A	mutation site d'épissage r.895g>a	p.G299R
DYSF3	16 55	hétérozygote	c.1448C>A c.*107T>A	r.1448c>a r.*107u>a	p.S483X
DYSF4	26i	homozygote	c.2810+2T>A	mutation site d'épissage	X

Table 6 : Numéros et mutations portées par les quatre lignées de myoblastes humains immortalisées existantes.

2. Modèles vertébrés

Souris déficientes en dysferline

Il existe à ce jour quatre modèles de souris déficientes qui présentent toutes une mutation différente. Trois autres modèles résultent du changement du fond génétique sur certaines de ces lignées. Le détail des mutations et des caractéristiques pathologiques des modèles sont disponibles dans l'annexe IV, et sont résumés dans la **Table 7** ci-dessous.

Souche	Mutation	Conséquence	Fond génétique
SJL/J	Mutation naturelle, délétion de l'exon 45 au niveau ARNm	Erreur d'épissage 10% de protéine	hétérogène
A/J	Rétrotransposon dans l'intron 4	Instabilité de l'ARN Absence de protéine	hétérogène
B6.129-Dysf ^{tm1Kcam} /J	Délétion ciblée des exons 53-55	Absence de protéine	129Svj et C57Bl/6J mélangé
Dysf ^{-/-}	Délétion ciblée de l'exon 45	Absence de protéine	129Svj et C57Bl/6J mélangé

Table 7 : Les lignées murines déficientes en dysferline.

Les souris transgéniques surexprimant la dysferline

En 2011, trois modèles de souris humanisées (B6(SJL)-Tg(Ckm-DYSF)3Kcam/J) pour la dysferline ont été construits par le laboratoire de K.Campbell (Glover, Newton et al. 2010).

Le gène DYSF humain, sous le contrôle du promoteur Ckm (creatine kinase) et flanqué du SV40polyA, a été introduit dans le génome de souris SJL/J ; trois lignées ont été choisies selon le nombre de transgènes qu'elles avaient intégrés. Dans ces trois lignées, le niveau d'expression de dysferline est de 2, 36, et 176 fois supérieur au niveau endogène observé sur les contrôles. Ces souris présentent une perte de masse et de force musculaire proportionnelle à la quantité de dysferline exprimée. En revanche, aucune malformation du sarcolemme n'est relevée.

Autres modèles

Des protéines dont la structure est proche des ferlines, et en particulier de la dysferline, sont retrouvées dans certains animaux inférieurs. C'est le cas chez le **nématode** *Caenorhabditis elegans* où Fer-1, un orthologue de DYSF, est connu. Des mutations dans ce gène provoquent un défaut de fusion de vésicules durant la spermatogenèse. Chez l'**arthropode** *Drosophila melanogaster*, le gène mrf code la protéine misfire. Cette protéine possédant 5 domaines C2, le domaine Fer1 et un domaine transmembranaire, a été décrite comme nécessaire à l'activation du spermatozoïde durant la fécondation (Smith and Wakimoto 2007).

Récemment, le **poisson** *Danio rerio* ou poisson zèbre, a été utilisé pour réaliser un knock down de la dysferline par la technique des oligonucléotides morpholinos. (Kawahara, Serafini et al. 2011; Roostalu and Strahle 2012). Le cDNA dysferline fait 6,3 kb et la protéine prédite serait à 68% homologue à la dysferline humaine. L'utilisation de morpholinos provoque sur les poissons une forte baisse de l'expression de la dysferline, visible par WB. La résultante est une désorganisation du muscle observable par bi-réfringence. Le développement de l'œil et du cerveau est également affecté.

III. Biologie de l'Anoctamine 5

A. Le groupe des Anoctamines

Les **anoctamines** sont une famille de protéines regroupant à ce jour **10 membres** (Table 8). Initialement désignées comme « transmembrane protein 16 » (TMEM16A à TMEM16K, TMEM16I n'est pas répertoriée dans les bases de données), la nomenclature a été modifiée et les protéines de cette famille sont aujourd'hui communément appelées Anoctamine 1 à 10 (ANO1 à 10) (ANO pour canal Anionique et OCTA pour 8 domaines transmembranaires). Cette appellation fait suite aux publications traitant de la fonction de **canal chlore dépendant du calcium** (CaCC) du premier membre de la famille caractérisé, ANO1 (Caputo, Caci et al. 2008; Yang, Cho et al. 2008; Almaca, Tian et al. 2009; Huang, Rock et al. 2009; Rock, O'Neal et al. 2009; Manoury, Tamuleviciute et al. 2010; Xiao, Yu et al. 2011; Tian, Schreiber et al. 2012). Globalement, l'expression d'ANO1, 6, 7, 8, 9 et 10 est restreinte aux tissus épithéliaux, alors qu'ANO2, 3, 4 et 5 sont présentes dans les tissus neuronaux et musculaires (Duran, Qu et al. 2012).

ANO	TMEM	Locus humain	Protéines	REFSEQ ARNm	OMIM
1	16A	11q13.3	986 AA; 114078 Da	NM_018043.5	610108
2	16B	12p13.3	1003 AA; 113969 Da	NM_020373.2	610109
3	16C	11p14.2	981 AA; 114657 Da	NM_031418.2	610110
4	16D	12q23.1	955 AA; 111462 Da	NM_178826.3	610111
5	16E	11p14.3	913 AA; 107188 Da	NM_001142649.1;NM_213599.2	608662
6	16F	12q12	910 AA; 106165 Da	NM_001025356.2;NM_001142678.1;NM_001142679.1;NM_001142680.1;NM_001204803.1	608663
7	16G	2q37.3	933 AA; 105532 Da	NM_001001666.3;NM_001001891.3	605096
8	16H	19p13.1 1	1232 AA; 136034 Da	NM_020959.2	610216
9	16J	11p15.5	782 AA; 90367 Da	NM_001012302.2	-
10	16K	3p22.1	660 AA; 76329 Da	NM_001204831.1;NM_001204832.1;NM_001204833.1;NM_001204834.1;NM_018075.3	613726

Table 8 : Les anoctamines chez l'Homme.

Les dix anoctamines présentent de fortes caractéristiques communes (**Figure 25**). Elles forment un groupe homogène de protéines de 900 à 1000 AA. Outre leurs **huit zones protéiques très hydrophobes** reconnues comme étant des domaines transmembranaires (TMD), elles présentent toutes un domaine **DUF590** dont la fonction n'est pas encore établie (Galindo and Vacquier 2005; Hartzell, Yu et al. 2009; Milenkovic, Brockmann et al. 2010). Toutes présentent également un site de **N-glycosylation** situé dans la boucle extracellulaire entre les TMD7 et TMD8, et une zone majoritairement hydrophobe entre les TMD5 et TMD6 formant une boucle pénétrant dans la membrane (boucle rééminente). Ce type de structure est retrouvé dans de nombreux canaux ioniques comme les canaux potassium et les aquaporines (Das, Hahn et al. 2008). Il est intéressant de noter que cette zone, avec la partie N-terminale, correspond à la partie la moins conservée entre les anoctamines (Duran, Qu et al. 2012). Des domaines **PDZ** sont présents aux extrémités C-ter des ANO2, 5 et 9 (Kennedy 1995). Ces domaines, très abondants chez les eucaryotes, sont impliqués dans les interactions protéine-protéine, dans la transduction du signal et dans les jonctions cellulaires, comme les jonctions serrées ou les jonctions synaptiques des cellules épithéliales. Ils aident les protéines transmembranaires à s'ancrer au cytosquelette (Ranganathan and Ross 1997).

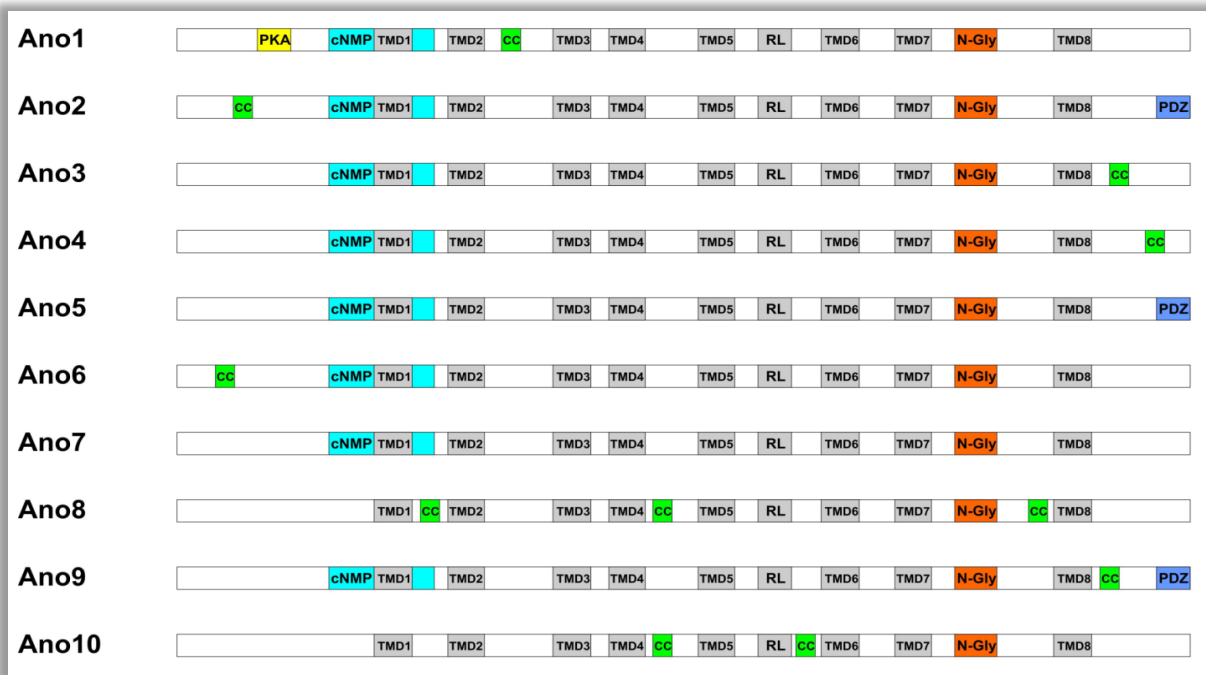


Figure 25 : Représentation schématique des anoctamines présentes chez les vertébrés.

L'appartenance des 10 anoctamines présentes chez les vertébrés à une même famille est soulignée par la forte conservation de domaines protéiques spécifiques sur chacune d'entre elles. TMD, domaine transmembranaire; RL, (re-entry loop) boucle ré-entrante; PDZ, domaine PDZ, N-Gly, site de N-glycosylation; PKA, site de phosphorylation à la protéine kinase A; cNMP, cyclic nucleotide-monophosphate binding domain ; cc, domaine coiled-coil (Figure issue de (Milenkovic, Brockmann et al. 2010)).

Les domaines N-ter et C-ter des anoctamines sont situés dans le cytoplasme cellulaire. Le modèle topologique communément admis, comptant les 8 domaines transmembranaires et la boucle réentrante, est présenté **Figure 26A**. Il comporte 5 boucles extracellulaires et 3 intracellulaires. Une étude conduite sur la présentation d'épitope propose un modèle différent où le sixième TMD est constitué par la zone connue comme réentrante (**Figure 26B**). La sixième boucle est alors intracellulaire au lieu d'être extracellulaire, masquant les épitopes 672 et 700 testés, alors que le 824 est exposé. Dans ce modèle, une boucle ré-entrante est présente entre les TMD 6 et 7 (Yu, Duran et al. 2012).

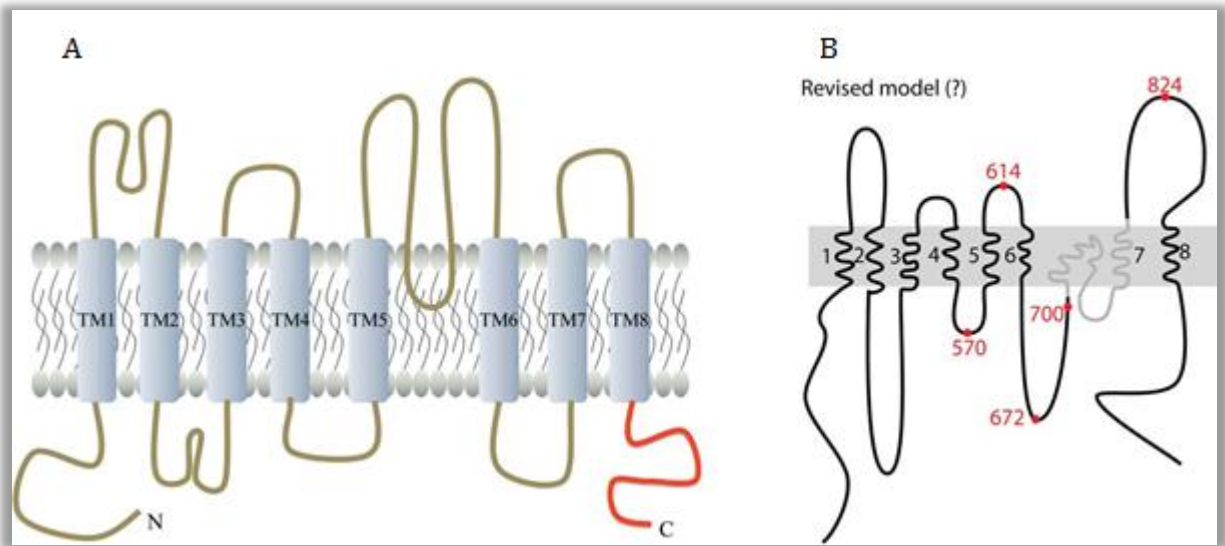


Figure 26 : Topologie des anoctamines.

(A) Topologie établie par analyse bioinformatique et confirmation expérimentale des séquences protéiques des anoctamines (Park, Chung et al. 2011). (B) Modèle révisé pour l'anoctamine 1 (Yu, Duran et al. 2012)

B. Fonction des anoctamines

La fonction de **canal chlore activé par le calcium (CaCC)** a été établie pour ANO1 et 2 par différentes techniques et confirmée par de nombreuses études (Caputo, Caci et al. 2008; Schroeder, Cheng et al. 2008; Almaca, Tian et al. 2009; Hartzell, Yu et al. 2009; Huang, Rock et al. 2009; Ousingsawat, Martins et al. 2009; Rock, O'Neal et al. 2009; Stephan, Shum et al. 2009; Stohr, Heisig et al. 2009; Manoury, Tamuleviciute et al. 2010; Romanenko, Catalan et al. 2010; Ousingsawat, Kongsuphol et al. 2011; Sancho, Garcia-Pascual et al. 2012). Les anoctamines 1 et 2 ont ainsi été décrites comme agissant comme CaCC dans divers tissus comme le muscle lisse, l'épithélium des systèmes respiratoire et digestif, les cellules ciliées olfactives, l'épithélium de l'urètre ou les neurones liés aux photorécepteurs. Concernant les autres anoctamines, de nombreux tests ont été réalisés et rapportent des résultats **contradictoires**. L'analyse de la conductance au chlore activée par le calcium après la surexpression de chacune des 10 anoctamines dans différents types cellulaires ne permet pas de conclure à l'activité CaCC des anoctamines 3 à 10 (Schreiber, Uliyakina et al. 2010; Duran, Qu et al. 2012).

De façon notable, ANO6 a enfin été classée comme une **scramblase**, protéine permettant la distribution asymétrique des phospholipides à la surface interne et externe des cellules (Suzuki, Umeda et al. 2010). ANO6 régule ainsi de façon calcium dépendante le mouvement

des phospholipides, comme la phosphatidylserine, à la surface des cellules d'une lignée lymphocytaire.

C. Données actuelles sur ANO5

1. Gène et isoformes

ANO5 est composé de **22 exons**, chez l'Homme comme chez la souris. De nombreux **variants transcriptionnels** ont été décrits chez la souris, où les exons 4, 6, 16, 20 et 21 ont été identifiés par RT-PCR comme exons alternatifs (Tsutsumi, Inoue et al. 2005). Les différentes combinaisons d'épissages alternatifs conduisent à la production de **14 isoformes**. La forme majoritaire trouvée dans le muscle est celle composée des 22 exons, alors que dans le cerveau, il s'agit de la forme ne contenant pas l'exon 6. Chez l'Homme, l'étude des isoformes n'a pas été conduite à ce jour (**Figure 27**).

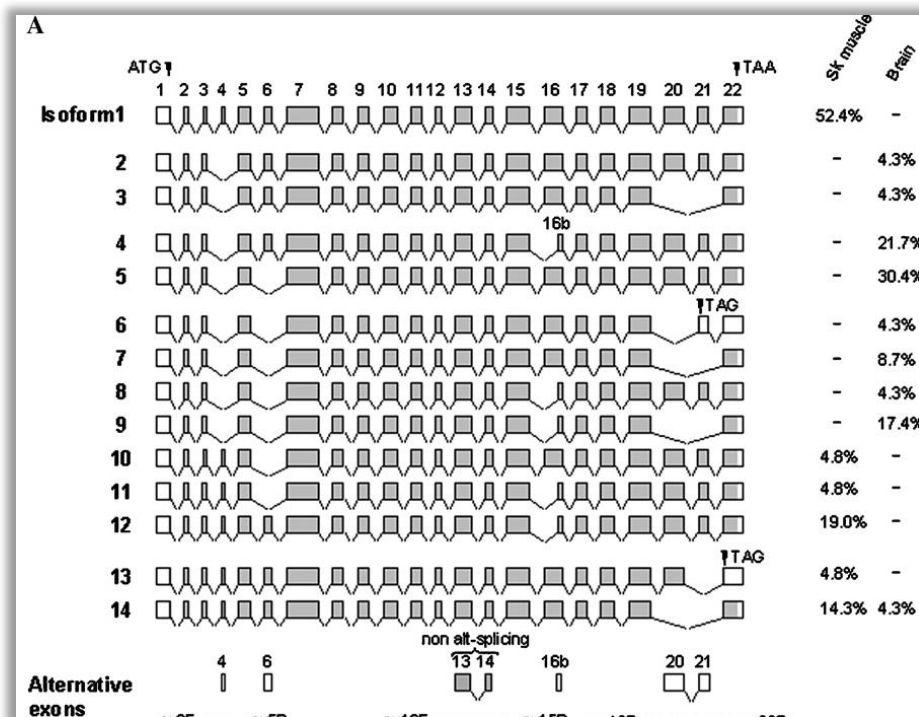


Figure 27 : Les isoformes ANO5 murines dans le muscle et le cerveau.

L'analyse par RT-PCR des transcrits murins d'ANO5 dans le muscle et le cerveau révèle 14 isoformes possibles, exprimées de façon différentielle entre le muscle et le cerveau (Tsutsumi, Inoue et al. 2005).

2. Localisation et fonction

Les anticorps commerciaux disponibles pour le marquage spécifique d'ANO5 ne sont actuellement pas efficaces. Seule une étude par marquage direct d'ANO5 en IHC de coupes

de tissu cardiaque humain existe dans la littérature (Mizuta, Tsutsumi et al. 2007) ; les autres études présentées utilisent des protéines de fusion (Tsutsumi, Kamata et al. 2004; Schreiber, Uliyakina et al. 2010; Duran, Qu et al. 2012; Tian, Schreiber et al. 2012). Les auteurs proposent toutefois une localisation **cytoplasmique** d'ANO5, en particulier dans des **vésicules subsarcolemmales**. Plusieurs études par protéines de fusion ont été menées. ANO5 fusionnées en C-ter avec un tag V5 présente un profil réticulé autour du noyau. Cette protéine de fusion colocalise avec la calréticuline, un marqueur spécifique du réticulum endoplasmique. La protéine de fusion ANO5-GFP est localisée dans l'espace intracellulaire, et pourrait appartenir à l'endoplasme (Duran, Qu et al. 2012) (Figure 28a). La protéine His-ANO5 semble être **membranaire** (Schreiber, Uliyakina et al. 2010; Tian, Schreiber et al. 2012) (Figure 28b). Ces études **contradictoires** ne permettent donc pas de conclure à la localisation d'ANO5 *in cellulo*. Au niveau fonctionnel, ANO5 n'a jamais été décrite comme étant un CaCC, et ce malgré plusieurs études (Schreiber, Uliyakina et al. 2010; Duran, Qu et al. 2012). Elle a en revanche été liée au processus de réparation membranaire par une étude de cellules de patients (Jaiswal, Marlow et al. 2007).

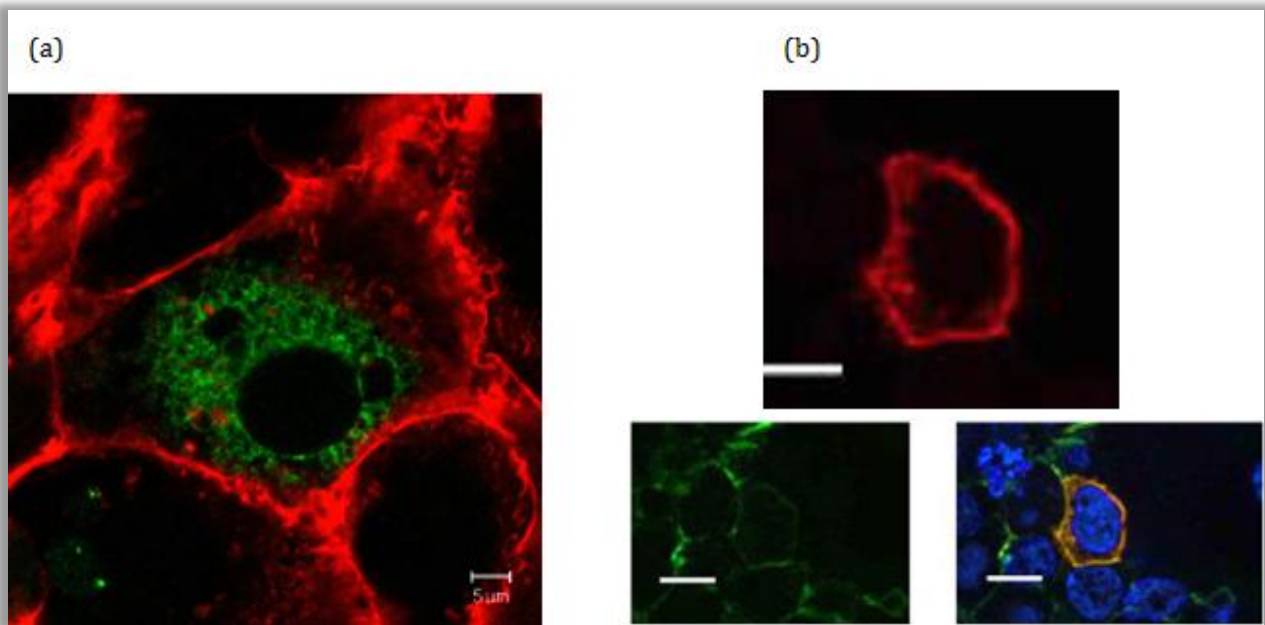


Figure 28 : Localisation cellulaire d'ANO5.

Selon les études, ANO5 est décrite comme cytoplasmique ou membranaire. (a) La protéine de fusion ANO5-GFP, exprimée par des cellules COS-7, est cytoplasmique (Duran, Qu et al. 2012) alors que la protéine His-ANO5, produite par des cellules HEK293, est membranaire (Tian, Schreiber et al. 2012). ((a) ANO5-GFP en vert, Agglutinine en rouge (b) His-ANO5 en rouge, β -caténine en vert, noyau en bleu).

IV. Thérapies des Dysferlinopathies.

Il n'existe pas de traitement pour les dysferlinopathies à l'heure actuelle. Cependant, de nombreuses approches, que ce soit de type pharmacologique ou par transfert de matériel génétique, ont été testées sur des modèles animaux de la pathologie.

A. Approche thérapeutique par molécules chimiques.

Plusieurs traitements chimiques **non curatifs** ont été évalués. Ils n'ont pas pour objectif final de soigner définitivement les malades, mais de s'attaquer aux **symptômes**. Il est possible de faire deux groupes dans ces approches pharmaceutiques : celles qui s'attachent à limiter les symptômes observés, et celle qui cherchent à rendre fonctionnelle la dysferline, même mutée.

1. Pharmacopée visant les symptômes :

L'utilisation **d'antioxydants** amenés par voie orale a été évaluée sur le modèle SJL/J. De nombreuses études ont montré que la réduction du stress oxydatif par l'apport d'antioxydants réduit de nombreux symptômes dans plusieurs pathologies (pour revue voir (Potgieter, Pretorius et al. 2011)). Deux antioxydants connus ont donc été testés : le coenzyme **CoQ10** et le **Resveratrol**. L'observation des quadriceps des souris traitées pendant 90 jours révèle une réduction des signes inflammatoires et une nette amélioration histo-morphologique (Potgieter, Pretorius et al. 2011).

Le blocage de la voie **TNF-alpha** (tumor necrosis factor) impliquée dans la réponse inflammatoire a également été testé. Cet essai se base également sur l'effet bénéfique de cette approche sur le modèle mdx (modèle murin de DMD) (Radley, Davies et al. 2008). Des souris SJL/J de 60 jours ont été traitées en voie sous-cutanée par de l'etanercept, un agent bloquant le TNF-alpha. Ce traitement entraîne une réduction dose-dépendante des signes inflammatoires et de la nécrose dans le muscle des souris.

Ces résultats, outre leur intérêt thérapeutique immédiat, indiquent que le stress oxydatif et le TNF-alpha jouent effectivement un rôle dans les dommages qui affectent les muscles déficients en dysferline.

Une autre étude, toujours sur les souris SJL/L, a consisté en l'injection d'un agent chimique capable de calfeutrer les brèches dans la membrane plasmique. L'administration du **poloxamer 188** *via* une pompe osmotique pendant 6 semaines provoque une réduction de

la perte de masse musculaire observée sur la même période chez des souris non traitées (Suzuki, Akiyama et al. 2012).

2. Pharmacopée visant à restaurer une dysferline fonctionnelle :

Une stratégie a été testée pour les mutations **faux-sens**. Elle consiste en **l'inhibition du protéasome** afin d'augmenter la quantité et/ou la durée de vie de la dysferline mutée, en supposant que la fonction de la dysferline n'est pas affectée par cette mutation. Des myoblastes portant la mutation A555R, identifiée comme étant prise en charge par le protéasome, ont été traités avec de la **Lactacystin** et du **Bortezomib**. Ces deux molécules, respectivement naturelle et synthétique, sont utilisées depuis plusieurs années pour leur capacité à inhiber la voie de dégradation des protéines par le protéasome. L'utilisation de ces molécules provoque effectivement l'échappement de la dysferline mutée de ce système de dégradation. Les myoblastes A555R traités montrent une amélioration au test de réparation membranaire et une capacité à la fusion accrue.

Une autre stratégie a été testée pour les mutations **non-sens**. L'utilisation de molécules chimiques permettant la **translecture de codon stop** prématuré est connue et déjà utilisée dans plusieurs pathologies. Le modèle mdx a par exemple été traité avec succès par une molécule connue sous le nom commercial **ataluren** (ou PTC124) (Welch, Barton et al. 2007). L'utilisation de ce composé a été testée sur des myoblastes de patients dysferlinopathes portant la mutation R1905X, conduisant à une absence totale de protéine. Le traitement permet la **restauration** d'environ 15% de dysferline comparativement à la quantité existante dans les cellules non mutées. L'utilisation du test de bourgeonnement de la membrane a permis de montrer que ce niveau de dysferline suffisait à une récupération d'un phénotype normal pour ce paramètre. Les modèles animaux connus à l'heure actuelle ne permettent pas de tester cette molécule *in vivo* puisqu'aucun ne porte de mutation non-sens (Wang, Yang et al. 2010).

B. Thérapie génique conventionnelle des Dysferlinopathies.

Les stratégies de transfert de gène dans le muscle font appel à des vecteurs dérivés du **virus associé aux adénovirus (AAV)**. Ils possèdent en effet des caractéristiques intéressantes : ils sont capables de transduire ce tissu, sont peu immunogènes et non toxiques chez l'Homme. Leur défaut majeur est une capacité d'encapsidation limitée à 4,7 kb. Dans le cas des dysferlinopathies, le transfert direct du cDNA codant pour la protéine dysferline par

AAVr est théoriquement impossible en raison de la taille de sa séquence codante. D'autres technologies ont donc été développées pour pallier à cette limitation.

Transfert de minigène : l'exemple de DMD et l'application à DYSF

Pour remédier à la capacité maximale d'encapsulation des vecteurs utilisés, une stratégie consiste à raccourcir le cDNA du gène d'intérêt encapsidé, en **éliminant** des parties identifiées comme codant des zones n'ayant pas de rôle fonctionnel connu au niveau de la protéine correspondante. Cette stratégie, qualifiée de **minigène**/mini-protéine a été envisagée avec succès pour **DMD**. Plusieurs études utilisant des vecteurs AAV codant pour différentes mini-dystrophines ont montré une expression à long terme de la mini-protéine, associée à une amélioration phénotypique et une augmentation de force musculaire (Dunckley, Wells et al. 1993; Vincent, Ragot et al. 1993; Yang, Lochmuller et al. 1998).

L'application de la stratégie de mini-protéine à la dysferline a été rendue possible par l'observation chez une personne non-atteinte de l'expression d'une **mini-dysferline** naturelle. Cette protéine, de **70 kDa** environ, est codée par un ARN présentant une délétion des exons 2 à 40 inclus. L'injection en IM chez la souris BLA/J d'un vecteur AAV codant pour cette mini-protéine permet la restauration de la capacité de réparation membranaire des cellules du FDB (Krahn, Wein et al. 2010) sans qu'il y ait cependant récupération histologique. Les données recueillies suggèrent également que la surexpression de la mini-dysferline peut être **toxique** dans le muscle (Lostal, Bartoli et al. 2012).

Transfert de gène par concatémérisation de rAAV

Une autre stratégie pour pallier à la capacité maximale d'encapsulation des vecteurs AAV utilise la capacité de l'ADN des AAV à se **concatémériser**. En effet, deux AAV une fois rentrés dans la cellule et sous leur forme double brin, vont pouvoir se **recombinaer** entre eux au niveau de leurs séquences ITR. Cette caractéristique permet donc d'élargir « virtuellement » la capacité d'encapsulation des AAV en séparant le transgène en deux parties, qui sera reconstitué *in cellulo* en un transgène complet fonctionnel (Yang, Zhou et al. 1999; Yan, Zhang et al. 2000). Ce mécanisme a été montré avec un **gène rapporteur** (Duan, Yue et al. 2001) et sur le modèle mdx où il a permis de restaurer une mini-dystrophine fonctionnelle (Lai, Yue et al. 2005; Lai, Yue et al. 2006; Lai, Li et al. 2008).

Cette stratégie a été appliquée à la **dysferline**. Deux vecteurs AAV portant les exons 1 à 28 (AAV 5') et 29 à 55 (AAV 3') ont été générés et injectés en IM ou en intraveineux (IV) dans le modèle BLA/J (**Figure 29**) (Lostal, Bartoli et al. 2010). L'injection en IM conduit à

l'expression d'un **ARNm DYSF complet** et d'une dysferline complète jusqu'à au moins un an après le traitement des souris. L'injection en systémique permet également l'expression d'une dysferline entière, restaurant les caractéristiques histologiques, les capacités de réparation membranaire et l'activité locomotrice des souris traitées.

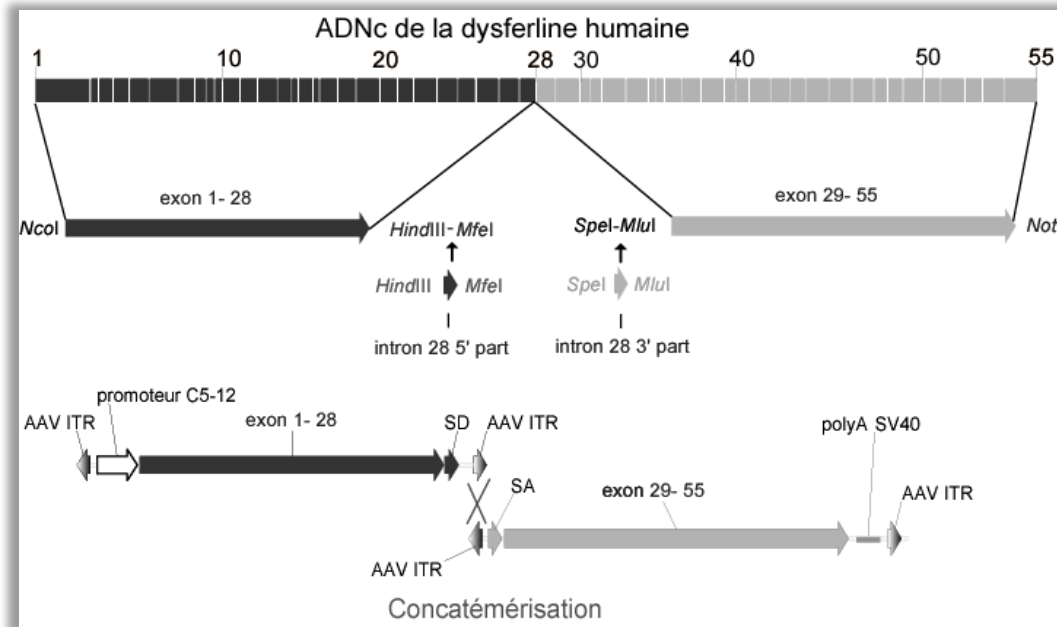


Figure 29 : Schéma des cassettes portant les deux fragments du message de la dysferline.

La première cassette porte le promoteur C5-12 suivi de l'ADNc de la dysferline humaine de l'exon 1 à 28 ainsi que la partie amont de l'intron 28 contenant le site donneur, le tout flanqué de séquences ITR – la seconde cassette est constituée de la partie contenant le site accepteur d'épissage de l'intron 28, suivi du restant de l'ADNc de la dysferline, exon 29 à 55 et d'un signal de polyadénylation SV40, le tout flanqué de séquences ITR. Conceptuellement, les deux vecteurs se concatémèrent grâce aux séquences ITR (dans toutes les orientations possibles). Sur la forme d'intérêt, un pré-messager va pouvoir être transcrit. Lors de l'épissage, les séquences introniques et celles des ITR par la même occasion, vont être éliminées pour conduire à un message entier de la dysferline humaine, laquelle pourra générer une protéine entière (Figure issue de la thèse de W.Lostal).

Transfert de gène total par recombinaison homologue

Une récente publication fait état du possible transfert total de l'ADNc dysferline en utilisant l'AAV5 (Grose, Clark et al. 2012). Ce sérotype ne possède pas de capacité plus grande d'encapsulation que les autres AAV ($\approx 4,7$ kb) mais favorise la recombinaison homologue des virions qu'il contient (Dong, Nakai et al. 2010; Wu, Yang et al. 2010). Dans le cas de la dysferline, la production d'un lot de vecteur AAV5 à partir d'une cassette [[Itr5', promoteur MHCK7, intron stabilisateur, ADNc Dysferline, signal polyA, Itr3']] de 7767 pb, génère deux populations de vecteurs : ceux contenant le promoteur et une partie de l'ADNc, les autres contenant la fin de l'ADNc et le signal polyA. L'injection de ce lot de vecteur dans des souris C129-Dysf/- permet l'expression d'une dysferline complète, détectée par WB. La

restauration de caractéristiques histologiques normales, de capacités de réparation membranaire et de la force du diaphragme sont également observée. De façon intéressante, aucun ARN tronqué ou isoforme courte de la dysferline n'est détecté, soulignant la nécessité de recombinaison pour l'expression de la protéine.

C. Thérapie par surexpression d'une protéine compensatrice

Une autre stratégie est de provoquer l'expression ou la surexpression d'une protéine pouvant remplir tout ou partie des fonctions de la protéine déficiente. Cette **compensation** peut être induite par un composé chimique activant l'expression de la protéine compensatrice endogène ou en apportant cette protéine de façon exogène. Dans le cas des dystrophies musculaires, cette stratégie a été appliquée à l' **α -sarcoglycane**, causant la LGMD2D, en utilisant l' **ϵ -sarcoglycane**, (Liu and Engvall 1999; Imamura, Mochizuki et al. 2005) et à la **dystrophine** par l'utilisation de l'**utrophine** (pour revue voir (Fairclough, Bareja et al. 2011)).

Pour la dysferline, la protéine montrant le plus d'homologie est la myoferline. Le modèle murin généré surexprimant la myoferline ne présente pas de caractéristiques histologiques dystrophiques. Le croisement de ces souris avec le modèle BLA/J crée des souris déficientes en dysferline qui surexpriment la myoferline. De façon intéressante, ces souris retrouvent une capacité de réparation membranaire normale, mais le phénotype histologique reste dystrophique (Lostal, Bartoli et al. 2012).

D. Thérapie ciblant les ARNs

Des stratégies thérapeutiques basées sur la manipulation des ARN ont vu le jour ces dernières années. Elles consistent à exclure, inclure ou échanger des exons au niveau des ARN pré-messagers endogènes. Une seule d'entre elles (le saut d'exon) a été testée dans le cadre des dysferlinopathies. La description de ces différentes approches thérapeutiques nécessite un rappel sur les ARN et sur l'étape clef de leur maturation : l'épissage.

1. Biologie des ARN

Synthèse des ARN par la cellule eucaryote

La **transcription** est l'étape au cours de laquelle des ARN sont synthétisés à partir d'une matrice ADN. Ce mécanisme est assuré par des **complexes multi-protéiques** capables de se fixer à un endroit donné du génome, de modifier l'état de compaction de la chromatine, d'ouvrir la double hélice d'ADN et de polymériser des acides ribonucléiques. Cette dernière

étape est assurée par une **polymérase**. Chez les eucaryotes, il existe trois polymérases et trois complexes associés, assurant la synthèse des ARN ribosomique, messenger et de transfert (respectivement ARNr, ARNm et ARNt).

Le complexe associé à l'**ARN polymérase I** synthétise l'ARN pré-ribosomal 45S, qui mature en ARNr 28S, 18S et 5,8S (Grummt 1999).

Le complexe associé à l'**ARN polymérase II** synthétise tous les ARNpm (pré-messenger), précurseurs des ARNm, ainsi que la plupart des petits ARN nucléaires (Small nuclear RNA, snRNA) et microARN (microRNA, miRNA) (Lee, Kim et al. 2004; Sims, Mandal et al. 2004). Les snRNA sont impliqués dans le mécanisme d'épissage, la régulation de facteurs de transcription et le maintien des télomères. Les miRNA sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes en provoquant la dégradation des ARNm ou l'inhibition de leur traduction. Les ARNm, qui seront traduits en protéines, représentent moins de 5% du total des ARN trouvés dans une cellule.

Le complexe associé à l'ARN polymérase III synthétise les ARNt, l'ARNr 5S et certains snRNA.

Maturation des ARNpm

Les **ARNpm** issus de la transcription par la polymérase II subissent plusieurs **modifications** permettant leur export du noyau au cytoplasme, leur maturation et leur traduction en protéines. Ces modifications des ARN sont primordiales dans le processus de contrôle de l'expression des gènes par la cellule.

L'extrémité **5'** de l'ARN néoformé est modifiée dans le noyau dès le début de la synthèse de l'ARN. Cette modification chimique, appelée **coiffe** ou 5'-cap, permet la stabilisation de l'ARNpm produit, son export du noyau et facilite l'initiation de sa traduction (pour revue voir (Topisirovic, Svitkin et al. 2011)). L'extrémité **3'** est également modifiée durant la synthèse de l'ARNpm par l'ajout de plusieurs dizaines de résidus adénine à l'ARN. La **polyadénylation** joue plusieurs rôles, en intervenant dans l'export des ARNm du compartiment nucléaire vers le cytoplasme, dans la protection de la dégradation des ARNm par des exonucléases, et enfin dans le recrutement du ribosome pour permettre leur traduction en protéines.

Deux autres mécanismes post-transcriptionnels existent. Ils ne sont **pas systématiques**, à l'inverse de l'ajout de la coiffe et de la polyadénylation. **L'édition**, permet à la cellule de

modifier ponctuellement la séquence de l'ARNm après la transcription (adénosines modifiées en inosines, et cytidines modifiées en uridines). Le **clivage** ciblé des ARNpm permet également la diversification du transcriptome, par la création de plusieurs isoformes d'un ARNm, mais aussi la création d'ARN non codants régulateurs (Mercer, Dinger et al. 2010).

L'épissage est un autre évènement post-transcriptionnel. Il permet l'élimination des introns et va être détaillé plus précisément dans le paragraphe suivant.

2. L'épissage, une étape clef dans le remodelage de l'information

Le regroupement des exons présents sur un ARNpm est assuré par un large complexe ribo-protéique appelé **splicéosome**. Cinq riboprotéines nucléaires, composées d'un **snRNA** et d'une **protéine**, et appartenant à la famille des **UsnRNPs** (Uridine-rich small nuclear RiboNucleoprotein Particules) jouent un rôle majeur dans ce complexe (snRNP U1, 2, 4, 5, et 6). Mais au total, ce sont près de 300 protéines qui peuvent être impliquées dans ce mécanisme (Rappsilber, Ryder et al. 2002).

Séquences régulatrices de l'épissage : éléments cis recrutant des facteurs trans.

La fixation du splicéosome aux ARNpm est due à la présence de **séquences consensus** au niveau des introns. Ces séquences *cis* régulatrices agissent comme site de fixation d'éléments *trans*-régulateurs. Trois **séquences majeures** d'épissage sont nécessaires au recrutement du splicéosome et sont impliquées chimiquement dans l'élimination des introns : le **Site Donneur** (SD), le **Point de Branchement** (PB) et le **Site Accepteur** (SA). Les **séquences mineures** d'épissage recrutent des facteurs favorisant ou défavorisant l'inclusion d'un exon.

- Les séquences majeures d'épissage :

Le **SD**, le **BP** et le **SA** sont des séquences nécessaires à l'action du splicéosome. Chez l'Homme, chacun de ces trois motifs inclut des nucléotides hautement conservés (**Figure 30**) (Padgett 2012). Les nucléotides pratiquement invariablement retrouvés sont les **résidus GT** en début d'intron et les **résidus AG** à la fin de celui-ci, ainsi que le résidu A du PB, 20 à 40 nucléotides avant le SA. La séquence entre le PB et le SA est généralement riche en bases pyrimidiques.

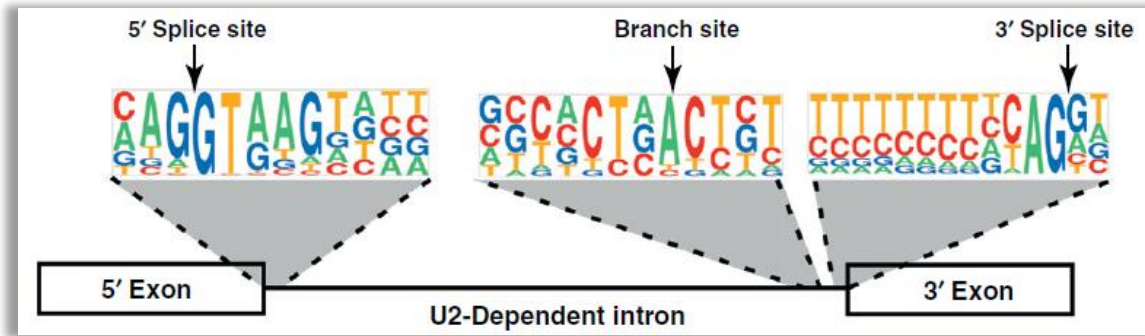


Figure 30 : Consensus des SD, BP et SA chez l'Homme.

La fréquence de chaque nucléotide retrouvé à une place donnée dans les séquences du site donneur, accepteur et point de branchement chez l'Homme est représentée par la taille de la lettre le symbolisant. Les bases GT, A et AG sont pratiquement invariablement retrouvées au niveau des SD, BP et SA, respectivement. Les bases sont rangées par fréquences relatives, de haut en bas (Padgett 2012).

- Les séquences mineures d'épissage :

Les **séquences mineures** sont par convention classées en fonction de leur présence sur un intron ou un exon, et en fonction de leur capacité à faciliter (Enhancer) ou à empêcher (Silencer) l'épissage. Les **ESE** (pour Exonic Splicing Enhancer) et les **ESS** (pour Exonic Splicing Silencer) recrutent ainsi des facteurs *trans* affectant l'épissage depuis l'exon où ils se trouvent, alors que les **ISE** (Intronic Splicing Enhancer) et **ISS** (Intronic Splicing Silencer) influent sur les exons adjacents depuis leur position intronique.

Eléments activateurs : ESE et ISE.

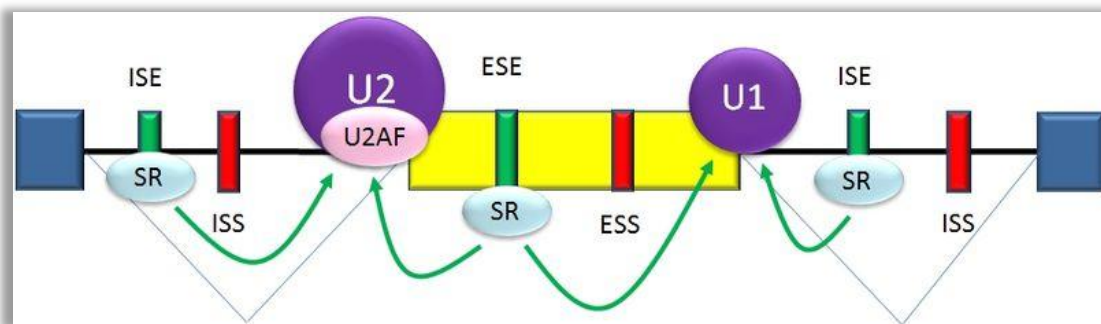


Figure 31 : ISE, ESE et protéines SR activent le spliceosome

Les protéines SR se fixent sur de courtes séquences en amont, ou en aval de l'exon à inclure et favorisent le recrutement d'éléments du spliceosome.

Les **ESE** mobilisent les **protéines SR** (pour protéines riches en serine(S)/arginine(R)), qui vont favoriser le recrutement de la snRNP U1 au niveau du SD, et celui du complexe U2AF et de la snRNP U2 au niveau du site d'épissage en 3' (**Figure 31**)(Chen and Manley 2009). Les

12 protéines SR caractérisées ont été regroupées sous le nom de **SRSF** (SR splicing factor, SRSF1 à 12) (**Figure 32 a**). Elles sont caractérisées par la présence d'un ou deux motifs reconnaissant l'ARN (RRM pour RNA Recognition Motifs) suivis d'un domaine carboxy-terminal (domaine RS) riche en tandems variables sérine/arginine ou arginine/sérine (Manley and Krainer 2010). Il n'existe pas de séquence **consensus** commune à tous les ESE. Toutefois, plusieurs motifs ont été identifiés en fonction du facteur *trans*-régulateur dont ils sont la cible, comme par exemple pour SRSF1 (**Figure 32 b**). La compilation de ces différentes séquences a permis l'élaboration d'outils de **prédiction** d'ESE sur une séquence donnée, comme « ESE finder » (Smith, Zhang et al. 2006).

Les **ISE** sont généralement situés dans la région riche en pyrimidines de l'intron, dans les zones adjacentes au SB ou au SD, mais aucun consensus n'est pour l'heure validé. Comme les ESE, ils agissent comme cible pour les protéines SR, mais également celles de la famille des **CELF** (CUGBP and ETR-Like Factors), connues pour intervenir dans le métabolisme des ARN (Barreau, Paillard et al. 2006).

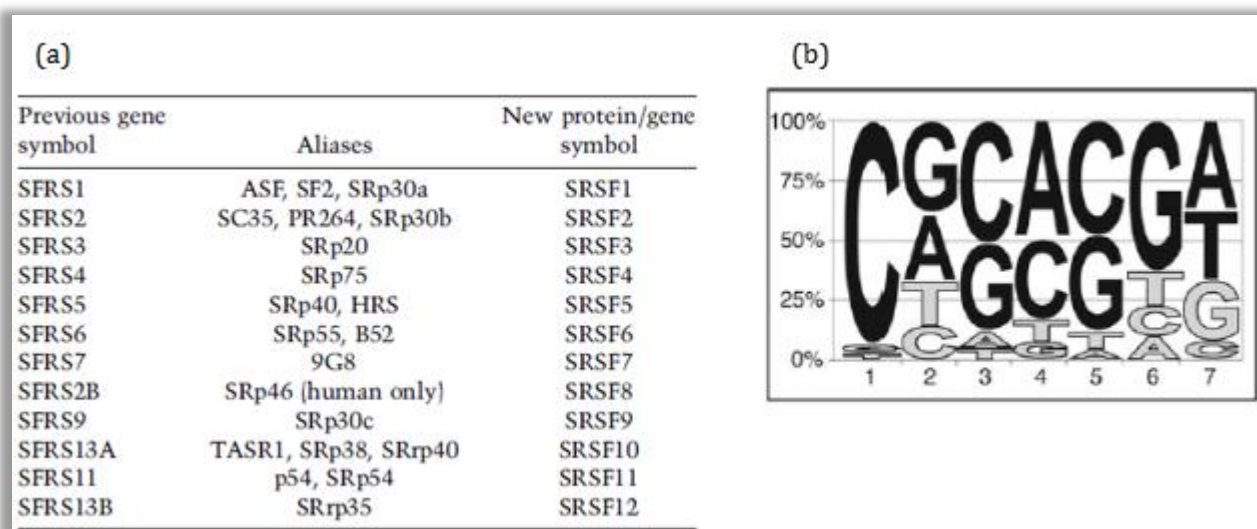


Figure 32 : listes des 12 protéines SR connues et site de reconnaissance de SRSF1.

(a) Correspondance entre les noms communément admis pour les protéines de la classe SR, et la nouvelle nomenclature officielle (Manley and Krainer 2010). (b) séquences consensus déterminées pour le domaine de fixation de SRSF1 (Smith, Zhang et al. 2006).

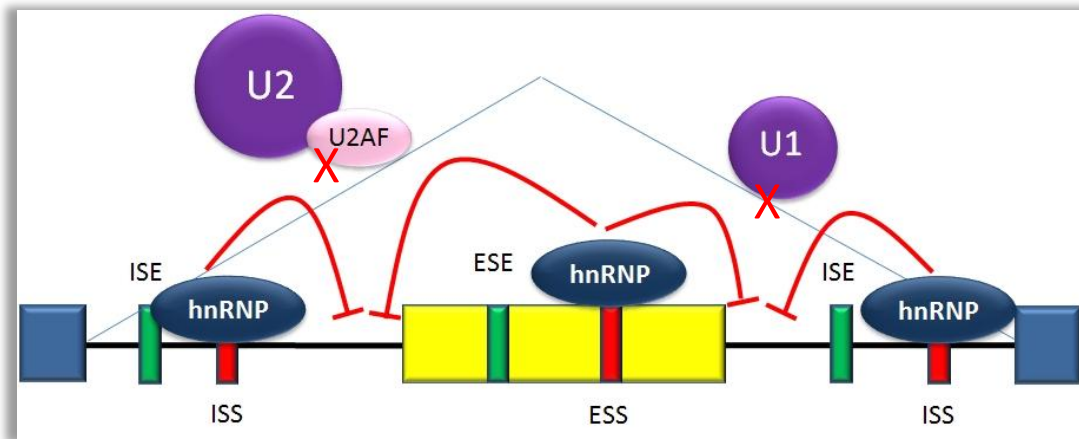
Eléments répresseurs

Figure 33 : ISS, ESS et protéines hnRNP inhibent le splicéosome

Les hnRNP, en se fixant sur le ISS ou ESS portés par l'ARNpm, inhibent la fixation des éléments du splicéosome, empêchant l'inclusion de l'exon ciblé.

Les **ESS**, moins bien caractérisés que les ESE, sont les sites de fixation de protéines régulant négativement l'épissage, appartenant à la famille des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (**heterogenous nuclear RiboNucleoProtein, hnRNP**). Elles possèdent la même structure que les protéines SR : un ou plusieurs domaines RRM associés à un domaine d'interaction protéine-protéine. L'action répressive des hnRNP est assurée soit par l'inhibition de la fixation des éléments du splicéosome en provoquant un encombrement stérique, soit par la compétition avec les protéines SR. Les **ISS** agissent à l'identique des ESS, mais depuis l'intron où ils se trouvent.

Mécanisme conduisant à l'élimination d'un intron

La reconnaissance d'un intron, l'assemblage du splicéosome, l'élimination de l'intron et la fusion des exons adjacents est un processus complexe divisible en cinq étapes distinctes schématisées dans la **Figure 34**, ci-dessous (pour revue voir (Wahl, Will et al. 2009)). La première consiste en la formation du **complexe E** (pour Early) avec les appariements de snRNP U1 au SD, de SF1 au résidu adénosine du PB, de U2AF-65 à la zone de polypyrimidines et de U2AF-35 au SA. Ce complexe est très instable et il est soit rapidement dissocié, soit consolidé par le remplacement de SF1 par le snRNP U2 au niveau du PB. Le **complexe A** formé par une réaction ATP dépendante est cette fois stable et recrute le groupe déjà formé du tri-snRNP U4/U5/U6 pour former le **complexe B**. Suite à de

nombreux changements conformationnels, les snRNP U1 et U4 sont libérés et le complexe B devient apte à induire les réactions de *trans*-estérification nécessaires à l'épissage (**complexe B***). Le spliceosome médie la première réaction de *trans*-estérification entre le résidu G du SD et le A du PB où le groupement 2'-hydroxyle de l'adénosine du site de branchement attaque le phosphate du premier nucléotide de l'intron. Cette réaction génère le **complexe C** et la formation d'une structure ARN en lasso. Ce complexe subit un nouveau réarrangement avant de provoquer la seconde réaction de *trans*-estérification entre la dernière base de l'exon en amont et la première base de l'exon en aval de l'intron éliminé. Dans ce cas, le groupement 3'-hydroxyle libre de l'exon en amont attaque le 5' phosphate de l'exon en aval, provoquant la liaison des deux exons et l'élimination de l'intron (Konarska, Vilardell et al. 2006).

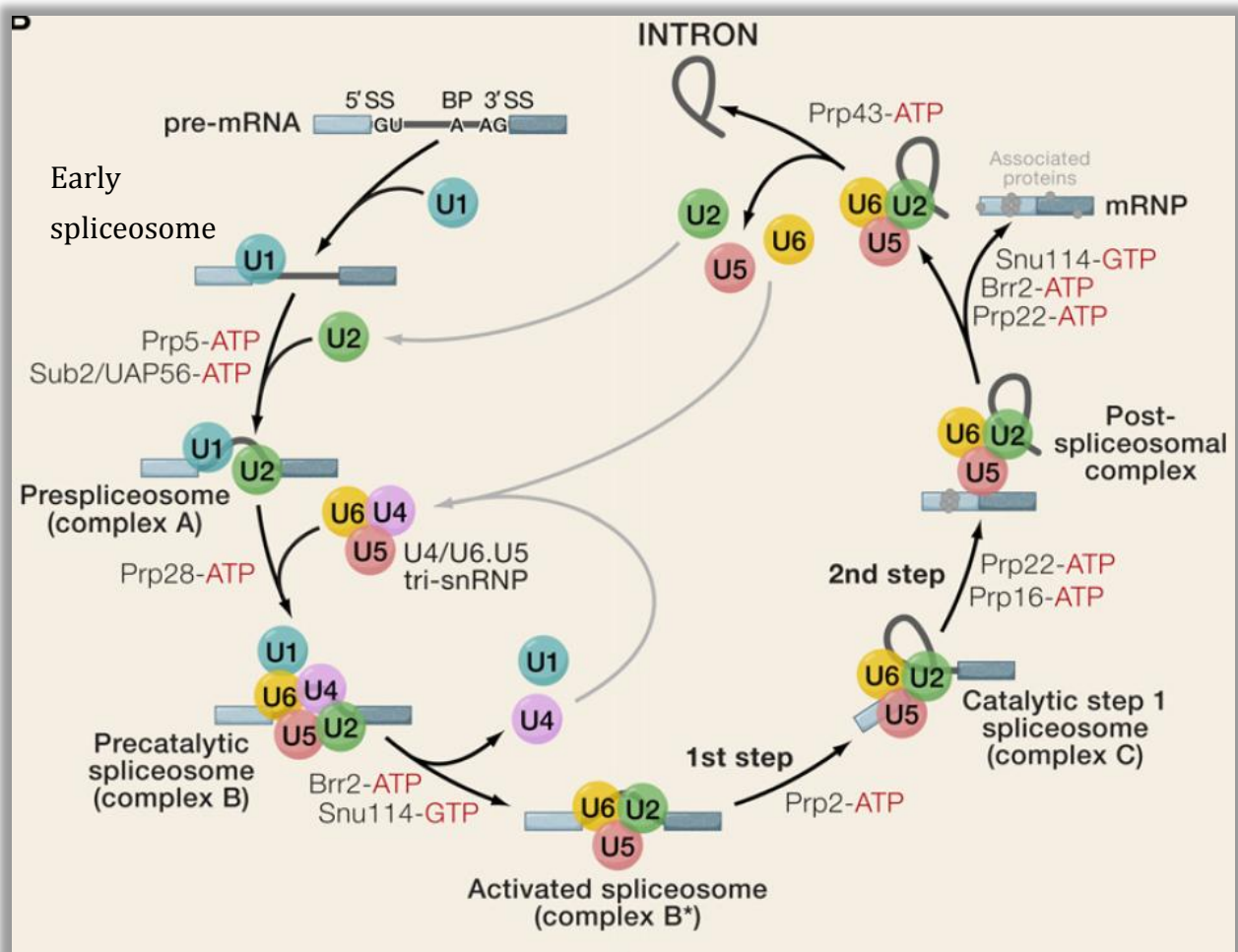


Figure 34 : Cycle d'assemblage/désassemblage du splicéosome lors de l'épissage d'un intron.

Représentation des différentes étapes d'assemblage des snRNP permettant l'élimination d'un intron (adapté d'après (Wahl, Will et al. 2009)).

3. L'ARN, cible en thérapie génique

Longtemps, l'ADN a été considéré comme cible unique de la thérapie génique. Cette stratégie a montré ces limites, par le fait que souvent la mutation n'est pas physiquement corrigée, mais qu'une copie saine du gène atteint est apportée à la cellule. Des stratégies existent pour corriger les mutations de l'ADN, comme l'édition de gène ou les méganucléases, mais elles montrent un niveau d'efficacité encore faible. D'autres stratégies sont donc aujourd'hui développées pour modifier le message entre l'ADN et la protéine : l'ARN. Elles s'attèlent à transformer directement l'ARN ou à moduler les mécanismes des régulations post-transcriptionnelles de la cellule.

Le saut d'exon est basé sur la possibilité d'éliminer certaines parties d'une séquence codante, si cette partie n'intervient pas ou peu dans l'activité biologique de la protéine codée. La modification de l'épissage est obtenue en masquant les séquences de régulation de l'épissage de l'exon (ex) qui doit être exclu de l'ARNm final. Ces sites sont masqués par des oligonucléotides antisens (AON) chimiquement stabilisés. Le spliceosome, ne trouvant pas ces sites de fixation sur l'exon, utilise ceux en amont et en aval et joint ainsi les exons -1 et +1. Pour obtenir une protéine fonctionnelle, les exons situés en amont et en aval de l'exon épissé doivent être en phase. Cette stratégie est au stade des essais cliniques pour la myopathie de Duchenne avec pour cible l'exon 51 (NCT00159250 et NCT01254019) ou 44 (NCT01037309).

L'observation chez une personne montrant un phénotype pathologique très limité d'une protéine dysferline plus courte, issue de l'expression après un épissage naturel de l'exon 32, (Sinnreich, Therrien et al. 2006) a motivé l'équipe du Dr Lévy à tester le saut d'exon sur la dysferline. L'utilisation d'AON visant l'exon 32 sur des myoblastes humains permet effectivement le saut de l'exon 32 pendant l'épissage, et une restauration de l'activité de la dysferline (Wein, Avril et al. 2010). La démonstration de la faisabilité du saut d'exon forcé sur les exons 19, 24, 30 et 34 a également été établie (Aartsma-Rus, Singh et al. 2010).

4. Le *trans*-épissage

Cette approche de chirurgie de l'ARN consiste à substituer la partie de l'ARNpm portant la mutation par une séquence saine. Cet outil thérapeutique est basé sur une propriété **naturelle** des ARN, qui est de pouvoir créer des chimères entre deux ARN initialement non fusionnés.

Mécanisme biologique du *trans*-épissage

Dans certains organismes, la diversité du protéome est enrichie par le possible épissage réalisé entre deux molécules d'ARNpm différentes : cet évènement est appelé le ***trans*-épissage**.

- *Trans*-épissage d'une séquence unique sur les ARNm :

Le trypanosome *Leishmania* utilise le *trans*-épissage pour lier une séquence en 5' de tous ses ARNm. Cette séquence de 140 pb, appelée **Splice Leader (SL)** ou mini-exon, est produite en grande quantité, et permet l'addition finale d'une séquence de 39 pb portant déjà la protéine Cap protégeant l'ARNm *trans*-épissé. Ce processus a l'avantage de générer des ARNm multiples à partir d'un précurseur **polycistronique**, grâce à son inclusion à n'importe quel endroit d'une séquence ARN (**Figure 35**) (Das and Bellofatto 2003).

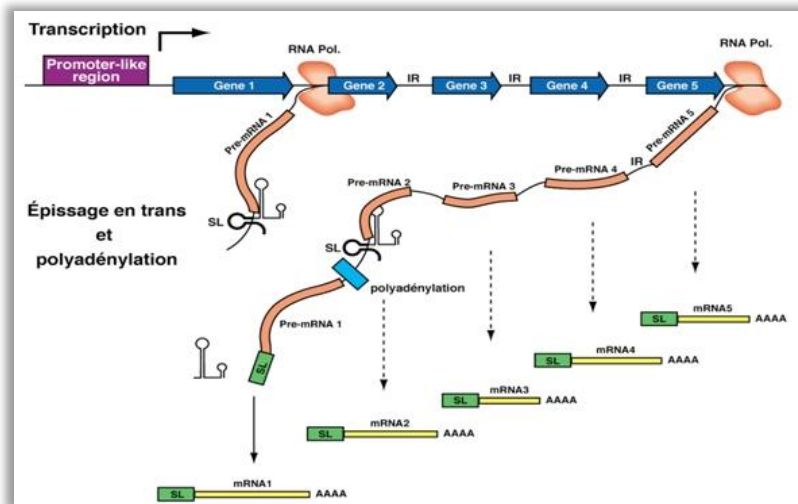


Figure 35 : Le *trans*-épissage chez le trypanosome.

L'ARN polycistronique produit par l'ARN polymérase subit plusieurs réactions de *trans*-épissage permettant de générer des ARNm indépendants, portant tous en 5' la région Splice Leader. Le *trans*-épissage provoque ici une structure en Y permettant en effet la réutilisation des ARN obtenus après *trans*-épissage, dans une ou plusieurs autres réactions de *trans*-épissage.

Découvert initialement chez le trypanosome (Parsons, Nelson et al. 1984), le *trans*-épissage d'un SL a été rapporté sur plusieurs embranchements eucaryotes (les nématodes, les plathelminthes, les cnidaires, les ascidies, les rotifères et les euglénozoaires) (revue dans (Stover, Kaye et al. 2006)). Il est absent de tous les eucaryotes supérieurs mais il a été démontré qu'une cellule de **mammifère** était capable de *trans*-épisser une séquence SL introduite par génie génétique (Bruzik and Maniatis 1992).

- *Trans*-épissage entre deux ARNpm :

Le *trans*-épissage entre deux ARNpm différents est qualifié de *trans*-épissage intergénique. Le mécanisme biochimique permettant cette réaction n'a pas encore été élucidé. Les ARN mis en cause peuvent être issus du même chromosome ou de chromosomes différents.

Le premier exemple de *trans*-épissage intergénique a été identifié chez le rat où ont été détectés des transcrits composés pour partie de l'ARNm de la carnitine octanoyltransférase et pour partie de l'ARN de la chaîne moyenne de l'acylCoA synthétase (Caudevilla, Serra et al. 1998). Chez la **drosophile**, deux exemples d'ARNm chimères issus du *trans*-épissage sont connus : les transcrits **modg4** et **lola** (Dorn, Reuter et al. 2001; Horiuchi, Giniger et al. 2003). Une analyse récente a permis de confirmer ces deux évènements et d'en identifier 80 autres (McManus, Duff et al. 2010). Chez **l'Homme**, plusieurs ARN résultant d'évènements de *trans*-épissage ont également été mis en évidence. Ils résultent de mécanismes assez différents : (i) le *trans*-épissage entre **deux copies** d'un même gène avec l'exemple du récepteur à l'œstrogène humain (Flouriot, Brand et al. 2002) ;

(ii) le *trans*-épissage entre **deux ARN** issus de chromosomes différents avec deux exemples répertoriés : la **Calmoduline** dépendante du calcium (Ca²⁺calmodulin-dependent protein kinase II, CaM kinase II), fusion d'ARN issus des chromosomes 10 et 18 (Breen and Ashcroft 1997) et **l'acyltranferase-1** (ACAT-1), hybride d'ARN codés par les chromosomes 1 et 7 (Li, Li et al. 1999);

(iii) le *trans*-épissage de gènes situés sur la **même région** chromosomique avec la démonstration de la fusion des ARN d'un Co-activateur de la transcription (CoAA) et de la protéine n°4 de fixation au motif ARN (RNA Binding Motif protein 4, RBM4), codés par des gènes situés au loci 11q13 (Brooks, Wang et al. 2009).

Plusieurs auteurs ont émis l'idée que le mécanisme de *trans*-épissage nécessitait une proximité spatiale lors de la génération des transcrits impliqués (Roux, Leveziel et al. 2006; Viles and Sullenger 2008). Cette idée a été confirmée par Khrameeva et ses collaborateurs qui ont révélé une structuration de la chromatine en régions exprimant des groupes de gènes dont les transcrits sont retrouvés fusionnés (Khrameeva, Mironov et al. 2012).

Le trans-épissage comme outil de thérapie génique

La description du mécanisme de *trans*-épissage a permis d'envisager une stratégie de thérapie génique par modification de l'ARNm. Cette technique est appelée Spliceosome Mediated RNA *Trans*-splicing (SMaRT). Deux autres outils permettent également d'obtenir

la fusion de 2 ARN uniques, sans l'intervention du spliceosome : les ribozymes de groupe I et les ARNt.

- Un but, trois outils

Trans-épissage médié par les ribozymes

Les stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation des **ribozymes de type I** utilisent la propriété spécifique de ces séquences ARN à s'auto-épisser en *trans* (Figure 36). Les limites de cette technique sont (i) sa capacité unidirectionnelle de *trans*-épissage en 3' des ARN cibles (impossibilité de modifier la partie 5' ou une partie interne l'ARNpm cible) et (ii) sa faible spécificité (liaison du ribozyme à sa cible peu régulée). En revanche, les ribozymes ne sont pas limités aux sites d'épissage définis par le spliceosome et peuvent donc être utilisés sur des gènes mono-introniques et des ARN non codants.

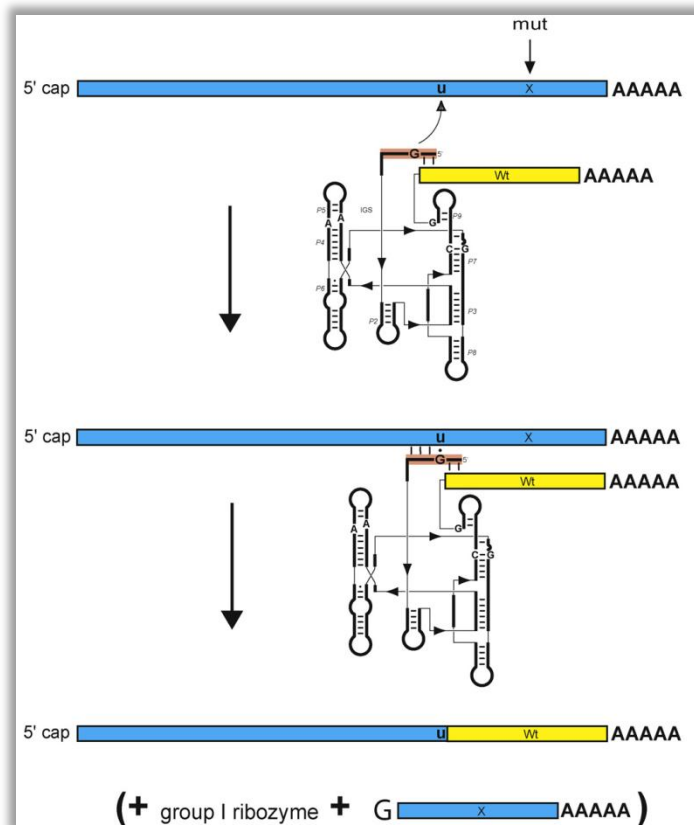


Figure 36 : Utilisation des ribozymes de type I en thérapie génique.

L'ARN non muté (en jaune) correspondant à un ARN muté cible (bleu) est fusionné à un ribozyme dont la zone d'appariement a été modifiée pour cibler l'ARN muté. La spécificité de reconnaissance et la capacité autolytique du ribozyme permet l'échange de la séquence mutée avec la séquence thérapeutique, et provoque la libération du ribozyme et du fragment d'ARN muté (Fiskaa and Birgisdottir 2010).

Trans-épissage médié par l'endonuclease d'ARNt des Archaea.

Les Archaea possèdent une endonucléase capable de reconnaître des motifs structuraux spécifiques présents au niveau des ARNt, et d'éliminer d'une partie de la séquence de l'ARNt ciblé. Ce mécanisme a été détourné pour permettre l'apport d'une séquence exogène en *trans*, via l'utilisation d'une endonucléase et un ARN exogène portant une séquence cible et la séquence codante thérapeutique d'intérêt (Figure 37). Cette stratégie permet, comme avec les ribozymes, de cibler les ARN mono-introniques et les ARN non codants. Elle présente en revanche le gros inconvénient de nécessiter l'apport d'une endonucléase exogène.

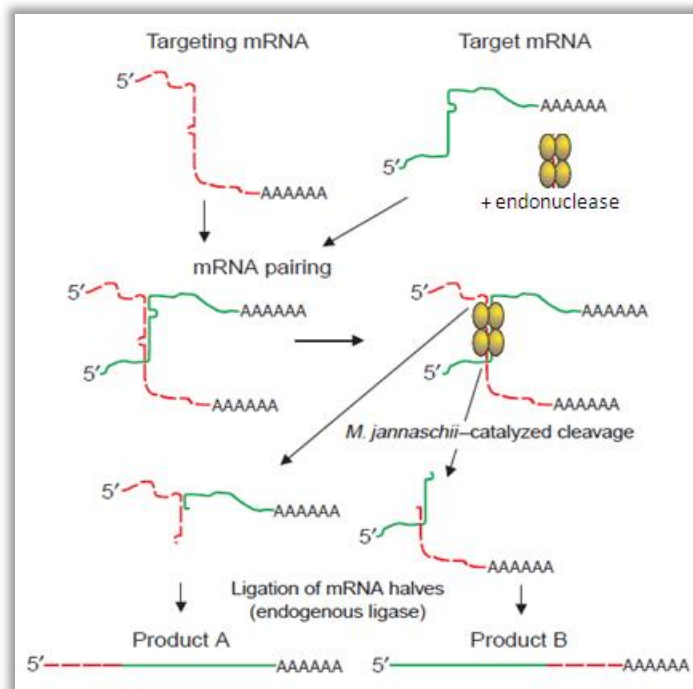


Figure 37 : Le *trans*-épissage thérapeutique utilisant l'endonucléase de *M. jannaschii*.

Un ARN exogène (vert) et l'endonucléase de *Methanocaldococcus jannaschii*, injectés dans une cellule de mammifère produisant un ARN cible (rouge), permettent la fusion des deux ARN, au site de coupure par l'endonucléase. La séquence cible portée par l'ARN vert provoque la formation d'un motif reconnu par l'endonucléase. Elle coupe alors l'ARN endogène et exogène. Les parties 5' de l'ARN endogène et 3' de l'ARN exogène sont liées (produit A), de même que les parties 5' de l'ARN exogène et 3' de l'ARN endogène (produit B).

Le Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing (SMaRT)

La reprogrammation de l'ARNm est ici basée sur la capacité naturelle du spliceosome à réaliser un épissage de 2 molécules en *trans*. La stratégie thérapeutique consiste à fournir à la cellule un ARN exogène thérapeutique portant un ou plusieurs exons qui pourront remplacer les exons mutés de l'ARN endogène cible. Cet ARN thérapeutique appelé

molécule ARN de *trans*-épissage (RNA-*trans*-splicing molecule, RTM) est constitué de trois régions ayant chacune une fonction précise dans l'évènement et la finalité thérapeutique : (i) une zone d'appariement à la cible (ou Binding Domain, BD), permettant la mise à proximité de l'ARN cible et de l'ARN thérapeutique ; (ii) un intron synthétique inducteur de l'épissage en *trans* et ; (iii) la séquence de remplacement des exons ciblés, généralement l'ADNc normal correspondant à la zone portant la mutation (**Figure 38**).

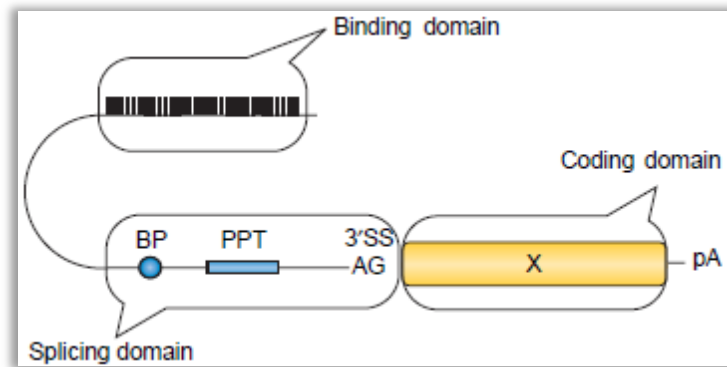


Figure 38 : Composition d'un RTM.

Trois zones du RTM sont nécessaires à son efficacité : le BD, responsable de l'appariement à la cible, l'intron synthétique portant les séquences de régulation de l'épissage en *trans* et la séquence codante de remplacement des exons ciblés (Mansfield, Chao et al. 2004).

Le SMaRT a l'avantage, contrairement aux ribozymes, de permettre l'échange des séquences ARN, aussi bien en 3' qu'en 5' de l'ARN cible (**Figure 39**). Dans le cas d'un échange en 3', l'intron synthétique porte les signaux nécessaires à la fusion du dernier exon endogène avec la séquence thérapeutique du RTM (site de branchement, site accepteur et signal de polyadénylation). Dans le cas d'un échange en 5', l'intron ne porte que le site donneur, le reste des signaux étant apportés par l'ARNpm endogène. La double compétence d'épissage en 3' et en 5' permet également l'échange d'un intron interne, grâce à une double réaction de *trans*-épissage. Cette technique est également connue sous le nom d'échange d'exon (ExChange) (**Figure 39**).

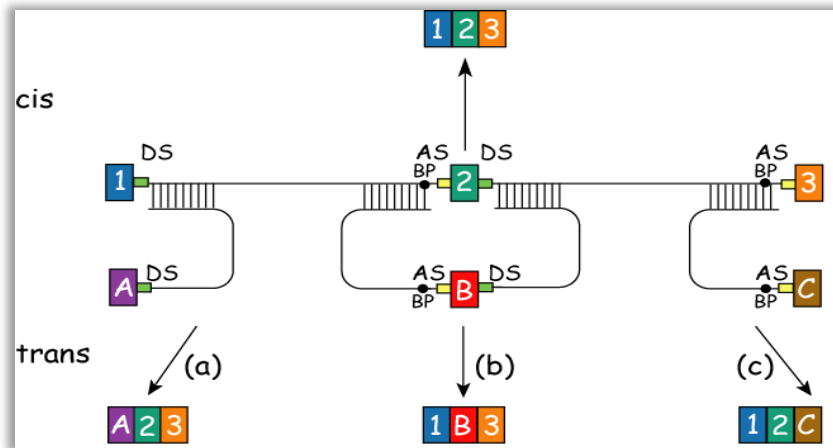


Figure 39 : Les différents SMaRT.

La construction de RTM spécifique permet de dériver le splicéosome d'une réaction de cis-épissage en une réaction de *trans*-épissage en 5' (a), en 3' (c) ou le remplacement d'exons internes (b).

Preuves établies de l'efficacité du trans-épissage par SMaRT en thérapie génique

De nombreuses publications ont démontré l'efficacité du *trans*-épissage en développant des modèles synthétiques basés sur l'utilisation de **gènes rapporteurs** tels que la GFP, la dsRED ou la β -galactosidase. La technique consiste à reconstituer par *trans*-épissage le gène rapporteur scindé en deux parties (Puttaraju, Jamison et al. 1999; Dallinger, Puttaraju et al. 2003; Mansfield, Clark et al. 2003; Mitchell and McGarrity 2005; Yang and Walsh 2005; Walls, Puttaraju et al. 2008; Wally, Brunner et al. 2010; Gruber, Gratz et al. 2011; Koller, Wally et al. 2011). La première preuve de principe a été établie par Puttaraju et ses collaborateurs sur un modèle *in vitro* utilisant la β -galactosidase (Puttaraju, Jamison et al. 1999). Les auteurs ont montré la correction de l'ARNm et le rétablissement de l'activité de la β -galactosidase, par l'utilisation d'un RTM permettant la correction du transcrite d'une β -globine non fonctionnelle, codée par un plasmide. Depuis, de nombreux travaux ont été publiés démontrant des corrections *in vitro* ou *in vivo* de gènes impliqués dans des maladies génétiques dominantes ou récessives (**Table 9**). Le détail des travaux résumés dans la **Table 9** est disponible dans l'Annexe V.

Au vu de ces éléments, le *trans*-épissage semble être une approche particulièrement intéressante notamment dans le cadre de protéines codées par un ADNc trop grand pour pouvoir bénéficier d'une autre approche de thérapie génique classique.

	Gène/ Maladie	Approche utilisée	Résultats	Référence
n vitro	COL7A1/épidermolyse bulleuse récessive	RTM3'/minigène	RT-PCR, séquençage	(Dallinger, Puttaraju et al. 2003).
		dblRTMrapporteur/minigène	RT-PCR, cytométrie de flux	(Koller, Wally et al. 2011).
		lentivirus RTM3'/endogène	RT-PCR, séquençage WB, IHF, morphométrie	(Murauer, Gache et al. 2011)
	SMN2/amyotrophie spinale	RTM3'et oligo antisens/minigène	RT-PCR, séquençage WB, IHF	(Coady, Shababi et al. 2007) (Coady, Baughan et al. 2008)
	MAPT/démence frontotemporale	RTM3'/minigène	RT-PCR, séquençage	(Rodriguez-Martin, Garcia-Blanco et al. 2005) (Rodriguez-Martin, Anthony et al. 2009)
	CFTR /mucoviscidose	RTM3'/minigène	RT-PCR, séquençage	(Mansfield, Kole et al. 2000)
		AAV RTM3'/endogène	RT-PCR, Récupération fonctionnelle des cellules	(Liu, Jiang et al. 2002)
		AAV 2 et 5 RTM3'/endogène	RT-PCR, Récupération fonctionnelle des cellules	(Liu, Luo et al. 2005)
		RTM5'/minigène	RT-PCR, séquençage	(Mansfield, Clark et al. 2003)
	PLEC1/épidermolyse bulleuse	RTM5'/endogène	RT-PCR, séquençage WB, IHF	(Wally, Klausegger et al. 2008)
	K14/épidermolyse bulleuse récessive	RTM5'/endogène	RT-PCR, séquençage, WB	(Wally, Brunner et al. 2010)
HBB/β-thalassémie	RTM5'/endogène	RT-PCR, séquençage	(Kierlin-Duncan and Sullenger 2007)	
DYS/Dystrophie Musculaire de Duchenne	DbIRTM/minigène	RT-PCR, séquençage	(Lorain, Peccate et al. 2010)	
in vivo	SMN2/amyotrophie spinale	plasmide RTM3' injecté dans l'espace ventriculaire intracérébrale	RT-PCR, WB survie	(Coady and Lorson 2010) (Shababi and Lorson 2012)
	F8/hémophilie de type A	plasmide RTM3' en IV	RT-PCR, WB test coagulation amélioré	(Chao, Mansfield et al. 2003)
	CD40L/hyperimmunoglobulinémie liée à l'X	lentivirus RTM3'ex-vivo sur cellules de la moëlle osseuse, autogreffe	RT-PCR, restauration CD40L	(Tahara, Pergolizzi et al. 2004)

Table 9 : Principales publications montrant des corrections par SMaRT de gènes impliqués dans des maladies génétiques.

Légende : RTM3', RTM5', dblRTM : *trans*-épissage provoqué en 3', en 5' ou double *trans*-épissage. Minigène/endogène : *trans*-épissage sur une cible exogène ou endogène. RT-PCR : efficacité du *trans*-épissage confirmé par la présence de l'ARN *trans*-épissé détecté par RT-PCR. Séquençage : vérification par séquençage du produit de RT-PCR. WB : présence de la protéine résultant du *trans*-épissage. IHF : localisation histologique correcte de la protéine résultant du *trans*-épissage. Récupération fonctionnelle des cellules, survie, test coagulation amélioré, restauration CD40L : tests fonctionnels spécifiques aux maladies traitées.

V. Contexte et Objectifs de la thèse :

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans une équipe de Recherche du Généthon, spécialisée dans l'étude et le traitement des dystrophies musculaires progressives. L'objectif est de mettre au point des stratégies thérapeutiques pour ces myopathies, pour lesquelles aucun traitement n'est aujourd'hui proposé. Les dysferlinopathies, qui regroupent essentiellement la LGMD2B et la MM, en font partie. Malgré un dynamisme de recherche élevé autour de ces maladies, aucune thérapie génique envisagée n'a pour l'heure débouché sur le traitement de malades.

L'objectif de cette thèse est de proposer et tester différentes solutions thérapeutiques innovantes pour ces pathologies dues à une déficience en dysferline chez l'Homme.

La première approche testée est une compensation de l'absence de la dysferline par une miniprotéine. Elle a pour intérêt majeur de concerner la quasi-totalité des patients dysferlinopathes. Nous avons tiré avantage d'une forme connue de « minidysferline » décrite dans le cerveau, où un ARNm ne codant que la moitié C-terminale de la protéine dysferline a été observé. L'utilisation d'une miniforme décrite à l'état naturel présente l'avantage théorique d'être non immunogène. Contrairement à l'ADNc de la dysferline entière, la séquence codante de cette forme courte est incorporable dans un vecteur AAVr. La première approche testée est l'évaluation du potentiel thérapeutique de cette isoforme chez des souris déficientes en dysferline. Ces travaux sont rapportés dans la Partie I des Résultats.

La deuxième stratégie thérapeutique évaluée est la compensation de l'absence de dysferline par l'anoctamine 5. Elle est basée sur deux faits : (i) la compensation par une protéine tierce est une approche possible pour les maladies génétiques (ii) les mutations du gène ANO5 et du gène DYSF génèrent des maladies aux symptômes très proches. Il est de plus rapporté que les protéines dysferline et anoctamines 5 interviennent toutes deux dans le processus de réparation membranaire. Les résultats de la surexpression de l'anoctamine 5 dans le modèle murin déficient en dysferline sont présentés dans la Partie II des Résultats.

La troisième approche testée s'attache à dépasser deux verrous technologiques imposés par la thérapie génique : la capacité maximale d'encapsidation des vecteurs utilisés et le contrôle de l'expression du transgène. Le choix d'une thérapie au niveau ARN par *trans*-épissage permet de

répondre à ces deux problématiques. Nous avons choisi de construire une molécule nous permettant de cibler environ 17,5% des patients en remplaçant les 6 derniers exons de la DYSF par du *trans*-épissage en 3'. Le compte rendu des expériences visant à évaluer cette molécule sur un minigène et sur des lignées cellulaires fait l'objet de la Partie III des Résultats.

RESULTATS : |

PARTIE I

Compensation de l'absence de dysferline par une forme courte identifiée dans le cerveau.

I. Contexte et rationnel de l'étude

La protéine dysferline est codée par un CDS de 6,2 kbp. Cette séquence nucléotidique dépasse les capacités d'encapsidation des vecteurs AAVr préférentiellement utilisés pour la thérapie génique dans le muscle. Comme cela a été présenté en introduction, des stratégies utilisant des formes courtes des protéines d'intérêt permettent de dépasser ce problème et ont déjà été testées pour plusieurs maladies. La détermination de formes courtes fonctionnelles est toutefois rendue difficile car elle nécessite l'identification des zones de la protéine suffisantes et nécessaires à sa/ses fonction(s). Pour les dysferlinopathies, contourner cette difficulté fut permis par l'utilisation d'une miniforme (minidysferline) mise en évidence chez un patient peu affecté (Krahn, Wein et al. 2010). Cette miniforme, qui n'est composée que d'une courte partie de la séquence C-terminale classique, n'apporte toutefois pas de bénéfice thérapeutique suffisant même si elle permet une restauration d'une des fonctions de la dysferline dans les souris traitées : la réparation membranaire (Lostal, Bartoli et al. 2012).

Une séquence décrite comme étant un variant d'épissage de la dysferline dans le cerveau humain a été rapportée dans un brevet. Comme la « minidysferline », cette séquence est une bonne candidate pour développer une stratégie de type miniprotéine d'autant qu'elle comporte plus de domaines que la minidysferline. Nous avons donc voulu utiliser cette forme décrite comme naturellement exprimée chez l'Homme comme une miniprotéine à but thérapeutique, nommée « BrainDysferlin ». Son utilisation comme transgène dans la thérapie génique des LGMD2B et MM permet de contourner le problème de taille du transgène et son origine naturelle devrait

permettre de limiter la réaction immunitaire. Il faut toutefois déterminer si cette miniforme a les fonctionnalités nécessaires et suffisantes pour se substituer à la dysferline absente.

II. Stratégie

L'expérience acquise dans le laboratoire du Dr Richard permet l'élaboration d'une stratégie simple, basée sur le test de l'efficacité thérapeutique de la forme « BrainDysferlin » directement sur un modèle murin déficient en dysferline. Cette rapidité de mise en œuvre est possible par (i) la possession du modèle murin Bla/J déficient en dysferline dûment caractérisé (histologie des muscles à différents âges, actimétrie, réparation membranaire, force sur muscle isolé)(Lostal, Bartoli et al. 2010) ; (ii) la capacité d'évaluation fonctionnelle de ce modèle ; (iii) la connaissance des vecteurs AAVr efficaces dans le muscle, et la possibilité de leur production; (iv) la connaissance de la séquence de la « BrainDysferlin », rapportée dans un brevet.

Au vu des éléments à notre disposition, nous avons choisi de produire un vecteur AAV8r exprimant la forme « BrainDysferlin » telle décrite dans un brevet, et de l'utiliser pour transduire des souris Bla/J par voie intramusculaire. L'efficacité thérapeutique du traitement a été évaluée par une analyse histologique des muscles injectés, par la détermination de l'index de centronucléation et par l'évaluation de la résistance au stress mécanique des fibres. Lors des contrôles que nous avons effectués pour nous assurer de l'exactitude de la séquence de la BrainDysferlin, nous avons mis en évidence que la séquence rapportée dans le brevet était fautive. La BrainDysferlin utilisée dans cette étude ne peut donc pas être considérée comme une isoforme naturelle, mais comme une miniforme synthétique.

III. Résultats

A. Clonage de la « BrainDysferlin » et production d'un AAVr.

1. Identification de la séquence « BrainDysferlin »

La séquence de la forme spécifique de la « BrainDysferlin » n'apparaît ni dans la littérature, ni dans les bases de données de séquences. Elle est en revanche rapportée dans un brevet américain déposé en 2004, où elle a été obtenue par marquage d'une banque d'ADNc humain (Stratagene) avec une sonde spécifique, puis séquençage des clones identifiés. Le transcrit décrit dans ce document comporte 3384 nucléotides (contre 6243 pb pour la dysferline complète). Il est composé d'une séquence en 5' de 489 bases spécifiques au variant d'épissage du cerveau, puis de

2895 bases strictement identiques à la séquence dysferline de référence (DYSF transcript variant 8, NM_003494.3). Cette homologie s'étend de la première base de l'exon 31 à la séquence du codon stop contenu dans l'exon 55, soit une séquence codante de 2964 pb. Cette séquence code les domaines C2D à C2G, ainsi que le domaine transmembranaire de la dysferline. La séquence ADN de la « BrainDysferlin » est partiellement reportée dans la **Figure 40** ci-dessous.

```
Tcctggttcaagcgattctctggcctcagcctcccgagtagctgggattacagggcatgctccaccaagcccgggtaattttgtattttt
aatagagacggggtttgccatgttggtcaggctggtctcgaactcctgacctcaggtgatctgccaccttgccctccaacgtgct
gagattacagggcatgagtcactgtgcccggcagagatggtctaattcatatgaaagaactctgaaaaagtagaaagtgtatttct
aaaataaggtacaaataattaatgtaagcataatcacctaacctgtggaatttttttttggagaagcaaattgcaaattgtgataga
tctaaaggagattgactaagaggggtaccatctggaaatgacgtcatgtgagaatggttaaagatgctcgggagattgagcctag
agaaaggaagatttgaaccaggaggcagaggtagagatccaggagaggcgcgctgatggatgacaagagtgaagatt
ccatgtccgtctccaccttgagcttcggtgtgaacagaccacgattcctgcatattcgac.....atcctctcatcatcctcttcatcc
tgctgctgttctggccatctcatctacgcctcccgaactatgctgcatgaagctggtgaagcccttcagctga
```

Figure 40: séquence du variant décrit dans le brevet.

La séquence de 489 bases spécifiques à la BrainDysferlin est en rouge. L'ATG en vert marque le début d'une ORF couvrant 2964 pb, incluant une séquence spécifique à la forme BrainDysferlin (soulignement double), puis la séquence de la dysferline classique (en gris) allant de la première base de l'exon 31 (orange) au codon stop (bleu) contenu dans l'exon 55.

2. Clonage et production d'un AAV8r-BrainDysferlin

Le clonage de la séquence BrainDysferlin a été réalisé dans un plasmide pEGFP-CMV-hDysferline présent au laboratoire (**Fiche technique n° 1**). Ce plasmide porte la séquence complète de la dysferline humaine fusionnée en 5' à la protéine GFP, le tout sous le contrôle du promoteur fort CMV. La séquence codante de 72 bases, caractérisée par le brevet comme spécifique au variant du cerveau, a été synthétisée chimiquement (Genecust, Luxembourg) et clonée en remplacement des exons 1 à 30 de la dysferline présente sur ce plasmide. Le clone pEGFP-CMV_BrainDysferlin sélectionné (carte présentée dans la **Figure 41a**) a été vérifié par séquençage avec les amorces T7 et sp6 dont les cibles sont présentes sur le plasmide. La bonne expression de ce plasmide après transfection en cellules HER911 (**Fiche technique n° 4**) a été contrôlée en WB avec les anticorps anti-GFP et Hamlet (**Figure 41b**)(**Fiche technique n° 7**). Un comarquage avec ces deux anticorps est visible à 140 kDa environ, taille attendue pour la protéine de fusion GFP-BrainDysferlin. Ce WB permet de vérifier que l'anticorps Hamlet (ciblant le peptide codé par l'exon 53 de DYSF) est bien capable de cibler cette miniforme.

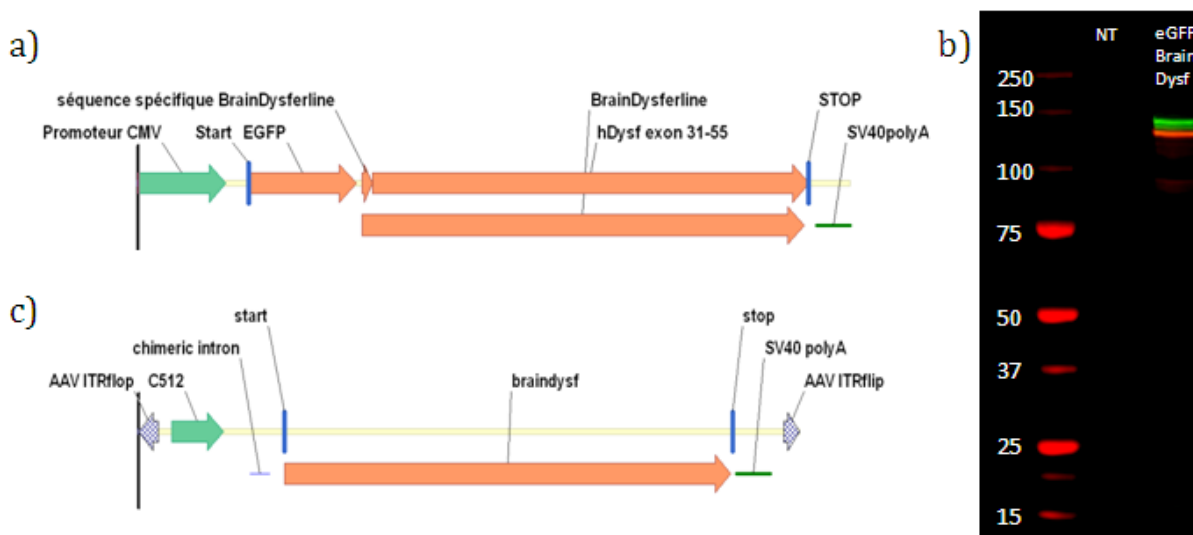


Figure 41: carte du plasmide pEGFP-BrainDysferlin et expression en HER911.

(a) Carte du plasmide pEGFP-CMV_BrainDysferlin (b) WB de lysat de cellules HER911 transfectées avec le plasmide pEGFP-CMV_BrainDysferlin (eGFP Brain Dysf) ou non transfectées (NT) marqué avec les anticorps anti-GFP (révélé en rouge) et anti-Dysferline (Hamlet-1, révélé en vert). (c) carte du vecteur AAV8r-BrainDysferlin.

Un sous-clonage uniquement de la partie codante de la forme du cerveau a été réalisé dans un plasmide pAAV (provenant de la banque Généthon), permettant la production d'AAVr (séquences des amorces disponibles dans l'Annexe VI). Le plasmide obtenu (pAAV-BrainDysferlin) a été contrôlé et validé par séquençage. La production d'un lot d'AAV8r a ensuite été réalisée avec ce plasmide, selon la technique de tri-transfection (**Fiche technique n° 3**). La carte du génome viral encapsidé dans cet AAV est disponible dans la **Figure 41c** ci-dessus.

B. L'AAV8r-BrainDysferlin est correctement exprimé après injection en IM dans la souris

Afin de tester la capacité du vecteur AAV8r-BrainDysferlin à transduire le muscle et exprimer un transgène détectable, nous avons injecté en IM le TA de souris Bla/J de 4 semaines, à raison de 1.10^{11} vg/kg (soit 30 μ l par TA d'une solution virale à $1,5.10^9$ vg/ml)(**Fiche technique n° 8**). Après 4 semaines, nous avons récupéré et analysé ces muscles par WB (**Fiche technique n° 7**). L'injection d'AAV8r-BrainDysferlin permet bien la production d'une forme courte de la dysferline, détectée par l'anticorps anti-dysferline Hamlet (**Figure 42**). La taille observée, d'environ 110 kDa environ, est conforme à la taille prédite de 113 kDa.

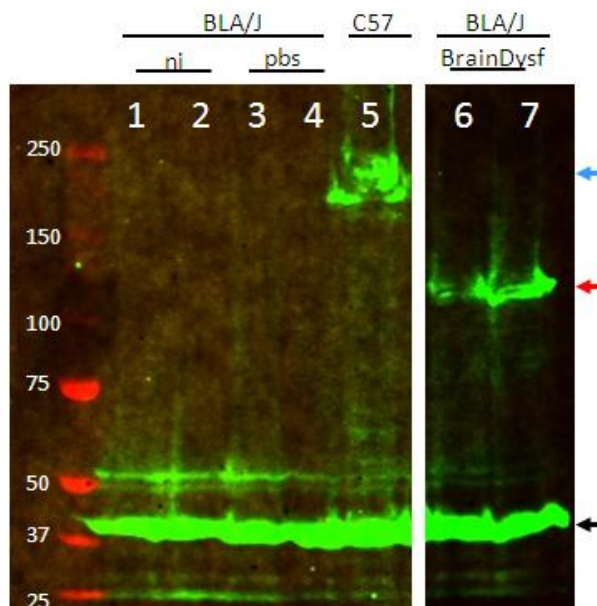


Figure 42: WB de détection de la BrainDysferlin dans des broyats de muscles de souris.

Analyse par western blot des TA de souris Bla/J non injectées (ni, 1 2), injectées avec du PBS (pbs, 3 4), de souris C57BL6 (5) et enfin de souris Bla/J injectées avec l'AAV8r-BrainDysferlin (BrainDysf, 6 7). L'utilisation de l'anticorps anti-dysferline Hamlet montre la présence de la dysferline à 240 kDa uniquement chez les C57Bl6 (flèche bleue). Une bande à 110 kDa environ est détectée pour les deux individus injectés avec l'AAV8r-BrainDysferlin, correspondant à la forme BrainDysferlin (flèche rouge). Un marquage de l'actine sert de normalisateur de dépôt (flèche noire). Marqueur de taille : Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad).

C. L'AAV8r-BrainDysferlin présente un effet toxique à une dose seuil

Nous avons testé la toxicité de la surexpression de la BrainDysferlin dans des souris sauvages C57Bl6 (**Fiche technique n° 8**). Trois doses d'AAV8r-BrainDysferlin (faible : $3,3 \cdot 10^{10}$ vg/kg, moyenne : $1 \cdot 10^{11}$ vg/kg et forte : $3 \cdot 10^{11}$ vg/kg) ont été injectées en IM dans le TA de souris C57Bl6 de 4 semaines ($n=3$ pour chaque groupe). Les doses faible, moyenne et forte correspondent à l'injection de 30 μ l d'une solution virale respectivement à $0,5 \cdot 10^9$, $1 \cdot 10^9$ et $3 \cdot 10^9$ vg/ml. Les muscles traités ont été prélevés 4 semaines après injection. La présence de la forme « BrainDysferlin » a été contrôlée par WB. L'histologie des muscles a été réalisée (**Figure 43**) (**Fiche technique n° 13**). L'injection de la plus forte dose provoque une augmentation significative du nombre de fibres centronucléées dans le TA, comparée aux souris C57Bl6 non-injectées (**Figure 43**) (**Fiche technique n° 12**). De façon notable, une des souris présentant une surexpression très forte de la forme « BrainDysferlin » détectée par le WB présente également un indice de centronucléation très élevé. Pour les doses inférieures ($3,3 \cdot 10^{10}$ vg/kg et $1 \cdot 10^{11}$ vg/kg) l'indice de centronucléation n'est pas plus important que celui des souris WT. Un seuil toxique d'administration de l'AAV8r-BrainDysferlin semble donc être franchi entre la dose à $1 \cdot 10^{11}$ vg/kg et celle à $3 \cdot 10^{11}$ vg/kg.

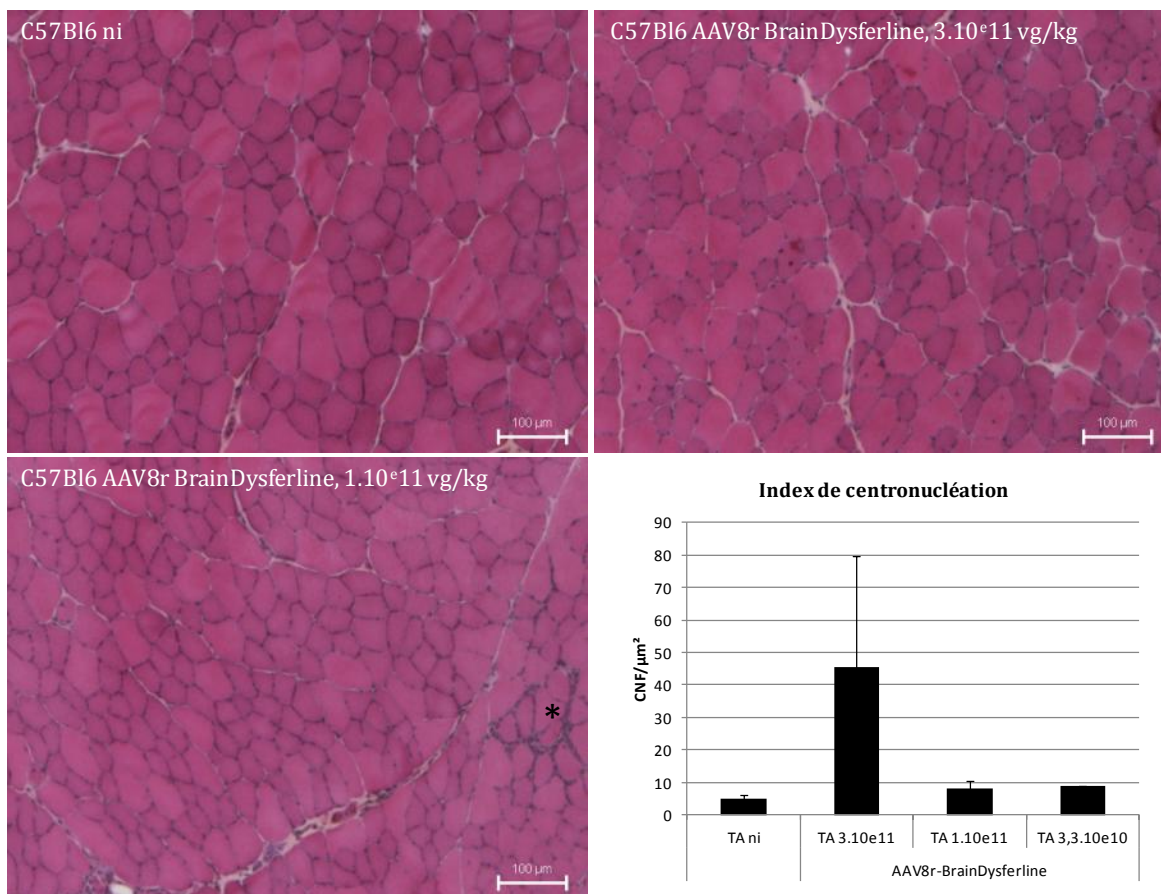


Figure 43: analyse histologique des muscles de souris C57Bl6 injectés ou non avec l'AAV8r-BrainDysferlin

Coloration HPS de coupes transversales de muscle de souris C57Bl6 non-injectées (ni) ou injectées avec l'AAV8r-BrainDysferlin (doses présentées : 3.10^{11} et 1.10^{11} vg/kg). Des fibres centronucléées sont détectables dans le muscle des souris injectées à la plus forte dose (3.10^{11} vg/kg), mais pas aux plus faibles doses. L'index de centronucléation (nombre de fibres centronucléées par μm^2) révèle une nette différence entre le groupe ni et le groupe injecté à 3.10^{11} vg/kg ($p < 0,01$ test de Mann-Whitney). On note la présence de foyers d'inflammation pour l'injection à 1.10^{11} vg/kg (*).

D. Evaluation du potentiel thérapeutique de l'AAV8r-BrainDysferlin sur les souris Bla/J

Nous avons testé l'effet thérapeutique de la forme BrainDysferlin dans le modèle Bla/J (**Fiche technique n° 8**). Cette étude a été faite par injection de l'AAV8r-BrainDysferlin en IM dans le TA de souris Bla/J âgées de 4 semaines, aux doses de 1.10^{11} et $3,3.10^{10}$ vg/kg (doses non toxiques sur les souris C57Bl6, voir **Figure 43**). Nous avons ainsi évalué si la BrainDysferlin était capable d'empêcher l'installation du phénotype dystrophique, les premiers symptômes n'apparaissant en effet pas avant l'âge de 2 mois dans le TA des Bla/J. Dans cette étude, l'approche de restauration d'une dysferline complète par concatémérisation d'AAV1r sert de référent positif, car cette approche a démontré sa capacité à réduire le phénotype dystrophique des souris Bla/J (Lostal, Bartoli et al. 2010). Les injections ont en effet été associées à une amélioration de l'aspect histologique du muscle, une réduction du nombre de fibres nécrotiques, la restauration de la

capacité de réparation de la membrane et une amélioration globale de l'activité locomotrice. Le mélange des AAV1r-concat apportant environ la moitié de l'ADNc dysferline chacun (AAV1r-5' et AAV1r-3') est injecté à raison de $5,8.10^{11}$ vg/kg. Les souris traitées sont également comparées à des souris C57Bl6 et Bla/J non traitées.

1. La BrainDysferlin ne modifie pas l'index de centronucléation des muscles Bla/J

Les muscles prélevés ont été coupés au microtome cryostaté et colorés par HPS (**Fiche technique n° 13**). Un échantillon représentatif de ces coupes est présenté dans la **Figure 44**. La présence de fibres centronucléées et l'apparition des premiers foyers d'inflammation est observable chez les souris Bla/J, alors que les muscles des souris C57Bl6 sont préservés et que les noyaux de leurs fibres se trouvent bien situés en périphérie. Les souris BLA/J injectées avec l'AAV-BrainDysferlin montrent toutes un phénotype dystrophique équivalent aux Bla/J non traitées, alors que l'injection de la dysferline complète *via* les AAV1r-concat permet une nette réduction des signes pathologiques. L'analyse de l'index de centronucléation, établi à partir de ces coupes, est également présentée dans la **Figure 44**. Le nombre de fibres centronucléées dans les souris traitées avec la BrainDysferlin (à 1.10^{11} et $3,3.10^{10}$ vg/kg) n'est pas réduit, comparé aux Bla/J. L'apport de la dysferline *via* la concatémérisation d'AAV permet, quant à elle, une diminution significative de cet indice (**Fiche technique n° 12**). L'index de centronucléation ainsi que l'observation des coupes HPS permet de conclure que la BrainDysferlin n'améliore pas le phénotype dystrophique des souris.

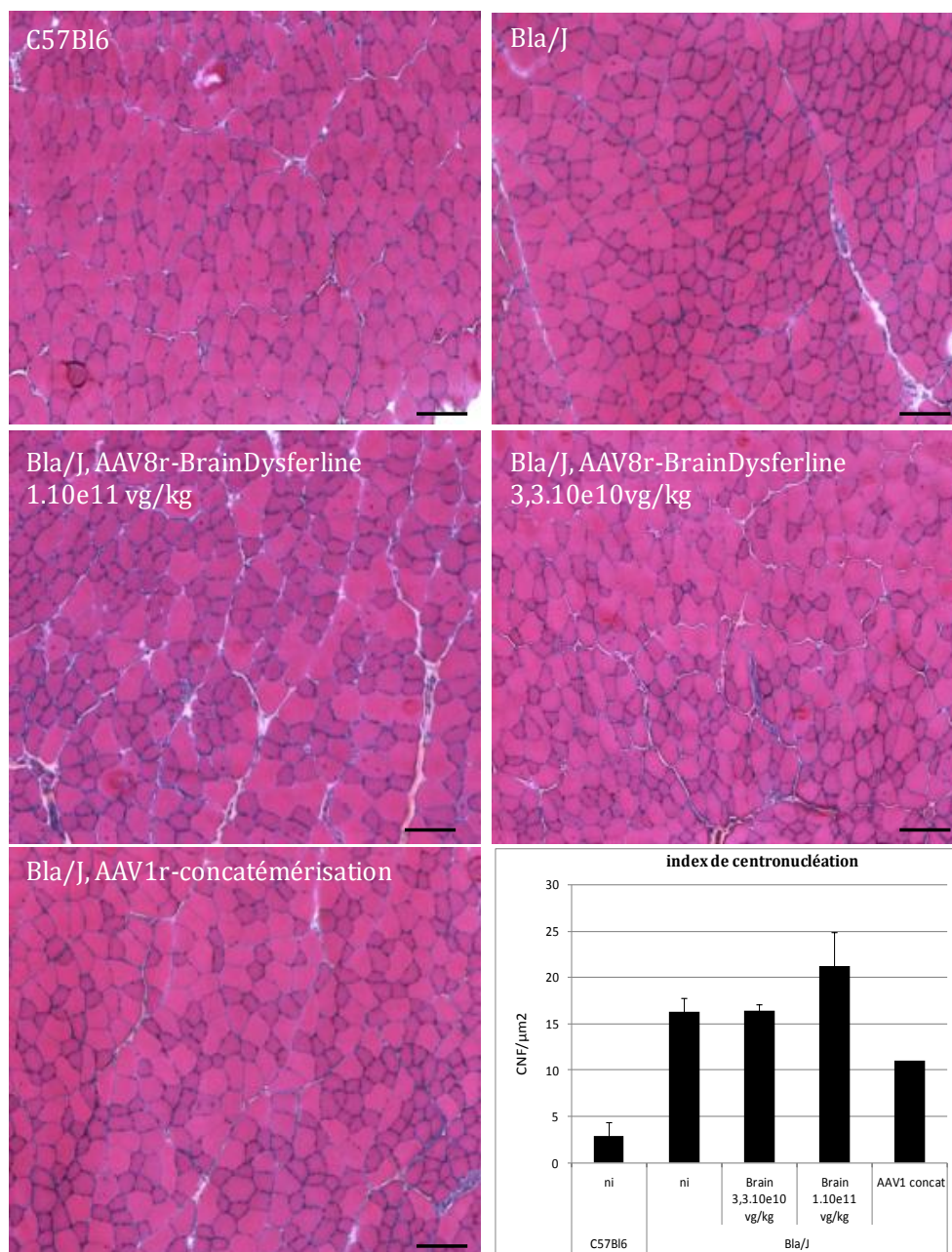


Figure 44: Analyse histologique des coupes musculaires de souris et index de centronucléation.

Coloration HPS de coupes transversales des muscles des loges antérieures de souris C57Bl6, Bla/J, Bla/J injectées avec l'AAV8r-BrainDysferlin (à 1.10^{11} vg/kg ou $3,3.10^{10}$ vg/kg), ou avec les AAVr1 de concatémérisation. Les muscles des souris Bla/J non injectés (ni) et Bla/J injectés avec l'AAV BrainDysferlin (dose 1.10^{11} vg/kg et $3,3.10^{10}$ vg/kg) ont un profil histologique proche (forte centronucléation et présence d'infiltrat) alors que l'utilisation de la concatémérisation d'AAVr pour exprimer une dysferline entière fait notablement réduire ces signes (Barre= 100 µm). L'index de fibres centronucléées a été établi à partir de ces colorations. L'histogramme présente le nombre de fibres centronucléées (CNF) par μm^2 de muscle chez les souris WT et Bla/J traitées (n=3 pour chaque groupe, sauf AAV1 concat ou n=1).

2. La BrainDysferline restaure la résistance au stress du muscle Bla/J traité

La BrainDysferline diminue la sensibilité aux lésions induites par le LSI

Le protocole LSI (Large Strain Injury) permet un exercice excentrique forcé des muscles dorsiflecteurs de la souris (loge antérieure constituée du TA et de l'EDL) (**Fiche technique n° 9**). Il consiste en une série répétée de contractions musculaires de ces muscles par stimulation électrique simultanément à un étirement forcé. Cette étude a été menée sur des souris Bla/J traitées en IM dans le TA par l'AAV8r-BrainDysferlin (injection à 4 semaines à 1.10^{11} vg/kg), et comparée à la valeur obtenue pour des souris C57Bl6, Bla/J et Bla/J injectées en IM par les AAV1r de concatémérisation (**Fiche technique n° 8**).

Trois jours après le protocole LSI, les souris ont été euthanasiées et les LA prélevées. L'observation de coupes histologiques de ces muscles, colorées à l'HPS, révèle une forte atteinte des muscles des 4 souris Bla/J (infiltrats lymphocytaires, nécrose, régénération), alors que dans le groupe des souris injectées avec l'AAV8r-BrainDysferlin à 1.10^{11} vg/kg, seuls 2 muscles sur 4 sont très abimés (**Figure 45**) (**Fiche technique n° 13**). Dans le groupe des souris injectées avec les vecteurs de concatémérisation, les muscles sont peu affectés. Ces observations semblent indiquer un effet protecteur de la BrainDysferlin au même titre que la dysferline complète apportée par concatémérisation. Cette action bénéfique peut avoir lieu durant le LSI (par une protection directe de la fibre) ou pendant la période de trois jours après le LSI (par une récupération améliorée, ou une protection de la fibre de processus nécrotiques). L'index de centronucléation n'a pas pu être déterminé en raison de l'état trop dégradé des muscles.

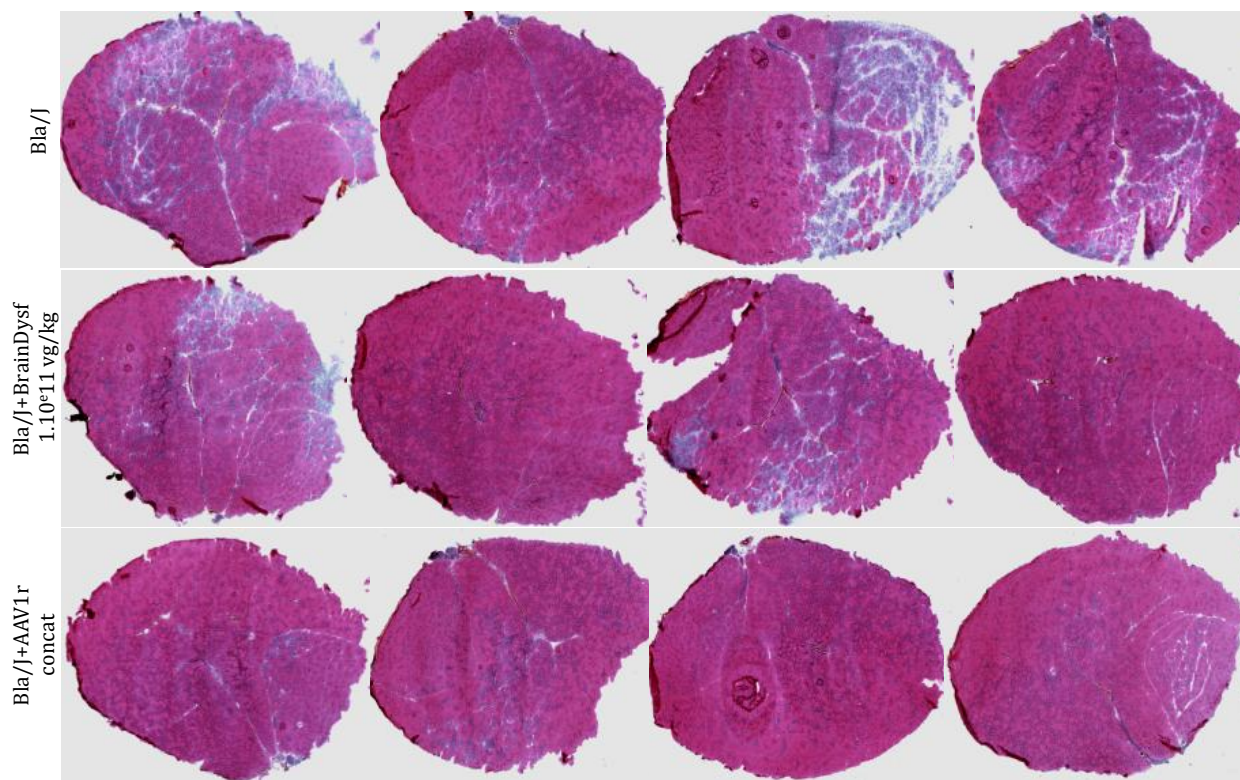


Figure 45: HPS de LA de souris trois jours après LSI

Présentation des coupes histologiques colorées à l'HPS des LA de souris, trois jours après LSI. Le LSI a un effet très délétère sur le muscle des souris Bla/J. De grandes zones d'inflammation sont observables sur les quatre souris analysées, avec un processus de nécrose très prononcé. Le TA et EDL des souris traitées avec l'AAV1r concat sont nettement moins affectés, et dans une moindre mesure les souris traitées avec l'AAV-BrainDysferlin à 1.10^{11} vg/kg. Les images représentent l'ensemble du muscle prélevé.

La BrainDysferlin réduit la perméabilisation des fibres, induite par le LSI

Un jour avant leur sacrifice, les souris sont injectées en IP avec du Bleu Evans (**Fiche technique n° 8**). Ce colorant a la particularité de pénétrer les fibres lésées et d'émettre une lumière fluorescente dans le rouge (680 nm) quand il est excité par une lumière aux alentours de 500 nm. Il marque donc les fibres dont la perméabilité membranaire n'est plus assurée. Les images des muscles observés au microscope à fluorescence sont présentées pour certains groupes dans la **Figure 46**, et la quantification relative de la fluorescence est présentée dans la **Figure 47**. Dans les C57Bl6, très peu de fibres sont positives au Bleu Evans, contrairement aux souris Bla/J non injectées qui présente un nombre élevé de fibres marquées (différence significative, $p < 0,05$. test de Mann et Whitney) (**Fiche technique n° 12**). Les souris traitées avec le mélange d'AAV1r de concatémérisation recouvrent un niveau de fibres positives au Bleu Evans équivalent à celui des C57Bl6 (pas de différence entre les groupes ; $p < 0,001$). Les souris traitées avec la faible ($3,3.10^{10}$ vg/kg) et forte (1.10^{11} vg/kg) dose d'AAV8r-BrainDysferlin ont respectivement 2 et

4 fois moins de fibres positives au Bleu Evans que les souris Bla/J. Pour les souris traitées à la forte dose, cette différence n'est toutefois pas significative ($p=0,08$).

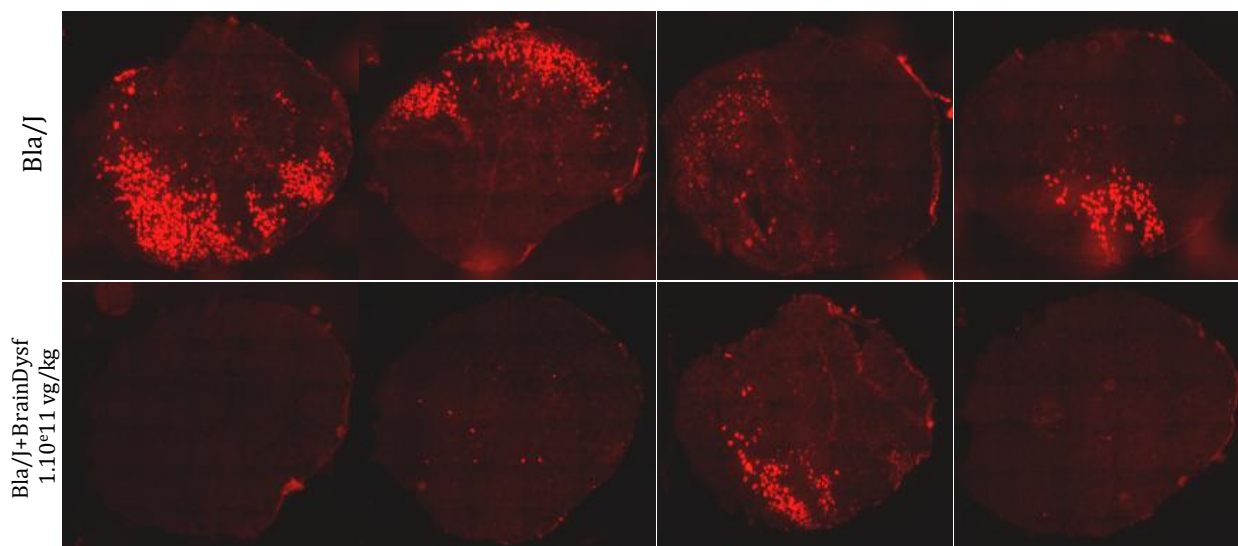


Figure 46 : analyse de la fragilité membranaire après traitement LSI

Analyse histo-fluorométrique des coupes de LA de souris trois jours après LSI. La perméabilité membranaire est révélée par un marquage des fibres par le Bleu Evans (visualisé en rouge). Les coupes de muscles de souris sont observées à 594 nm afin de visualiser les fibres positives au Bleu Evans. Une diminution du nombre de fibres nécrotiques est observée chez les animaux traités par la BrainsDysferline à 1.10^{11} vg/kg comparés aux contrôles non injectés. (Evans Blue Dye / EBD ; 0,1 mL à 0,5 mg/mL pour 10 g de souris).

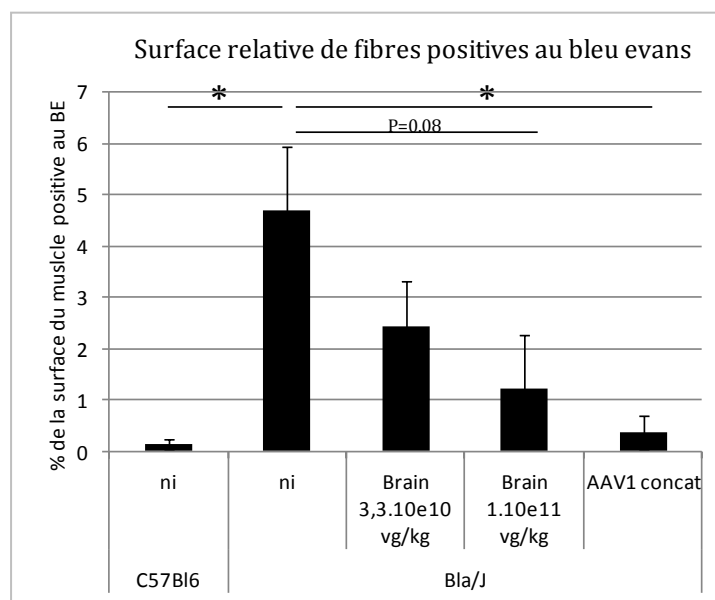


Figure 47 : surface relative des fibres positives au bleu evans

La surface de fibre positive au bleu Evans sur les coupes de LA de souris trois jours après LSI a été quantifiée et rapportée à la surface totale du muscle. Peu de fibres sont marquées chez les C57Bl6, contrairement aux souris Bla/J non injectées. Le traitement avec l'AAVr1 concat permet un retour quasiment au niveau des WT. La BrainDysferlin a un effet similaire mais plus mesuré qui est dose dépendant.

E. La séquence de la forme BrainDysferlin est erronée

Parallèlement à ces études, nous avons souhaité vérifier par nos propres expériences la séquence décrite comme variant d'épissage de la dysferline dans le cerveau. Une analyse par alignement Blast a révélé que la séquence de 489 bases spécifiques à la BrainDysferlin (voir **Figure 40**) présente une homologie à 96% avec l'intron 1 de l'ARNpm ankyrine-2 (NM_001127493.1) (**Fiche technique n° 11**). Cette homologie est quasi totale sur l'intégralité de la séquence considérée, seules les 20 pb avant le point de jonction avec l'exon 31 de la dysferline ne sont pas similaires à l'intron de l'Ankyrine-2. Cet ARNm est codé par un gène situé sur le chromosome 4 humain, alors que celui de la dysferline est sur le chromosome 2. Aucune séquence similaire à la partie spécifique à la BrainDysferlin n'est retrouvée en amont du gène DYSF. Il semblait possible que cette forme résulte en fait d'un artéfact de clonage.

La séquence spécifique à la forme « BrainDysferlin » n'est pas retrouvée

Nous avons voulu vérifier que la séquence spécifique à la BrainDysferlin était amplifiable ou non par PCR spécifique (**Fiche technique n° 6**). Deux amorces ciblant la séquence spécifique à la BrainDysferlin ont donc été synthétisées, et utilisées avec deux amorces en anti-sens ciblant les exons 31 et 34 de la dysferline classique (voir le schéma **Figure 48**). Les matrices étudiées sont des ADNc synthétisés à partir d'ARN extraits de cerveaux et de muscles humains (**Fiche technique n° 5**). Le plasmide pAAV-BrainDysferlin a également été utilisé comme contrôle. Aucune des quatre PCR, devant amplifier la jonction de la séquence spécifique à la BrainDysferlin avec le reste de la séquence codant la dysferline (voir tableau **Figure 48**), ne permet une amplification à la taille attendue. Les couples Fbd-cds/Rex34h et Fbd-cds/Rex31h amplifient eux le fragment attendu sur le plasmide pAAV-BrainDysferlin. La séquence spécifique à la BrainDysferlin est donc absente de notre échantillon d'ARN de cerveau humain.

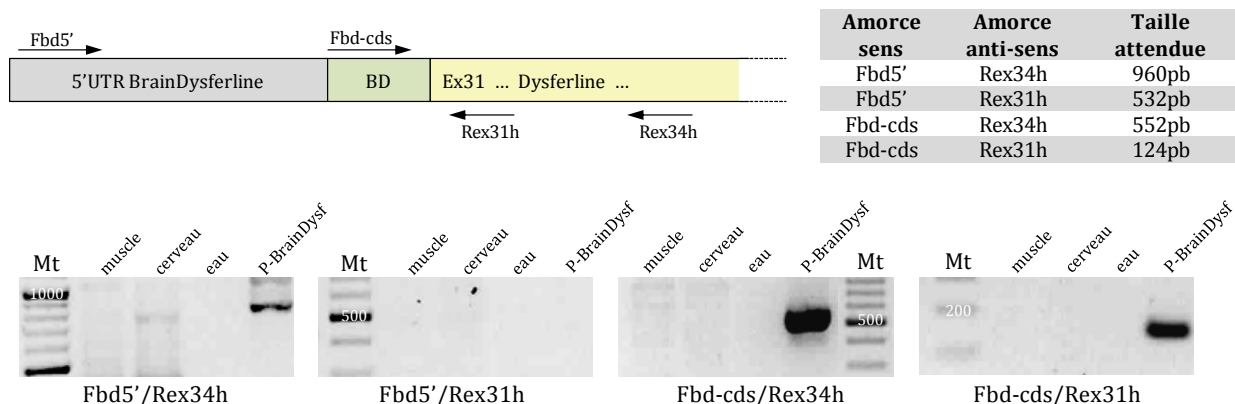


Figure 48: amorces et RT-PCRs spécifiques de la BrainDysferlin.

Deux amorces spécifiques de la séquence BrainDysferlin ont été générées (séquences en annexe VI). Elles ciblent la partie 5'UTR ou la partie codante de cette séquence. Des PCR avec ces amorces ont été réalisées sur les ADNc issus d'ARN de cerveau et de muscle humain, et sur le plasmide pEGFP-CMV_BrainDysferlin. Le couple d'amorce Fex31h/Rex34h est capable d'amplifier chacune des matrices testées, alors que les couples Fbd5'/Rex34h, Fbd-cds/Rex34h et Fbd5'/Rbd-cds ne donnent aucun amplicon, à l'exception du couple Fbd-cds/Rex34h sur le plasmide pEGFP-CMV_BrainDysferlin. Une amplification non spécifique est générée avec le couple Fbd5'/Rex34h sur le plasmide.

L'isoforme complète de la dysferline est transcrite dans le cerveau

Nous avons vérifié la présence de la séquence complète de la dysferline dans le cerveau humain. Quinze couples d'oligonucléotides ont été choisis tout au long de la séquence dysferline (séquences des amorces disponibles dans l'Annexe VI). Ils permettent chacun d'amplifier environ 600 pb de la dysferline, la totalité de la séquence codante de la dysferline étant couverte. Des PCR avec ces couples d'amorces ont été réalisées sur des ADNc synthétisés à partir d'ARN extraits de cerveaux et de muscles humains (Stratagene) (**Fiche technique n° 6**)(**Fiche technique n° 5**). Des amplicons sont détectés à la taille attendue pour tous les couples d'amorces sur les ARN issus du muscle. A partir des ARN issus du cerveau, une nette amplification est également générée avec tous les couples d'amorces, à l'exception de celui couvrant les exons 8 à 16. La faible amplification également observée avec ce couple sur l'ADNc issus du muscle laisse présager une faible efficacité de PCR avec ces amorces. Ces RT-PCR permettent de conclure que le transcrit complet de la dysferline est présent dans le cerveau humain.

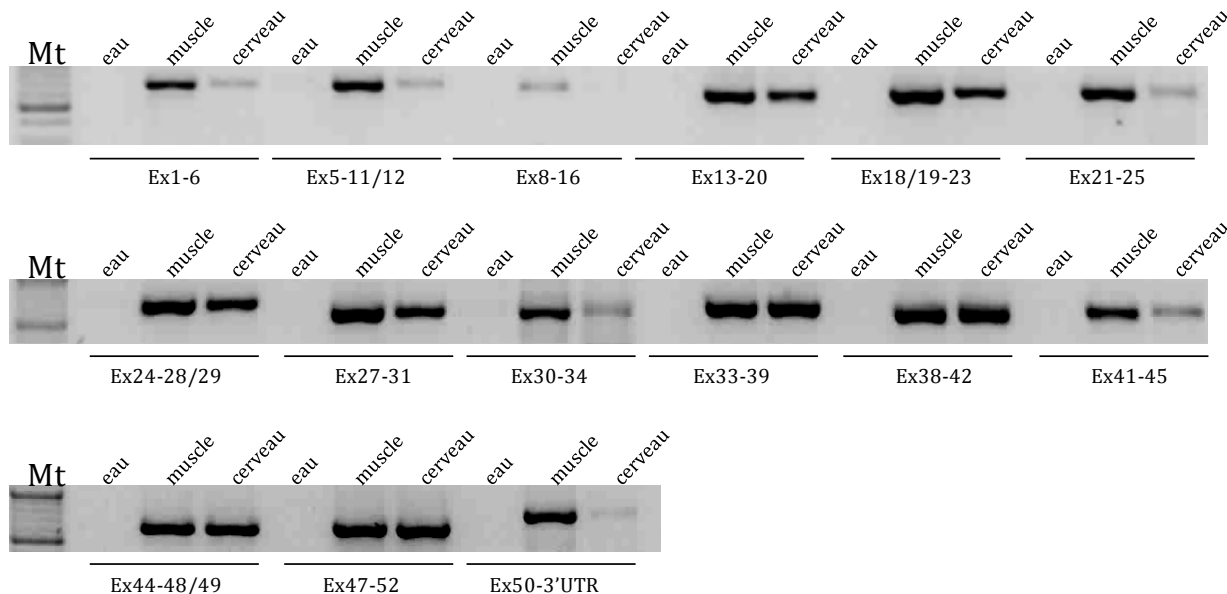


Figure 49: analyse de l'expression de la dysferline par RT-PCR dans le cerveau et le muscle humain

RT-PCR sur les ARN issus de cerveau et de muscle humain avec quinze couples d'amorces couvrant l'intégralité de la séquence codante dysferline. Un contrôle sans matrice (eau) a été réalisé pour chacun des couples.

IV. Conclusion

La BrainDysferlin a été utilisée comme miniprotéine à visée thérapeutique pour les dysferlinopathies. La stratégie mise en œuvre visait à utiliser une isoforme naturelle exprimée dans le cerveau, mais nous avons montré que la séquence décrite n'était pas correcte. Le potentiel thérapeutique de cette protéine tronquée a donc été évalué en tant que miniforme. Cette évaluation a été faite par transfert de gène par AAV8r-BrainDysferlin dans le modèle Bla/J. Après 1 mois d'expression, nous avons constaté que le phénotype dystrophique du muscle n'était pas amélioré et que l'index de centronucléation n'évoluait pas. En revanche, après un exercice excentrique forcé, la membrane des fibres moins abimée. Cette forme courte permet donc de restaurer une fonctionnalité au moins partielle de la dysferline. Nous avons également démontré un effet toxique de la surexpression de la BrainDysferlin. L'amélioration de certains paramètres fonctionnels sans amélioration de l'histologie du muscle ouvre des voies sur la compréhension des fonctions de la dysferline.

PARTIE II

Compensation de l'absence de dysferline par surexpression d'ANO5.

I. Contexte et rationnel de l'étude

Comme nous l'avons abordé en introduction, la compensation de l'absence d'une protéine par une protéine aux caractéristiques similaires a déjà été envisagée comme une voie de thérapie génique possible (l' ϵ -sarcoglycane pour l' α -sarcoglycane et l'utrophine pour la dystrophine par exemple). Pour la dysferline, une stratégie de compensation par la myoferline a été évaluée. La construction d'un modèle murin KO dysferline surexprimant la myoferline n'a pas abouti à l'élimination des symptômes induits par l'absence de dysferline. Ainsi la surexpression de myoferline n'a pas d'effet thérapeutique pour les dysferlinopathies.

Des mutations dans les gènes codant la dysferline et l'anoctamine 5 peuvent conduire à la fois à une myopathie musculaire des ceintures (LGMD) et une myopathie de Miyoshi (MM). Ces protéines ont également en commun d'être impliquées dans le processus de réparation du sarcolemme. Sur la base de ces similitudes, nous avons émis l'hypothèse qu'ANO5 pourrait compenser l'absence de dysferline. ANO5 étant vectorisable dans un vecteur AAVr du fait de la taille de sa partie codante (2742 pb), nous avons décidé d'évaluer si la surexpression d'anoctamine 5 *via* un AAVr pouvait compenser un déficit en dysferline dans le modèle murin déficient en dysferline BLA/J.

II. Stratégie

Comme pour l'approche évaluant le potentiel thérapeutique de la BrainDysferlin, nous avons choisi de tester directement l'effet d'une surexpression de l'anoctamine 5 dans la souris Bla/J. Cette analyse a nécessité la caractérisation de l'isoforme d'ANO5 majoritairement exprimée dans le muscle humain afin de la cloner. Le plasmide obtenu a permis de produire un vecteur AAV8r codant pour cette isoforme. Utiliser l'anoctamine humaine dans cette approche a deux

avantages : pouvoir discriminer l'anoctamine 5 exogène de l'anoctamine 5 exprimée par le modèle et posséder l'AAVr susceptible d'être transposable à l'Homme.

L'AAV8r codant l'Anoctamine 5 humaine a été injecté en IM et IV dans un modèle murin déficient en dysferline. L'efficacité thérapeutique a été évaluée par une analyse histologique des muscles injectés, par la détermination de l'index de centronucléation et par l'évaluation de la résistance au stress mécanique des fibres. Nous avons en outre évalué les capacités de réparation membranaire des cellules issues des muscles injectés.

L'ensemble des travaux présentés dans cette partie font l'objet d'une publication en préparation, disponible à la fin de ce rapport (soumission prévue à Human Gene Therapy).

III. Résultats

A. Mise au point d'outils de détection de l'anoctamine 5

1. Validation des PCRq de l'anoctamine 5 humaine et murine.

La quantification des transcrits ANO5 a été réalisée en utilisant des amorces et une sonde incluent dans un mix TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystem) (**Fiche technique n° 6**). Les couples oligonucléotides/sondes quantifiant le transcrit murin (Mm00624629_m1) ou le transcrit humain (ABI_Hs01381106_m1) ciblent la jonction des exons 16 et 17 de l'ADNc de ANO5. L'évaluation des PCRq sur des échantillons d'ARN reverse-transcrits humain et murin sont concluants : chacun des couples est spécifique au transcrit de l'espèce ciblé (**Fiche technique n° 5**). La PCRq ciblant le transcrit humain sera donc capable de détecter spécifiquement la surexpression de l'ADNc de ANO5 humain dans la souris.

2. Synthèse et validation d'un anticorps Anti-ANO5

Un anticorps anti-ANO5 a été généré par production en lapin (Eurogentech), et ciblant un double épitope, en N- et C-ter d'ANO5 (**Fiche technique n° 7**). Cet anticorps a été utilisé pour révéler l'anoctamine 5 murine sur des coupes de TA de souris C57Bl6 (**Figure 50**). Le marquage réalisé (**Fiche technique n° 13**) permet de constater qu'ANO5 est essentiellement sarcoplasmique, sans pouvoir la localiser plus précisément dans la cellule. Un marquage fort est visible dans des zones sub-sarcolemmales très localisées.

Les essais pour développer un protocole de WB efficace pour visualiser ANO5 sont encore en cours au moment de la rédaction de ce rapport.

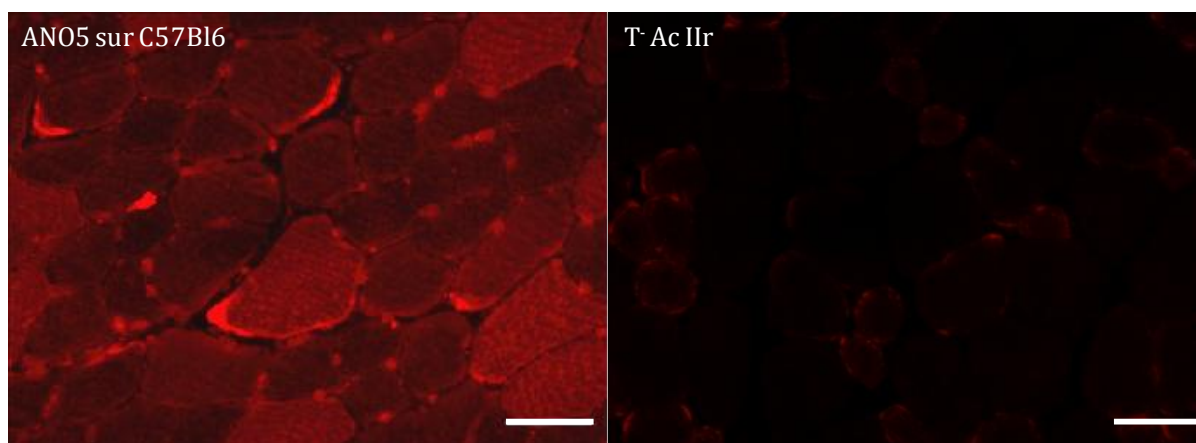


Figure 50 : marquage IHF d'ANO5 sur cryosection de TA de souris

L'immunomarquage de coupes de muscle de souris C57Bl6 avec un anticorps anti-ANO5 révèle une localisation essentiellement sarcoplasmique de l'anoctamine 5, avec une présence marquée dans des zones sub-sarcolemmales. Le marquage est comparé à une IHF réalisée sans anticorps primaire anti-ANO5 (T⁻ Ac Ilr). Barre : 20µm.

B. Analyse de l'expression d'ANO5 chez la souris C57Bl6 et Bla/J

1. ANO5 est majoritairement exprimée dans le muscle squelettique

Le niveau d'expression d'ANO5 dans différents tissus murins a été étudié par RT-PCRq (**Fiche technique n° 6**). Les différents ARN ont été extraits à partir d'échantillons prélevés sur des souris C57Bl6, reverse transcrits, et analysés avec le couple oligonucléotides/sonde spécifique d'ANO5m (**Fiche technique n° 5**). Parmi les 10 tissus testés (muscle squelettique, langue, ovaire, rein, cerveau, poumon, rate, cœur, intestin et foie), le niveau maximal d'expression est détecté dans le muscle (**Figure 51**). ANO5 est exprimée à un niveau moindre dans la langue et les ovaires (respectivement 2,5 et 2,6 fois moins que dans le muscle), et très peu dans les autres organes, en particulier le cœur (0,2% du niveau constaté dans le muscle).

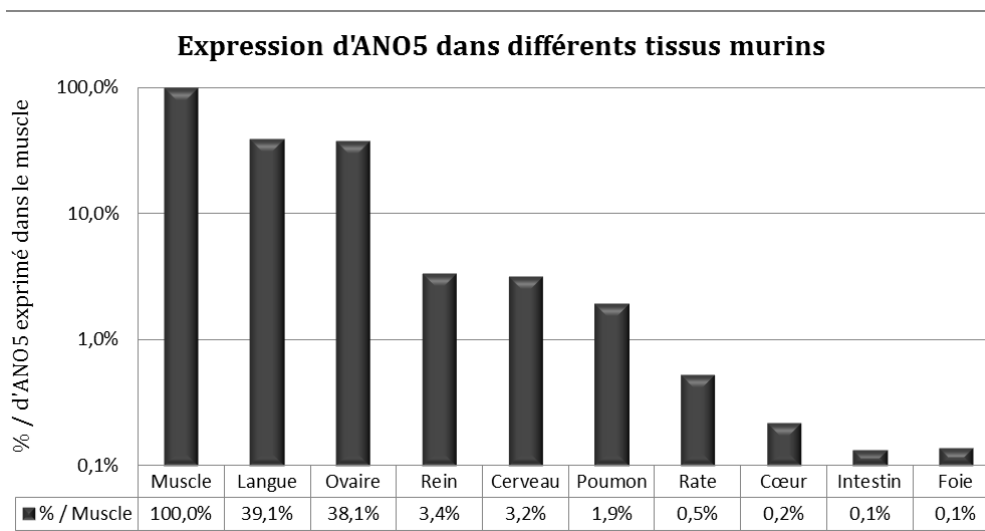


Figure 51 : analyse par RT-PCRq de l'expression d'ANO5 dans différents tissus de souris

L'analyse par RT-PCRq des transcrits ANO5 dans différents tissus murins révèle que ce gène est majoritairement exprimé dans le muscle squelettique, et dans une moindre mesure dans la langue et les ovaires. Les niveaux d'expression sont donnés en comparaison de la valeur déterminée dans le muscle. Les valeurs entre les différentes PCRq ont été normalisées par rapport à l'expression du gène PO.

2. ANO5 est sous exprimée dans le modèle BLA/J

Nous avons cherché à déterminer si le niveau d'expression d'ANO5 était affecté dans le modèle Bla/J, en comparaison du niveau détecté dans des souris C57Bl6. Cette analyse a été conduite dans le TA et le QUA, à des âges différents (1, 2 et 4 mois) et sur des souris mâles et femelles (n=3 par groupe) (**Fiche technique n° 8**). Les résultats des PCRq sur les échantillons à 4 mois sont présentés dans la **Figure 52**. Le niveau d'ANO5m détecté dans les souris Bla/J est significativement réduit par rapport au C57Bl6 dans le QUA des mâles (12%) et de femelles (27%), ainsi que dans le TA des femelles (19%) ($p < 0,05$). Une tendance identique est observée dans le TA des mâles, mais n'est pas significative ($p = 0,07$). L'expression d'ANO5 est donc dérégulée au niveau ARN par un mécanisme de déficience secondaire imputable à l'absence de dysferline. Ce résultat confirme l'intérêt de la stratégie de compensation de l'absence de la dysferline par la surexpression de l'anoctamine 5. En effet, une partie des symptômes observés dans les dysferlinopathies pourrait être imputable à cette déficience secondaire en anoctamine 5. Les maladies liées aux mutations d'ANO5 étant récessives, il faudrait une diminution de plus de 50% de son expression pour justifier de son caractère délétère en cas d'absence de dysferline.

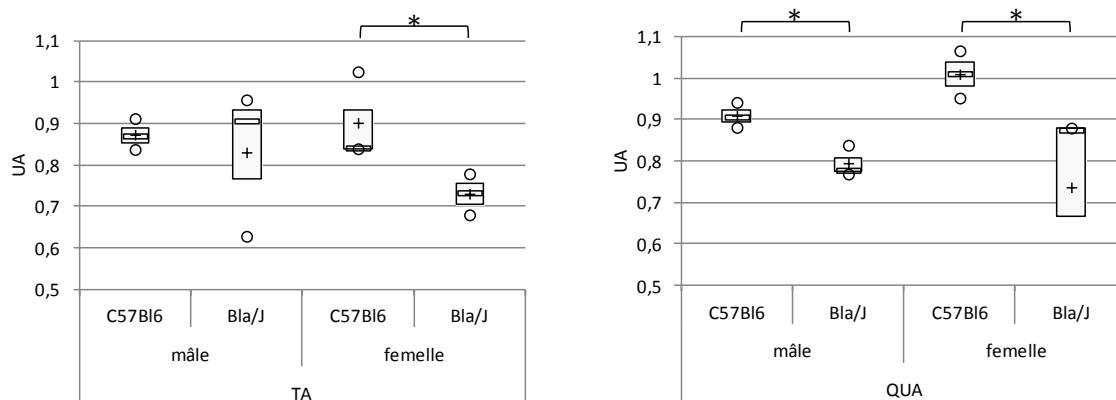


Figure 52 : analyse quantitative de l'expression d'ANO5 dans les souris BLA/J à 4 mois.

Niveau d'expression d'ANO5 déterminé par RT-PCRq sur les ARN extraits de TA et de QUA de souris Bla/J ou C57Bl6 mâle et femelle de 4 mois. Les valeurs entre les différentes PCRq ont été normalisées par rapport à l'expression du gène PO. Les groupes analysés sont composés de trois individus (+ : moyenne ; \square : médiane ; \circ : maximum). Les analyses statistiques ont été réalisées par un test de Mann-Whitney).

Une RT-PCR classique a également été réalisée avec des couples d'amorces couvrant l'intégralité de la séquence d'ANO5 (séquences des amorces disponibles dans l'Annexe VI) (**Fiche technique n° 5 ; Fiche technique n° 6**). Les amplicons obtenus ont été analysés sur gel d'agarose. Le profil d'épissage d'ANO5 est similaire entre les Bla/J et les C57Bl6 et ne diffère pas des données déjà publiées (Tsutsumi, Inoue et al. 2005).

C. Analyse de l'expression d'ANO5 chez l'Homme et construction du vecteur AAVr

1. L'isoforme majoritaire anoctamine 5 dans le muscle humain est la forme entière

Les transcrits d'ANO5 humains n'ont jamais été décrits dans une publication. Afin de déterminer l'isoforme la plus pertinente à cloner dans un vecteur AAV à but thérapeutique, nous avons analysé les isoformes exprimées dans le muscle humain. L'analyse a été faite par PCR sur des transcriptions inverses d'ARN issus du *Gastrocnemius Lateralis* (GL), du *Gastrocnemius Medialis* (GM), et du *Soleus* (Sol) de deux individus (échantillons fournis par le Dr Udd, Department of Neurology, Vasa Central Hospital, Vasa, Finland) (**Fiche technique n° 5 ; Fiche technique n° 6**). Quatre couples chevauchants d'oligonucléotides, couvrant l'intégralité des 22 exons de la séquence ANO5, ont été utilisés (couple 2 : exon 1 à 6 ; couple 3 : exon 4 à 14 ; couple 4 : exon 7 à 21 ; couple 5 : exon 19 à 22) (schéma disponible **Figure 53**). Les RT-PCR réalisées avec ces couples d'amorces génèrent toutes un amplicon unique à la taille maximale attendue, à l'exception du couple 3 qui en produit un second de 200 pb inférieur à la taille majoritaire observée (**Figure 53**, gauche). Ces fragments d'ADN ont été prélevés et séquencés. Les quatre

amplicons majoritaires contiennent l'intégralité des exons d'ANO5. L'amplicon faible issu du couple 3 (flèche sur **Figure 53**) correspond à une isoforme ne contenant pas les exons 8 et 9. Les exons 7 et 10 ne sont pas en phase, un exon stop est rapidement présent sur la séquence, en aval de ce point d'épissage. L'isoforme codée par ce variant d'épissage est une protéine de 30 kDa environ, dénuée de domaines transmembranaires.

Des RT-PCR ont également été réalisées sur des ARN commerciaux (Stratagene, 540029-41) correspondant à un mélange d'ARN de différents muscles humains. Les couples d'amorces utilisés amplifient les parties 5' et 3' non codantes d'ANO5 (couple 1 et 6, respectivement). Les amplicons obtenus correspondent aux fragments attendus, il n'y a donc pas de variant d'épissage au niveau des 5' et 3'UTR (**Figure 53**, droite).

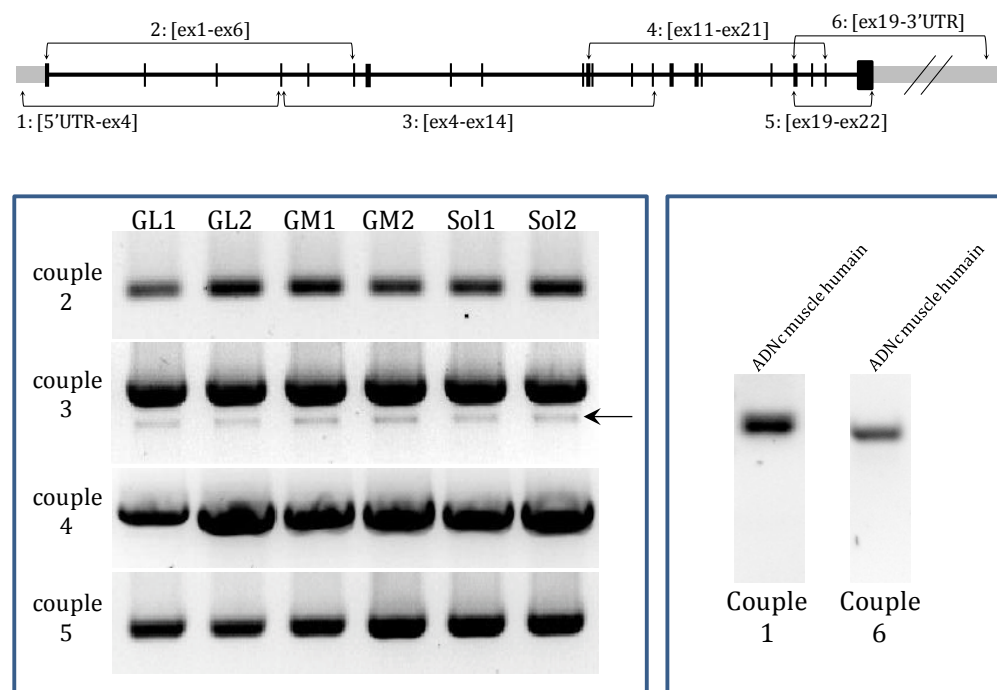


Figure 53 : analyse RT-PCR des transcrits ANO5 dans différents muscles humains

Les différents couples d'amorces utilisés sont représentés sur le schéma en haut de la figure. Des RT-PCR ont été faites sur le GL, le GM et le Sol de deux individus, avec les couples 2, 3, 4, et 5. ANO5 est exprimée dans ces trois muscles sous sa forme complète, plus un variant de transcription révélé par le couple 3 (flèche). Les RT-PCR avec les couples 1 et 6 sur un mélange d'ARN de muscles humains ne révèlent pas de variant de transcription au niveau des parties UTR de l'ARNm ANO5. La séquence des amorces utilisées est disponible en annexe VI.

2. Clonage de l'anoctamine 5 et production d'un AAV8r.

Le variant transcriptionnel majoritaire déterminé dans le muscle humain étant celui comportant tous les exons décrits d'ANO5, nous avons cloné la séquence codante de cet ARNm dans un plasmide pAAV (**Fiche technique n° 1**). Ce clonage a été réalisé par amplification PCR sur le clone

IMAGE 100061756 (Thermo Fisher Scientific) de la séquence d'intérêt (séquences des amorces disponibles dans l'Annexe VI). La carte du pAAV-hANO5 obtenu est présentée dans la **Figure 54**. Le produit de transcription de ce plasmide après transfection en cellules HER911 a été contrôlé par RT-PCR et séquençage (**Fiche technique n° 5** ; **Fiche technique n° 6**). L'ARNm codé correspond bien à la séquence codante complète ANO5h. Le pAAV-hANO5 a servi à la fabrication d'un lot de vecteur AAV8r-hANO5. Le lot a été produit par le service « vector core » de l'Institut de Recherche Thérapeutique à Nantes.

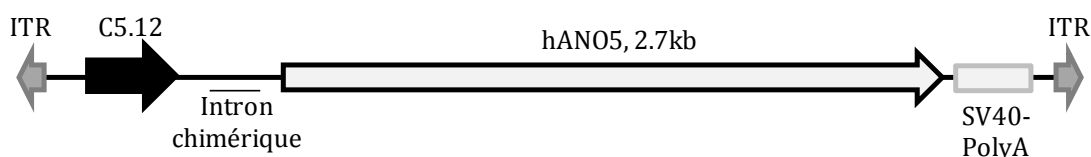


Figure 54 : carte de la cassette AAV du plasmide pAAV-hANO5

La partie codante d'ANO5h est placée sous le contrôle du promoteur C5.12 et est suivie d'un signal SV40-PolyA. La cassette d'expression, d'ITR à ITR, fait 4142 b.

D. Evaluation du potentiel thérapeutique de l'AAV8r-hANO5

1. L'AAV8r-hANO5 ne présente pas d'effet toxique aux doses et âges considérés

Avant de tester le potentiel thérapeutique de la surexpression d'anoctamine 5 sur le modèle Bla/J, nous avons vérifié la non-toxicité d'une telle surexpression sur le modèle C57Bl6. Des souris de 3 mois ont été injectées en IM dans le TA et en IV dans la veine caudale à la dose de $1,2 \cdot 10^{13}$ vg/kg et $4 \cdot 10^{14}$ vg/kg respectivement (**Fiche technique n° 8**). Des souris ont également été injectées avec du PBS afin de servir de témoin. Les souris ont été suivies tout au long de l'expérience et ont été sacrifiées 30 jours après l'injection. Les TA et les cœurs ont été prélevés et analysés.

L'anoctamine 5 est surexprimée dans le cœur et le muscle après injection d'AAV8r

Les TA traités en IM, ainsi que les TA et les cœurs des souris traités en IV ont été broyés. Les ARN ont été extraits et analysés par RT-PCRq avec le couple oligonucléotides/sonde quantifiant spécifiquement le transcrite ANO5 humain (**Fiche technique n° 5** ; **Fiche technique n° 6**). Les transcrits ANO5 présents dans un échantillon d'ARN de muscle humain (Stratagene, 540029-41) et de cœur humain (Stratagene, 540011) ont été quantifiés en même temps. Le niveau d'expression d'ANO5h dans les souris traitées a été rapporté à ces échantillons. Toutes les PCRq ont été normalisées par le gène ubiquitaire de la phosphoprotéine ribosomale. L'injection en IM

et IV provoquent dans le muscle une expression supérieure de respectivement 72 fois et 2,8 fois à celle constatée dans les échantillons de muscle humain non injecté (**Figure 55**). Dans le cœur, l'expression d'ANO5h est 89,9 fois plus importante que dans l'échantillon humain de référence. La surexpression dans le muscle a été confirmée par une augmentation du marquage IHF spécifique à ANO5 (**Fiche technique n° 13**).

Nous avons quantifié par RT-PCRq le niveau d'expression d'ANO5m dans les souris surexprimant l'ANO5h (**Fiche technique n° 5 ; Fiche technique n° 6**). Le niveau d'ANO5m n'est pas modifié, même pour les souris traitées en IM et exprimant un niveau élevé d'ANO5h. Il ne semble pas y avoir de mécanisme de rétrocontrôle du niveau de l'expression de l'anoctamine 5 endogène.

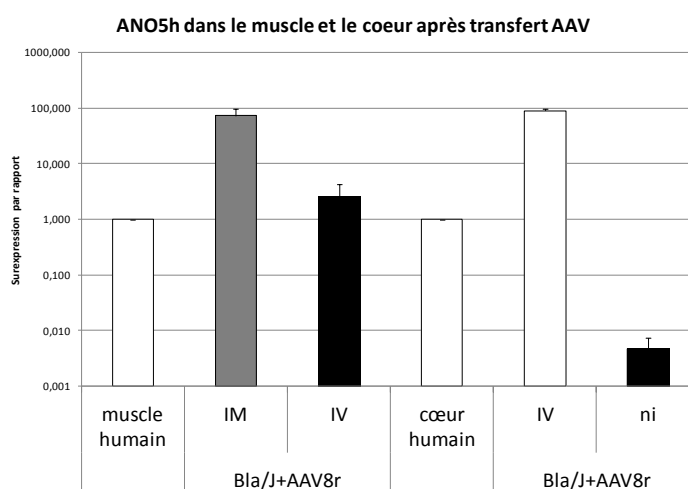


Figure 55 : quantification de l'expression d'ANO5h dans le muscle et le cœur après injection d'AAV.

Analyse par PCRq du niveau d'expression de l'anoctamine 5 humaine dans les muscles ou les cœurs des souris traitées en IM ou IV par l'AAV8r-hANO5. Les valeurs sont comparées à la quantité de transcrits ANO5 détectée dans des échantillons humains de référence (muscle ou cœur). Les injections d'AAVr provoquent toutes, à des niveaux variables, une surexpression d'ANO5h. Le niveau d'ANO5h détecté dans le cœur des souris Bla/J non injectées (ni) est proche de 0, et correspond au bruit de fond inhérent à la PCRq. Les valeurs entre les différentes PCRq ont été normalisées par rapport à l'expression du gène P0.

La surexpression de l'anoctamine 5 n'est pas toxique dans le muscle ni le cœur

Les analyses histologiques conduites sur les muscles prélevés 4 semaines après injection en IM ou IV de l'AAVr-hANO5 ne montrent aucune atteinte particulière du TA (**Figure 56a**) (**Fiche technique n° 13**). On ne détecte pas de présence d'infiltrat inflammatoire ou de nécrose de fibre, ni d'augmentation du nombre de fibres centronucléées aux âges des souris traitées. La surexpression d'ANO5 dans le muscle ne semble donc pas délétère.

L'analyse des colorations HPS des cœurs des souris injectées en IV révèle un profil histologique comparable à celui des souris non injectées, de même que la coloration au Rouge Sirius (**Figure**

56b) (Fiche technique n° 13). Ce colorant marque spécifiquement les fibres de collagène et de réticuline, et permet d'estimer l'apparition d'une fibrose. Aucun signe dystrophique ni de fibrose n'est retrouvé dans le cœur 4 semaines après l'injection du vecteur, malgré sa forte expression (89,9 fois la normale dans le cœur humain). L'injection d'AAV8r-hAN05 ne provoque donc pas de toxicité cardiaque au moins dans le temps évalué.

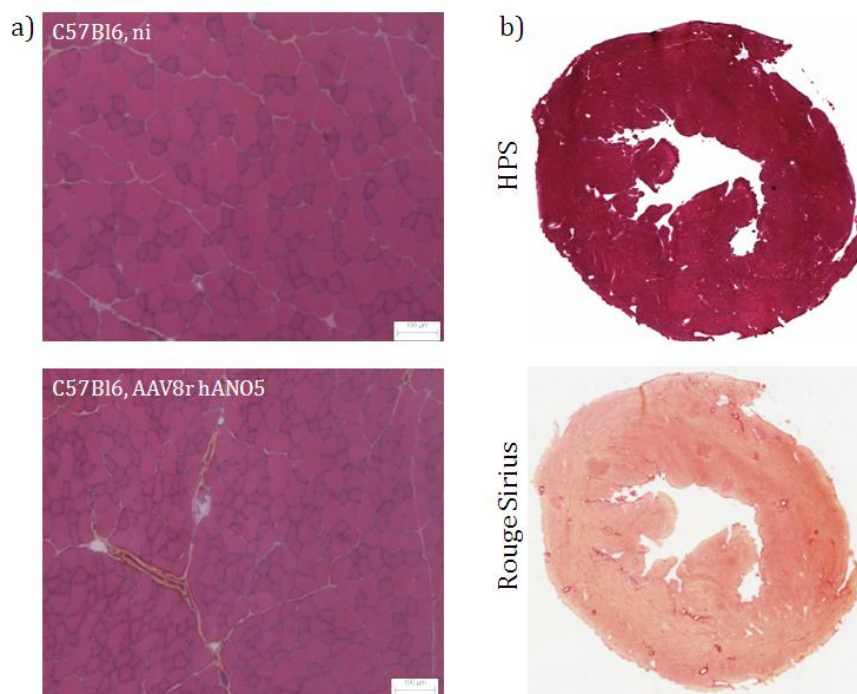


Figure 56 : histologie du muscle et du cœur de souris C57Bl6 traitées avec l'AAV8r-hAN05 en IV.

a) analyse histologique du TA de souris C57Bl6 injectées ou non (ni) avec le vecteur AAV8r-hAN05 en IM dans le TA à une dose de $1,2 \cdot 10^{13}$ vg/kg. Le nombre de fibres centronucléées n'augmente pas 4 semaines après traitement, et il n'y a pas d'infiltrats inflammatoires. Barre, 100 μ m. b) le cœur d'une souris traitée en IV à $4 \cdot 10^{14}$ vg/kg ne présente aucun signe pathologique observable par coloration HPS et Rouge Sirius.

2. L'AAV8r-hAN05 ne corrige pas le phénotype BLA/J

Après avoir déterminé la non-toxicité de la surexpression d'AN05h chez la souris, nous avons cherché à évaluer son potentiel thérapeutique pour les dysferlinopathies. L'impact du transfert d'AN05 a été évalué au niveau histologique sur le modèle Bla/J.

AN05 ne modifie pas le phénotype histologique ni l'index de centronucléation de BLA/J

Des souris mâles Bla/J de 4 semaines ont subi des injections en IM du vecteur AAV8r-hAN05 dans le TA ($1,33 \cdot 10^{11}$ vg/kg) et dans le Glu ($2,21 \cdot 10^{11}$ vg/kg) (Fiche technique n° 8). Les muscles ont été prélevés 30 jours après l'injection. L'analyse par RT-PCRq montre une surexpression d'AN05h de 43,1 et 28,8 fois dans TA et Glu, respectivement. Cette valeur est

calculée par rapport à la quantité détectée dans l'échantillon de muscle normal humain de référence (Stratagene). Ces valeurs sont inférieures au niveau détecté dans les souris WT n'ayant pas induit d'effet toxique (voir **Figure 55**). La surexpression dans le muscle a également été confirmée par une augmentation du marquage IHF spécifique à ANO5 (**Fiche technique n° 13**).

L'analyse histologique des coupes colorées à l'HPS, des TA des souris injectées par l'AAV8r-hANO5, ne révèle pas d'amélioration phénotypique (**Figure 57**) (**Fiche technique n° 13**). La centronucléation persiste, aucune différence significative n'est mise en évidence par rapport à des souris traitées avec du PBS (**Figure 57**, graphique de droite). Comme sur les souris C57Bl6, aucune aggravation morphologique supplémentaire n'est observée ce qui permet de confirmer l'absence d'effet toxique dû à la surexpression d'anoctamine 5 humaine dans les fibres musculaires murines, 1 mois après injection.

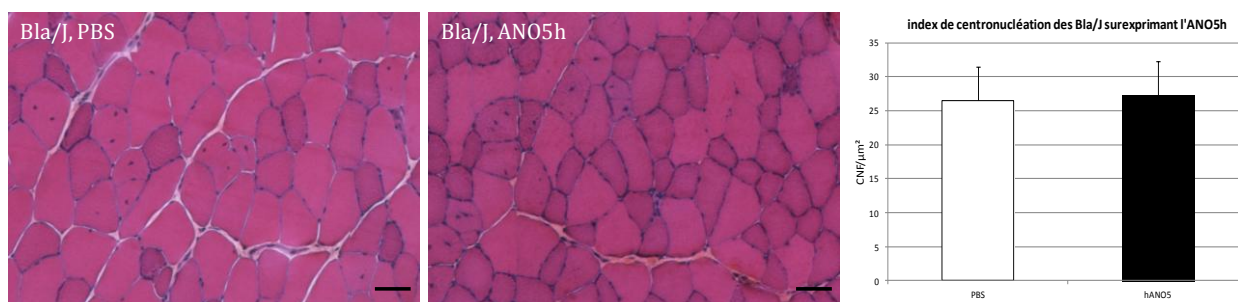


Figure 57 : HPS et indice de centronucléation des souris BLA/J surexprimant l'anoctamine 5.

La comparaison de coupes de muscles TA colorées par HPS des souris Bla/J injectées avec du PBS ou avec l'AAV8r-hANO5 ne révèle pas d'amélioration du phénotype dystrophique (barre=50 µm). L'index de centronucléation (en nombre de fibres centronucléées par µm² de muscle) confirme cette observation : il est équivalent dans les deux groupes de souris.

ANO5 n'améliore la résistance au stress mécanique du muscle BLA/J traité.

Nous avons ensuite analysé si la surexpression d'ANO5h dans le modèle Bla/J améliorait ses capacités à récupérer des microtraumatismes provoqués par un exercice excentrique forcé (LSI) (**Fiche technique n° 9**). Nous avons injecté dans le TA gauche de souris Bla/J de 4 semaines une dose à $1,33 \cdot 10^{11}$ vg/kg de l'AAV8r-hANO5. Un mois après cette injection, les souris ont été soumises à un protocole LSI, puis laissées au repos trois jours avant d'être euthanasiées. Un jour avant ce sacrifice, les souris ont été injectées en IP par une solution de Bleu Evans (BE, 1 ml à 0,5 mg/ml pour 10 g de souris). Comme pour les évaluations précédentes, nous avons validé la surexpression d'ANO5h par RT-PCRq (**Fiche technique n° 5 ; Fiche technique n° 6**). L'observation au microscope à fluorescence des coupes de TA surexprimant ANO5h, comparées aux TA de Bla/J traitées avec du PBS ne montre pas de différence visible (**Figure 58**) (**Fiche technique n° 13**). La comparaison de la surface relative de muscle positive au BE entre ces deux groupes de souris

(PBS et AAV8r-hANO5) ne révèle en effet aucune différence significative (Fiche technique n° 12). La surexpression d'ANO5h dans le modèle Bla/J ne permet donc pas de modifier la sensibilité aux microtraumatismes du sarcolemme des souris Bla/J.

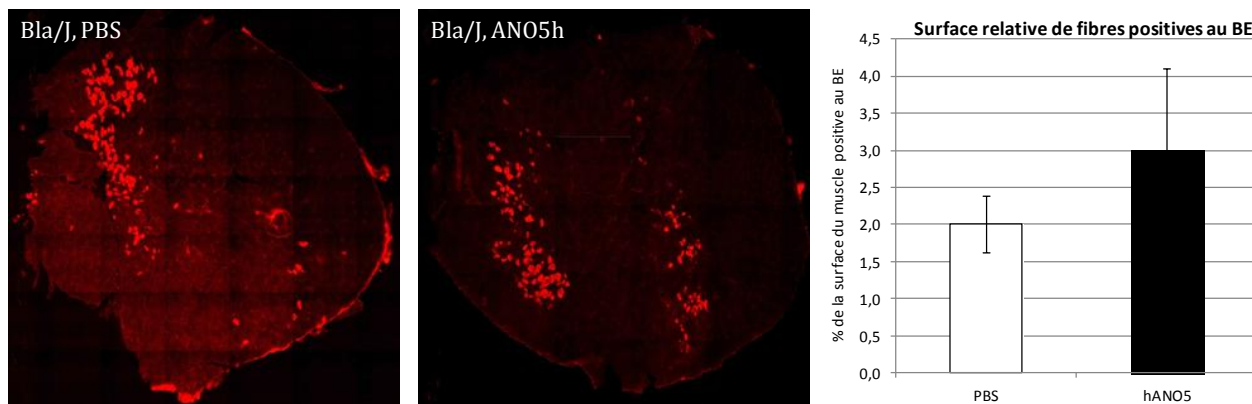


Figure 58 : surface relative des fibres positives au bleu evans après LSI

Analyse histo-fluorométrique des coupes de LA de souris trois jours après LSI et quantification de la fluorescence rapportée à la surface totale du muscle. La surface relative moyenne positive au BE est équivalente dans le groupe de souris Bla/J injectées avec du PBS ou de l'AAV8r-ANO5h (n=3, p=1 au test de Mann-Whitney)

ANO5 n'améliore pas les capacités de réparation membranaire des cellules de muscle BLA/J traitées

Nous avons évalué la capacité de réparation membranaire des fibres musculaires de souris Bla/J traitées par l'AAV8r-hANO5 par un test de réparation membranaire (Fiche technique n° 10). Ce test consiste à créer un trou dans la membrane plasmique à l'aide d'un laser, puis à observer la quantité de marqueur (FM1-43) pénétrant dans la fibre et devenant fluorescent au contact des lipides contenus dans la cellule. Le *Flexor Digitorum Brevis* (FDB) de souris Bla/J mâles de 3 semaines a été injecté par l'AAV8r-hANO5 à $1,5 \cdot 10^{13}$ vg/kg ou par du PBS (Fiche technique n° 8). Un mois plus tard, les FDB ont été prélevés et préparés pour une analyse avec le test de réparation membranaire. Des fibres musculaires isolées de FDB de souris C57Bl6 servent de référent d'une réparation membranaire efficace. Ces dernières ont la capacité de réparer une lésion membranaire en présence de calcium, ce qui se traduit par l'arrêt rapide de pénétration de FM1-43, et donc l'arrêt rapide d'apparition de fluorescence (Figure 59). La pénétration de fluorescence est significativement plus importante dans les fibres des FDB de souris Bla/J injectées avec du PBS que dans ces souris C57Bl6 ($p < 0,05$), ce qui indique leur incapacité à réparer la lésion induite par le laser. L'entrée de fluorescence semble encore plus importante dans les FDB des souris Bla/J traitées avec l'AAV8r-hANO5. La différence entre les cellules issues de souris Bla/J et celles de souris Bla/J traitées avec l'AAV8r-hANO5 n'est toutefois pas significative, en raison de la très grande variabilité des données collectées. Ce résultat indique

que l'expression de l'anoctamine 5 humaine dans le muscle d'une souris déficiente en dysferline n'est pas en mesure de favoriser le mécanisme actif de réparation membranaire.

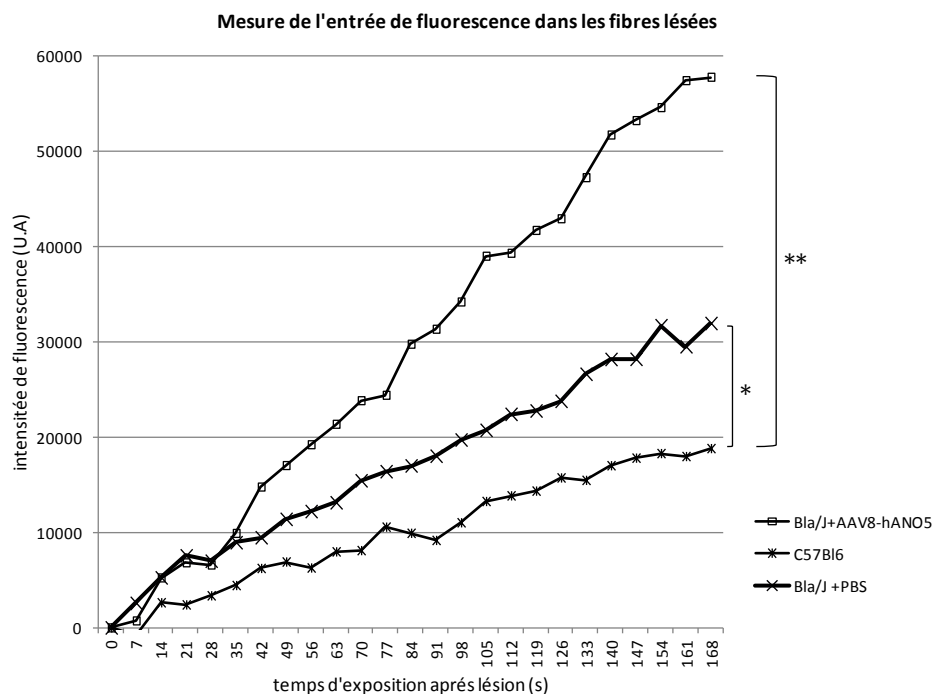


Figure 59 : analyse de la réparation membranaire par suivi de l'entrée de fluorescence dans la fibre lésée

Un test de réparation membranaire a été réalisé sur des fibres isolées de muscle FDB de souris C57Bl6, Bla/J injectées par du PBS et Bla/J injectées par l'AAV8r-hANO5. Le graphique présente l'entrée du marqueur fluorescent FM1-43 dans la fibre mesurée au cours du temps, après sa lésion par laser au temps t=0. Une quantification de la fluorescence est faite toutes les sept secondes pendant 168 secondes. Chaque point de la courbe correspond à la moyenne de fluorescence observée sur respectivement 27 fibres de C57Bl6, 19 fibres de Bla/J injectées avec du PBS et 26 fibres de Bla/J injectées avec l'AAV8r-hANO5. Tous les tests ont été réalisés en présence de calcium.

IV. Conclusion

En nous basant sur les similitudes de fonction et de pathologies observées pour la dysferline et l'anoctamine 5, nous avons voulu évaluer la capacité de l'anoctamine 5 à compenser l'absence de dysferline. Nous avons pour cela montré que l'isoforme complète d'ANO5 est celle majoritairement exprimée dans le muscle humain, et l'avons utilisé comme transgène. La surexpression de l'anoctamine 5 humaine dans la souris ne semble pas toxique ni dans le muscle ni dans le cœur, aux âges de souris et quantités de vecteurs utilisées. L'évaluation du potentiel thérapeutique de cette protéine a été établie dans le modèle Bla/J. La surexpression d'ANO5h n'améliore pas l'histologie, la résistance au stress mécanique ou la capacité de réparation

membranaire des souris Bla/J. La compensation de l'absence de dysferline par l'anoctamine 5 n'est donc pas une voie thérapeutique intéressante.

PARTIE III

Modification de l'ARN messenger dysferline par *trans*-épissage.

I. Contexte et rationnel de l'étude.

Les vecteurs AAVr sont très majoritairement utilisés pour la thérapie génique dans le muscle du fait de leur efficacité à transduire les cellules musculaires. Pour la dysferline, apporter l'ADNc entier (6,2 kpb) dans le muscle reste cependant un problème puisque la capacité d'encapsidation des vecteurs AAVr est trop limitée pour cela (4,7 kpb). Cette limitation technique a déjà été contournée en incluant l'ADNc fractionné de la dysferline dans deux populations de vecteurs. Cette approche a permis de recouvrer un phénotype normal dans un modèle murin déficient en dysferline grâce à l'expression d'une dysferline exogène complète (Lostal, Bartoli et al. 2010; Grose, Clark et al. 2012). Cette stratégie nécessiterait cependant l'injection de deux vecteurs viraux et par conséquent d'une grande quantité de particules virales chez le patient, particulièrement si la voie systémique était choisie (faible efficacité observée chez la souris). Cette limitation rend difficile, pour le moment, son application clinique. De plus, elle ne résout pas le problème du contrôle de l'expression du transgène, particulièrement problématique dans le cas de la dysferline, qui est connue pour être toxique quand elle est exprimée à des niveaux supérieurs au niveau endogène (Glover, Newton et al. 2010; Lostal, Bartoli et al. 2012).

Pour répondre à ces deux problématiques majeures : (i) capacité limitée d'encapsidation des vecteurs AAVr et (ii) expression maîtrisée du transgène, nous avons choisi d'explorer la chirurgie de l'ARN de la dysferline. Le saut d'exon présente un bon potentiel de réparation de l'ARN mais est d'une part, très ciblé donc ne s'adresse qu'à une faible quantité de patients, et d'autre part, entraîne indubitablement la synthèse d'une protéine incomplète. Le *trans*-épissage, lui, permet la modification d'un ARNpm endogène, sans en affecter sa transcription ou sa traduction, et peut être provoqué par l'apport d'une molécule exogène. La taille de cette molécule est modulable et un compromis peut être trouvé entre la volonté de cibler un maximum de mutations et la capacité d'encapsidation des vecteurs AAVr. Comme présenté en introduction, le *trans*-épissage

provoqué par une molécule exogène peut être effectué de trois façons : par le splicéosome (SMaRT), par un ribozyme ou par une endonucléase. Nous avons choisi d'utiliser le SMaRT qui présente l'avantage de n'utiliser que les enzymes endogènes (contrairement au *trans*-épissage par endonucléase) et ne nécessite qu'une courte séquence régulatrice (contrairement au ribozyme).

II. Stratégie

La mise en œuvre de *trans*-épissage par SMaRT est basé sur la construction d'une molécule d'ADN codant pour l'ARN provoquant le *trans*-épissage, les RTM (pour RNA-*trans*-splicing molecule). Nous avons dans un premier temps construit un RTM spécifique à la dysferline humaine (**RTM-hDysf**). Il a été testé et évalué sur un minigène dysferline portant une étiquette V5 (voir **Figure 60**) avant d'être utilisé sur des lignées humaines non musculaires exprimant la dysferline. Il a enfin été testé en myoblastes humains pour établir la preuve de principe de la faisabilité chez l'Homme. Nous avons décidé de construire un RTM provoquant un *trans*-épissage en 3' de l'ARNpm de la dysferline pour échanger les 6 derniers exons de DYSF, soit les exons 49 à 55 (**Figure 60**). Ce choix permet de cibler 17,5% des patients répertoriés à ce jour (selon la base de mutation UMD-DYSF). Afin de pouvoir le détecter, et détecter les molécules résultantes du *trans*-épissage, il porte une étiquette 3XFlag en 3' de la séquence codante. La stratégie thérapeutique développée permet d'apporter une séquence exogène courte, compatible avec les capacités d'encapsidation d'un vecteur AAVr (2245 b, d'ITR à ITR). Le choix de cette stratégie a également été orienté par la taille de l'intron 48 ciblé : il est court et permet la synthèse d'un minigène mimant fidèlement l'ARNpm de la dysferline. Dans un souci de conservation d'un contexte endogène d'épissage, cet intron cible a été flanqué des introns adjacents (voir **Figure 60**).

Un second RTM a été construit, ciblant la dysferline murine (**RTM-mDysf**) (**Figure 60**). Comme le RTM-hDysf, il cible l'intron 48 et porte une séquence codante correspondant aux exons 49 à 55 du gène DYSF murin, suivie de l'étiquette 3XFlag. Après avoir été mis au point *in cellulo* dans une lignée de cellule murine exprimant la dysferline, il a pour objectif d'être testé sur un modèle murin adéquat, c'est-à-dire muté dans les derniers exons de DYSF. Le traitement du modèle murin par *trans*-épissage a pour but de faire la démonstration de l'efficacité thérapeutique de cette stratégie.

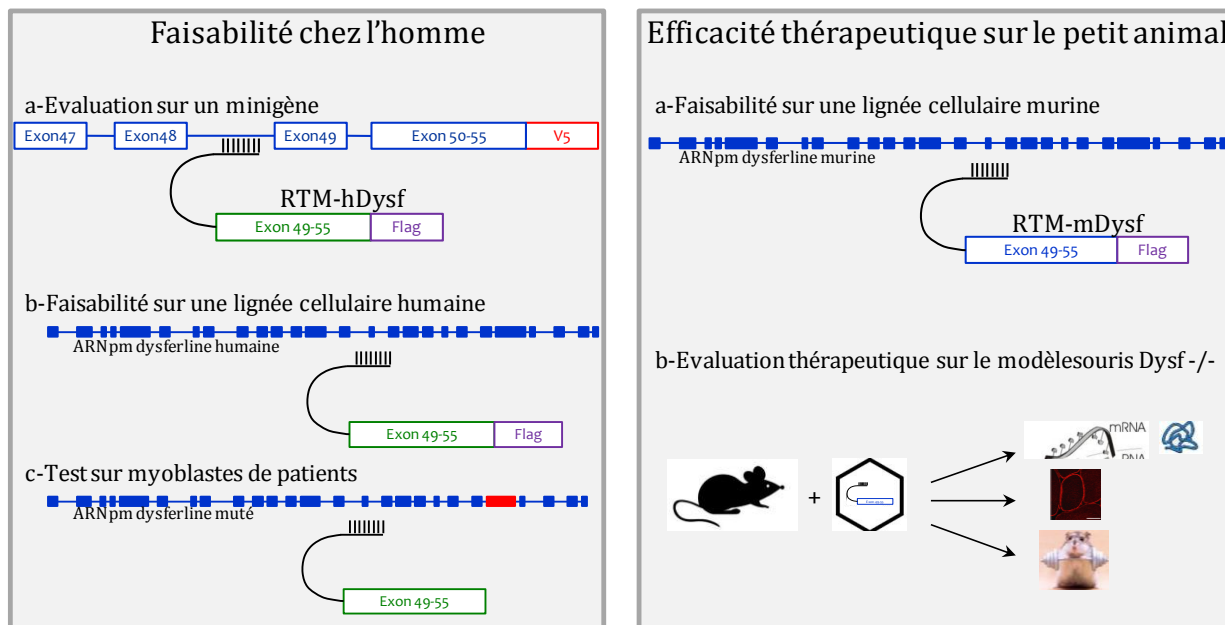


Figure 60 : stratégies pour le *trans*-épissage de la dysferline

Deux molécules RTM sont développées. La première (RTM-hDysf) a pour objectif de permettre la démonstration de la faisabilité d’une approche de thérapie par *trans*-épissage de la dysferline chez l’Homme. Elle devrait permettre la correction de mutations sur une population de myoblastes de patients. L’autre molécule (RTM-mDysf) est développée dans le but d’apporter la preuve thérapeutique de l’efficacité d’une telle approche, en soignant un modèle murin déficient en dysferline.

III. Résultats

A. Détermination d’outils pertinents pour l’étude

1. Modèles cellulaires humains et murins

Les RTM, aussi bien le RTM-hDysf que le RTM-mDysf, doivent être testés *in cellulo*. Nous avons donc recensé les différentes lignées cellulaires disponibles pour effectuer ce travail. Nous avons besoin de cellules facilement transfectables et avec les spécificités suivantes selon les objectifs à atteindre :

- une lignée cellulaire humaine n’exprimant pas la dysferline pour tester le RTM-hDysf sur le minigène ;
- une lignée cellulaire humaine exprimant la dysferline pour tester le RTM-hDysf sur l’ARNpm endogène ;
- des myoblastes de patients portant une mutation dans les 6 derniers exons de la dysferline, produisant un ARNpm dysferline stable mais pas de protéine ;

- une lignée cellulaire murine exprimant la dysferline pour tester le RTM-mDysf sur l'ARNpm endogène.

Nous avons recherché l'expression de la dysferline au niveau ARN (par RT-PCR) et protéique (par WB) dans différents types cellulaires (**Fiche technique n° 4** ; **Fiche technique n° 5** ; **Fiche technique n° 6** ; **Fiche technique n° 7**). Les cellules étudiées étaient soit présentes au laboratoire (HER911, HT1080, Nih3T3, myoblastes WT), soit identifiées dans la littérature et achetées auprès de fournisseur (HUVEC (Sharma, Yu et al. 2010)), soit fournies par des collaborateurs (myoblastes déficients en dysferline). Des lysats de chaque type cellulaire ont été séparés sur gel d'acrylamide et analysés par WB avec l'anticorps anti-dysferline Hamlet-1 (Novocastra). La dysferline est détectable à 240 kDa environ dans tous les types cellulaires testés, à l'exception des cellules HER911 et des myoblastes déficients en dysferline (**Figure 61a**). Les ARN ont été extraits des mêmes lysats cellulaires et ont été utilisés comme matrice de RT-PCR avec un couple d'amorces amplifiant la zone ciblée par nos RTM (amplification des exons 47 à 52). Le produit de PCR a été déposé sur gel d'agarose puis visualisé sur table à UV. L'amplicon attendu est systématiquement amplifié dans tous les échantillons testés, même pour les cellules HER911 et les myoblastes déficients en dysferline (**Figure 61b**).

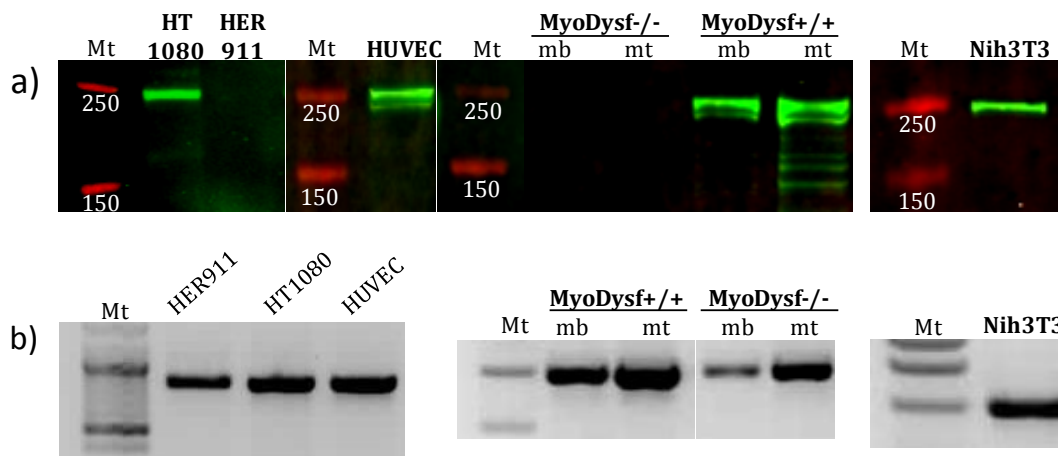


Figure 61 : étude de l'expression de la dysferline dans les modèles cellulaires utilisés pour l'étude

a) analyse par WB de lysat de cellules (HT1080 ; HER911 ; myoblastes de patients sains (MyoDysf +/+) et déficients en dysferline (MyoDysf -/-) au stade myoblaste (mb) ou après 14 jours de différenciation (mt) ; Nih3T3). Le WB a été marqué avec l'anticorps anti-dysferline (Hamlet, Novocastra) qui révèle spécifiquement la présence de la dysferline à 240 kDa environ. Les HER911 et les MyoDysf^{-/-} (mb et mt) sont les seules à ne pas exprimer la dysferline.

b) Les ARN des mêmes échantillons ont été analysés par RT-PCR avec un couple d'amorces amplifiant les exons 48 à 52 de la dysferline humaine ou murine (séquence en annexe VI). L'amplicon de 600 pb environ est présent sur tous les types cellulaires, la dysferline est donc transcrite dans chacun des types cellulaires étudiés.

Nous avons choisi les cellules humaines HER911 pour tester notre modèle de *trans*-épissage sur minigène. Ces cellules ont l'avantage de ne pas exprimer la dysferline au niveau protéique (**Figure 61**), et d'être facilement transfectables (**Fiche technique n° 4**). Malheureusement, la dysferline endogène est détectée au niveau ARN, ce qui pourrait influencer nos tests sur minigène. Aucune des cellules testées n'exprimaient pas la dysferline au niveau ARN, et c'est par défaut que ce choix a été fait. Les cellules humaines sélectionnées pour tester le RTM-hDysf sur la dysferline endogène sont les HT1080 et les HUVEC. Toutes deux expriment une dysferline détectable au niveau ARN et protéique (**Figure 61**) et peuvent donc être utilisées pour la preuve de principe du *trans*-épissage sur la dysferline endogène humaine, dans un contexte non musculaire. Les myoblastes de patients portant une mutation dans les derniers exons de la dysferline (R1905X) (nommés MyoDysf-/-) ont été fournis par le Dr Gallardo (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espana). Les lignées cellulaires stables établies à partir de myoblastes primaires humains déficients en dysferline étaient inutilisables dans notre cas (Philippi, Bigot et al. 2012). Ils expriment un ARNm dysferline détectable par RT-PCR, mais pas de protéine (**Figure 61**). Une lignée de myoblastes humains sains de la banque ADN de Généthon a été utilisée en témoin (MyoDysf+/+). Ces deux derniers types de cellules permettent de tester le *trans*-épissage sur l'ARNpm dysferline endogène et dans un contexte musculaire, et ainsi d'envisager une démonstration de faisabilité chez l'Homme. Enfin, les cellules Nih3T3 ont été choisies pour tester les RTM murins, car elles transcrivent et traduisent la dysferline.

2. Optimisation des capacités d'introduction d'ADN exogène dans chaque modèle cellulaire

Différents types de transfection ont été évalués sur les lignées cellulaires choisies (lipofectamine (Life technologies), Fugene 6 (Roche), Fugene HD (Promega), phosphate de calcium) (**Fiche technique n° 4**). Le Fugene HD a montré les meilleures capacités de transfection des différentes lignées, y compris des HT1080 décrites pour être difficilement transfectables. Dans nos mains, l'efficacité de transfection est de 80 à 90% (**Figure 62**). Le Fugene HD a donc été utilisé pour toutes les expériences *in cellulo*.

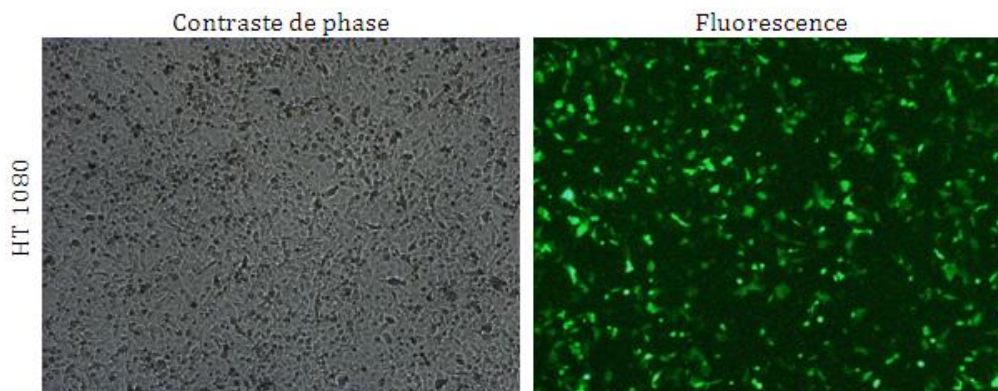


Figure 62 : efficacité de transfection des cellules HT1080 par le Fugene HD.

Images en contraste de phase et en microscopie à fluorescence de cellules HT1080, 48 heures après la transfection d'un plasmide GFP avec le Fugene HD (grossissement 4x). L'efficacité de transfection, établie par cytométrie de flux, est située en moyenne entre 80 et 90%.

Pour les primocultures de myoblastes humains sains, la transfection par un lipofectant est très peu efficace. Nous avons donc comparé l'efficacité de transduction d'un vecteur lentiviral codant la GFP et l'efficacité de nucléofection d'un plasmide GFP (promoteur identique pour les deux rapporteurs) (**Fiche technique n° 3 ; Fiche technique n° 4**). Les cellules traitées ont été observées au microscope à fluorescence 48 heures après traitement. La GFP est plus exprimée dans les cellules suite à la nucléofection qu'à la transduction lentivirale (**Figure 63**). Nous avons également vérifié que la nucléofection était possible sur les MyoDysf^{-/-}. La nucléofection de plasmide GFP dans ces cellules donne les mêmes résultats que dans les MyoDysf^{+/+}. Elle a donc été utilisée pour réaliser nos tests.

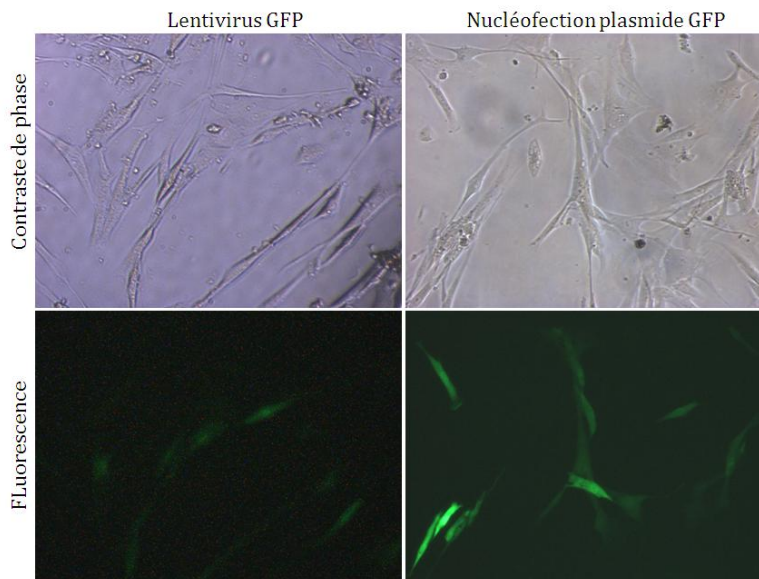


Figure 63 : comparaison des méthodes de nucléofection et transduction lentivirale sur les myoblastes

Images en contraste de phase et en microscopie à fluorescence de myoblastes humains transduits par un vecteur lentiviral GFP (à gauche) ou nucléofectés par un plasmide GFP (à droite) (grossissement 10x). La GFP est exprimée par plus de cellules traitées par nucléofection.

3. Modèles murins

Choix du modèle

Le modèle murin Bla/J disponible dans le laboratoire ne convenait pas à notre approche de *trans*-épissage en 3' de la dysferline. Sa déficience en dysferline est en effet due à une mutation dans l'intron 4. En revanche, le modèle Dysf^{-/-} (B6.129-Dysf^{tm1Kcam}/J) issu du laboratoire du Dr Campbell, porte une délétion des exons 53 à 55 du gène DYSF (Bansal, Miyake et al. 2003) (**Fiche technique n° 8** et annexe IV). Ce modèle est pertinent pour une approche de *trans*-épissage visant à restaurer les 6 derniers exons de DYSF. La souche correspondante sur un fond 129S (129-Dysf^{tm1Kcam}/J) a donc été commandée auprès de « The Jackson Laboratory » (www.jax.org).

Validation du modèle pour le trans-épissage en 3' de la dysferline

A réception du modèle, nous avons cherché à vérifier qu'il constituait un bon modèle pour le *trans*-épissage en s'assurant que la stabilité de l'ARNpm de la dysferline n'était pas affectée par la mutation (car nécessaire comme cible au RTM) (voir annexe IV pour la description du modèle). La mutation pourrait en effet induire une élimination rapide de l'ARNm muté par le processus de dégradation des ARNm non-sens (Nonsense mediated decay, NMD), ou simplement par l'absence de signal de polyadénylation provoqué par la méthode de construction du modèle (Bansal, Miyake et al. 2003). Un couple d'amorces permettant l'amplification par PCR des exons 48-49 de

la dysferline a été généré (séquence en annexe VI). Ces exons encadrent l'intron ciblé par le RTM-mDysf, et leur détection au niveau ARNm permettrait de conclure que l'ARNpm dysferline contient bien l'intron ciblé par notre approche de *trans*-épissage. Les RT-PCR réalisées avec ce couple d'amorces sur les ARN de dix souris dysf/- n'exprimant pas de dysferline (contrôle fait par WB avec l'anticorp Hamlet-1) donnent toutes l'amplicon attendu, comparable à celui observé sur l'ARN issu de souris C57Bl6 (données non présentées) (**Fiche technique n° 5 ; Fiche technique n° 6**). L'ARNm dysferline est donc stable même avec la mutation. Le modèle Dysf/- peut donc potentiellement être utilisé pour évaluer le bénéfice thérapeutique de l'apport des exons 49 à 55 par *trans*-épissage.

B. Design et construction des RTM et du minigène

1. Construction des RTM

Quatre éléments ont été pris en compte pour le choix des séquences constituant les RTM :

- (i) les RTM ont été placés sous le contrôle du promoteur C5.12, un promoteur synthétique fort, en particulier dans le muscle, et connu dans notre laboratoire pour s'exprimer dans de nombreux autres types cellulaires ;
- (ii) les zones d'appariement à la cible (ou Binding Domain, BD) ont été choisies pour reconnaître l'intron 48. Cet intron est court aussi bien chez l'Homme (269 pb) que chez la souris (257 pb) ; il est donc facilement analysable, modifiable, et peut être intégré au minigène prévu pour le test du RTM humain ;
- (iii) l'intron synthétique (IntS) comporte une séquence non régulatrice suivie d'un BP, d'un PPT et d'un SA fort (**Figure 64**). La séquence choisie est dérivée de celle publiée par l'équipe de Mitchell (Puttaraju, Jamison et al. 1999). L'évaluation des sites d'épissage a été faite par les logiciels HSF et Splice predictor.
- (iv) la séquence codante couvre les exons 49 au codon stop contenu dans l'exon 55. Elle est fusionnée à l'étiquette triple Flag (3XFlag) pour permettre sa détection en RT-PCR comme en WB.

Les RTM ont été synthétisés et clonés dans des pAAV (Genecust, Luxembourg) pour permettre leur production en AAVr (**Fiche technique n° 1**). Leur carte globale est présentée dans la **Figure 66** ci-dessous. Ils sont nommés pAAV-RTM-hDysf et pAAV-RTM-mDysf pour les RTM codant respectivement les exons 49 à 55 humains et murins.

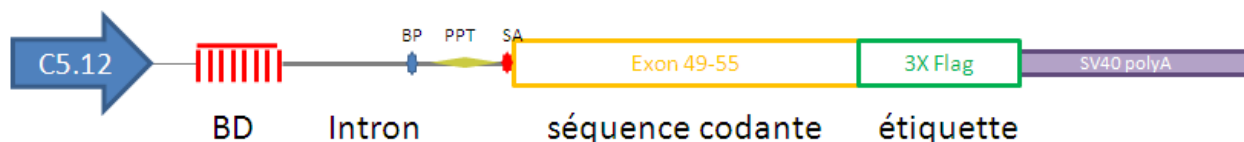


Figure 64 : carte schématique des RTMs construits

Les différents éléments constituant les RTM sont représentés sur ce schéma. L'utilisation du promoteur C5.12 assure une expression forte du RTM. Le SV40polyA permet sa polyadénylation après transcription, et assure ainsi sa stabilité (BD : Domaine de liaison ; Intron : intron synthétique ; BP : branching point ; PPT : polypyrimidine track ; SA : site accepteur).

Le choix du domaine de liaison (BD) a été fait en accord avec les données bibliographiques du moment décrivant les RTM les plus efficaces. Nous avons retenu les critères de taille des BD (supérieure à 50 nt), de non recouvrement des SD et SA, de ciblage de l'intron adjacent au site de *trans*-épissage, et de linéarité du BD (pas de structure tige boucle) (Puttaraju, Jamison et al. 1999; Dallinger, Puttaraju et al. 2000; Mansfield, Kole et al. 2000; Liu, Jiang et al. 2002; Chao, Mansfield et al. 2003; Dallinger, Puttaraju et al. 2003; Rodriguez-Martin, Garcia-Blanco et al. 2005; Zayed, Xia et al. 2007; Hengge 2008; Rodriguez-Martin, Anthony et al. 2009). Comme il est apparu que le choix du BD était crucial pour l'efficacité du *trans*-épissage, nous avons cloné 5 différents BD pour le RTM-hDysf (**RTM1-hDysf** à **RTM5-hDysf**) et 4 pour le RTM-mDysf (**RTM1-mDysf** à **RTM4-mDysf**) (Fiche technique n° 1). Les zones d'appariement des différents BD avec leur cible sont représentées sur la Figure 65.

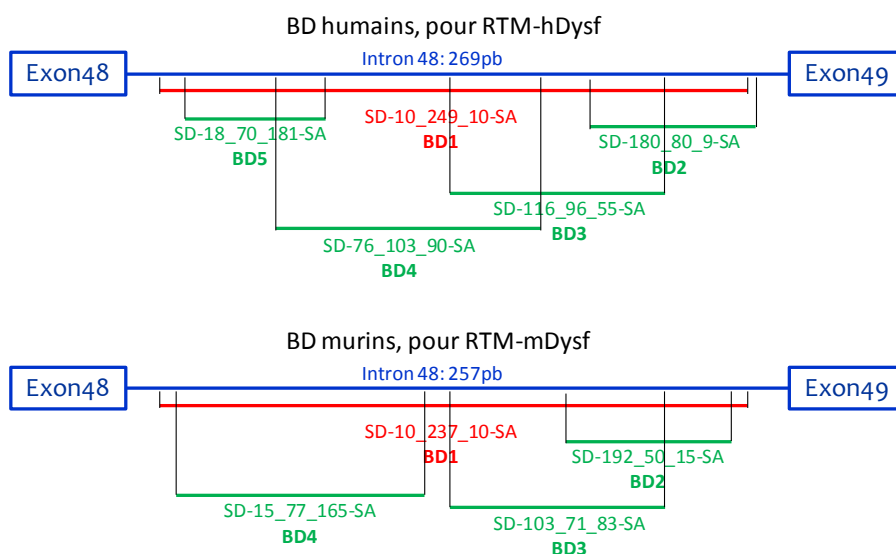


Figure 65 : les différents BD des RTM-hDysf et RTM-mDysf

Zones d'appariement des différents BD humains (5) et murins (4). Les trois valeurs données pour chaque BD (SD-X_Y_Z-SA) correspondent à (X) sa distance du SD, (Y) sa taille et (Z) sa distance du SA.

2. Minigène

Le minigène construit sert de cible au RTM-hDysf. Pour garder un contexte au plus proche de ce qui peut être retrouvé sur l'ARNpm de la dysferline produit par une cellule humaine, nous avons décidé de construire un minigène comportant plusieurs introns. Cloner l'intégralité de la séquence ADNg des 7 derniers exons de DYSF était impossible en raison de la taille d'une telle construction (>20 kpb). Nous avons donc choisi de fabriquer un minigène hybride, composé en partie de la séquence d'ADNg DYSF (exons 47 à 50), puis de l'ADNc dysferline (exons 51 à 55) (voir schéma **Figure 66**). Cette construction est en phase avec une étiquette V5 qui doit permettre de détecter l'ARN et la protéine produite par ce transgène. Le minigène a été synthétisé et cloné dans un plasmide d'expression (p-minigène) sous le contrôle du même promoteur que les RTM : le promoteur synthétique C5.12 (**Fiche technique n° 1**).

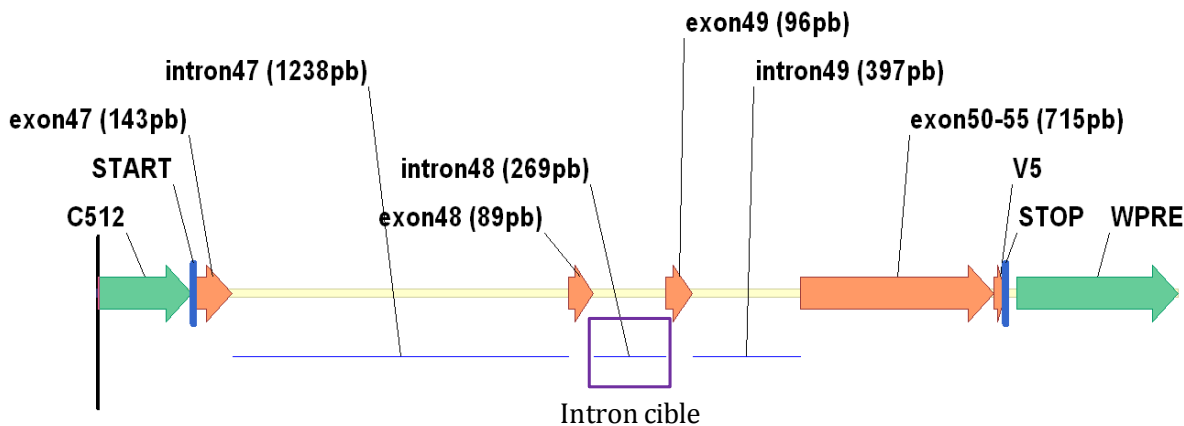


Figure 66 : carte du minigène

L'expression du minigène est assurée par le promoteur C5.12. Les exons 47, 48, 49 et 50 sont séparés par les introns présents au niveau du gène DYSF. Les exons 50 à 55 s'enchaînent sans intron, et sont suivis de la séquence de l'étiquette V5. Le motif WPRE (Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element) sert à optimiser son expression en stabilisant l'ARNm produit. La taille des différents exons et introns est indiquée en paire de bases.

3. Outils de détection

Les étiquettes V5 et 3XFlag permettent la détection des ARN et des protéines spécifiques au minigène, au RTM-hDysf et à la molécule chimérique [minigène/RTM-hDysf] résultant du *trans*-épissage (**Figure 67**). En RT-PCR, trois couples d'amorces sont utilisés : (i) un couple spécifique du minigène, (ii) un couple spécifique du RTM, et (iii) un couple amplifiant la molécule chimérique résultant du *trans*-épissage (séquences des amorces en annexe VI) (**Fiche technique n° 6**). Les protéines produites sont détectées par l'anticorps anti-V5 pour le minigène, et anti-Flag pour la protéine résultant du *trans*-épissage (**Fiche technique n° 7**).

Pour le RTM-mDysf, trois couples d'amorces sont également utilisés. La séquence des amorces est simplement adaptée à la séquence de la dysferline murine (Fex48m, Fex49m), et la recherche de la cible (la dysferline endogène) est assurée par le couple d'amorces ciblant la dysferline endogène (Fex48m_Bex52m) sans intervention de l'étiquette V5 (l'étiquette V5 est présente uniquement sur le minigène). Les couples utilisés sont donc (i) Fex48m_Bex52m pour la détection de la cible, (ii) Fex49m_BFlag pour la détection du RTM et (iii) Fex48m_BFlag pour la détection de la molécule chimérique (**Fiche technique n° 6**).

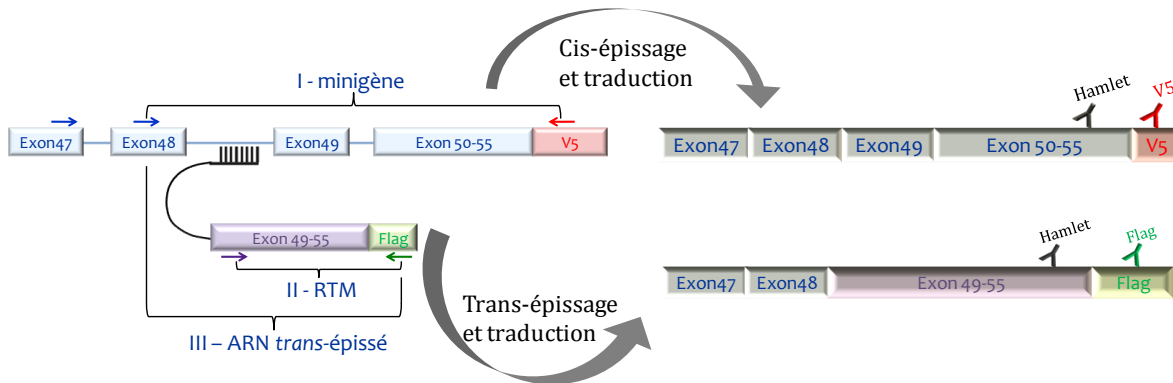


Figure 67 : outils de détection des ARN et des protéines

L'analyse des ARN produits par le minigène et le RTM est réalisée par RT-PCR grâce à trois couples d'amorces spécifiques : (i) un couple spécifique du minigène (amorces Fex48h_BV5) ; (ii) un couple spécifique du RTM (amorces Fex49h_BFlag) ; et (iii) un couple spécifique du *trans*-épissage (amorces Fex49h_BFlag) (séquence en annexe VI). Occasionnellement, l'amorce Fex47h a été utilisée en remplacement de Fex48h. Les protéines présentes après épissage et traduction sont détectées par l'anticorps anti-V5 pour le minigène (rouge), et anti-Flag pour la protéine résultant du *trans*-épissage (vert). Ces deux protéines peuvent également être révélées par l'anticorps anti-dysferline Hamlet (noir).

C. Evaluation du *trans*-épissage sur le minigène

1. Le minigène et le RTM sont correctement transcrits, et produisent une molécule chimérique

Les cellules HER911 ont été transfectées avec le plasmide p-minigène seul ou le pAAV-RTM1-hDysf seul pour vérifier leur bonne expression (**Fiche technique n° 4**). Le *trans*-épissage a été testé par transfection d'un mélange p-minigène/pAAV-RTM1-hDysf, à ratio variable. La quantité de p-minigène est fixe, c'est la quantité de pAAV-RTM1-hDysf qui varie. Les cellules ont été récupérées 48 heures après traitement. Les PCR réalisées sur les ARN reverse transcrits issus de ces cellules montrent que le minigène et le RTM sont transcrits correctement (**Figure 68**, lignes 1 et 2) (Fiche technique n° 5 ; Fiche technique n° 6). La quantité de RTM détectée ne varie pas, quelque soit la quantité de plasmide pAAV-RTM1-hDysf utilisée. Cette observation témoigne probablement d'une saturation de la PCR. La présence d'un ARN chimérique est détectée en utilisant le couple d'amorces spécifique au *trans*-épissage (Figure 68, ligne 3). La quantité d'ARN

chimérique varie : elle est d'autant plus importante que la quantité de RTM transfecté est grande. Le ratio minigène/RTM semble donc jouer un rôle important dans la quantité d'ARN chimérique détectée. Pour les tests suivants, nous avons augmenté ces ratios à 1/5, 1/8 et 1/11. Les mêmes PCR faites sur les matrices ARN ayant suivi un protocole de transcription inverse (RT) classique mais sans enzyme reverse transcriptase sont toutes négatives (Figure 68, ligne 4). Les molécules détectées par la PCR sont donc bien dues à la RT.

Couple PCR	Taille attendue	Résultats							Taille observée
		Mt	NT	mini	RTM	1/1,5	1/3	1/5	
Minigène : Fex47h/BV5	1066 pb								1000 pb
RTM : Fex49h/BFlag	795 pb								800 pb
Trans-épissage : Fex48h/BFlag	867 pb								850 pb
Contrôle Sans RT Trans-épissage : Fex48h/BFlag	-								-

Figure 68 : RT-PCR mettant en évidence l'expression du minigène, du RT, et de la molécule chimérique d'intérêt

RT-PCR réalisée sur les ARN extraits des cellules HER911 transfectées avec le p-minigène, le pAAV-RTM1-hDysf ou co-transfectées aux ratios 1/1,5, 1/3 et 1/5. Des PCR spécifiques de chaque élément sont réalisées (Fexh47/BV5 : minigène, Fex54h/BFlag : RTM, Fex48h/BFlag : molécule chimérique). La molécule chimérique résultant du *trans*-épissage est visible dès le ratio 1/5 (flèche), et sa quantité semble augmenter aux ratios 1/8 et 1/11. Une quantification par PCRq est toutefois impossible en raison de l'amplicon minimal spécifique à cette molécule (environ 850 pb). Les ratios sont calculés en nombre de molécule. Mt : Smart ladder.

L'amplicon obtenu avec la PCR Fex48h/BFlag sur le ratio 1/5 a été prélevé et séquencé. L'analyse du séquençage révèle que la séquence 3XFlag a été associée à la séquence de l'intron 48 de la dysferline humaine (Figure 69). Cette molécule résulte nécessairement de l'association du début de la séquence codante du minigène avec la séquence codant du RTM (chimère [minigène/RTM]).

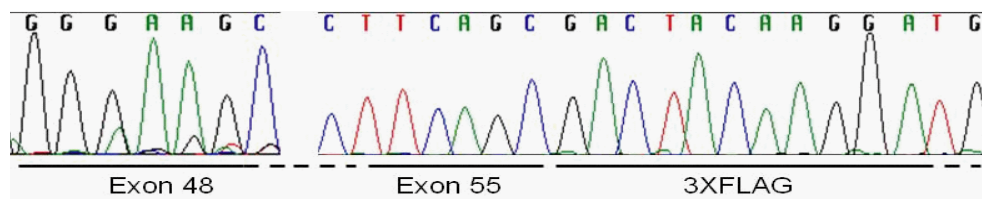


Figure 69 : séquençage du produit d'amplification de la PCR détectant le *trans*-épissage

Le séquençage de l'amplicon issu du puits 1/5 (Figure 68) par la méthode de Sanger avec les oligonucléotides RFlag et Fex48h correspond à la séquence attendue après *trans*-épissage : l'exon 48 du minigène est lié avec, au-delà des exons 49 à 55, le 3XFLAG.

Nous avons voulu exclure la possibilité que la molécule chimérique soit créée durant la PCR directement par amplification des plasmides. Les PCR faites sur un mélange de plasmide pAAV-RTM-hDysf et p-minigène sont présentées sur la Figure 70 (Fiche technique n° 6). Aucun amplicon n'est détecté avec le couple d'amorce utilisé, spécifique du *trans*-épissage.

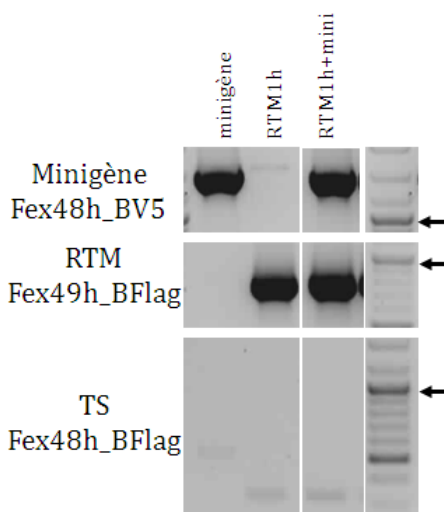


Figure 70 : PCR de contrôle de la non recombinaison des plasmides minigène et RTM

Les couples d'amorces utilisés pour amplifier le minigène, le RTM et la molécule chimérique résultant de leur *trans*-épissage ont été testés directement sur les plasmides p-minigène (minigène), pAAV-RTM-hDysf (RTM1h) et le mélange pAAV-RTM-hDysf + p-minigène (RTM1h=mini). Le minigène est amplifié à 1537 pb, sa taille avec les introns. La flèche indique la bande à 1000 pb du marqueur de taille.

2. L'analyse par WB révèle un profil d'expression protéique complexe, dû en partie à l'expression du RTM seul.

Le RTM exprime à lui seul un grand nombre de protéines

Les protéines extraites de cellules transfectées de la même façon que précédemment mais avec des ratios de 1/5, 1/9 et 1/11 (minigène / RTM) ont été analysées par Western Blot (Figure 71) (Fiche technique n° 7). L'hybridation avec les anticorps anti-V5 et anti-Flag est utilisée pour

mettre en évidence les protéines respectivement issues de l'expression du minigène et du *trans*-épissage.

L'anticorps V5 révèle de multiples protéines (**Figure 71**, zoom à gauche). Le minigène, composé d'exons et d'introns (voir **Figure 66**) devrait être exprimé à 42 kDa environ (en gras dans la **Table 10**, gauche). Si cette protéine est bien détectable (* sur la **Figure 71**), d'autres sont également mises en évidence, en particulier aux alentours de 32 kDa (#). Différentes ORF présentes sur le minigène selon les épissages alternatifs possibles peuvent expliquer ces protéines (**Table 10**, gauche), dont celles observées aux alentours de 32 kDa (soulignée dans la **Table 10**, gauche). Parmi ces ORF, plusieurs ont des séquences de Kozak fortes autour de leur codon initiateur (**Fiche technique n° 11**). Malgré une séquence de Kozak forte, ce n'est pas l'ORF à 42 kDa qui est exprimée majoritairement. D'autres bandes, ne correspondant pas à des ORF prédites, pourraient être dues à de la dégradation (bande de faible poids moléculaire), ou à un épissage non conventionnel de l'ARNpm codé par le minigène (création d'une ORF plus grande expliquant la protéine observée à 48 kDa).

L'anticorps anti-Flag révèle également de nombreuses protéines portant l'étiquette 3XFlag. Le zoom à droite de la **Figure 71** permet la visualisation de ces protéines dans le cas d'une transfection du RTM seul. Une bande non spécifique, liée à l'anticorps utilisé, est observée à 37 kDa environ (visible dans le contrôle non transfecté). Les protéines peuvent être dues à l'expression du RTM seul, comme un transgène classique : les ORF présentes au niveau du RTM sont rapportées dans la **Table 10**, droite ; quatre d'entre elles (soulignées) sont visibles sur le WB. Toutes ces ORF ont des séquences de Kozak fortes, à l'exception de l'ATG2. Les protéines observées au-delà de 32 kDa, taille maximale théorique, peuvent résulter du *trans*-épissage de l'ARNpm de la dysferline humaine endogène. Nous avons en effet décrit plus haut que les HER911 expriment la dysferline au niveau ARN. Ces protéines peuvent également provenir d'un épissage des séquences régulatrices du RTM, créant des ORF de taille supérieure. Ces protéines pourraient aussi être dues à des événements de *trans*-épissage sur d'autres ARNpm.

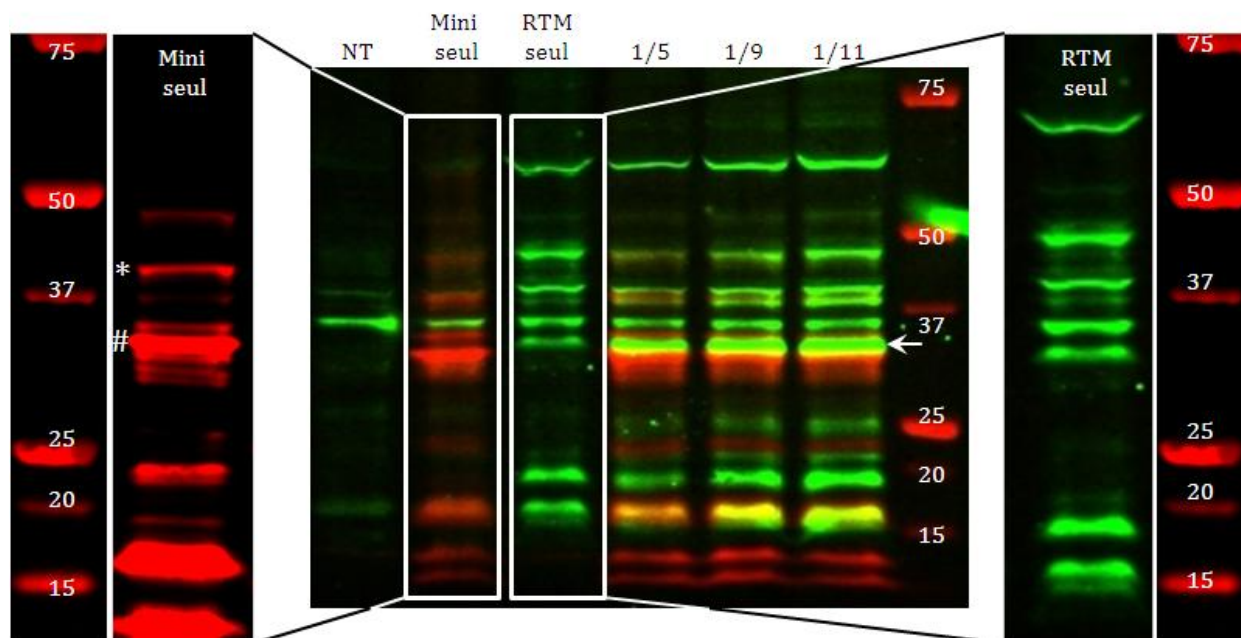


Figure 71 : profil d'expression protéique du *trans*-épissage sur minigène en cellules HER911

Analyse WB de cellules HER911 transfectées par le p-minigène et/ou le pAAV-RTM1-hDysf (NT : non transfecté ; Mini seul : 1 µg de p-minigène ; RTM seul : 7 µg de pAAV-RTM1-hDysf ; Ratio : 1 µg de p-minigène et 5, 9 ou 11 fois plus de pAAV-RTM1-hDysf. Toutes les transfections sont normalisées à 8 µg d'ADN plasmidique avec un plasmide non codant. 3.10⁶ cellules traitées par test). Le marquage avec l'anticorps V5 (révélé en rouge) met en évidence le minigène, et le FlagM2 (révélé en vert) permet de visualiser les protéines issues du RTM. Le zoom à gauche permet de voir les multiples protéines codées par le minigène, alors que le zoom à droite permet de visualiser les protéines issues de l'expression du RTM seul.

ORF présentes sur le minigène				ORF présentes sur le RTM1-hDysf				
Epissage minigène	taille (kDa)	nombres d'AA	score kozak	ORF RTM1-hDysf	Id ATG	taille (kDa)	nombres d'AA	score kozak
complet	42	361	0.804	1	ATG1	32	270	0.531
(47-48-49-50à55-V5)	36,4	310	0.339	2	ATG2	31	261	0.195
	<u>30,5</u>	260	0.495	3	ATG3	20	173	0.465
delta ex48	36,4	312	0.097	4	ATG4	14	118	0.714
(47--49-50à55-V5)	<u>30,5</u>	260	0.555	5	ATG5	11	94	0.511
delta ex49	38,3	329	0.605	6	ATG6	9	70	0.661
(47--49-50à55-V5)	35,5	278	0.507	7	ATG7	4	32	0.819
delta ex48-49	<u>32,6</u>	280	0.137					
	<u>29,4</u>	251	0.201					
communes à tous les épissages (situées sur les exons 50à55-V5)	18,9	163	0.465					
	12,7	108	0.714					
	10	84	0.511					
	7,1	60	0.661					
	2,4	22	0.167					

Table 10 : liste des ORF potentielles pour le minigène et le RTM

Le tableau de gauche rapporte les ORF directes ou nichées présentes sur le minigène, suite à son épissage classique ou après les épissages alternatifs des exons 49, 48 ou 49et48. La taille attendue est en gras. Le tableau de droite rapporte les ORF directes ou nichées présentes sur le RTM. Celles correspondant à des protéines observées sur la **Figure 71** sont soulignées. Le score des séquences kozak entourant chaque ATG a été établi avec le logiciel NetStart 1.0 (www.cbs.dtu.dk/services/NetStart).

Une protéine spécifique au *trans*-épissage du minigène est visible par WB

Le *trans*-épissage du minigène devrait produire une protéine portant l'étiquette Flag à environ 42 kDa. Une protéine dans le test où le RTM est transfecté seul est détectée à cette taille, et masque potentiellement cette cible. Le minigène étant majoritairement exprimé aux alentours de 32 kDa, la protéine résultant du *trans*-épissage pourrait être observée à ce niveau. Malheureusement, à cette taille une protéine résultant de l'expression du RTM seul est également présente. Les protéines résultant de l'expression du RTM seul nous empêche donc de conclure à l'apparition d'une protéine spécifique au *trans*-épissage. Toutefois, une très nette augmentation de la quantité de protéines détectées avec l'anticorps anti-flag est visible pour les cellules transfectées avec un ratio de 1minigène/11RTM (flèche sur la [Figure 71](#), et [Figure 72](#)), ce qui laisse supposer que la protéine résultant du *trans*-épissage pourrait être mêlée à une protéine résultant de l'expression du RTM seul.

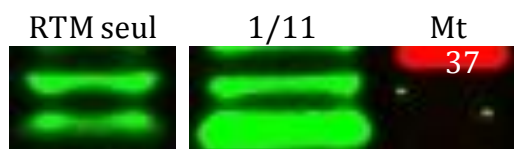


Figure 72 : comparaison du niveau d'expression de la protéine à 32kDa

Le WB présenté est un grossissement de celui décrit dans la [Figure 71](#). La comparaison du niveau d'expression de la protéine observée à 32 kDa dans le cas d'une transfection du RTM seul ou avec le minigène laisse clairement entrevoir une protéine résultant du *trans*-épissage.

D. Validation expérimentale des résultats de *trans*-épissage

Suite à ces premiers résultats, nous avons voulu réaliser un certain nombre de contrôles et d'expériences afin de valider nos résultats, d'exclure d'éventuels artéfacts expérimentaux et de comprendre les événements observés (particulièrement l'expression du RTM seul). Pour ce faire nous avons été amenés à construire un certain nombre de nouveaux RTM.

Nous avons construit par ingénierie moléculaire un RTM portant un BD aléatoire (RTM-hDysf-scBD, pour scamble Binding Domain) ([Fiche technique n° 1](#)). Nous avons également construit un RTM ne portant pas de BD (RTM-hDysf-dBD) et un RTM ne portant ni BD, ni intron synthétique (RTM-hDysf-dBD-dIntS). Ces RTM sont qualifiés de non fonctionnels en raison de leur incapacité théorique à provoquer du *trans*-épissage sur la dysferline.

Au vu des résultats de WB suggérant une possible traduction du RTM et afin de voir si l'expression du RTM comme transgène autonome peut être empêchée, nous avons muté les ATG initiateurs des quatre plus larges ORF présentent sur le RTM (voir [Table 10](#)). Ces mutations ont

deux objectifs : évaluer la possibilité de contrôler l'expression du RTM, et éliminer des protéines résultant de l'expression du RTM qui peuvent potentiellement masquer les protéines résultant du *trans*-épissage. Nous avons construit ces RTM en mutant les ATG (méthionine) en ACG (thréonine) des 4 plus longues ORF par mutagenèse dirigée (**Fiche technique n° 2**). Trois RTM ont été construits en éliminant les ORF1 et 2 (RTM1hDysf- Δ 32-31), l'ORF3 (RTM1hDysf- Δ 20) ou les ORF1, 2, 3 et 4 (RTM1hDysf- Δ 4ATG) (voir **Table 10** pour les correspondances ORF-ATG).

1. Analyse au niveau nucléaire.

Les amplicons de PCR correspondant au trans-épissage sont un mélange de molécules

Des cellules HER 911 ont été co-transfectées avec le plasmide RTM1hDysf- Δ 4ATG et le minigène (**Fiche technique n° 4**). Ces cellules ont été récupérées 48 heures après traitement, et les protéines analysées par WB avec l'anticorps anti-Flag. Aucune protéine résultant du *trans*-épissage n'est détectée (données non présentées). L'utilisation du RTM1h- Δ 4ATG ne permet pas d'affirmer qu'il y ait, ou non, une protéine due au *trans*-épissage au milieu des bandes dues à l'expression du RTM seul.

L'analyse par RT-PCR de cette expérience permet pourtant d'amplifier un amplicon avec le couple d'amorces spécifique à l'ARN *trans*-épissé (**Fiche technique n° 5** ; **Fiche technique n° 6**). La molécule attendue est une chimère des exons 47 et 48 apportés par le minigène et des exons 49 à 55 apportés par le RTM1h-d4ATG (suivi du 3XFlag). Sur cette molécule, on devrait donc retrouver les codons ACG remplaçant les ATG. L'analyse par séquençage de l'amplicon correspond à cette séquence, mais révèle une matrice complexe précisément au niveau des bases T mutées en G (**Figure 73**). On observe au niveau du chromatogramme (visualisé à l'aide du logiciel Sequencher, <http://genecodes.com>) que la base G est présente dans trois cas sur quatre (**Fiche technique n° 11**). Le séquençage est donc fait sur un mélange de molécules ou un hétéroduplexe incitant à la prudence quand à l'analyse des résultats de RT-PCR.

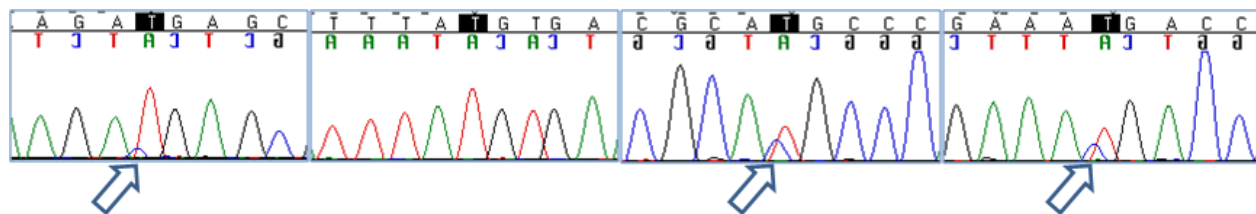


Figure 73 : séquençage de l'amplicon correspondant à l'ARN chimérique attendu avec le RTM1h- Δ 4ATG.

Chromatogramme de séquençage de l'amplicon obtenu avec le couple d'amorces spécifique à l'ARN chimérique (Fex48h_BFlag) sur les ARN de cellules HER911 co-transfectées par le p-minigène et le RTM1hDysf- Δ 4ATG. La séquence attendue devrait porter les quatre mutations ATG en ACG. C'est systématiquement la séquence ATG qui est lue, mais la base Guanine (en bleu) est présente dans trois cas sur quatre (flèches).

Un ARN mimant l'ARN trans-épissé est mis en évidence avec les RTM non-fonctionnels

Des cellules HER911 ont été co-transfectées par les plasmides codant pour le minigène et le RTM-hDysf-dBD, le RTM-hDysf-dBDdIntS, ou le RTM-hDysf-scBD. Quarante-huit heures plus tard, les cellules ont été récupérées et les ARN extraits (Fiche technique n° 4 ; Fiche technique n° 5). L'analyse par RT-PCR de ces ARN avec le couple d'amorce spécifique du *trans*-épissage montre un amplicon similaire pour les cellules traitées avec le RTM fonctionnel que pour chacun des échantillons correspondant à un RTM non fonctionnel (# sur la Figure 74). L'analyse par séquençage confirme que cette molécule est une chimère semblable à celle attendue après *trans*-épissage. Un amplicon d'une taille légèrement supérieure est observé pour le RTM1-hDysf (* sur la Figure 74). Il correspond (après séquençage) à la partie codante du RTM, précédée d'une partie de l'intron synthétique.

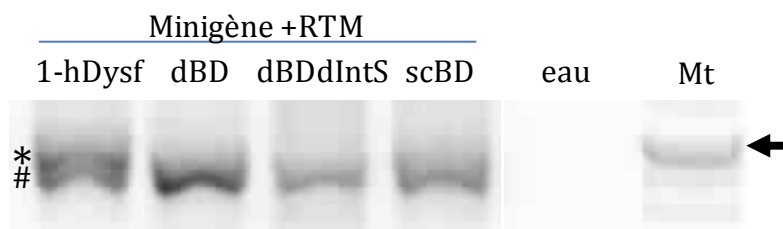


Figure 74 : analyse par RT-PCR des ARN résultant de l'utilisation des RTM non-fonctionnels.

L'ARN des cellules transfectées par le minigène et les différents RTM a été analysé par RT (protocole RevertAid), et PCR avec les couples d'amorces spécifiques du *trans*-épissage. La flèche indique la bande à 1000 pb du marqueur de taille.

D'où provient cette molécule chimérique si elle n'est pas issue d'un évènement de trans-épissage ?

L'observation par RT-PCR d'une molécule chimérique avec les RTM non fonctionnels (Figure 74) ainsi que les séquences complexes obtenues avec le RTM-d4ATG (Figure 73) nous a conduits à rechercher des artefacts de manipulation mimant un ARN *trans*-épissé par la cellule. Ces

artefacts, ainsi que les tests mis en œuvre pour les évaluer sont synthétisés dans la **Table 11** ci-dessous. Ils ont pour caractéristique commune de créer un ARN, ADNc ou amplicon similaire à celui attendu par *trans*-épissage.

Artefact recherché	Test	Rationnel
Recombinaison plasmidique durant la PCR	PCR sur mélange de plasmide	Grande zone homologue entre le minigène et le RTM
Recombinaison plasmidique <i>in cellulo</i>	PCR sur plasmides extraits des cellules traitées	Grande zone homologue entre le minigène et le RTM
La reverse transcriptase glisse d'une matrice à l'autre	RT sur mélange d'ARN issus de cellules transfectées par mini seul et RTM seul	Capacité de switch de matrice connu pour les RT
	Différents protocoles de RT	Capacité de switch de matrice différente selon les RT
La polymérase glisse d'un ADNc à l'autre, les ADNc jouent un rôle mutuel d'amorce	PCR sur mélange d'ADNc issus de cellules transfectées par mini seul et RTM seul	Capacité de switch de matrice connu pour les polymérases

Table 11 : contrôles mis en place pour la validation d'un évènement de *trans*-épissage

- La molécule chimérique n'est pas dû à une recombinaison de plasmide

Nous avons déjà montré plus haut que la molécule chimérique n'était pas due à une amplification illégitime des plasmides durant la PCR (**Figure 70**). Nous avons voulu également vérifier que ces plasmides ne se soient pas recombines *in cellulo* durant les 48 heures d'incubation, entre la transfection et la récupération des cellules. Pour cela, des PCR ont été réalisées sur de l'ADN plasmidique extrait de cellules HER911 co-transfectées par le minigène et le RTM1-hDysf. Elles sont présentées sur la **Figure 75 (Fiche technique n° 6)**. Aucun amplicon n'est détecté par le couple spécifique du *trans*-épissage, suggérant que les plasmides ne sont pas recombines *in cellulo*.

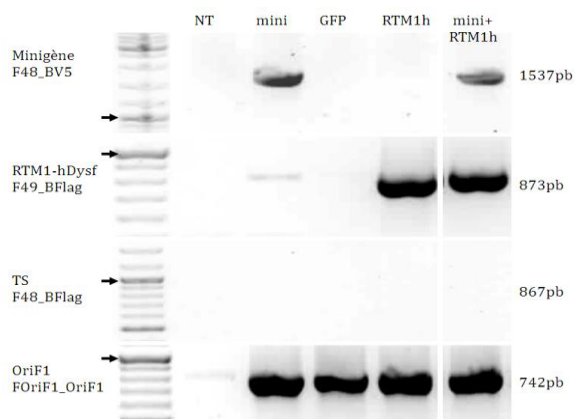


Figure 75 : PCR sur les ADNs plasmidiques ayant passés 48 h dans les cellules transfectés

PCR avec différents couples d'amorces (séquences en annexe VI) sur les plasmides extraits de cellules HER911 48 h après qu'elles aient été co-transfectées par le minigène et le RTM1-hDysf. Le minigène, avec l'intron 48, et le RTM1-hdysf sont détectés, de même qu'une partie non codante du plasmide (OriF1). Aucun amplicon n'est détecté avec le couple utilisé pour mettre en évidence le *trans*-épissage (TS). La flèche indique la bande à 1000 pb du marqueur.

- La transcription inverse et la PCR influent bien sur la molécule chimérique détectée

Un possible artefact créé par la méthode expérimentale est la « fabrication » d'un ADNc unique à partir de deux molécules d'ARN distinctes. Il a en effet été démontré que les reverse transcriptases sont capables de changer de matrice en cours de synthèse et qu'elles miment ainsi un évènement de *trans*-épissage (Huber, McCoy et al. 1989; Cocquet, Chong et al. 2006). Le changement de matrice est, en plus, différent selon les reverse transcriptases (Houseley and Tollervey 2010).

Nous avons testé cette hypothèse en réalisant une RT avec deux enzymes différentes (Verso et RevertAid) sur un mélange d'ARN provenant soit de cellules transfectées avec uniquement le minigène, soit de cellules transfectées avec un RTM (RTM1-hDysf, RTM1hDysf- Δ 4ATG, RTM-hDysf-dBD, RTM-hDysf-dBD-dIntS, RTM-hDysf-scBD). Une PCR avec la couple d'amorce révélant le *trans*-épissage est réalisée sur ces deux produit de RT. Elle est comparée à une PCR identique réalisée sur les produits de RT des ARN non mélangés (RT Verso et RevertAid également). Un amplicon à la taille attendue en cas d'artéfact (867 pb) est détecté uniquement pour la RT réalisée avec l'enzyme RevertAid sur le mélange d'ARN (Figure 76, colonne du milieu en haut). Un tel amplicon n'est pas observé avec la RT Verso ni sur aucune des RT faites sur les ARN non mélangés (Figure 76, colonne du milieu en bas, et colonne de gauche). Selon la RT réalisée, on observe donc un amplicon similaire à celui attendu en cas de *trans*-épissage.

Un artéfact de PCR lié à l'homologie de séquences entre le minigène et le RTM pouvant conduire à l'utilisation de ces molécules pour initier la PCR est possible (cette hypothèse est présentée dans la discussion). Un autre artefact possible est lié à la capacité des ADN polymérase de changer, elles aussi, de matrice en cours de synthèse (Guieysse, Praseuth et al. 1995; Odelberg, Weiss et al. 1995; Patel, Lin et al. 1996; Shammas, Heikkila et al. 2001). Nous avons testé ces hypothèses en réalisant une PCR sur un mélange d'ADNc (RT Verso et RT RevertAid) obtenu à partir de cellules transfectées uniquement avec le minigène, et de cellules transfectées avec uniquement un des différents RTM. La PCR est réalisée avec les amorces spécifiques du *trans*-épissage. Un amplicon est présent à la taille attendue en cas d'artéfact pour les deux conditions testées (Figure 67, colonne de droite). Cet amplicon n'est présent que si l'ADNc du minigène est mélangé avec l'ADNc d'un RTM, pas sur l'un ou l'autre de ces ADNc seul (Figure 67, colonne de gauche). La PCR est donc susceptible de produire un amplicon similaire à celui attendu en cas de *trans*-épissage, mais à partir de deux molécules distinctes.

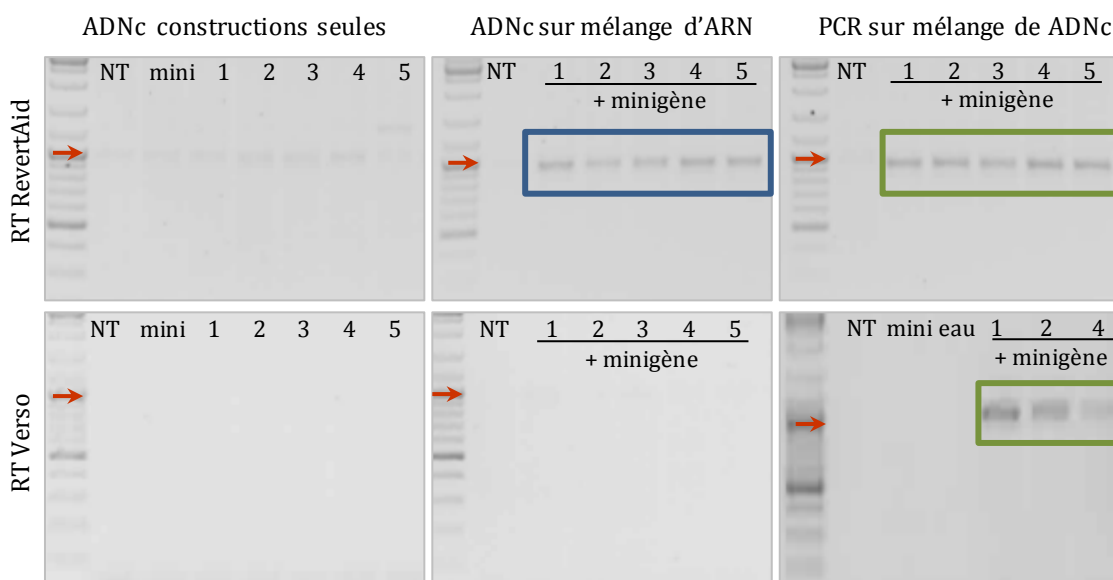


Figure 76 : analyse des capacités d'erreurs induites par l'étape de transcription inverse et la polymérase

Des PCR avec le couple d'amorces spécifique du *trans*-épissage ont été réalisées sur différentes matrices. Les « ADNc construction seules » correspondent à la réverse transcription d'ARN de cellules transfectées uniquement avec le minigène ou les RTM. Les « ADNc sur mélange d'ARN » correspondent à la réverse transcription d'un mélange d'ARN provenant de cellules transfectées d'un côté par les RTM et de l'autre par le minigène. La « PCR sur mélange d'ADNc » est réalisée sur un mélange d'ADNc obtenu après RT d'ARN de cellules transfectées uniquement avec le minigène et de cellules transfectées uniquement avec les RTM. Le couple d'amorces spécifique du *trans*-épissage produit un amplicon de 867 pb (1 : RTM1-hDysf ; 2 : RTM1hDysf-Δ4ATG ; 3 : RTM-hDysf-dBD ; 4 : RTM-hDysf-dBD-dIntS ; 5 : RTM-hDysf-scBD). La flèche indique la bande à 1000 pb du marqueur de taille. Des amplicons sont imputables à la RT (encadré bleu) et à la PCR (encadrés verts).

2. Analyse au niveau protéique.

Le RTM est traduit en fonction des ORF qu'il présente, mais aussi selon d'autres modalités.

Les plasmides mutés au niveau des ATG ont été transfectés en cellules HER911, puis les protéines analysées 48 heures plus tard par WB avec un marquage de l'étiquette Flag (**Fiche technique n° 7**). Les mutations font effectivement disparaître les bandes correspondantes aux ORF ciblées (Figure 77). La suppression des ORF 1 et 2 fait clairement disparaître la bande observée à environ 32 kDa, et la suppression de l'ORF 4 agit de même pour la bande à 16 kDa. La mutation de l'ORF 3 produit un effet moins net car des protéines sont toujours détectées aux alentours de 20 kDa après son élimination. Une bande semble tout de même spécifique à cette ORF, visible pour le RTM1hDysf- Δ 32-31 (qui est le seul à encore posséder cet ORF sur le WB présenté **Figure 77**). De façon surprenante, la mutation des ATG initiateurs des ORF 1-2 fait également disparaître la bande observée à 60 kDa environ, alors que cette protéine semble totalement indépendante de ces ORF (elle est presque deux fois plus grande que la taille prédite pour ces ORF). Les protéines à 48 et 42 kDa sont elles toujours présentes. Elles pourraient résulter du *trans*-épissage de l'ARNpm de la dysferline humaine endogène, présent dans les cellules HER911. Elles peuvent également résulter d'un épissage en *cis* du RTM seul, incluant ses séquences régulatrices, et créant des ORF de tailles supérieures. Cette explication est concordante avec la disparition de la bande à 60 kDa avec les RTM où les ATG1 et 2 sont mutés. La mutation du premier ATG fait par exemple disparaître un site donneur d'épissage fort, potentiellement utilisé lors d'un épissage en *cis* du RTM (valeur accordée d'après le logiciel Human Splicing Finder).

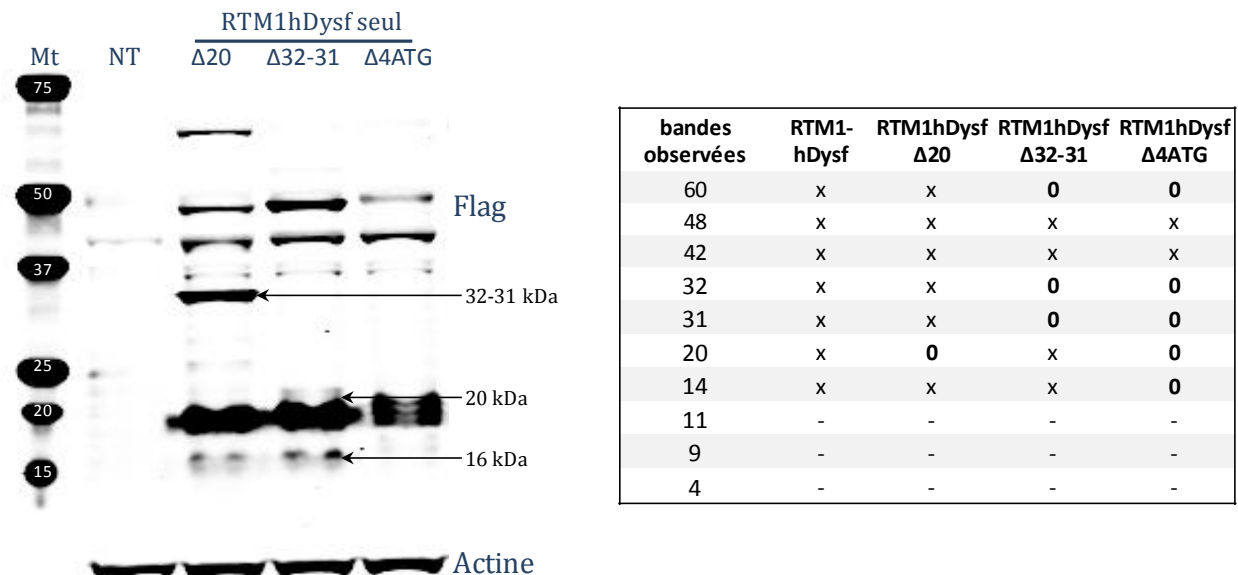


Figure 77 : profil d'expression protéique des RTM1h aux ORF mutées

Analyse par WB des protéines de cellules HER911 transfectées par les RTM1hDysf-Δ20, RTM1hDysf-Δ32-31 et RTM1hDysf-Δ4ATG (7 μg de pAAV-RTM1-x et 1 μg d'ADN plasmidique non codant), ou non transfectées (NT). Le marquage avec l'anticorps anti-Flag met en évidence la traduction des RTM seuls. Les mutations des différents ATG permet bien d'éliminer certaines protéines résultant de la traduction du RTM (résumé dans le tableau de droite : x=présence de la protéine, 0=absence de la protéine), mais pas d'empêcher totalement son expression. RTM1hDysf-Δ4ATG exprime toujours nettement les protéines à 42 et 48 kDa.

Les RTM non-fonctionnels co-transfectés avec le minigène provoquent un profil protéique similaire à celui du RTM1-hDysf

Des cellules HER911 co-transfectées par les plasmides codant pour le minigène et le RTM-hDysf-dBD, le RTM-hDysf-dBDdIntS, ou le RTM-hDysf-scBD ont été analysées par WB (Figure 78) (Fiche technique n° 7). La bonne expression du minigène a été vérifiée par un marquage avec l'anticorps V5. Le marquage avec l'anticorps anti-Flag révèle un profil identique entre le RTM1-hDysf et tous les RTM non fonctionnels (RTM-dBD, dBDdIntS et scBD); aucune bande n'est absente avec les RTM non fonctionnels comparés au RTM1-hDysf, à l'exception de la bande à 42 kDa environ pour le RTM-hDysf-dBD-dIntS. Pour ce RTM, on note globalement une faible présence de protéines. Elle pourrait être due à une mauvaise expression de sa séquence codante, cette dernière se retrouvant très proche du promoteur C5.12 dans le plasmide. Cette faible détection de protéines pourrait également provenir du fait que ce RTM ne provoque pas de *trans*-épissage sur des ARN non ciblés. On ne peut toutefois pas conclure que la bande détectée à 42 kDa pour le RTM1-hDysf est bien due au *trans*-épissage, car elle est également présente avec les RTM-hDysf-dBD et RTM-hDysf-scBD.

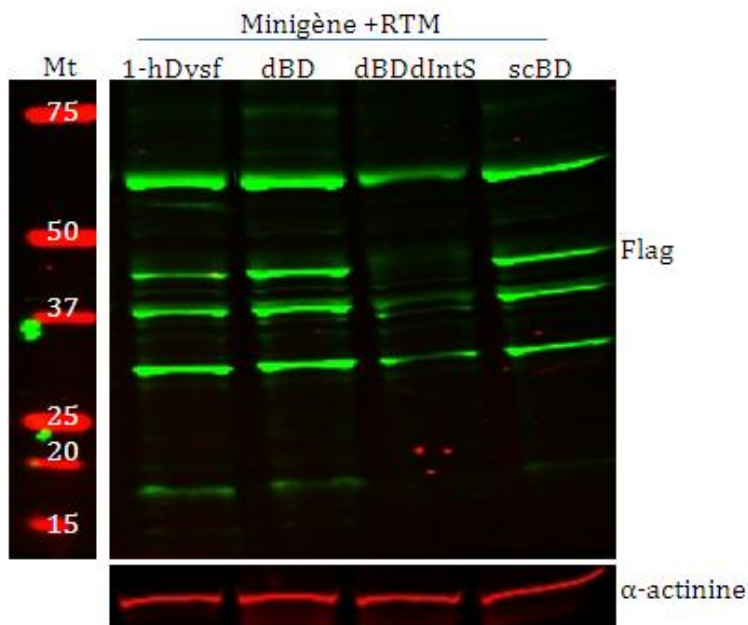


Figure 78 : profil protéique des RTM non-fonctionnels co-transfectés avec le minigène

Analyse WB de cellules HER911 transfectées par le p-minigène et le RTM 1-hDysf (1-hDysf) ou les différents RTM non fonctionnels (dBD : RTM-hDysf-dBD ; dBDdIntS : RTM-hDysf-dBD-dIntS ; scBD : RTM-hDysf-scBD). La quantité de plasmide transfecté est de 1 µg de p-minigène et 11 fois plus de pAAV-RTM. 3.10^6 cellules sont traitées par test. Le marquage avec l'anticorps FlagM2 (révélé en vert) permet de visualiser les protéines issues du RTM. L'Alpha-actinine est utilisé comme normalisateur de dépôt.

E. L'utilisation de nouveaux RTM valide la possibilité de *trans*-épissage sur le minigène au niveau ARN et protéine

1. Un RTM avec une séquence codante différente du minigène permet de visualiser une protéine résultant du *trans*-épissage

Nous avons émis l'hypothèse que les artéfacts créés par la RT et/ou la polymérase lors de l'analyse de nos manipulations étaient dus à la grande homologie de séquence entre le minigène et le RTM. En effet, l'intégralité de la séquence codante du RTM est retrouvée sur le minigène. Lors des différentes étapes *in vitro* (RT et PCR), le risque d'appariement du RTM et du minigène est grand. Ces appariements pourraient donc être à l'origine des artéfacts de RT et de PCR.

Nous avons donc choisi de construire un RTM dont la séquence codante est constituée de l'équivalent des exons 49 à 55 de la dysferline, mais avec des codons optimisés pour la traduction chez l'Homme (**Fiche technique n° 1**). Cette optimisation consiste à changer les codons rares (peu d'ARNt correspondant disponible dans la cellule) chez l'Homme pour d'autres, équivalents, mais dont l'ARNt est commun. Le plasmide portant la séquence optimisée de la dysferline, nommée « OptiDysf », nous a été fourni par le Dr Matthew Hirsch (University of North Carolina, NC, USA).

La séquence correspondant aux exons 49 à 55 a été clonée grâce à l'utilisation d'enzymes de restriction dans le plasmide pAAV-RTM1-hDysf, à la place des exons 49 à 55 de la dysferline classique. La différence de séquence observée des exons 49 à 55 entre la dysferline et la dysferline optimisée est de 18% (**Fiche technique n° 11**). Deux autres modifications ont été apportées à ce plasmide : l'ajout d'un ISE fort dans l'intron synthétique du RTM et l'ajout du 3'UTR naturel de la dysferline humaine. Les ISE spécifiques du muscle, présentes en amont de l'exon à intégrer, sont riches en Uridine (Castle, Zhang et al. 2008) ; la séquence sélectionnée pour notre étude a donc été le motif consensus "UUCUCUU". Le 3'UTR est ajouté car il régule probablement l'épissage et intervient dans la stabilité de l'ARNm produit (Bolognani and Perrone-Bizzozero 2008). Il a été amplifié par PCR sur de l'ADNg humain et inséré en aval de l'étiquette 3XFlag, en remplacement du SV40-PolyA. Le plasmide obtenu est nommé p-RTMOptiDysf-ISE-3'UTR (abrégé RTM-OptiDysf).

Des cellules HER911 ont été transfectées avec les plasmides p-minigène et p-RTMOptiDysf au ratios de 1/5, 1/9 et 1/11, avec le plasmide p-minigène seul, ou avec le plasmide p-RTMOptiDysf seul (**Fiche technique n° 4**). Les cellules ont été récupérées 48 heures après traitement et les protéines analysées par WB. Un des dépôts a été réalisé avec le lysat protéique de cellules transfectées avec le plasmide p-minigène et pAAV-RTM1-hDysf au ratio 1/11 (même échantillon que celui présenté en **Figure 71**). Le minigène est exprimé dans chacun des échantillons ayant été transfectés par le p-minigène (Figure 79, en bas). L'expression semble toutefois plus forte lorsqu'il est transfecté avec le pAAV-RTM1-hDysf. Deux protéines résultant de l'expression du RTM-OptiDysf sont détectées, mais à un niveau très faible (* sur la Figure 79). De façon intéressante, la taille estimée de ces bandes est sensiblement différente de celles observées lors de l'utilisation du RTM1-hDysf. Cette différence corrobore l'idée d'un épissage en *cis* du RTM, provoquant l'apparition de ces protéines. Une bande spécifique à la co-transfection du minigène avec le RTM-OptiDysf est détectée à 32 kDa environ (flèches). Cette bande correspond au résultat du *trans*-épissage du minigène par le RTM-OptiDysf. Dans le puits contrôle, contenant le p-minigène et pAAV-RTM1-hDysf, les marquages avec l'anticorps Flag sont très intenses. Nous avons démontré plus haut que certaines de ces bandes, en particulier celles à 32-31 kDa étaient dues à l'expression du RTM1-hDysf seul. Cette protéine masque donc probablement une protéine résultant du *trans*-épissage, ce qui explique que nous n'avons pas pu la voir lors de nos précédents WB. C'est probablement parce que le RTM-OptiDysf est beaucoup moins exprimé seul que l'on peut distinguer une bande spécifique au *trans*-épissage.

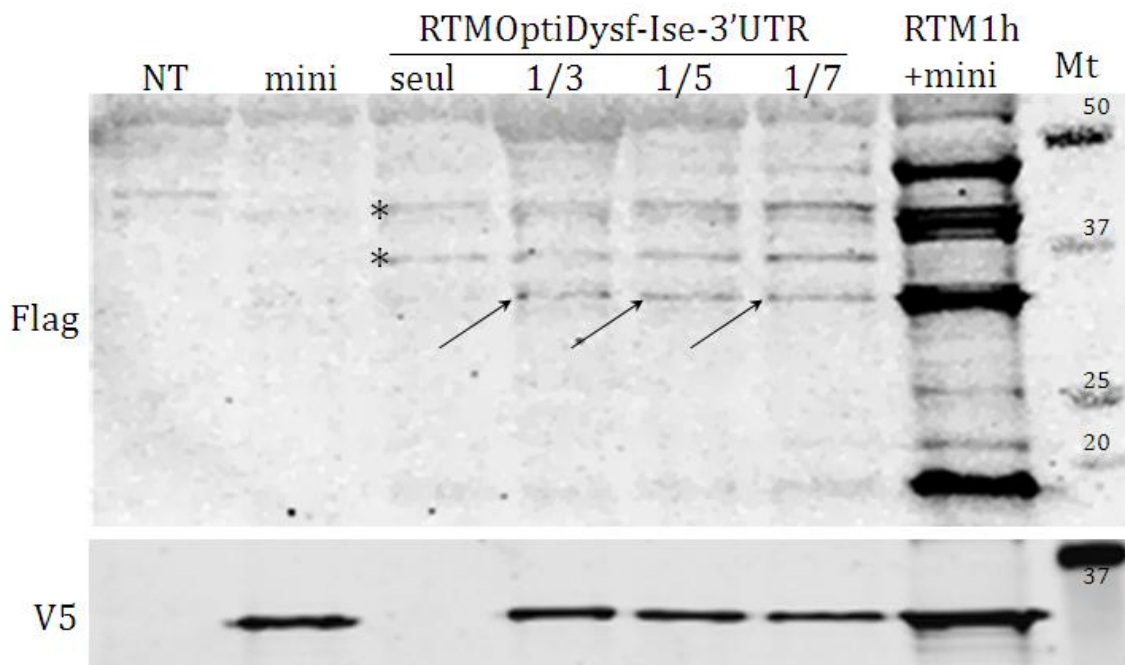


Figure 79 : analyse par WB du RTM-OptiDysf

Analyse WB de protéines extraites de cellules HER911 transfectées par le p-minigène et/ou le p-RTMOptiDysf (NT : non transfectées ; mini : p-minigène ; RTM1h+mini : ratio 1/11 de minigène/ pAAV-RTM1-hDysf). Toutes les transfections sont normalisées à 8 µg d'ADN plasmidiques avec un plasmide non codant ; 3.10⁶ cellules traitées par test. Le marquage avec l'anticorps V5 (en bas) met en évidence le minigène, et le FlagM2 (en haut) permet de visualiser les protéines issues du RTM ou du *trans*-épissage. Une protéine est spécifiquement observée pour la co-transfection minigène/RTMOptiDysf (flèches), malgré l'expression de ce RTM seul (*).

2. Les artéfacts de RT-PCR persistent avec le RTM-OptiDysf

L'analyse par RT-PCR de l'expérience présentée ci-dessus est rapportée dans la **Figure 80** (**Fiche technique n° 5 ; Fiche technique n° 6**). L'expression du minigène et du RTM est confirmée par les couples d'amorces qui leur sont spécifiques (**Figure 80**, ligne 1 et 2). Le couple d'amorces spécifique à l'ARN *trans*-épissé provoque l'apparition d'un amplicon double, spécifique à la co-transfection du p-Minigène et du p-RTMOptiDysf (**Figure 80**, ligne 3). Ces deux bandes ont été prélevées et séquencées. L'analyse révèle que la bande du haut correspond à la partie codante du RTM incluant une partie de l'intron synthétique de régulation du *trans*-épissage. La bande du bas correspond à la molécule chimérique attendue. L'observation du chromatogramme de séquençage révèle une matrice complexe, avec un mélange de la séquence de la dysferline classique avec la dysferline optimisée : au niveau de chaque acide nucléique différent entre ces deux séquences, on retrouve un mélange quasi égal de l'acide nucléique provenant de la séquence normale et de la séquence optimisée (flèches vides de la **Figure 80**) (**Fiche technique n° 11**). Cette observation suggère que cette fois encore, de la même manière que dans le test avec le

RTM1hDysf- Δ 4ATG (Figure 73), le séquençage soit réalisé sur un mélange de molécules ou un hétéroduplexe

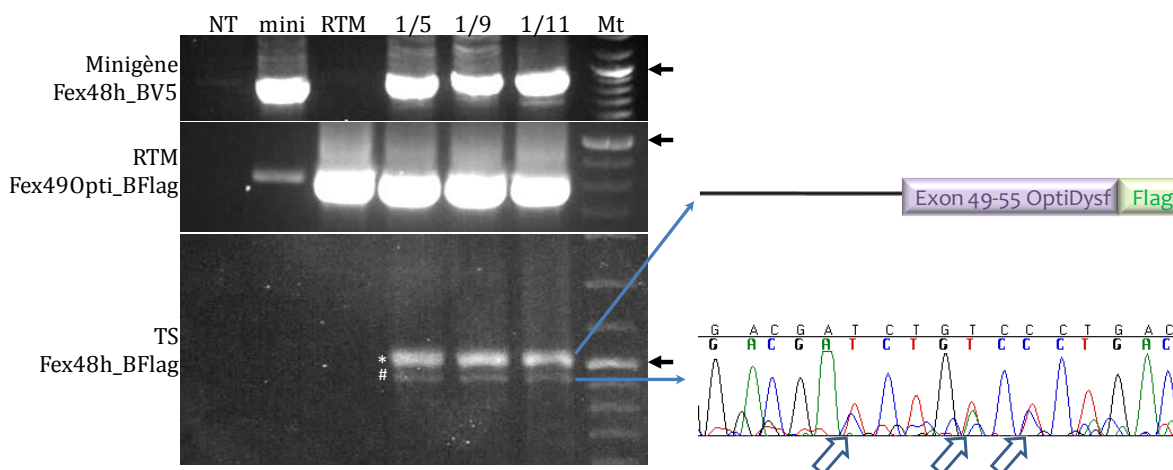


Figure 80 : analyse par RT-PCR du RTM-OptiDysf

RT-PCR réalisée sur les ARN extraits des cellules HER911 transfectées avec le p-minigène, le p-RTMOptiDysf ou co-transfectées aux ratios 1/5, 1/9 et 1/11. Des PCR spécifiques de chaque élément sont réalisées (Fexh47/BV5 : minigène, F49Opti /BFlag: RTM, Fex48h/BFlag : ARNm *trans*-épissé). L'amorce F49Opti correspond à l'amorce F49, mais elle cible spécifiquement la séquence de la dysferline optimisée (séquence en annexe VI). Le séquençage de l'amplicon double obtenu avec le couple d'amorces TS correspond pour la bande du haut au RTM avec une partie de l'intron régulateur, et pour la bande du bas à la molécule chimérique attendue, mais encore une fois dans une matrice complexe. Mt : Smart ladder.

3. Le *trans*-épissage du minigène est confirmée par un autre RTM

Parallèlement à la construction du p-RTMOptiDysf, nous avons muté par mutagenèse dirigée les quatre ATG présents sur la séquence codante du RTM5-hDysf (RTM5hDysf- Δ 4ATG) (Fiche technique n° 2). Le RTM5-hDysf est similaire au RTM1-hDysf, seul le BD est différent (voir Figure 65). Le RTM5-hDysf a été choisi pour cette optimisation car il présente, lorsqu'il est transfecté seul, un profil d'expression protéique différent des quatre autres RTM (RTM1à4-hDysf, données non présentées). L'analyse par WB des cellules HER911 co-transfectées avec le minigène et le RTM5hDysf- Δ 4ATG permet la détection d'une protéine unique à 32 kDa environ (Figure 81, flèche) (Fiche technique n° 7). Cette protéine est pratiquement masquée par l'expression du RTM lorsqu'il n'est pas muté sur les ATG (#), pourtant la protéine *trans*-épissée est visible (*). Le fait d'avoir éliminé les ATG initiateurs présents sur le RTM5-hDysf nous permet d'affirmer que la protéine observée à 32 kDa résulte du *trans*-épissage du minigène.

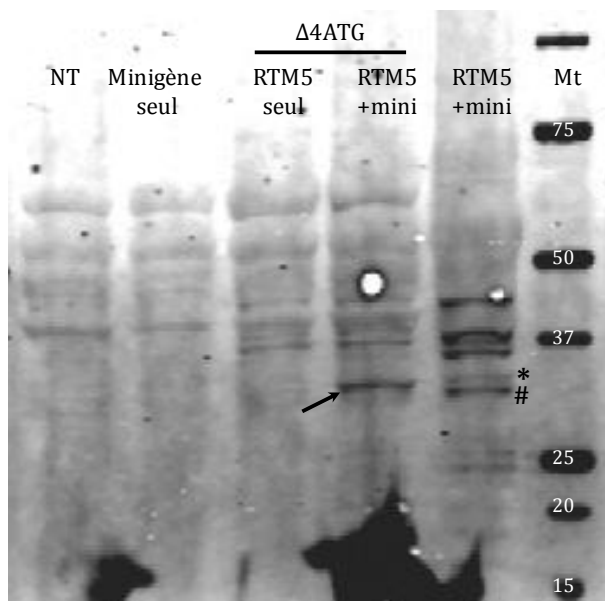


Figure 81 : *trans*-épissage du minigène par le RTM5-hDysf- Δ 4ATG

Analyse WB de cellules HER911 transfectées par le RTM5hDysf- Δ 4ATG seul ou avec le minigène, et de cellules co-transfectées avec le minigène et le RTM5-hDysf non muté (NT : non transfectées ; mini : minigène seul). Le WB est marqué par l'anti-corps anti-Flag-M2. La bande de *trans*-épissage apparaît nettement aux alentours de 32 kDa. Elle est présente avec le RTM5-hDysf (*), mais est très minoritaire comparée à l'expression du RTM seul à 31-32 kDa (#). La mise en évidence de ces bandes est possible probablement en raison de la plus faible traduction du RTM5-hDysf comparée à celle du RTM1-hDysf.

F. Evaluation du *trans*-épissage sur la dysferline endogène

1. Le *trans*-épissage de la dysferline endogène est possible

Nous avons évalué la capacité des RTM à *trans*-épisser l'ARNpm de la dysferline humaine endogène exprimé par différents types de cellules. Les résultats, qui montrent la protéine résultant du *trans*-épissage du minigène par le RTM-OptiDysf et le RTM5- Δ 4ATG, n'ayant été obtenus que tard dans le développement du projet, c'est avec le RTM1-hDysf que les essais de *trans*-épissage de la dysferline endogène ont été réalisés. Ce RTM a été transfecté dans les lignées cellulaires HUVEC et HT1080, ou électroporé dans les myoblastes humains par nucléofection (**Fiche technique n° 4**). Les ARN récupérés de ces différentes cellules ont été analysés par RT-PCR nichée (PCR Fexh48_BFlag sur produit d'amplification Fex47h_BFlag) (**Fiche technique n° 5** ; **Fiche technique n° 6**). Pour chacun des types cellulaires, nous avons obtenu une molécule chimérique correspondant à la dysferline *trans*-épissée. Mais nous n'avons jamais pu mettre en évidence, par WB ou IP par l'étiquette Flag, la protéine résultant de ce *trans*-épissage. Un essai par transduction des myoblastes humains par un lentivirus (enveloppe VSVG) codant le RTM1-hDysf a également été mené (**Fiche technique n° 3**). Nous voulions tester un autre moyen

d'apporter le RTM que par la nucléofection. Les RT-PCR menées sur ces échantillons n'ont pas permis la mise en évidence d'une molécule chimérique.

Nous avons également évalué la capacité des RTM-mDysf (1 à 4) à *trans*-épisser l'ARNpm dysferline endogène murin exprimé par les Nih3T3 (**Fiche technique n° 4**). Nous avons d'abord validé la bonne transcription de ces RTMm avant de rechercher de l'ARN *trans*-épissé. L'analyse a été faite par RT-PCR avec un couple d'amorces spécifique de la molécule chimérique attendue (Fex48m_BFlag, séquences dans l'annexe VI) sur les ARN issus de cellules transfectées avec ces différents RTMm (**Fiche technique n° 5 ; Fiche technique n° 6**). Cette PCR génère un amplicon (à l'exception du RTM1-mDysf) correspondant au *trans*-épissage. Ces amplicons ont été séquencés, et correspondent à la molécule chimérique attendue (présence de l'étiquette Flag à l'extrémité 3' de la dysferline murine). Mais là encore, l'analyse des protéines par WB et par IP ne permet pas de conclure à la présence de la protéine *trans*-épissée (**Fiche technique n° 7**).

Aucun des essais de *trans*-épissage de l'ARN de la dysferline endogène sur cellules humaines ou murines ne nous a donc permis de mettre en évidence une protéine résultant du *trans*-épissage. En raison des doutes soulevés au niveau de la validité des résultats obtenus par RT-PCR, nous ne pouvons pas conclure avoir réellement détecté du *trans*-épissage tant que la protéine équivalente n'a pas été visualisée sur WB. Les expériences sont en cours avec les RTM-OptiDysf et RTM5hDysf- Δ 4ATG pour obtenir cette évidence.

2. La recherche de la protéine résultant du *trans*-épissage TS endogène révèle des évènements non attendus

Les WB visant à détecter la dysferline complète traduite après *trans*-épissage de l'ARNpm DYSF exprimé de façon endogène se sont toujours révélés infructueux (**Fiche technique n° 7**). Pour mettre en évidence la dysferline endogène *trans*-épissée, nous avons donc cherché à enrichir les fractions analysées en protéines d'intérêt. Nous avons pour cela réalisé des immunoprécipitations (IP) par l'étiquette Flag. La dysferline *trans*-épissée doit en effet porter cette étiquette dans sa partie N-ter.

Des cellules HT1080 ont été transfectées avec le pAAV-RTM1-hDysf et récupérées 48 heures plus tard (**Fiche technique n° 4**). Une IP avec l'anticorps anti-FlagM2 (produit en souris) a été réalisée sur le lysat de ces cellules. La fraction récupérée a été déposée sur gel d'acrylamide puis analysée par WB. Le marquage du WB a été réalisé avec un anticorps anti-Flag produit en lapin (Sigma), pour éviter les réactions croisées d'anticorps secondaires. Ce protocole aurait dû nous permettre de révéler une protéine à environ 250 kDa, correspondant à la dysferline *trans*-épissée portant

l'étiquette 3XFlag. A notre grande surprise, le WB révèle la présence de nombreuses protéines de toutes tailles (**Figure 82**). Ces protéines sont spécifiques de la présence du RTM1-hDysf car elles ne sont pas détectées dans les cellules non transfectées. Les marquages avec l'anticorps anti-dysferline ne permettent pas de visualiser de protéine co-marquée avec l'anticorps anti-Flag. Nous ne mettons donc pas en évidence la dysferline endogène résultant du *trans*-épissage. Les protéines observées pourraient résulter de l'expression du RTM seul, comme cela a déjà été observé sur le modèle minigène, en particulier les protéines observées à 32, 42 et 48 kDa. Les protéines observées à un plus haut poids moléculaire pourraient provenir du *trans*-épissage d'ARNpm, autres que celui de la dysferline.

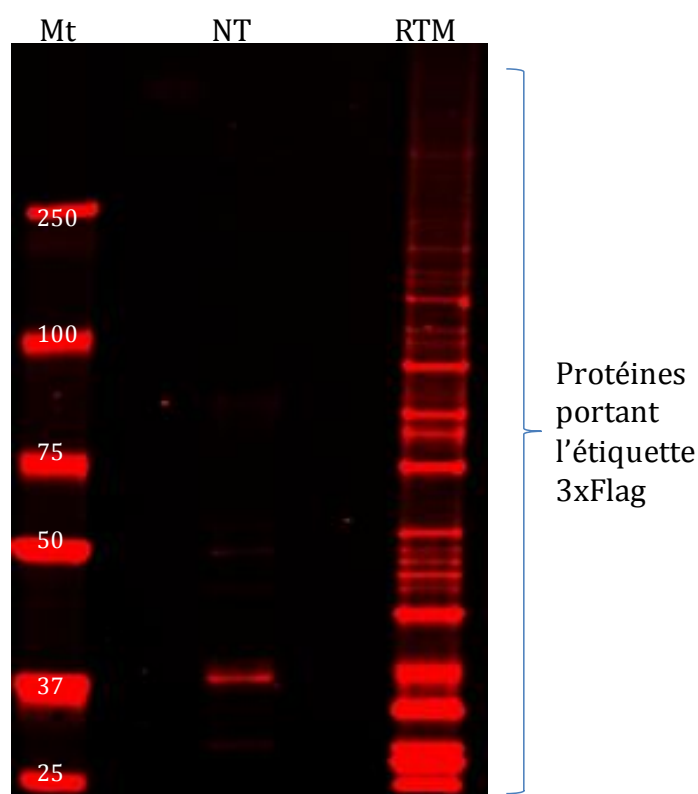


Figure 82 : profil protéique après IP Flag des cellules HT1080 transfectées par le RTM1hDysf

Des immunoprécipitations par le Flag (FlagM2 sigma, produit en souris) ont été réalisées à partir de lysat de cellules HT1080 transfectées avec le pAAV-RTM1-hDysf (RTM) ou non (NT). La fraction protéique récupérée a été séparée sur gel d'acrylamide puis analysée par WB. L'anticorps primaire utilisé est un autre anticorps anti-Flag (Sigma, produit en lapin) qui a été révélé par un anticorps secondaire anti-lapin portant un fluorophore Odyssey 680 nm. Une multitude de protéines portant l'étiquette Flag sont révélées dans les cellules ayant été transfectées par le pAAV-RTM1-hDysf.

IV. Conclusion

Nous avons construit plusieurs RTM visant à *trans*-épisser la dysferline humaine et murine, avec pour objectif de faire la démonstration de la faisabilité d'une telle approche chez l'Homme et d'en établir l'efficacité thérapeutique sur le modèle de souris *Dysf*^{-/-}.

Nous avons démontré sur un modèle minigène qu'une protéine résultant du *trans*-épissage pouvait être détectée, mais que la détection par RT-PCR de l'ARN chimérique résultant du *trans*-épissage ne pouvait pas être considérée comme probante dans notre cas. La technique de RT-PCR utilisée est en effet capable de créer la molécule chimérique attendue à partir de deux molécules distinctes. Les molécules chimériques que nous avons observées lors d'essais de *trans*-épissage de la dysferline endogène (humaine et murine) ne peuvent donc pas être imputées de façon certaine à un phénomène de *trans*-épissage. La protéine résultant du *trans*-épissage doit être montrée pour pouvoir conclure à la faisabilité de cette approche chez l'Homme. Des travaux sont actuellement menés en ce sens en optimisant les RTM utilisés. L'évaluation de l'efficacité thérapeutique de cette stratégie sur le modèle de souris *Dysf*^{-/-} n'est pas envisageable en l'état.

Sur un autre aspect, nous avons mis en évidence que le RTM pouvait être traduit en protéine de façon autonome, et que l'élimination des ORF présentes sur sa séquence ne suffisait pas à empêcher cette expression. En cherchant à *trans*-épisser la dysferline endogène, nous avons également montré que le RTM, par un mécanisme non élucidé, provoquait la création de multiples protéines portant au moins une partie de sa séquence codante. Ces deux éléments sont à prendre en considération pour l'optimisation du *trans*-épissage de la dysferline.

DISCUSSION |

Les études présentées dans ce mémoire ont eu pour objectifs de proposer et de tester différentes approches thérapeutiques innovantes pour les dysferlinopathies. La première approche évaluée a consisté à compenser l'absence de la dysferline par une minidysferline apportée par vecteur AAVr. Nous avons conclu de nos expériences sur des souris déficientes en dysferline, que l'expression de cette forme courte permet une restauration partielle de la protection des fibres musculaires, sans pour autant entraîner une amélioration du profil dystrophique du muscle. Nous avons également observé que la surexpression de cette forme présentait un caractère délétère pour le muscle. Une deuxième étude a permis de conclure que la surexpression de l'anoctamine 5 (pourtant impliquée dans des pathologies et des activités similaires à la dysferline), ne permettait pas de compenser l'absence de la dysferline. Aucun des paramètres étudiés, y compris la capacité de réparation membranaire des fibres traitées, n'a été amélioré par la surexpression d'ANO5 dans le modèle Bla/J. Enfin, nous avons montré qu'une stratégie par *trans*-épissage de la partie 3' terminale de la dysferline était possible, mais que la très faible efficacité de cette approche ne permettait pas, pour l'heure, d'obtenir une protéine corrigée détectable. L'étude menée *in cellulo* nous a conduit à identifier et caractériser des limites techniques liées à cette approche, ainsi qu'à soulever des restrictions à l'application thérapeutique d'une telle méthode.

La présente discussion vise à replacer les résultats obtenus dans un contexte scientifique plus large afin d'en critiquer la pertinence. Ce travail de réflexion permettra l'élaboration de perspectives de travail. Ce chapitre est organisé en deux parties, l'une discutant des deux approches thérapeutiques par apport direct d'ADNc *via* un vecteur AAV chez l'animal, et l'autre, de la chirurgie des ARN par le SMaRT.

I. Thérapies géniques compensatrices par AAVr

A. Compensation avec une miniforme

1. Origine de la séquence BrainDysferlin

L'utilisation de la BrainDysferlin ne repose pas sur son observation chez un patient, mais sur la description d'un variant d'épissage de la dysferline, spécifique au cerveau humain. Nous avons montré en la comparant à la séquence complète du génome humain que la séquence publiée ne correspondait pas à une séquence biologique probable. Par une recherche RT-PCR, nous avons également prouvé expérimentalement que cette séquence n'était pas amplifiable sur des ARN de cerveau humain. Le transgène utilisé dans cette étude n'est donc pas une isoforme naturelle, mais une miniforme synthétique de la dysferline, portant une séquence spécifique en N-terminal.

En comparant le variant d'épissage décrit au génome humain, nous avons déterminé que la séquence présente au début de ce variant correspond à un fragment de l'intron 1 du gène codant l'Ankyrine-2. Ce gène est porté par le chromosome 4, alors que DYSF est sur le chromosome 2. Les séquences chimériques issues de loci non contigus ne peuvent être générées que par translocations chromosomiques ou par *trans*-épissage d'ARNm. Même si des événements de *trans*-épissage ont été prouvés chez l'Homme (Breen and Ashcroft 1997; Li, Li et al. 1999; Flouriot, Brand et al. 2002), il est peu probable qu'un de ces mécanismes biologiques puisse expliquer la fusion des deux séquences considérées dans notre cas. En particulier, l'évènement de *trans*-épissage peut être exclu car il n'y a pas de site donneur d'épissage au niveau de la séquence d'ANK2.

Il est en revanche plus probable qu'un mécanisme artéfactuel, souligné à une autre occasion dans ce rapport, en soit la cause : la possibilité pour les enzymes assurant la transcription inverse de changer de matrice en cours de synthèse (Cocquet, Chong et al. 2006). La séquence de la BrainDysferlin décrite dans le brevet a été obtenue en criblant une banque commerciale de clone d'ADNc. La génération de ces clones est nécessairement passée par une étape de transcription inverse qui a pu générer cet artéfact. La récente prise en considération de ce problème amène d'ailleurs à réviser les données laissant à penser que le *trans*-épissage est un évènement répandu chez l'Homme. Il a en effet été publié que les bases de données contenaient un grand nombre de transcrits chimériques, toutes espèces confondues (Akiva, Toporik et al. 2006; Gingeras 2009) et que 1% de tous les transcrits

chimériques pourraient être le résultat de *trans*-épissage (Romani, Guerra et al. 2003). La plupart des séquences chimériques dans les bases de données pourraient être des résultats d'artéfacts (Houseley and Tollervey 2010). L'écart important entre le nombre d'ARN chimériques décrits et de protéines chimériques réellement signalées à ce jour (rapport de l'ordre de 100:1) plaide en faveur de cette hypothèse (Frenkel-Morgenstern, Lacroix et al. 2012).

2. Intérêts/inconvénients d'une miniforme

La BrainDysferlin a été utilisée dans ces travaux comme une miniforme à visée thérapeutique sur un modèle de souris déficient en dysferline. Cette miniforme comporte le désavantage de porter dans sa région N-terminale une séquence protéique non répertoriée dans les bases de données. Ce peptide pourrait avoir une incidence importante sur le potentiel immunogène de la miniforme BrainDysferlin, discuté plus bas dans ce rapport. Cependant, elle correspond à une partie de la dysferline plus grande que celle codée par la minidysferline analysée antérieurement (domaines C2D à transmembranaire inclus, voir **Figure 83**).

Les miniformes sont depuis longtemps considérées comme une approche pertinente de thérapie génique. Elles sont en particulier utilisées pour contourner les difficultés à apporter les grands ADNc en thérapie génique utilisant des vecteurs AAVr. La première démonstration utilisant une miniforme comme approche thérapeutique pour une maladie neuromusculaire fut réalisée sur la maladie de Duchenne (Ragot, Vincent et al. 1993). Dans ce travail, c'est une isoforme naturelle, décrite comme provoquant un phénotype beaucoup plus léger (la Dystrophie de Becker) qui a été utilisée comme transgène (England, Nicholson et al. 1990). En utilisant une forme courte connue de la protéine d'intérêt, les auteurs soulignaient pouvoir anticiper le bénéfice thérapeutique, à l'inverse de la création d'une miniforme *de novo*. Pour la dysferline, une isoforme courte identifiée chez un unique patient ayant un phénotype très modéré et tardif, a été évaluée sur un modèle murin de dysferlinopathie (Krahn, Wein et al. 2010). De façon inattendue, cette isoforme n'a pas permis l'amélioration du phénotype des souris traitées, seule la capacité de réparation des membranes a été restaurée (Lostal, Bartoli et al. 2012). Il n'est donc pas systématique qu'une isoforme courte décrite dans une forme modérée d'une maladie puisse être utilisée comme transgène thérapeutique pour les patients atteints plus sévèrement. L'absence de corrélation entre le phénotype léger observé chez le patient exprimant la minidysferline et

son efficacité comme transgène thérapeutique (inefficace en l'occurrence) doit faire prendre conscience que le transfert des enseignements tirés de l'observation des patients ne peut être directement traduit en stratégie thérapeutique. Une stratégie comparable est parfois utilisée pour identifier les exons pouvant être la cible de stratégies de sauts d'exons. Ces exons sont définis après l'observation de formes tronquées d'une protéine d'intérêt chez des patients peu ou pas affectés (Nelson, Crosbie et al. 2009; Wein, Avril et al. 2010). Même si une stratégie de ce type reste fondée, les outils thérapeutiques qui en résultent doivent impérativement être validés expérimentalement.

B. Compensation par une tierce protéine

L'apport de l'anoctamine 5 humaine dans les souris déficientes en dysferline n'a pas permis de restaurer les paramètres étudiés tels que l'histologie du muscle et la réparation membranaire, connus pour être affectés dans le modèle murin de dysferlinopathies Bla/J. Cette stratégie thérapeutique a été développée en se basant sur deux constatations : une similarité des phénotypes lorsque l'anoctamine 5 et la dysferline sont mutées, et une implication commune dans la réparation membranaire. La pertinence de cette stratégie a été renforcée par l'identification d'une sous-expression secondaire d'ANO5 en cas d'absence de dysferline. Les stratégies de compensation développées jusqu'alors en thérapie génique se basent essentiellement sur une homologie de séquence, comme l' ϵ -sarcoglycane remplaçant l' α -sarcoglycane impliquée dans la LGMD2D (Liu and Engvall 1999; Imamura, Mochizuki et al. 2005) ou l'utrophine compensant l'absence de dystrophine (Fairclough, Bareja et al. 2011). Cette stratégie s'est avérée inefficace pour la dysferline (avec la myoferline) (Lostal, Bartoli et al. 2012). L'idée de compenser une protéine par une autre protéine très différente mais potentiellement impliquée dans la même voie pathologique est nouvelle et méritait d'être testée.

Il faut tout de même noter que l'absence d'efficacité thérapeutique pourrait être due à un événement ayant masqué, ou empêché la compensation de la dysferline par l'anoctamine 5. Le transgène utilisé est l'anoctamine 5 humaine. Ce choix a été fait afin de pouvoir distinguer le transgène de l'anoctamine 5 murine exprimée de façon endogène et en raison de notre volonté de développer des AAVr rapidement transposables dans des essais précliniques. Plusieurs risques sont associés à ce choix, et doivent être pris en considération. Le premier est la possibilité accrue d'une réponse immune contre le transgène. En effet, malgré une forte homologie de séquence entre l'ANO5 humaine et

murine (86%), une réaction immune contre l'anoctamine 5 humaine ne peut pas être exclue. Nous n'avons pas noté la présence d'infiltrats inflammatoires dans le muscle ou le cœur. Toutefois, nous n'avons pas recherché spécifiquement une réponse immune contre l'anoctamine 5 humaine. Un test par ELISA permettant la détection de la présence d'un anticorps anti-hANO5 circulant dans le sang pourrait être envisagé. Un autre risque associé à l'utilisation d'ANO5 humaine est une conformation tertiaire erronée, créant une protéine inactive chez la souris, ou une reconnaissance par le contrôle qualité du réticulum endoplasmique et une dégradation de la protéine (Nishikawa, Brodsky et al. 2005; Lederkremer 2009). La protéine humaine pourrait également manquer d'affinité avec des partenaires essentiels à une activité normale chez la souris, ou encore présenter des problèmes d'ancrage à la membrane.

Finalement, le point positif de cette approche aura été de développer un AAVr codant l'anoctamine 5 humaine, efficace en IM et en IV, et ne présentant pas de toxicité chez la souris. Ce vecteur est donc utilisable dans une approche thérapeutique des LGMD2L et MMD3 sur le modèle murin KO ANO5 en cours de développement au laboratoire.

C. La toxicité des transgènes

1. La toxicité de l'isoforme BrainDysferlin

Deux marqueurs de toxicité différents ont été observés suite à la surexpression de la BrainDysferlin dans les souris C57Bl6 : l'un a été l'augmentation de l'indice de centronucléation, corrélé à la dose de vecteur injectée, l'autre l'apparition de foyers inflammatoires dans le muscle.

La surexpression de la dysferline entière est toxique, comme cela a pu être démontré sur un modèle murin exprimant 36 fois le niveau habituel de dysferline (Glover, Newton et al. 2010) (voir Introduction partie II C 2). La surexpression d'une forme courte de la dysferline, dans des valeurs de surexpression équivalentes, est également toxique (Lostal, Bartoli et al. 2012). Cette minidysferline ne contient que les domaines C2F et C2G, et le domaine transmembranaire. L'isoforme BrainDysferlin contient les domaines C2D à G et le domaine transmembranaire (**Figure 83**). La BrainDsferline est donc une minidysferline augmentée des domaines C2D et C2E. Il n'est donc pas surprenant d'observer une toxicité liée à la surexpression de cette protéine. La présence de la séquence illégitime ANK2 en amont de la demi-dysferline doit également être prise en compte, et les résultats devraient

être réévalués avec une miniprotéine sans cet élément. Le fragment intronique de l'ankyrine-2 (codant les 24 acides aminés spécifiques de la BrainDysferline) ou le point de fusion des séquences ankyrine-dysferline pourraient provoquer une réponse immunitaire ou une cytotoxicité. L'observation de foyers d'inflammation à la dose de $1.10e11$ vg/kg souligne une possible réponse tardive contre le transgène. Les données obtenues avec la BrainDysferline sont toutefois concordantes avec celles obtenues pour la minidysferline et on peut présager que cette modification de la construction n'éliminera pas son caractère toxique lorsqu'elle est exprimée au dessus du niveau endogène habituel.

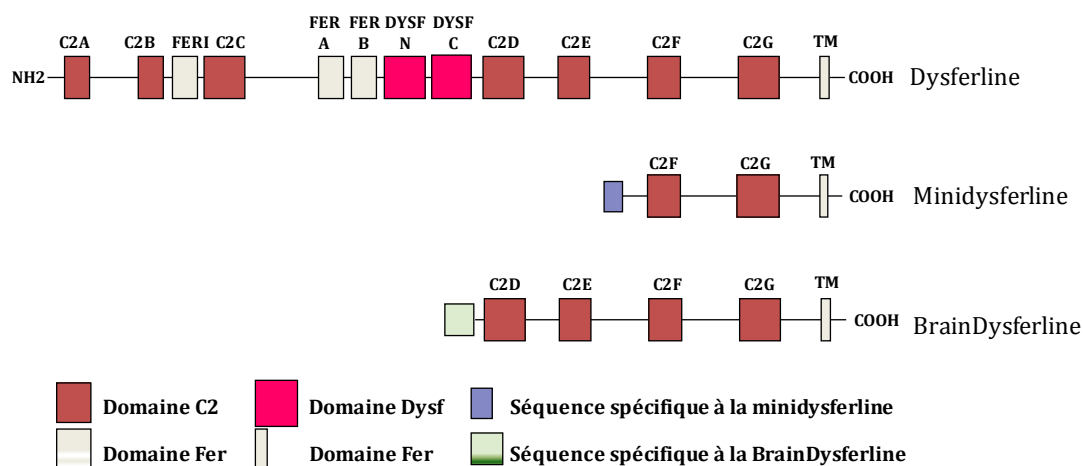


Figure 83 : représentation schématique de la dysferline et des miniformes Minidysferline et BrainDysferlin

2. La non toxicité de l'anoctamine 5

Nous avons obtenu par injection d'AAV8r codant l'ANO5, des niveaux d'expression très élevés comparés au niveau d'expression habituel dans un tissu humain (72 fois supérieur dans le muscle, et de près de 100 fois dans le cœur). L'absence de toxicité malgré cette nette surexpression de l'anoctamine 5, permet d'envisager un traitement par thérapie génique des LGMD2L et MMD3. Une approche directe de vectorisation de l'ADNc complet, sous le contrôle d'un promoteur fort peut être envisagée. Il faut toutefois modérer la portée de cette observation, la toxicité d'ANO5 n'ayant peut être pas été établie en évaluant les bons paramètres. En effet, la fonction d'ANO5 n'est pas connue, donc les critères que nous avons évalués ne sont peut être pas pertinents. Une toxicité pourrait jouer sur des processus ne conduisant pas à la dégradation/régénération des fibres (mesurée par l'indice de centronucléation) ou à la sensibilité des membranes (évaluée par le LSI et le test de réparation membranaire) mais sur d'autres paramètres. En particulier, l'ANO5 pouvant être

un canal au chlore, il pourrait être intéressant de vérifier que sa surexpression ne conduit pas à la perturbation du potentiel membranaire des fibres musculaires. Cette perturbation pourrait se traduire par une faiblesse musculaire plutôt qu'une augmentation de la centronucléation. On peut toutefois noter que la surexpression d'ANO5, comme celle des autres anoctamines, ne semble pas toxique *in cellulo*. En effet, les analyses fonctionnelles des anoctamines ont été réalisées par surexpression de protéines de fusion, et aucune toxicité n'a été rapportée (Duran, Qu et al. 2012; Perez-Cornejo, Gokhale et al. 2012; Tian, Schreiber et al. 2012).

D. Choisir la bonne cible thérapeutique

La dysferline n'est pas exprimée seulement dans le muscle squelettique mais aussi dans d'autres tissus tels que le cœur, le placenta, les poumons, le foie ou encore dans des tissus plus spécifiques comme les cellules endothéliales vasculaires (Ho, Gallardo et al. 2002; Vandre, Ackerman et al. 2007; Leung, Utokaparch et al. 2011). Aucune étude de cas cliniques n'a démontré de symptômes associés à une absence de dysferline dans le poumon ou le foie. De même, le placenta ne présente pas de malformation ou dysfonction notoire. Dans le cadre d'un essai clinique, il ne semble donc pas obligatoire de cibler ces tissus. En revanche, le dépôt amyloïde observé dans les vaisseaux sanguins de certains patients (Spuler, Carl et al. 2008; Rosales, Gastier-Foster et al. 2010) pourrait être associé à une altération fonctionnelle des cellules endothéliales vasculaires. De plus, l'absence de la dysferline dans ces cellules réduit l'angiogenèse, par absence de régulation du trafic des vésicules contenant PECAM-1 (Sharma, Yu et al. 2010). Dans le cadre d'une thérapie, restaurer un phénotype normal au muscle atteint nécessitera probablement la genèse de nouveaux vaisseaux sanguins. Il pourrait donc être nécessaire de considérer les cellules endothéliales vasculaires comme une cible importante à traiter. Dans le tissu cardiaque, une fréquence assez élevée de faibles anomalies a été rapportée chez des patients et chez la souris déficiente (Choi, Park et al. 2010; Rosales, Moser et al. 2011). Il ne semble toutefois pas que ces atteintes portent préjudice au malade (Wenzel, Geier et al. 2007) ; cibler le tissu cardiaque ne semble donc pas nécessaire, mais une surveillance doit être envisagée en cas de traitement.

Il est probable que d'autres tissus, encore non identifiés, expriment la dysferline ou une isoforme de la dysferline. Si seule une atteinte physiologique du muscle est décrite aujourd'hui (les vaisseaux sanguins ne présentent pas d'altération physiologique

rapportée), il est légitime de se poser la question de l'effet de l'absence de la dysferline dans ces tissus, et de la potentielle nécessité de cibler ces organes dans une approche thérapeutique globale. Comment identifier ces tissus ? Et comment évaluer ceux dans lesquels la dysferline est nécessaire, et ceux où elle peut être absente sans incidence pathologique ? Les nouvelles technologies de séquençage doivent pouvoir répondre à la première question. Elles permettent en effet de dresser le transcriptome exhaustif d'un type cellulaire donné. Les cellules identifiées comme exprimant la dysferline (ou une isoforme) pourraient alors être plus précisément caractérisées.

A l'inverse, la surexpression de la dysferline dans certains tissus pourrait être indésirable. C'est potentiellement le cas dans le cerveau où elle est accumulée en cas d'Alzheimer (Galvin, Palamand et al. 2006). La dysferline étant toxique quand elle est surexprimée dans le muscle, il pourrait en être de même dans le cerveau. Il a été démontré qu'au moins les sérotypes d'AAV 1, 8 et 9 permettaient l'expression du transgène dans le système nerveux central (SNC) après une injection systémique (cortex, cervelet, bulbe olfactif et tronc cérébral) (Miyake, Miyake et al. 2011). Il y a donc un risque d'expression de la dysferline dans le cerveau en utilisant des vecteurs AAVr codant tout ou partie de la protéine en injection systémique. Il faut donc tenir compte du risque pour le SNC induit par ces approches, et en évaluer les conséquences.

E. Enseignements sur les fonctions de la dysferline et de l'Anoctamine 5

1. « L'autre » fonction de la dysferline

Comme la minidysferline (Krahn, Wein et al. 2010), la BrainDysferlin a montré dans nos expériences qu'elle permet une amélioration de la résistance de la membrane des cellules musculaires de souris déficientes en dysferline, sans pour autant corriger l'histologie des muscles. La quantification d'entrée de Bleu Evans après un exercice LSI n'est pas un outil de détection directe de la réparation membranaire, mais renseigne sur la capacité des fibres à maintenir une membrane intègre. Dans le cas d'un traitement du muscle de souris Bla/J avec la BrainDysferlin, ce paramètre est amélioré. Il faudrait évaluer par un test spécifique de la réparation membranaire (tir laser sur fibres isolées) la capacité réelle de la BrainDysferlin à intervenir directement dans la réparation membranaire pour pouvoir l'affirmer, mais on peut légitimement supposer qu'elle assumera le même rôle que la minidysferline.

La dualité observée entre la récupération fonctionnelle (réparation membranaire) et l'absence d'effet thérapeutique (histologie) souligne que la dysferline est très probablement impliquée dans un autre processus que la réparation membranaire. D'après les résultats obtenus avec la minidysferline, la présence des domaines C2F et C2G suffit à restaurer un mécanisme de réparation membranaire efficace. Différentes constructions de la dysferline où chacun des domaines C2 a été supprimé ont d'ailleurs démontré que les domaines C2F et G étaient suffisants à l'ancrage de la dysferline à la membrane plasmique et à son activité de réparation membranaire (Di Fulvio, Azakir et al. 2011; Azakir, Di Fulvio et al. 2012). La BrainDysferlin apporte ces deux domaines, plus les domaines C2D et C2E (voir **Figure 83**). Si ces deux domaines supplémentaires apportaient un avantage fonctionnel à notre miniforme, cela devrait se traduire par une amélioration histologique du muscle. Comme ce n'est pas le cas, on peut exclure la possibilité que la seconde fonction de la dysferline soit assurée par les domaines C2D et C2E.

Il faut envisager que la seconde fonction de la dysferline, dont la restauration permettrait une récupération phénotypique, soit conditionnée par la présence de tous ses domaines C2. Elle fait en effet partie des rares protéines à en posséder plus de deux, avec les synaptotagmines-like et les MCTP (Shin, Han et al. 2005; Min, Chang et al. 2007). La présence de mutations pathologiques dans tous les domaines C2 plaide également pour l'importance de chacun d'entre eux. Les synaptotagmines-like et les MCTP sont des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire, il est donc probable que la seconde fonction de la dysferline soit à rechercher dans ce domaine.

L'absence d'efficacité thérapeutique de la minidysferline et de la BrainDysferlin pourrait être également liée à l'interaction absente avec un partenaire protéique essentiel. La dysferline interagit en effet directement avec beaucoup de protéines, dont certaines dans sa première moitié (comme l' α -tubuline ou Ahnak).

Le manque d'efficacité thérapeutique de la BrainDysferlin laisse également supposer qu'une activité essentielle de la dysferline dans le muscle puisse être apportée par la première moitié de sa séquence. Malgré de nombreuses études menées pour identifier le rôle de chacun des domaines de la dysferline, cette spécificité reste non élucidée (Huang, Laval et al. 2007; Therrien, Di Fulvio et al. 2009; Evesson, Peat et al. 2010; Di Fulvio, Azakir et al. 2011; Leung, Utoakaparch et al. 2011; Azakir, Di Fulvio et al. 2012). En particulier, la fonction des domaines Dysf et Fer, présentant pourtant une architecture très spécifique, n'a

toujours pas été élucidée. La compréhension de l'activité de la dysferline est cruciale pour déterminer une stratégie thérapeutique, et un travail visant à identifier les fonctions de chaque domaine de la dysferline est donc en cours dans le laboratoire. S'il devait apparaître de cette étude que tous les motifs protéiques sont nécessaires aux activités de la dysferline, il faudrait fortement considérer les stratégies visant à apporter une dysferline complète, ou les stratégies thérapeutiques personnalisées tel que le saut d'épissage ou l'édition de gène.

2. L'anoctamine 5 dans la réparation membranaire

La surexpression d'ANO5 dans le modèle Bla/J n'a pas permis d'améliorer la résistance des fibres à un stress mécanique induit par le LSI, ni d'améliorer la capacité de réparation membranaire des cellules traitées. La surexpression de dysferline est elle capable d'améliorer ces paramètres (Lostal, Bartoli et al. 2010). On peut déduire de ces observations que si ANO5 intervient dans la réparation membranaire, c'est d'une façon sensiblement différente que la dysferline. Le laboratoire a créé un modèle murin déficient en ANO5 qui va permettre de vérifier, par un test de réparation membranaire sur fibre de FDB isolées, que l'absence d'anoctamine 5 conduit bien à un défaut de la réparation membranaire. Cette observation n'a en effet été décrite que par un groupe de recherche, sur des cellules de patients (Jaiswal, Marlow et al. 2007). La localisation intracellulaire d'ANO5 dans les vésicules et le réticulum endoplasmique (Duran, Qu et al. 2012) l'impliquerait plus dans le trafic des vésicules intervenant dans la réparation membranaire que dans un processus actif de réparation de la membrane. De façon intéressante, ANO6 qui est l'anoctamine la plus proche d'ANO5 d'un point de vue évolutif, (86% d'homologie) (Milenkovic, Brockmann et al. 2010) a été décrite comme ayant une activité de scramblase (Suzuki, Umeda et al. 2010). Les scramblases sont des enzymes membranaires capables de transporter les phospholipides chargés négativement de part et d'autre de la membrane phospholipidique où elles sont ancrées. Un tel rôle pour ANO5 est envisageable. Les mutations sur ANO5 pourraient provoquer la modification de propriétés physico-chimiques de vésicules intra-cytoplasmiques, telles que les enlargeosomes, et induire les difficultés observées dans la réparation membranaire chez les patients atteints de MMD3 ou LGMD2L. Si cette hypothèse s'avérait juste, la surexpression d'ANO5 n'aurait aucun impact pour des cellules déficientes en dysferline, toujours incapables de restaurer leurs membranes. Elle pourrait même expliquer l'aggravation d'incapacité de réparation membranaire des cellules traitées que nous avons observées (voir [Figure 59](#)). L'activité des scramblases peut être évaluée *in vitro*, en quantifiant le mouvement de phospholipides marqués (Francis, Majeed

et al. 2012). Un test équivalent peut être envisagé pour ANO5, comme présenté sur la **Figure 84**. L'évaluation de l'activité de scramblase peut également être menée *in vivo*, avec des inhibiteurs chimiques tels que le R5421 (Gonzalez, Gibbons et al. 2009).

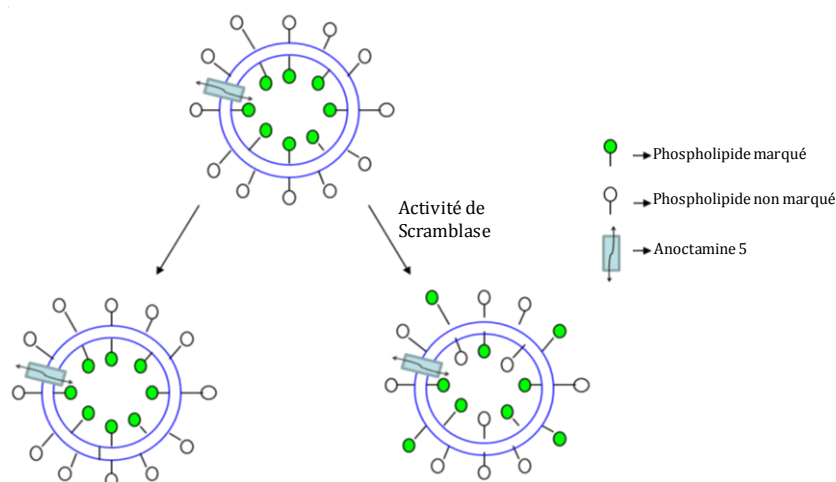


Figure 84 : Test de l'activité d'ANO5 en tant que scramblase

Dans un test *in vitro*, le suivi de l'entrée et de la sortie des phospholipides marqués dans les vésicules permet de déterminer si ANO5 est une scramblase ou non (Adapté d'après (Francis, Majeed et al. 2012)).

II. Thérapie génique par chirurgie des ARN *via* SMaRT

Comme nous l'avons déjà abordé, la surexpression dans le muscle de la dysferline complète ou d'une miniforme (minidysferline ou BrainDysferlin) présente un risque fort de toxicité (Lostal, Bartoli et al. 2010; Grose, Clark et al. 2012; Lostal, Bartoli et al. 2012). Par conséquent, il est très important que les approches de thérapie génique pour les dysferlines prennent en compte le contrôle de l'expression du transgène. Cette problématique est très étudiée à l'heure actuelle. Les pistes envisagées pour contrôler l'expression des transgènes consistent à choisir des promoteurs tissus spécifiques ou inducibles, réguler leur niveau d'expression par des miRNA endogènes, ou cibler des régions chromosomiques plus ou moins propices à la transcription par exemple pour y insérer le transgène (Bratkovic, Glavan et al. 2012; Lachmann, Brenning et al. 2012; Sakuma, Barry et al. 2012). Toutes ces améliorations sont toutefois limitées par un élément majeur : le patient. Chaque individu est en effet unique, et la régulation unilatérale d'un transgène sensible, aussi fine soit elle, ne pourra probablement pas convenir à un groupe de personnes forcément hétérogène. Les approches conservant le contrôle endogène de l'expression de la protéine d'intérêt ont donc un avantage majeur sur les autres approches de thérapie génique. La modification des ARN

messagers par le saut d'exon, la translecture de codon stop, l'édition d'ARN ou le SMaRT utilisé dans cette étude, permet de bénéficier de cet avantage.

A. Questions soulevées sur les techniques de mise en évidence de l'ARN *trans*-épissé

La mise en évidence de l'ARN résultant du *trans*-épissage nécessite plusieurs étapes de manipulation mettant en œuvre des techniques de chimie (extraction d'ARN) et de biologie moléculaire (RT et PCR). Nous avons identifié au niveau de ce protocole plusieurs points critiques, résumés sur la **Figure 85**, risquant de créer des artefacts majeurs en créant un ARN chimérique identique à celui recherché après *trans*-épissage. Pour deux d'entre eux (la transcription inverse (RT) et la réaction de PCR), nous avons montré que ces artefacts étaient effectivement présents, et qu'ils mimaient la molécule chimérique attendue. Ces observations soulignent que l'étude de l'ARN *trans*-épissé par RT-PCR n'est pas adéquate, et que probablement seule la détection de la protéine résultant du *trans*-épissage est concluante.

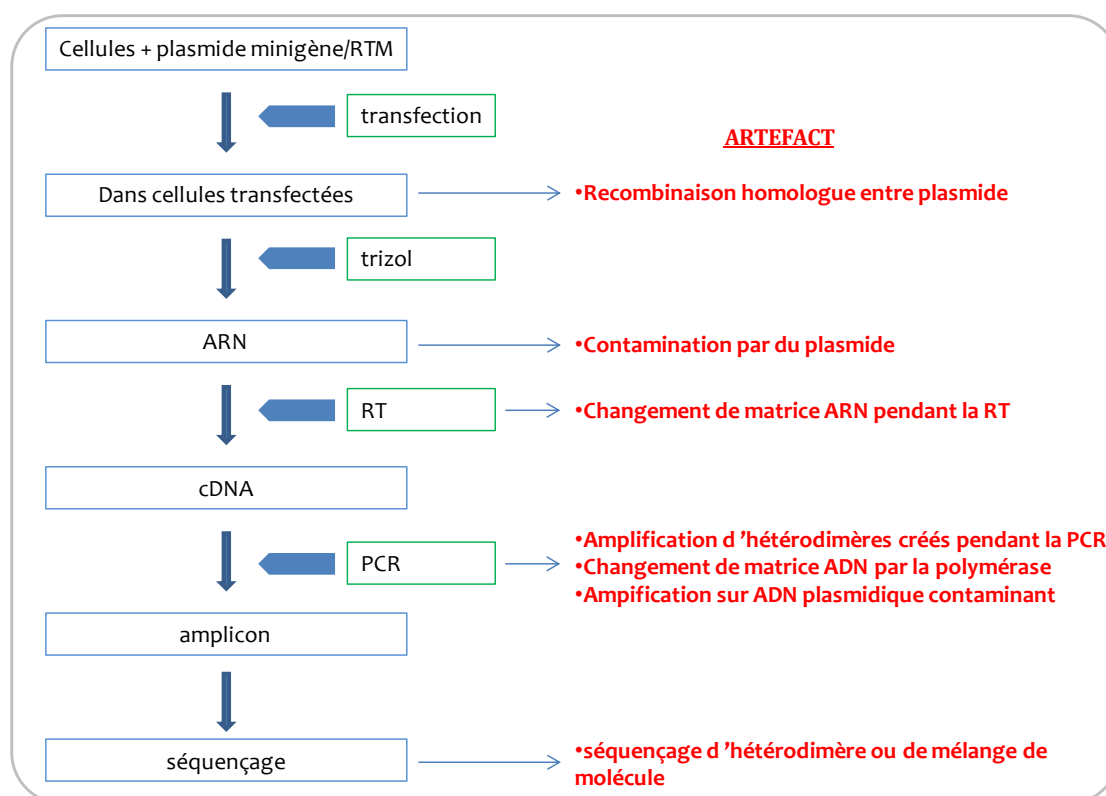


Figure 85 : liste des différents artefacts possibles durant la recherche de l'ARN *trans*-épissé

1. Les PCR sur plasmide

Dans les publications traitant du SMaRT, une partie seulement des artéfacts précédemment cités est prise en considération : celle d'une recombinaison des plasmides portant la séquence codant le minigène et le RTM *in cellulo* ou lors de la PCR. Les auteurs excluent cet artéfact en réalisant une PCR avec un couple d'amorces spécifiques de leur molécule chimérique soit directement sur un mélange de plasmide, soit sur les ADN extraits de cellules transfectées (Puttaraju, Jamison et al. 1999; Mansfield, Kole et al. 2000; Puttaraju, DiPasquale et al. 2001; Dallinger, Puttaraju et al. 2003; Coady, Baughan et al. 2008; Rodriguez-Martin, Anthony et al. 2009). Comme pour nous, aucune de ces PCR ne provoque l'amplification d'une séquence similaire au *trans*-épissage. Ce contrôle reste pertinent et doit être réalisé pour chaque approche de SMaRT. En effet, la capacité de la PCR à créer des chimères entre plasmides est reconnue, elle est même utilisée comme technique de biologie moléculaire pour le clonage (Erijman, Dantes et al. 2011). Ce contrôle est d'autant plus légitime, que les ARN sont souvent contaminés par les plasmides utilisés en transfection. Il est reconnu que la contamination des ARN par les plasmides utilisés en transfection est difficilement éliminable (Rio, Ares et al. 2010). Certains auteurs d'études sur le SMaRT précisent d'ailleurs en être victimes mais précisent, à juste titre, que cela n'influe pas sur leurs résultats (Rodriguez-Martin, Anthony et al. 2009).

2. Les contrôles plus complexes

Lors des expériences visant à détecter l'ARN *trans*-épissé sur le modèle minigène, nous avons observé avec des RTM non fonctionnels la création de molécules chimériques similaires à celles attendues. Ces RTM ont un domaine d'appariement non fonctionnel ou absent (RTM-hDysf-scBD et RTM-hDysf-dBD, respectivement), ou ne présentent aucun des éléments permettant le *trans*-épissage (RTM-hDysf-dBD-dIntS). L'observation d'évènements de *trans*-épissage avec des RTM non fonctionnels sont également présents dans la littérature (Kikumori, Cote et al. 2001; Puttaraju, DiPasquale et al. 2001; Rodriguez-Martin, Garcia-Blanco et al. 2005; Coady, Shababi et al. 2007), et les auteurs émettent l'hypothèse d'un *trans*-épissage non spécifique. Cette hypothèse ne concorde pas avec les résultats obtenus avec le RTM-hDysf-dBD-dIntS, qui est dénué de toute capacité de *trans*-épissage. Nous avons donc évalué la possibilité d'artéfacts induits durant nos tests.

Nous avons testé la possibilité de la RT à créer un unique ADNc à partir de deux ARN distincts, en glissant d'une matrice à l'autre. Nous avons pour cela tiré parti de l'observation faite par Houseley *et al.* : ce changement de matrice est différent selon les reverses

transcriptases utilisées (Houseley and Tollervey 2010). En réalisant une RT (avec l'enzyme RevertAid) sur un mélange d'ARN contenant le minigène et d'ARN contenant le RTM, nous avons obtenu la démonstration qu'une molécule mimant la molécule chimérique résultant du *trans*-épissage était produite. Comme décrit par Houseley *et al.*, cette molécule n'était pas présente avec une autre enzyme de RT (Verso). La différence observée entre les deux tests prouve l'implication de la RT dans cet artéfact. Une amélioration de ce contrôle pourrait être la production *in vitro* des ARN « pré-messagers » du RTM et du minigène, afin d'être assuré de leur pureté, et de les utiliser dans des RT-PCR de contrôle comme décrit ci-dessus.

Nous avons démontré que la PCR, réalisée sur des ADNc de minigènes mélangés à des ADNc de RTM, pouvait également produire une molécule chimérique. Cet artéfact pourrait être créé, comme pour la RT, par le glissement de la polymérase d'une matrice à l'autre (Odelberg, Weiss et al. 1995). Un autre mécanisme peut également expliquer ce résultat : une hybridation du minigène et du RTM durant la PCR, créant *in fine* la molécule chimérique attendue. Cette hypothèse, qui repose sur l'homologie de séquence existant entre le minigène et le RTM, est présentée dans la **Figure 86**. Elle pourrait expliquer les amplifications observées pour nos RTM non fonctionnels, similaires à celles attendues après *trans*-épissage.

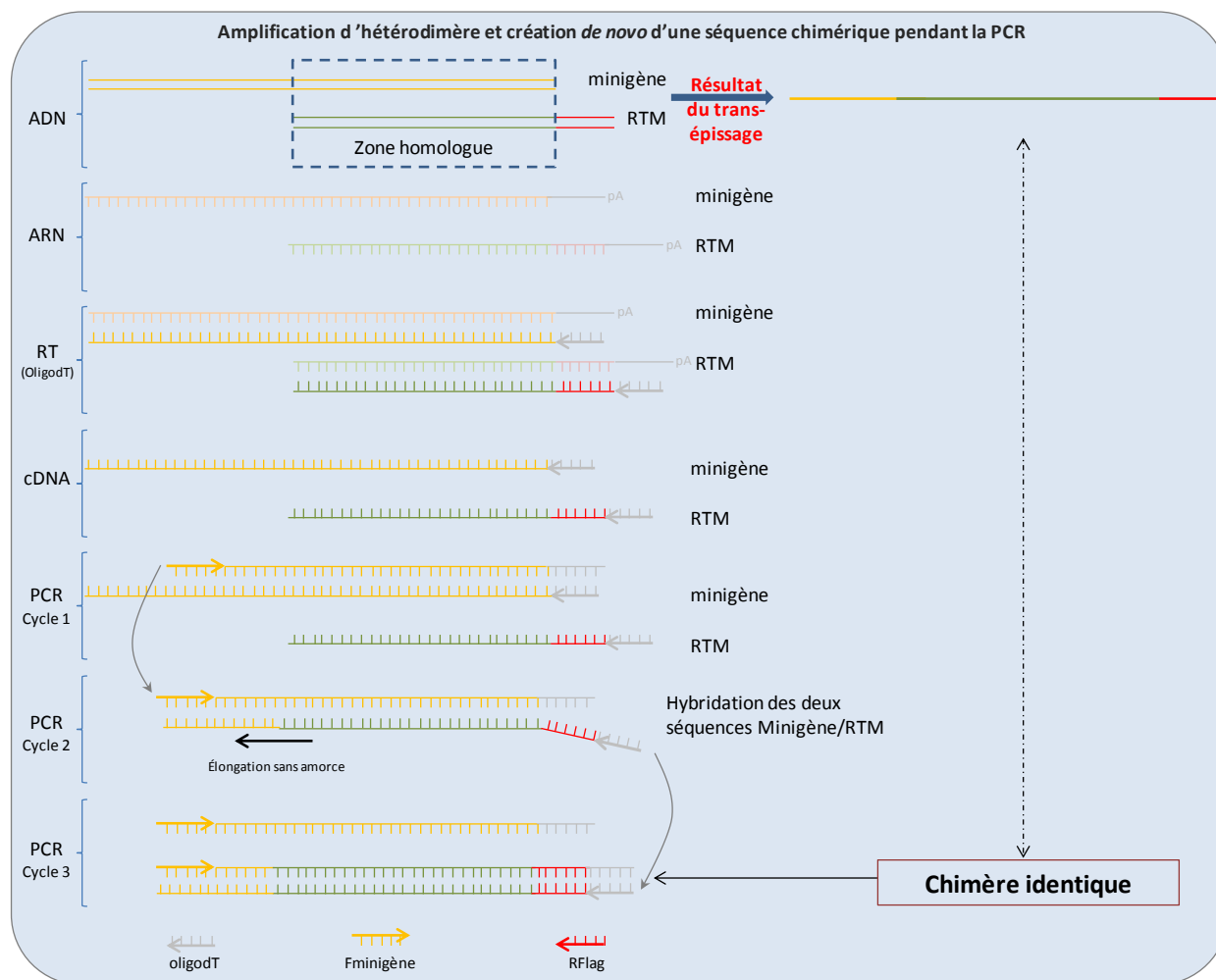


Figure 86 : création d'un artefact par appariement du minigène et du RTM durant la PCR

Une molécule mimant l'ARN *trans*-épissé peut être produite lors d'un protocole de RT-PCR. Au cours du second cycle de PCR, les ADN du minigène et du RTM s'hybrident, permettant une amplification sans l'intervention des amorces. C'est grâce à cette élongation que le début du minigène se retrouve fusionné au RTM. A partir du cycle 3, la molécule obtenue *de novo* est amplifiée de façon classique par les amorces présentes dans la réaction de PCR.

Par ces contrôles, nous avons prouvé l'existence d'artéfacts lors de la recherche de l'ARN *trans*-épissé liés à la RT et à la PCR. Il faudra en tenir compte à l'avenir, en particulier dans l'évaluation de l'efficacité de *trans*-épissage. Ces problèmes n'ayant jamais été soulevés dans la littérature, il faut avoir conscience qu'ils peuvent avoir faussé certaines données publiées.

B. Pertinence du modèle minigène

L'efficacité fonctionnelle du SMaRT a été prouvée à plusieurs reprises, et cela sur différentes maladies (pour revue, voir (Wally, Murauer et al. 2012)). Les approches initiales, et aujourd'hui l'initiation de nouveaux projets thérapeutiques, passent souvent par

la preuve de principe du SMaRT par double transfection « minigène – RTM ». Pour cela, le RTM ainsi que sa cible sont apportés de façon exogène dans une cellule eucaryote. La cible peut être une réplique du gène de la maladie étudiée, sous une forme de minigène porté par un plasmide, ou un gène rapporteur ne portant que l'intron ciblé par le RTM (voir annexe V)(Puttaraju, Jamison et al. 1999; Mansfield, Kole et al. 2000; Puttaraju, DiPasquale et al. 2001; Chao, Mansfield et al. 2003; Mansfield, Clark et al. 2003; Xu, Yue et al. 2004; Liu, Luo et al. 2005; Rodriguez-Martin, Garcia-Blanco et al. 2005; Coady, Baughan et al. 2008; Koller, Wally et al. 2011). L'avantage de ce système réside dans le fait que le niveau d'expression de la cible et du RTM peut être maîtrisé, permettant le plus souvent de détecter le résultat du *trans*-épissage aussi bien au niveau ARN que protéique. Mais une fois le meilleur RTM choisi, de nombreux auteurs décrivent une baisse de l'efficacité du *trans*-épissage obtenu sur une cible endogène (Coady, Baughan et al. 2008; Coady and Lorson 2010) (Liu, Jiang et al. 2002 et Mansfield, 2000 #673; Liu, Luo et al. 2005; Rodriguez-Martin, Garcia-Blanco et al. 2005)}(Wally, Brunner et al. 2010).

Dans notre approche, nous avons choisi de construire un minigène se rapprochant le plus possible de la cible endogène, qui puisse être cloné dans un plasmide (voir **Figure 66**). Cette stratégie avait pour but d'augmenter l'efficacité du *trans*-épissage en favorisant le recrutement des facteurs d'épissages mais surtout d'éviter la baisse de cette efficacité souvent observée lors du passage du système minigène au système endogène. L'intron cible choisi de DYSF (int48) est entouré de la séquence exacte de l'ARNpm de la dysferline endogène des exons 47 à 50. Ainsi, un complexe splicéosome peut se former intégralement sur l'intron précédant et celui suivant l'intron ciblé par le RTM. Dans notre cas, il n'est pas possible de dire si le rendement de *trans*-épissage a été augmenté en réalisant cette approche. Pour le savoir, il aurait été nécessaire de le comparer avec le rendement du même RTM ciblant un minigène portant les mêmes exons, mais avec seulement l'intron cible. Il apparaît en revanche clair que la construction d'un minigène proche de la cible endogène ne suffit pas à développer un RTM efficace sur sa cible endogène. En effet, les RTM ayant permis la production d'une protéine correspondant au minigène *trans*-épissé n'ont pourtant pas permis d'obtenir une protéine après *trans*-épissage de l'ARNpm de la dysferline. L'explication réside probablement dans le contexte cellulaire dans lequel nous avons mené nos expérimentations. Nos tests de *trans*-épissage ont été réalisés dans des types cellulaires différents pour le système minigène (HER911) et le système endogène (HT1080, HUVEC et myoblastes). Les régulateurs d'épissage, tels que les protéines SR ou

hnRNP, sont probablement exprimés à des niveaux différents dans nos deux modèles (l'épissage est en effet un processus tissu spécifique), provoquant des efficacités de *trans*-épissage très variables. C'est à ce titre que nous jugeons que la valeur du système minigène est limitée, de part son inadéquation à permettre le développement d'un RTM efficace sur une cible endogène.

C. L'expression du RTM seul

1. Le RTM est un transgène comme les autres

Lors de nos expériences, nous avons observé la présence de protéines résultant de la seule présence du RTM dans les cellules étudiées. Dans la littérature spécifique au SMaRT, l'expression directe de protéine(s) par le RTM n'a que rarement été décrite, et n'a pas été envisagée comme problématique. Le RTM, codant une partie de la β -Gal, développé par Puttaraju *et al.* produit des protéines qui lui sont spécifiques (Puttaraju, DiPasquale *et al.* 2001). Dans une des études de Coady *et al.* sur SMN, une protéine imputable à l'expression du RTM est visible sur le WB, mais les auteurs ne décrivent pas cette observation (Coady, Shababi *et al.* 2007). Certains RTM ne semblent pas coder de protéine du tout, comme dans le cas du rapporteur GFP utilisé par Koller *et al.* (Koller, Wally *et al.* 2011). De façon plus surprenante, l'utilisation de RTM avec une séquence codante très longue n'a pas été rapporté comme augmentant le risque d'expression d'une protéine tronquée, comme les RTM développés pour CFTR (Mansfield, Kole *et al.* 2000; Liu, Jiang *et al.* 2002) ou le collagène de type VII (Murauer, Gache *et al.* 2011). Ces résultats doivent être considérés avec précaution, car les auteurs ont pu omettre de préciser avoir observé de tels événements d'expression du RTM seul.

Si peu d'auteurs décrivent une possible expression du RTM seul, ils sont aussi peu nombreux à prendre en considération la possibilité que les protéines produites par l'expression des RTM soient des miniprotéines fonctionnelles. Par conséquent si seule l'activité de ces protéines est recherchée, elle peut être retrouvée par la seule présence d'une miniprotéine synthétisée par le RTM. Les tests d'activité des gènes rapporteurs comme la β -Galactosidase (Puttaraju, DiPasquale *et al.* 2001; Liu, Luo *et al.* 2005) ou de mise en évidence de la GFP (Murauer, Gache *et al.* 2011) pourraient ainsi en être faussés, ainsi que les tests fonctionnels des protéines visées dans un but thérapeutique (Coady, Baughan *et al.* 2008; Coady and Lorson 2010).

2. Le *cis* épissage du RTM crée des ORF imprévisibles

Nous avons fait la démonstration que plusieurs des protéines observées dans notre cas étaient dues à la présence d'ORF en phase avec l'étiquette 3XFlag. L'élimination des ATG initiant ces ORF a permis de prévenir l'expression de certaines protéines mais pas toutes, suggérant que d'autres mécanismes soient à l'origine de l'expression de ces protéines. En effet, il existe plusieurs évidences qui tendent à démontrer que le RTM est épissé en *cis* et que cet épissage permet, par la création de nouvelles ORF, la formation de protéines. La première évidence est que la modification de séquence au niveau des ATG 1 et 2 du RTM1-hDysf (voir **Table 10**) permet bien de faire disparaître les protéines à 32 et 31 kDa correspondantes mais également, et de façon beaucoup plus surprenante, la protéine observée à 60 kDa. La seconde évidence tient au fait qu'en changeant complètement la séquence nucléotidique codante du RTM (avec le RTM-OptiDysf), le profil d'expression protéique du RTM seul est complètement modifié (voir **Figure 79**). Dans ces deux exemples, aucune ORF modifiée ne peut être directement incriminée dans la modification du profil protéique observé. Une explication plausible est donc que des sites d'épissage soient changés par les modifications de séquences du RTM, et que l'utilisation de ces sites modifiés crée de nouvelles ORF après épissage. Dans la **Figure 87** ci-dessous, un exemple théorique d'épissage en *cis* des RTMh-Dysf et RTMh-OptiDysf est proposé. Un même site donneur est utilisé, mais la modification de la séquence codante du RTM provoque un changement de site accepteur. Dans les deux cas un codon ATG peut être utilisé pour produire une protéine, plus ou moins longue, en phase avec le 3XFlag. L'épissage en *cis* pourrait également être influencé par le site d'appariement ; c'est ce que semble démontrer le profil d'expression du RTM5-hDysf (différent des quatre autres RTMh).

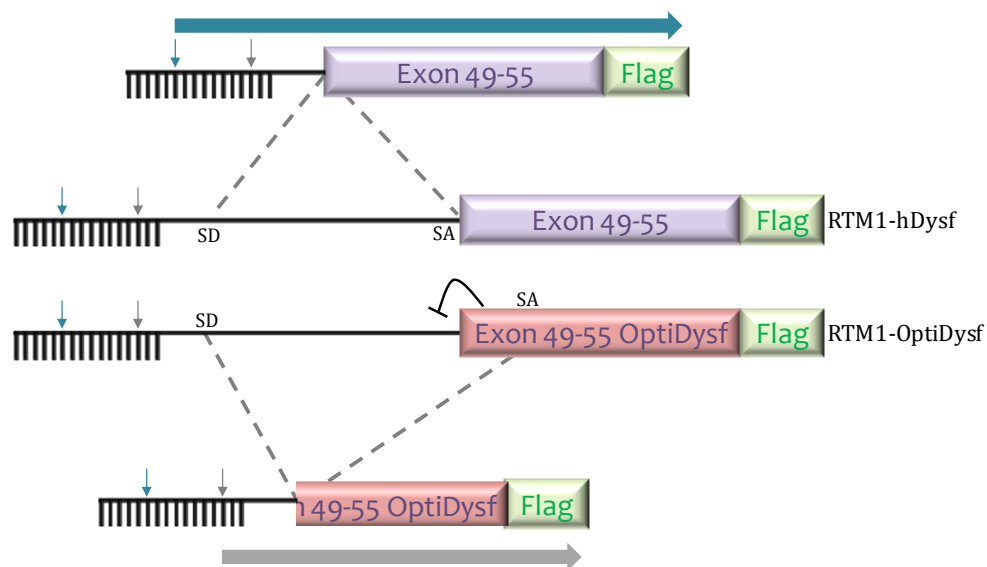


Figure 87 : l'épissage en cis des RTM1-hDysf et RTM-OptiDysf crée des protéines de tailles différentes

L'ARN résultant de l'expression du RTM1-hDysf ou RTM-OptiDysf peut être traité comme un ARNpm, et donc être épissé. La séquence « codante » des RTM étant différente, des sites d'épissage (majeurs ou mineurs) sont susceptibles d'être modifiés. Dans le cas hypothétique présenté ici, le RTM1-hDysf est épissé depuis un site donneur présent sur l'intron synthétique à un site accepteur fort prévu pour le *trans*-épissage. L'ARN produit après épissage peut coder une longue protéine grâce à un ATG (flèche bleue) présent dans le domaine de liaison. Dans le cas du RTM-OptiDysf, un ISS fort créé sur la séquence recrute des protéines de type hnRNP, défavorisant l'utilisation du SA du *trans*-épissage au profit d'un SA cryptique dans la séquence « codante » du RTM. L'épissage qui en résulte crée une ORF plus courte, utilisant un ATG (flèche grise) qui n'est pas dans la même phase de lecture que l'ATG précédemment cité (flèche bleue). Ce modèle est purement hypothétique, car l'évaluation des scores des SA, SD, et éléments régulateurs d'épissage connu (ISE, ISS, ESE, ESS) permet d'imaginer des milliers de combinaisons possibles.

Le *cis* épissage du RTM n'a jamais été abordé dans la littérature. Il serait intéressant de pouvoir vérifier si les protéines observées avec le PTMCF24 de Puttaraju *et al.* dans sa première description du *trans*-épissage sont dues à la seule présence d'ORF sur le RTM et/ou si un épissage en cis peut expliquer la présence de certaines (Puttaraju, DiPasquale *et al.* 2001). Nous émettons la suggestion aux autres chercheurs travaillant sur cette problématique de prendre en considération cette hypothèse.

La possibilité de s'affranchir du *cis*-épissage du RTM semble très problématique. En effet, avant de pouvoir maîtriser cet évènement, il faudrait pouvoir en prévoir/déterminer les acteurs. L'identification de différents variants d'épissage est possible par RT-PCR en utilisant des amorces ciblant les régions théoriquement non codantes du RTM. Dans notre cas, nous n'avons utilisé que des amorces ciblant les parties codantes, elles ne nous permettent donc pas de détecter si les parties régulatrices du RTM sont incluses dans un ARNm codant. Il nous faudrait réaliser ces PCR de contrôle. Des techniques de séquençage à

haut débit, comme le RNA-seq, peuvent également être envisagées. Identifier les sites responsables de l'épissage en *cis* pourrait alors permettre leur modification, pour en limiter (voire empêcher) l'action. Une autre possibilité serait de provoquer le repliement du RTM sur lui-même, comme l'a proposé Puttaraju (Puttaraju, Jamison et al. 1999). Cette technique, dite de « safety », masque le site d'appariement par une séquence complémentaire imparfaite. Cette idée a été développée afin de limiter le risque d'appariement non spécifique du RTM, mais apparaît également intéressante pour limiter le cis-épissage du RTM.

3. L'expression du RTM en tant que transgène limite l'intérêt du *trans*-épissage

L'expression du RTM seul limite son efficacité puisque tout ARN qui est utilisé pour l'épissage et/ou la traduction signifie qu'il n'a pas été utilisé de façon optimale pour le *trans*-épissage. Cette expression inattendue du RTM représente surtout un risque toxique non négligeable, tout au moins dans notre cas. En effet, comme présenté ci-dessus, la surexpression de minidysferline est toxique (Lostal, Bartoli et al. 2012). Le RTM que nous utilisons porte une séquence courte de la dysferline (exons 49 à 55), suffisante pour produire une miniforme comportant le domaine C2G et le TM, qui pourrait s'avérer toxique. L'observation de l'expression du RTM seul pose donc un problème majeur de sécurité de la technique SMaRT, d'autant plus que comme nous l'avons montré, une partie des protéines produites par le RTM résulte d'un mécanisme complexe d'épissage en *cis*, difficilement prédictible et donc maîtrisable. Il est primordial dans notre cas de s'affranchir de ces problèmes de traduction du RTM avant de réaliser des essais sur la dysferline *in vivo*. Ce problème doit également être pris en compte dans les autres approches par SMaRT susceptibles de donner lieu à des essais cliniques.

D. Perspectives thérapeutiques pour les dysferlinopathies

1. Améliorer l'efficacité du *trans*-épissage

Comme cela a été présenté au début de cette discussion, les approches conservant le contrôle endogène de l'expression de la protéine d'intérêt ont un avantage majeur sur les autres approches de thérapie génique des dysferlinopathies. En l'état, le *trans*-épissage de la dysferline n'est pas envisageable en préclinique, mais l'efficacité observée au niveau protéique sur le minigène est suffisante pour faire la preuve de principe que le *trans*-épissage peut être assez puissant pour permettre la reprogrammation de la dysferline. Des

optimisations sont donc à mener au niveau des RTM pour augmenter l'efficacité de *trans*-épissage de la dysferline endogène.

ISE/ISS et ESE/ESS

Dans nos travaux, l'optimisation de la séquence intronique régulant le *trans*-épissage n'a pas été traitée. Cette séquence apparaît pourtant comme cruciale dans l'évènement recherché. Nous avons eu l'occasion de modifier la balance ISE/ISS, en éliminant des ISS potentiels et en favorisant un ISE musculaire fort (Bolognani and Perrone-Bizzozero 2008) (données non présentées), mais nous n'avons pas observé d'effet sur l'efficacité de *trans*-épissage avec nos outils de mesure (RT-PCR et WB). De récentes publications décrivent avec précision les facteurs régulant l'épissage depuis l'intron, comme le travail de Wang et ses collaborateurs (Wang, Ma et al. 2012). Les séquences décrites pourraient être incluses à l'intron synthétique de nos RTM pour en optimiser l'efficacité. Il peut également être intéressant de modifier les ESE et ESS présents sur la séquence codante du RTM, mais cette approche est partiellement limitée par la nécessité de ne pas modifier la séquence d'acides aminés codée par le RTM.

Domaines de liaison

Les domaines de liaison (BD) ont une importance primordiale dans l'efficacité d'un RTM (Dallinger, Puttaraju et al. 2003; Tahara, Pergolizzi et al. 2004; Koller, Wally et al. 2011; Shababi and Lorson 2012). Nous en avons testé plusieurs mais il est impossible d'envisager un large crible avec les techniques de clonage que nous avons utilisées. Koller *et al.* ont montré qu'il était possible de générer un grand nombre de RTM avec des BD différents en fractionnant l'intron cible, et en clonant ces fragments en tant que BD (Koller, Wally et al. 2011). Cette étude était possible car le gène *trans*-épissé était un gène rapporteur (GFP) permettant un crible facile des RTM efficaces. Dans le cadre d'un gène à visée thérapeutique, il pourrait être envisagé de faire appel à des entreprises spécialisées, comme VIRxSYS (VIRxSYS Corporation, Gaithersburg, MD).

Structures secondaires des RTM

Les structures secondaires formées par l'ARN doivent être prises en compte dans la construction des RTM. Elles jouent en effet un rôle important dans l'assemblage et l'activité du spliceosome (McManus and Graveley 2011; Lange, Maticzka et al. 2012). Lors du développement d'une stratégie de « safety » similaire à celle proposée par Puttaraju *et al.* (Puttaraju, Jamison et al. 1999), nous avons étudié la formation des structures secondaires

de nos RTM (logiciel utilisé : CLCBio). Ils forment systématiquement des structures secondaires complexes. Il serait intéressant de chercher à étudier ces structures en les modifiant, en jouant sur la composition de la séquence de l'intron synthétique par exemple, et de déterminer celles optimisant la réaction d'épissage en *trans*.

Localisation des RTM

Plusieurs auteurs ont émis l'idée que le mécanisme de *trans*-épissage nécessitait une proximité spatiale lors de la génération des transcrits impliqués (Roux, Leveziel et al. 2006; Viles and Sullenger 2008). Cette idée a été confirmée par Khrameeva et ses collaborateurs qui ont révélé une structuration de la chromatine en régions exprimant des groupes de gènes dont les transcrits sont retrouvés fusionnés (Khrameeva, Mironov et al. 2012). Cette observation pourrait expliquer la différence d'efficacité de *trans*-épissage obtenue sur le minigène et l'ARNpm endogène. En effet, les deux plasmides (minigène/RTM) seraient exprimés conjointement dans le noyau, alors que le RTM pourrait se retrouver distant de sa cible ARNpm endogène. Cette hypothèse est évaluable en comparant l'efficacité de *trans*-épissage obtenu dans deux conditions bien distinctes : (i) la transfection d'un plasmide unique portant le RTM et le minigène (ii) la transfection d'un plasmide portant le RTM et d'un plasmide portant le minigène avec deux outils bien différents comme la lipofection et la nucléofection. Dans le premiers cas, les ARN produits devraient être très proches, contrairement à la seconde expérience.

2. Envisager d'autres possibilités thérapeutiques pour les dysferlinopathies

Comme je l'ai précisé dans ce rapport, les thérapies basées sur l'apport direct de tout ou partie de la séquence codant la dysferline se heurtent à une possible toxicité induite par une expression trop importante du transgène. Cette toxicité n'est pas due à une réponse immunitaire mais bien à une toxicité directe, encore non caractérisée, de la dysferline. Si les stratégies visant à totalement empêcher l'expression d'un transgène dans un tissu donné semblent prometteuses (Geisler, Jungmann et al. 2011; Qiao, Yuan et al. 2011), une régulation quantitative est beaucoup plus problématique. Les approches thérapeutiques garantissant une régulation endogène de l'expression de la dysferline ont donc un avantage majeur. Le SMaRT fait partie de ces thérapies correctives, mais il nécessite encore de nombreux développements. Ainsi, il est important d'envisager d'autres approches. Je pense qu'il est intéressant d'évaluer la correction de gène (gène editing) comme stratégie

correctrice de la dysferline. La correction de gène regroupe un ensemble de technologies permettant la modification choisie de nucléotides ou l'insertion ciblée de séquence exogène dans l'ADNg. Citons : (i) les oligonucléotides simple brin (single-stranded all-DNA molecules, ssODN), capables de modifier une base unique dans l'ADNg (Pierce, Liu et al. 2003; Papaioannou, Simons et al. 2012) ; et (ii) les outils enzymatiques tels que les TALENs (pour transcription activator-like effector nuclease), les ZFN (pour Zinc-finger nucleases) ou les méganucléases, permettant de couper l'ADNg à un endroit précis et d'y insérer une séquence d'ADN exogène (Bibikova, Beumer et al. 2003; Epinat, Arnould et al. 2003; Cermak, Doyle et al. 2011). Ces techniques ont longtemps été restreintes à une utilisation *in cellulo*, mais les premières réussites *in vivo* sont rapportées. Ainsi, l'utilisation de ZFN a provoqué une édition de gène assez efficace chez des souris hémophiles pour améliorer leurs paramètres de coagulation sanguine (Li, Haurigot et al. 2011). Les TALENs ont eux démontré leurs capacités à cibler un gène impliqué dans une maladie (la drépanocytose) dans des cellules humaines et à être utilisés *in vivo* (Bedell, Wang et al. 2012; Sun, Liang et al. 2012).

Même si des paramètres comme le contexte chromatinien et l'épigénétique (Daboussi, Zaslavskiy et al. 2012), mais surtout la génotoxicité et la spécificité d'insertion devront être pris en compte dans la faisabilité thérapeutique de la correction de gène (Jensen, Dalsgaard et al. 2011), je pense que ces stratégies présentent un fort potentiel pour les dysferlinopathies.

III. Conclusion Générale et Perspectives

Les études présentées dans ce rapport font état de la difficulté à développer une approche de thérapie génique pertinente pour les dysferlinopathies. La miniforme BrainDysferlin a confirmé la difficulté de moduler la séquence de la dysferline pour des approches thérapeutiques. En effet, aucune miniforme testée *in vivo* à ce jour (minidysferline et BrainDysferlin) n'a permis de corriger les caractéristiques dystrophiques du muscle des souris déficientes en dysferline. Il semble donc que la dysferline ne soit pas « compressible », sans perdre sa/ses fonctionnalité(s). L'utilisation de la BrainDysferlin a surtout corroboré la toxicité potentielle de la surexpression de tout ou partie de la dysferline. Cette observation limite fortement les approches thérapeutiques par apport direct d'ADNc, tant le contrôle du niveau d'expression du transgène est difficile. Les stratégies de concatémérisation d'AAVr, de recombinaison homologue ou d'apport de l'ADNc complet de la dysferline par un autre vecteur (synthétique ou lentiviral par exemple) risquent de trouver ici leur limite. L'avenir du traitement des dysferlinopathies se trouvent probablement dans les thérapies ciblées, visant l'ARN ou l'ADN. L'approche de correction ciblée par *trans*-épissage en fait partie. Nous avons montré que cette technique était applicable à la dysferline, même si elle nécessitait encore beaucoup d'améliorations pour en augmenter l'efficacité et en diminuer les risques. En particulier, l'expression du RTM seul est une problématique majeure à considérer. D'autres stratégies déjà expérimentées, comme le saut d'exon, ont également un bon potentiel mais implique de réaliser une médecine spécialisée s'adressant à peu de patients. Les récentes avancées dans le domaine des thérapies ciblées de l'ADN font surtout penser que l'édition de gène est une voie thérapeutique particulièrement intéressante pour les dysferlinopathies.

Sur un tout autre aspect, l'essai de compensation de la dysferline par l'anoctamine 5, s'il s'est avéré infructueux, a permis de créer les outils nécessaires pour proposer une potentielle thérapie par AAVr adressée aux patients atteints de LGMD2L et/ou de MMD3.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

Fiche technique n° 1 : Constructions plasmidiques.....	193
Fiche technique n° 2 : Mutagénèse dirigée.....	195
Fiche technique n° 3 : Production de vecteur AAVr et lentivirus.....	196
Fiche technique n° 4 : Culture cellulaire et Méthodes de transfection, nucléofection et transduction.....	202
Fiche technique n° 5 : Extraction d'ARN et Transcription Inverse.....	206
Fiche technique n° 6 : PCR et PCR quantitative en temps réel.....	209
Fiche technique n° 7 : Extraction de protéine, WesternBlot et immunoprécipitation.....	211
Fiche technique n° 8 : Expérimentation animale.....	215
Fiche technique n° 9 : Méthode d'analyse par Large Strain Injury (LSI).....	217
Fiche technique n° 10 : Test de réparation membranaire sur fibres isolées.....	220
Fiche technique n° 11 : Logiciels de Bioinformatique.....	222
Fiche technique n° 12 : Analyses statistiques.....	223
Fiche technique n° 13 : Marquages histologiques, Immunomarquages et Imagerie.....	224

Fiche technique n° 1 : Constructions plasmidiques

Principe :

Les plasmides sont des ADN circulaires multipliés de façon autonome au matériel génétique bactérien. Plusieurs centaines d'un même plasmide peuvent être présents dans une unique bactérie. Ils sont utilisés pour le clonage et la multiplication du matériel génétique. L'utilisation de gène de résistance aux antibiotiques codé par le plasmide permet la sélection des bactéries possédant le plasmide. Un transgène porté par un plasmide peut être exprimé en cellule eucaryote s'il est précédé d'un promoteur eucaryote. Les plasmides sont également utilisés dans la production de vecteurs viraux. La manipulation du matériel génétique d'un plasmide peut être réalisée par enzyme de restriction, ligation ou mutagenèse dirigée.

Constructions plasmidiques utilisées dans ce mémoire :

Thérapie par la BrainDysferlin

Le clone pEGFP-CMV_BrainDysferlin a été obtenu par synthèse et clonage de la séquence spécifique à l'isoforme BrainDysferlin en lieu et place des exons 1 à 30 de la dysferline présente sur le plasmide pEGFP-CMV-hDysferline (du laboratoire). La synthèse chimique de la nouvelle séquence a été assurée par Genecust (Luxembourg). Le clonage a été réalisé par digestion/ligation.

Le plasmide pAAV-C5.12-BrainDysferlin a été obtenu par amplification PCR de la cassette d'expression du plasmide pEGFP-CMV_BrainDysferlin avec les oligonucléotides ForBrainDysf pEGFP et BacBrainDysf pEGFP. Ces amorces portent les sites de restriction permettant le clonage et l'ATG nécessaires à l'expression de la BrainDysferlin sans l'eGFP en 5' (amorces en Annexe VI).

Thérapie par l'anoctamine 5

Le pAAV-hANO5 a été réalisé par amplification PCR et clonage. L'amplification PCR de la séquence d'intérêt a été réalisée sur le clone IMAGE 100061756 (Thermo Fisher Scientific), en utilisant les amorces TMEM16EhFatg et TMEM16EhRstop (séquences dans l'Annexe VI). Le clonage a été réalisé dans un pAAV de la banque Généthron.

Thérapie par *Trans*-épissage

Les plasmides pAAV-RTM1-hDysf et pAAV-RTM1-mDysf ont été synthétisés par Genscript dans un plasmide pAAV de la banque de Généthon.

Le changement des BD a été réalisé par digestion par enzyme de restriction des pAAV-RTM1-hDysf ou pAAV-RTM1-mDysf, récupération du fragment d'intérêt sur gel, et ligation du nouveau BD. Les BD ont été synthétisés sous forme d'oligonucléotides sens et anti-sens par Sigma, et associés en ADN double brin avant ligation par ébullition/refroidissement lent. Les plasmides pAAV-RTM-hDysf-dBD et pAAV-RTM-hDysf-dBDdInt ont été obtenus par digestion par enzyme de restriction du pAAV-RTM1-hDysf éliminant le BD ou le BD et l'intron, et ligation du plasmide sur lui-même.

La séquence OptiDysf a été gracieusement fournie par le Dr Matthew Hirsh (University of North Carolina, NC, USA) sous forme de plasmide p-OptiDysf. La partie correspondant aux exons 49 à 55 a été clonée dans le plasmide RTM1-hDysf par enzyme de restriction, en remplacement de la séquence codante de la dysferline.

L'ajout d'un ISE fort dans l'intron synthétique des RTM a été réalisé par mutagénèse dirigée avec les amorces imparfaites présentées dans la **Fiche technique n° 2**.

L'élimination du SV40-polyA et son remplacement par le 3'UTR de la dysferline humaine ont été réalisés sur le plasmide pAAV-RTM1-hDysf. Le 3'UTR a été amplifié sur de l'ADNg humain avec les oligonucléotides FhDysf-3'UTR et RhDysf-3'UTR (séquences en annexe VI). Le clonage du 3'UTR a été réalisé en remplacement du signal SV40 polyA présent derrière le codon STOP de la cassette d'expression, par digestion enzymatique.

Le plasmide p-Minigène a été synthétisé et cloné par Genscript dans un plasmide pRRL de la banque de Généthon.

Fiche technique n° 2 : Mutagenèse dirigée

Principe :

La mutagenèse dirigée permet l'induction d'une ou plusieurs mutations dans un ADN, de façon précise et volontaire. Elle est particulièrement utilisée pour modifier les ADN plasmidiques, par le biais de différentes techniques utilisant pour la plupart une étape de PCR.

Méthode :

Les mutations ont été introduites dans les plasmides codant pour les RTM à l'aide d'un kit de mutagenèse dirigée (*QuickChange site-directed mutagenesis kit*, Stratagène), selon les recommandations du fournisseur et en utilisant les oligonucléotides appropriés. Toutes les mutations générées ont ensuite été vérifiées par séquençage. Les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse sont décrits dans le tableau ci-dessous :

Mutation	Modification	Amorce forward (5' -> 3')	Amorce reverse (5' -> 3')
ISE	+7 pb	CCGCGGAACATTATTATAACG TTGCTCGAATACTAACTGGTA TTCTCTTCCTCTTCTTTTTT TTTGATATCCTGCAG	CTGCAGGATATCAAAAAAAAAAAG AAGAGGAAGAGAATACCAGTTAG TATTCGAGCAACGTTATAATAAT GTTCCGCGG
ORF32-31	2 pb	GGGAGAAGACGAGCGACATTT ATGTGAAAGGTTGGACGATTG GCTTTG	CAAAGCCAATCGTCCAACCTTCA CATAAATGTCGCTCGTCTTCTCCC
ORF20	1 pb	GCTCGATCTCAACCGCACGCC CAAGCCAGCCAAGACAGC	GCTGTCTTGGCTGGCTTGGGCGTG CGGTTGAGATCGAGC
ORF14	1 pb	GGCAAGCTGGAAACGACCTTG GAGATTGTAGC	GCTACAATCTCCAAGGTCGTTTCC AGCTTGCC

Fiche technique n° 3 : Production de vecteur AAVr et lentivirus

Production et Titration des vecteurs AAV

Principe :

Les vecteurs AAVr, dérivés des virus AAV, sont préparés par la méthode de tri-transfection. Cette méthode consiste à transfecter avec différents plasmides les cellules HEK293, qui sont utilisées comme cellules d'emballage (packaging cells), dans le but de leur faire produire les particules virales. Trois plasmides sont utilisés : le plasmide portant le gène d'intérêt (pAAV), le plasmide helper (pRepCap) qui apporte les gènes viraux *Rep* et *Cap* et le plasmide pXX6 qui contient des gènes codant les protéines adénovirales nécessaires à la réplication de l'AAV. Les vecteurs produits restent dans les cellules HEK-293. Pour les récolter, les cellules sont lysées et les particules virales sont purifiées soit par chromatographie d'affinité, soit par ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium.

Méthode :

Ce protocole a été utilisé pour produire le vecteur AAV8r-BrainDysferlin. L'AAV8r-hANO5 a été produit par les services de l'Institut de Recherche Thérapeutique à Nantes.

Ensemencement et transfection des cellules

Les cellules ont été cultivées dans des boîtes T175, à 5×10^6 par flasque, 3 jours avant la transfection. Le milieu de culture était du DMEM contenant 4,5 g/l de glucose, Glutamax-1 1 mM, SVF 10 %, pyruvate de sodium 1 mM, pénicilline 50 U/ml, streptomycine 50 µg/ml. La transfection a été effectuée de la façon suivante (pour chaque boîte):

Les trois plasmides décrits précédemment ont été déposés dans un tube selon les proportions suivantes : 25 µg de pXX6, 12,5 µg de plasmide helper et 12,5 µg de plasmide vecteur. 5 ml de NaCl (150 mM) a été ajouté ensuite sur ce mélange.

Dans un deuxième tube, 28,125 µg de polyéthylèneimine (PEI 25 kDa; Sigma) a été déposé et complétée avec 5 ml de NaCl.

Le mélange de PEI a été ajouté ensuite sur le mélange d'ADN goutte à goutte avec un intervalle de 1 min entre chaque ml. L'ensemble a été incubé 20 min à température ambiante.

Après incubation, le milieu de transfection appauvri en sérum (DMEM 4,5 g/l glucose + glutamax + 1% SVF pénicilline et streptomycine) a été ajouté sur le mélange. Le milieu de culture a été aspiré et 12 ml de milieu de transfection a été ajouté sur les cellules.

Un volume équivalent de milieu de culture a été ajouté sur les cellules au bout de 5-7 h.

Les cellules sont incubées à 37°C pendant 72 heures. Après cette incubation, les cellules sont récoltées par grattage, culottées par centrifugation à 1500 rpm durant 15 min et resuspendues dans 1 ml de tampon de lyse (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM). Cette suspension est lysée par 4 cycles de congélation (carboglance + éthanol) /décongélation (37°C) afin de libérer le vecteur qui est essentiellement cytoplasmique.

Purification des vecteurs

Le lysat brut obtenu a été centrifugé à 2500 rpm pendant 15 min à 4°C pour séparer les débris cellulaires (culot) du surnageant contenant le vecteur.

Celui-ci a été traité par 25 U/ml de benzonase durant 30 min à 37°C afin de digérer les acides nucléiques contaminants.

Puis le lysat a été centrifugé à 8500 rpm pendant 20 min à 4°C afin de culotter les débris cellulaires restants.

Le vecteur présent dans le surnageant a été par la suite précipité par ajout d'un volume équivalent de sulfate d'ammonium saturé froid à 1 M et pH 7, et incubé 1 h sur glace avant de procéder à une centrifugation de 1000 rpm pendant 30 min à 4°C.

Le culot d'AAV a été resuspendu dans 2 ml de PBS contenant des ions calcium et magnésium (CaCl₂ 0,9 M et MgCl₂ 0,5 M).

Un gradient de CsCl a été préparé contenant dans la première couche 3 ml de CsCl à 1,35 g/ml et dans la deuxième couche 3 ml de CsCl à 1,5 g/ml (sous la 1^{ère} couche ajoutée avec une pipette Pasteur).

Les vecteurs (dissous en PBS) ont été ajoutés sur le gradient à la pipette Pasteur.

Une ultracentrifugation a été effectuée sur le tube contenant le gradient (ultracentrifugeuse Beckmann, le rotor 90 TI, à 67000 rpm).

Après l'ultracentrifugation, un réfractomètre a été utilisé pour collecter les fractions ayant une densité comprise entre 1,368 et 1,376 (45 gouttes ou 1 ml pour le 1^{er} gradient et 25 gouttes ou 500 µl pour le 2^{ème} gradient). La récolte a été arrêtée juste avant la bande blanche formée dans le tube (les protéines).

A la fin du 1^{er} gradient, les fractions positives sont déterminées visuellement, les fractions troubles contiennent les impuretés, les fractions dites « claires » ont été regroupées et un nouveau gradient a été réalisé.

Pour cela les fractions mélangées ont été déposées au fond d'un tube Beckmann, qui a été rempli par la suite avec du CsCl 1,41 g/ml jusqu'au bord.

Une ultracentrifugation identique à la première a été réalisée sur la nuit.

La récolte des fractions a été réalisée le lendemain selon le même protocole mais avec environ 25 gouttes.

10 µl de chaque fraction ont été prélevés pour un dot blot qui a été réalisé pour déterminer qu'elles sont les fractions qui contiennent le virus.

Vérification des génomes viraux par Dot Blot

Des aliquots de différentes fractions de gradient ont été traités à la soude NaOH/EDTA (0,4N/10mM) 5 min à 95°C, ce qui libère les génomes viraux des capsides. Un dot blot a été réalisé avec une sonde spécifique du génome viral à l'aide de l'appareil à dot-blot (BIORAD), afin de sélectionner les fractions les plus riches en vecteur. Ce système permet d'hybrider les fractions virales sur une membrane de nylon. La sonde marquée par la phosphatase alcaline (kit AlkPhos, Amersham) permet une révélation chimioluminescente dont l'intensité est déterminée pour chaque fraction de dot blot à l'aide d'un scanner Storm 840 (Molecular Dynamics) et du logiciel ImageQuantTL.

Dialyse

Enfin la purification a été finalisée par une dialyse des fractions les plus riches en vecteur dans le PBS contenant du Ca^{2+} et Mg^{2+} . Cette étape vise à éliminer le chlorure de césium de la préparation virale. Le mélange des fractions riches a été introduit dans une cassette possédant une membrane à limite d'exclusion de 10 kDa. La cassette a été plongée dans 5 bains successifs du PBS pendant 2 heures. La solution virale ainsi préparée a été aliquotée et conservée à -80°C .

Titration de la production de vecteur AAV

Les génomes viraux ont été extraits sur 5 μl de production de vecteur AAV à l'aide du kit *High Pure Viral Nucleic Acid* (Roche) selon le protocole du fournisseur (destruction des capsides à l'aide de protéinase K après une étape de digestion des ADN contaminants par la DNaseI, et purification finale sur colonne de silice). Les génomes viraux purifiés sont alors dilués en série (en duplicat) et soumis à une réaction de PCR quantitative utilisant la sonde Taqman-MGB (5'-GTTAATGATTAACCC-3') et les amorces spécifiques de l'ITR2 (F: 5'-CTCCATCACTAGGGGTTTCCTTGTA-3' ; R: 5'-TGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGC-3'). Une gamme de plasmide interne a aussi été soumise au même protocole PCR. Le titre obtenu est exprimé en génomes viraux par millilitre (vg/ml).

Production et Titration des vecteurs lentivirauxPrincipe :

La production de vecteur lentivirus dérivé du VIH-1 et pseudotypé par VSVG (*Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein*) est réalisée par la méthode de quadri-transfection transitoire. Cette méthode consiste à transfecter les cellules HEK-293T avec 3 plasmides codant pour les gènes viraux gag/pol (pMD gag pol PRE), rev (pRSV rev) et VSVG (pMDG) et un plasmide vecteur contenant le transgène (pRRL). Le surnageant des cellules transfectées contient les particules virales. Il est récolté et les particules virales sont concentrées par ultracentrifugation. Le titrage des solutions de vecteurs lentiviraux obtenues se fait à l'aide d'une analyse qPCR. Le principe consiste à infecter les cellules HCT116 par une série de dilutions successives de la solution virale, puis

extraire l'ADN génomique et effectuer une PCRq en utilisant un contrôle interne et une gamme de dilution plasmidique.

Méthode :

Ce protocole a été utilisé pour produire le lentivirus codant la GFP (VSVG-GFP) et le lentivirus codant le RTM1-hDysf (VSVG-RTM1-hDysf).

Ensemencement et transfection des cellules

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes 15 cm, à 2×10^6 par boîte, 3 jours avant la transfection. Le milieu de culture est du DMEM contenant 4,5 g/l de glucose, Glutamax-1 1 mM, SVF 10 %, pénicilline et streptomycine 1%. La transfection est effectuée de la façon suivante (pour chaque boîte):

Les trois plasmides décrits précédemment sont déposés dans un tube selon les proportions suivantes : 14,6 µg de (pMD gag pol PRE), 5,6 µg de (pRSV rev), 7,9 µg de (pMDG) et 22,5 µg du plasmide vecteur pRRL-RTM1-hDysf ou pRRL-GFP. Le tampon de transfection (TE 0,1 X, H₂O et CaCl₂ 2,5 M) est ensuite ajouté à ce mélange (1113 µl par boîte). 5,7 ml d'HBS 2X (281 mM NaCl, 100 mM HEPES, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH=7,12) sont ajoutés sur le mélange d'ADN/tampon de transfection, au goutte à goutte. L'ensemble est incubé 5 min à température ambiante.

Le mix d'ADN est alors ajouté goutte à goutte sur les cellules.

Les cellules sont immédiatement mises à l'incubateur à 37°C pendant 4 jours. Le premier jour post transfection, le milieu de culture est récolté (récolte-1) et remplacé par 14 ml de milieu neuf. Pendant les 2 jours suivants, le milieu est récolté deux fois par jour (récolte -2 à 5), le matin et le soir. La récolte est réalisée une dernière fois le 4^{ème} jour post transfection (récolte-6) puis les cellules sont détruites.

Concentration des surnageants viraux

Les récoltes sont centrifugées (5 min à 1500 rpm) puis filtrées (0,45 µm) pour éliminer les débris cellulaires. Une ultracentrifugation (2 h à 19500 rpm et à 12 °C) est effectuée sur la solution

obtenue à l'aide d'une ultracentrifugeuse Coulter Beckman optima XL-80K. Le culot ainsi obtenu est séché à l'air et repris dans 70 µl de PBS. La solution virale peut être conservée à -80°C.

Titration de la production de vecteurs lentiviraux

Les cellules HCT116 sontensemencées dans une plaque 12 puits (2×10^5 /ml) dans le même milieu de culture que celui utilisé pour les cellules HEK-293T.

Une dilution en cascade au $1/40^{\text{ème}}$ de la solution virale est préparée. Chaque puits de cellule HCT116 est infecté par une dilution de la solution virale en utilisant du polybren à 1 mg/ml comme adjuvant de transduction. 24 heures après l'infection, les cellules sont récoltées et une extraction d'ADN génomique est réalisée à partir du culot cellulaire.

100 ng d'ADN génomique est analysé par PCRq pour déterminer le nombre de copie du génome virale. Une gamme de dilution de plasmide codant pour l'Albumine et le gène d'Albumine endogène sont amplifiées en parallèle pour la normalisation et la quantification absolue du nombre de génomes viraux.

Fiche technique n° 4 : Culture cellulaire et Méthodes de transfection, nucléofection et transduction

Culture cellulaire

Principe :

Les lignées cellulaires sont des cellules extraites et purifiées d'un organisme vivant, ayant en théorie une capacité illimitée de division. Elles peuvent être immortelles en raison d'une origine cancéreuse, transformées artificiellement par un oncogène (tel que T de SV40), ou mutées pour des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Elles échappent ainsi à la sénescence cellulaire normale.

Cellules et milieux de culture utilisés :

Au cours de ce travail, nous avons utilisé les lignées cellulaires HER911, HT1080, HUVEC et Nih3T3. Les lignées HER911, HT1080 et Nih3T3 sont cultivées en routine à Genethon, et conservées sous forme d'ampoules dans l'azote. Elles sont cultivées dans du milieu *Dulbecco's modified Eagle's medium-Glutamax* (DMEM-Glutamax) (Gibco, Invitrogen) contenant 10% sérum de veau fœtal (SVF), 1% MEM-Non Essential Amino Acids et 10 µg/ml de gentamicine (Gibco, Invitrogen). Les cellules HUVEC ont été achetées à Lonza (ref : C219A) et cultivées dans le milieu recommandé par le fournisseur EGM™-2 BulletKit™ (CC-3162). Le milieu de base développé pour la culture des cellules endothéliales humaines est supplémenté à une concentration finale de sérum de 2%, et contient différents facteurs de croissance et antibiotiques (hEGF, Hydrocortisone, GA-1000 (Gentamicine, Amphotéricine-B, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1, Acide Ascorbique, Héparine).

Les myoblastes de patients ont été fournis par le Dr Gallardo (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Espana). Ils ont été cultivés sur boîte gélatinée (1%) dans un milieu contenant 64,8 ml de DMEM et 4,5 g/l de glucose (Gibco, BE12-604F), 21,6 ml de M-199 medium 199 (LONZA, BE12-117F), 20 ml de FETAL BOVINE SERUM (FBS, Gibco, Genethon), 1 ml de Insulin from bovine pancreas (Sigma, I-5500), 1 ml de L-Glutamin 200mM (LONZA, BE17-605^E), 0,1 ml de Recombinant Human EGF (peprotech, AF-100-15), 0,5 ml de Recombinant Human FGF-basic (peprotech, AF-100-18B), 1 ml de Penicillin streptomycin 10 000 UI/ml (LONZA, BE17-602), 0,1 ml de Fungizone (GIBCO, 15290-018). La différenciation des myoblastes en myotubes a été réalisée en appauvrissant le milieu à 5% de FBS (PromoCell, C-39366), durant 14 jours.

Les myoblastes humains sains issus de la banque Généthon ont été cultivés dans du milieu « Skeletal muscle cell growth medium » (PromoCell, C-23060). La différenciation des myoblastes en myotubes a été réalisée en remplaçant ce milieu par du milieu de différenciation « Skeletal muscle cell differentiation medium » (PromoCell, C-39366), durant 14 jours.

Les différentes cultures ont été incubées à 37°C sous atmosphère humide à 5 % de CO₂.

Insertion d'ADN dans les cellules : transfection, nucléofection et transduction

Principe :

L'apport d'une séquence exogène d'ADN au noyau d'une cellule nécessite de forcer les barrières physiologiques des cellules (membrane plasmique et membrane nucléaire). Un ADN nu ne possède pas cette capacité. Il peut être aidé de plusieurs façons : chimique, électrique ou virale.

Méthode :

Nous avons utilisé différentes techniques pour introduire un ADN exogène dans la cellule : la transfection, la nucléofection et la transduction.

1. Transfection des cellules HER911, HT1080, HUVEC et Nih3T3

Les expériences de transfection ont été réalisées sur plaques 6 puits, ou en dish 10 cm. Les transfusions de plasmides ont été réalisées à l'aide du FUGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science) ou Fugene HD (Promega) 24 heures après ensemencement des cellules, à une confluence de 80-90% environ, selon les protocoles suivants :

Fugene 6 :

Dans un tube polystyrène (T1), déposer la quantité de plasmide voulue dans la transfection. Dans un second tube polystyrène (T2) mélanger 200 µl milieu DMEM sans SVF à 6 µL de FUGENE 6 par µg de plasmide utilisé. Laisser incubé 10 min. Passer le contenu de T2 au goutte à goutte dans T1 et agiter brièvement. Incuber 30-40 min à température ambiante. Après cette incubation, déposer le contenu de T1 au goutte à goutte sur un puits de cellule avec 1 ml de milieu de culture. Mélanger doucement et placer la boîte dans l'incubateur (37°C, 5% CO₂) 24 à 48 heures. Ajouter 1 ml de milieu de culture, 12 heures après transfection.

Les valeurs sont à multiplier par 8 pour les transfections réalisées en dish de 10 cm.

Fugene HD :

Dans un tube polystyrène mélanger 200 µl milieu DMEM sans SVF à la quantité de plasmide voulue dans la transfection. Ajouter 3 µL de FUGENE HD par µg de plasmide utilisé, agiter brièvement, et laisser incuber 10 min. Après cette incubation, déposer le contenu du tube au goutte à goutte sur un puits de cellule avec 2 ml de milieu de culture. Mélanger doucement et placer la boîte dans l'incubateur (37°C, 5% CO₂) 24 à 48 heures.

Les valeurs sont à multiplier par 8 pour les transfections réalisées en dish de 10 cm.

2. Nucléofection de primoculture de myoblastes humains sains et déficients en dysferline

Les différents myoblastes ont été « nucléofectés » à l'aide du Kit Normal Human Dermal Fibroblasts (PromoCell) et du Nucleofector® device (Lonza), selon le protocole du fournisseur, résumé ci-dessous :

- Préparer la solution de Nucléofection à raison de 82 µl de solution Nucléofector® + 18 µl supplémentaire solution, soit 100 µl de solution de nucléofection par échantillon.
- Répartir du milieu de culture dans 3 dish de 6 cm (pré-coaté la veille en gélatine 1%) et les incuber en préchauffage à 37°C dans l'incubateur.
- Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, préparer 3 µg du plasmide souhaité.
- Centrifuger les myoblastes humains à 80 g pendant 10 min à Température Ambiante (RT). Préparer ainsi 500 000 cellules par Nucléofection.
- Eliminer le milieu de culture et reprendre les culots de myoblastes dans 100 µl de solution de Nucléofection, par 5 flush à la p200. Prendre 100 µl de solution cellulaire, les déposer dans le tube contenant le plasmide, faire un flush, récupérer le volume total et le déposer sans faire de bulles dans la cuvette d'électroporation.
- Procéder à la Nucléofection (Programme de Nucléofection: U-023).
- Récupérer la dish préchauffée à 37°C dans l'incubateur et la poser sous la hotte.

- Récupérer les cellules rapidement dans la cuvette d'électroporation avec un peu de milieu de culture provenant d'une dish.
- Répartir les cellules nucléofectées dans la dish comme avec un stylo, par balayage.
- Mettre dans l'incubateur pendant 2 jours.

3. Transduction des primocultures de myoblastes humains

Le protocole suivant a été utilisé pour la transduction des cellules avec le vecteur lentivirus :

Une quantité équivalente de cellules a étéensemencée dans les différents puits d'une plaque 6 puits. 24 heures après l'ensemencement, les cellules d'un puits ont été trypsinées et dénombrées sur cellule de Malassez.

Dans l'autre puits, un volume approprié du vecteur lentiviral exprimant le transgène d'intérêt (RTM ou GFP) mélangé à du Polybrene a été ajouté sur les cellules (dans 1 ml de milieu de culture) à raison d'une MOI (*Multiplicities Of Infection*) de 10, 100 et 1000. Après 3 heures d'incubation à 37°C, 1 ml de milieu de culture a été ajouté sur les cellules pour arrêter la transduction. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 48 heures.

Fiche technique n° 5 : Extraction d'ARN et Transcription Inverse

Extraction d'ARN

Principe :

L'extraction des ARN repose sur les propriétés hydrophile ou hydrophobe des différents constituants d'une cellule. Le procédé classique est l'extraction par le couple phénol-chloroforme. Il est basé sur la solubilité différentielle de différentes molécules dans deux liquides non miscibles différents. Le Trizol[®] Reagent (GibcoBRL), solution de phénol et d'isothiocyanate, permet de détruire les membranes et dissoudre les composants cellulaires tout en maintenant l'intégrité des ARN. L'ajout de chloroforme provoque la création d'une phase aqueuse et organique, dont la séparation est faite par centrifugation. La phase aqueuse contient les acides nucléiques qui sont finalement récupérés sous forme solide à la suite d'une précipitation à l'alcool isopropylique.

Méthode :

Echantillons :

Les ARN ont été récupérés sur deux types d'échantillons : les cultures cellulaires et les muscles de souris.

Les cellules sont récoltées par simple grattage et culotées par centrifugation douce à 500 g, 5 minutes. Le culot cellulaire obtenu est directement utilisé pour l'extraction d'ARN. Les muscles sont broyés dans un tampon de lyse contenant 20 mM de Tris (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 2 mM d'EGTA, 1 % (v/v) de TRITON X-100, et un cocktail d'inhibiteur de protéase (PIC, ROCHE). Après centrifugation douce (500 g, 5 minutes), le surnageant est utilisé pour l'extraction d'ARN.

Extraction des ARNs :

L'extraction est réalisée selon le protocole suivant :

- Mettre 200 µl de lysat musculaire ou le culot cellulaire dans un tube RNase-free, DNase-free.
- Ajouter 0,8 ml de TRIZOL[®] reagent (Invitrogène) et mélanger.

- Ajouter 0,2 ml de chloroforme (Prolabo), mélanger et laisser reposer 3 min à température ambiante.
- Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 15 minutes.
- Récupérer la phase supérieure contenant les ARN, ajouter 0,5 ml de Propanol-2 (Prolabo), mélanger et laisser reposer 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 15 minutes.
- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 0,5 ml d'éthanol 75% froid (Prolabo).
- Centrifuger à 12000 g à 4°C pendant 10 minutes.
- Eliminer le surnageant et laisser sécher partiellement le culot à l'air.

Afin d'éliminer l'ADN (ADNg et ADN plasmidique) potentiellement contaminant, les échantillons ont ensuite systématiquement été traités à la DNase à l'aide du kit «DNA-free» (*DNase treatment and removal reagents*) (Ambion) selon les instructions du fournisseur.

A l'issue de l'extraction, la qualité des ARN a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% et leur concentration a été évaluée par mesure de la densité optique (DO) avec un spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific).

Transcription inverse

Principe :

La transcription inverse (ou rétrotranscription) est la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARN grâce à une ADN polymérase ARN dépendante ou encore transcriptase inverse.

Méthode :

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux à l'aide du kit « Verso cDNA Kit » (Thermo Fisher) selon les instructions du fournisseur, ou avec le kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), là encore selon les instructions du fournisseur. Les mixes et temps d'incubation sont donnés ci-dessous à titre indicatif.

Le mix de réaction pour le « Verso cDNA Kit » (volume total de 20 µl) contient:

- 1 µg d'ARNs
- 50 ng d'hexamères
- 1x final de tampon first strand synthesis
- 500 µM de chaque dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs
- 1 µl d'enzyme RT enhancer
- 1 µl d' enzyme RT

Le mix est incubé pendant 1 heure à 42°C et l'enzyme est désactivée pendant 15 minutes à 75°C.
Les ADNc sont conservés à -20°C.

Le mix de réaction pour le «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» (volume total de 20 µl) contient:

- 1 µg d'ARNs
- 50 ng d' hexamères
- 1x final de tampon 5X reaction Buffer
- 500 µM de chaque dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs
- 0,25 U final de Ribolock Rnase Inhibitor
- 1 µl d'enzyme RevertAid H-RT

Le mix est incubé pendant 10 minutes à 25°C, 1h15 à 42°C et l'enzyme est désactivée pendant 10 minutes à 70°C. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C.

Fiche technique n° 6 : PCR et PCR quantitative en temps réel

Amplification par PCR

Principe :

À partir d'un échantillon complexe et peu abondant cette technique enzymatique permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un segment précis d'ADN. Une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Méthode :

Les PCR ont été réalisées sur ADN et ADNc dans un volume final du mélange réactionnel de 20 µl. Les mélanges réactionnels ont été composés comme suit :

- 100 ng d'ADNc ou 20 ng d'ADN plasmidique ou 200 ng d'ADNg ;
- 1 µl d'oligonucléotide spécifique (10 µM) ;
- 10 µl de RedExtract N-Amp™ PCR Ready Mix™ (Sigma).

L'amplification PCR est réalisée dans un thermocycleur pendant 34 cycles (95°C, 15 secondes ; 59°C, 15secondes ; 72°C, 1minute) précédé d'une dénaturation de 30 secondes et d'une élongation finale d'1 minute.

Les PCR nichées sont réalisée de la même manière, mais sur 1µl de produit PCR d'une première amplification.

Les produits de PCR sont analysés par migration sur gel d'agarose (pourcentage variable selon la taille de l'amplicon recherché) coloré au SYBR® Safe (Invitrogen) 4/10000. Les gels sont observés et photographiés à l'aide d'une Gbox (Syngene).

La liste des amorces utilisées et des séquences correspondantes est disponible dans l'annexe VI.

Analyse par PCR quantitative en temps réel

Principe :

La PCR quantitative en temps réel est basée sur l'activité exonucléasique 5'-3' de l'enzyme AmpliTaq Gold (Roche) qui permet la détection de produit de PCR par libération d'un rapporteur fluorescent durant la PCR. Ce rapporteur fluorescent (FAM) est situé en 5' de la sonde nucléotidique qui est également marquée par un quencher (TAMRA) en 3'. La séparation du rapporteur et du quencher entraîne une augmentation de la fluorescence du rapporteur. Cette augmentation de fluorescence est mesurée par l'appareil et est la conséquence directe de l'amplification du gène ciblé au cours de la PCR.

Méthode :

La réaction d'amplification se fait dans une plaque 96 puits, permettant de faire une PCR sur plusieurs échantillons en même temps. Chaque réaction PCR contient de l'ADNg ou l'ADNc à amplifier et un mix de PCR qui est préparé comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

	[initiale]	vol (µl)	[finale]
Tampon	x2	9	x1
Oligo 1 (F)	20 pmol/µl	0,18	0,2 µM
Oligo 2 (R)	20 pmol/µl	0,18	0,2 µM
Sonde (P)	10 pmol/µl	9,18	0,1 µM
Volume mix		9,54	
Volume mix utilisé		9,5	
Volume ADNc		8,5	
Total		18	

L'ADN a été amplifié dans les conditions suivantes : 1 cycle de dénaturation, 10 minutes à 95°C ; puis 40 cycles d'hybridation, 15 secondes à 95°C, 1 minute à 60°C. L'expression du gène ubiquitaire de l'acide ribophosphoprotéique (P0) a été utilisée pour normaliser les résultats. Chaque échantillon a été dosé en duplicat et le dosage a été répété au moins 3 fois.

Les couples oligonucléotides/sondes utilisés ont été celui quantifiant le transcrit ANO5 murin (Mm00624629_m1) et le transcrit ANO5 humain (ABI_Hs01381106_m1) (Applied).

Fiche technique n° 7 : Extraction de protéine, WesternBlot et immunoprécipitation

Analyse par Western Blot des protéines

Principe :

Un western blot utilise la capacité d'un anticorps à se fixer à une protéine spécifique dans un échantillon protéique complexe. Les protéines sont séparées selon leur masse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide puis transférées sur une membrane qui permet la fixation d'un anticorps spécifique à la protéine d'intérêt. Il est possible, grâce à cette technique de détecter la présence d'une protéine dans un tissu et d'évaluer sa taille ainsi que sa concentration.

Méthode :

Extraction des protéines totales

Depuis une culture cellulaire : les cellules sont grattées directement dans leur milieu de culture et centrifugées à 500 g, 5 minutes à 4°C ; le culot est repris dans un tampon de lyse contenant 20 mM de Tris (pH 7,5), 2 mM d'EGTA, 1 % (v/v) de TRITON X-100, 150 mM de NaCl et des inhibiteurs de protéases (*complete mini protease inhibitor cocktail* ; Roche Biomedicals). Les cellules sont laissées à lyser à 4°C pendant 30 minutes, avec des vortex réguliers.

Depuis un échantillon de muscle : Les muscles prélevés sur souris sont broyés dans des tubes à billes (lysing matrix A, 6910-500, MP Biomedicals) à l'aide d'un appareil FAST Prep (Bio101), dans le même tampon que décrit plus haut.

Les éléments insolubles sont éliminés par centrifugation à 12000 g, pendant 10 minutes à 4°C. La concentration en protéines des extraits obtenus (issus de cellules ou de tissus entiers) a été déterminée par la méthode BCA (PIERCE), selon le protocole du fournisseur.

Analyse protéomique par la technique du Western-Blot

Les extraits protéiques sont traités en suivant le protocole suivant :

Ajouter du tampon dénaturant 4X (Nupage LDS Sample Buffer (Invitrogen)) – DTT (100mM final) et chauffer à 70°C pendant 10 minutes.

Déposer sur gels de sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide précoulés (4-12 % Bis-Tris, Invitrogen) et soumettre à une électrophorèse à l'aide du système NuPage (Invitrogen), pendant 1 heure à 150 V.

Récupérer le gel et transférer sur membrane Immobilon-P PVDF (Millipore) pendant 1 heure à 100 V, ou sur membrane nitrocellulose avec le système iBlot (Invitrogen ; programme P7). Après transfert, colorer au Rouge Ponceau 0,2 % (w/v) la membrane pour s'assurer du bon transfert des protéines.

Saturer par une solution Blocking Buffer (LI-COR, Odyssey) PBS (v/v) pendant 45 minutes.

Hybrider avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué dans un mélange v/v de Blocking Buffer/PBS entre 2 heures à température ambiante et une nuit à 4°C, sous agitation.

Laver en TTBS 3x5-10 minutes.

Hybrider avec l'anticorps secondaire donkey anti-mouse ou donkey anti-rabbit couplé à des fluorophores émettant à 800 nm ou 680 nm (LI-COR) (dilution au 1/10000 dans mélange v/v de Blocking Buffer/PBS) pendant 30-45 minutes à température ambiante.

Laver en TTBS 3x5-10 minutes.

Laver en PBS 2x5-10 minutes.

Procéder à la révélation du blot avec le scanner Li-COR ODYSSEY à 680 et 800 nm.

Lors de ces analyses, les poids moléculaires des protéines ont été estimés par comparaison avec le marqueur Precision Plus Protein Standards (BIORAD). La protéine contrôle FLAG est une BAP-FLAG de chez Sigma attendue à 49 kDa.

Les membranes PVDF peuvent être deshybridées par incubation dans un tampon contenant du Tris (pH 6,8 ; 65 mM), 2 % de SDS (w/v) et du DTT (100 mM) pendant 30 minutes à 50°C. Les membranes sont ensuite lavées (3x5-10 minutes) en TTBS, puis en PBS, avant d'être ré-hybridées avec d'autres anticorps.

Anticorps utilisés

L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre la dysferline (NCL-Hamlet, Novocastra, dilution 1/200) a été utilisé pour détecter la dysferline et la BrainDysferlin.

L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope V5 (Invitrogène, dilution 1:5000) a été utilisé pour la détection de l'étiquette V5.

L'anticorps monoclonal de souris (M2, Sigma) et l'anticorps polyclonale de lapin (Roche) dirigés contre l'épitope Flag ont été utilisés pour révéler l'étiquette 3xFlag.

L'anticorps anti-actine de lapin (Invitrogène) a été utilisé pour la normalisation des WB, en marquant l'actine.

L'anticorps Anti α -actinine (H300, SantaCruz) a été utilisé pour la normalisation des WB, en marquant l' α -actinine.

La protéine GFP a été détectée grâce à un anticorps polyclonale de lapin dirigé contre la GFP (Abcam).

L'anoctamine 5 a été détectée grâce à un anticorps polyclonale de lapin généré par Eurogentech (EUROGENTEC S.A., Belgique).

Immunoprécipitation par l'étiquette Flag

Principe :

L'immunoprécipitation (IP) est une technique qui permet la précipitation d'un antigène en solution (la protéine cible) par un anticorps. Elle est utilisée pour isoler et concentrer une protéine parmi des milliers d'autres. L'immunoprécipitation est possible car l'anticorps est lié à un substrat solide qui permet sa récupération de manière aisée. L'utilisation du drapeau Flag permet l'utilisation de kits commerciaux très spécifiques.

Méthode :

Les IP Flag ont été réalisées à l'aide du kit FLAG Immunoprecipitation Kit (Sigma) utilisant l'anticorps anti-Flag M2 fixé à des billes d'agarose. Le protocole a été réalisé selon les conseils du fournisseur, à partir de dish de 10 cm de cellules confluentes. L'élution finale a été réalisée dans du bleu Nupage 4x dénaturant (100 mM dTT) par ébullition 3 minutes.

Fiche technique n° 8 : Expérimentation animale

Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec les règles européennes d'éthique concernant l'utilisation des animaux pour la recherche expérimentale. Tous les animaux utilisés ont été élevés dans des conditions exemptes de pathogènes spécifiques (ou EOPS pour Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques) à l'animalerie de Généthon ou à l'animalerie du fournisseur Charles Rivers. Les animaux ont accès à volonté à la nourriture et à l'eau. Les animaux ont été manipulés après anesthésie en intrapéritonéal (Kétamine 100 mg/kg et Xylazine 1 mg/kg).

Lignée murine

Les souris C57BL/6 proviennent du fournisseur Charles Rivers et aucune expérimentation n'a été effectuée sur ces animaux avant une période d'acclimatation minimale d'une semaine à l'animalerie de Généthon.

Les souris Bla/J ont été élevés dans des conditions exemptes de pathogènes spécifiques (ou EOPS pour Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques) à l'animalerie de GENETHON.

Les souris Dysf^{-/-} proviennent du fournisseur Charles Rivers et ont été élevés dans des conditions exemptes de pathogènes spécifiques (ou EOPS pour Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques) à l'animalerie de GENETHON.

Injection intramusculaire et intraveineuse d'AAVr

L'injection intramusculaire (IM) est réalisée sur animal anesthésié. Dans le TA, l'injection est réalisée « longitudinalement » au niveau du muscle tibial antérieur gauche (*TAG*) avec un volume final de 30 µl, en utilisant une seringue Hamilton équipée d'une aiguille de 30G. Le muscle tibial antérieur droit (*TAD*) est injecté, chez chaque souris, comme contrôle latéral avec un volume équivalent de PBS.

L'injection intraveineuse (IV) est effectuée dans la veine caudale avec de l'AAV ; les souris ont été placées dans un cylindre de contention et l'injection est réalisée dans la veine caudale à l'aide

d'une seringue à insuline (29G). Le volume final injecté par voie intraveineuse est de 200 µl. Les contrôles ont été injectés par un volume équivalent de sérum physiologique.

Pour les expériences de réparation membranaire, le muscle *Flexor Digitorum Brevis (FDB)* a reçu en IM 15 µl de solution de vecteur.

Certaines expériences ont nécessité l'injection de marqueur Bleu Evans, marqueur des fibres nécrotiques. L'injection a été réalisée en intrapéritonéal (0,1 mg/10 g de masse corporelle), la veille du sacrifice.

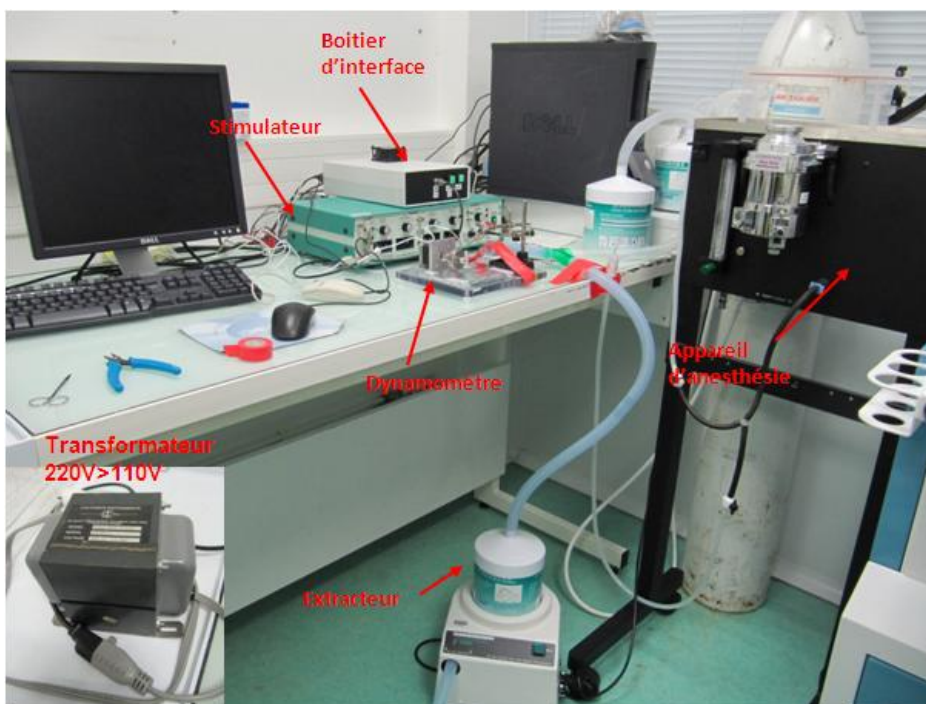
Prélèvement des muscles

Pour l'étude des protéines et des ARN, les muscles sont directement congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C. Pour l'histologie, les muscles sont disséqués, placés sur un bout de liège enduit de gomme arabique, et congelés en isopentane refroidi dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C.

Fiche technique n° 9 : Méthode d'analyse par Large Strain Injury (LSI)

Principe :

Le LSI permet un exercice excentrique forcé sur les muscles dorsiflecteurs de la souris (loge antérieure constituée du Tibialis antérieur et de l'EDL). Il consiste en une série répétée de contractions musculaires par stimulation électrique, simultanément à un étirement forcé du muscle. Le LSI consiste en une série de 15 contractions excentriques espacées de 2 minutes de repos provoquant une altération de la fonction contractile musculaire et sollicitant une récupération via les processus de réparation membranaire.



Méthode :

Allumer le poste d'anesthésie et préparer l'animal:

1. Anesthésier l'animal sous isoflurane.
2. Epiler la patte gauche à la crème dépilatoire. Hydrater régulièrement la zone de peau épilée avec de l'huile minérale à l'aide d'une pipette.

3. Positionner la souris sur le dos. Introduire délicatement une aiguille 27G stérile dans la jonction du genou au niveau de la tête tibiale Cette aiguille ainsi prise dans l'épaisseur de la patte doit être perpendiculaire au tibia, de façon à constituer un axe tibial de rotation.
4. Positionner la pince crocodile du dynamomètre sur l'axe tibial afin que le tibia soit à 90° par rapport à l'axe de la pédale et parallèle au sol. Fixer fermement la pince. Scotcher le pied sur la pédale avec une bandelette adhésive de scotch de 3 mm de large. Vérifier que le mouvement sur 90° est possible sans gêne en manipulant la pédale à faible vitesse à la main.

Mesures de force initiale (Pre-Injury)

1. Immobiliser la pédale à la valeur d'angle optimale pour mesurer la force du modèle de souris étudié (autour de 20°).
2. Procéder aux mesures de twitch et téтанos en tenant compte des réglages de stimulation.
3. Pour provoquer la contraction, appliquer l'électrode bipolaire sur la peau sur le point osseux où passe la branche du nerf sciatique innervant les dorsiflecteurs, et envoyer une stimulation électrique.
4. Régler ainsi le twitch et le téтанos.

Exercice excentrique de type LSI :

1. Placer l'électrode sur le nerf et envoyer une stimulation électrique. Déclencher la rotation de la pédale pendant le téтанos. La période de pré-stimulation doit être bien visible. Enregistrer les mesures grâce au logiciel. Attendre 2 minutes avant la stimulation suivante.
2. Recommencer ainsi de suite 15 fois, sur une durée totale de 30 minutes. Réhydrater ponctuellement la zone épilée à l'huile minérale.
3. Après la 15^{ème} stimulation, attendre 4 minutes avant de poursuivre.

Mesures Post-Injury

Replacer la pédale à 20° et faire les acquisitions de force selon la même procédure qu'en Pre-Injury.

Prélèvements et fin de la manipulation :

1. Libérer la patte et son axe de la pince. Retirer le scotch de la patte. Désinfecter l'extrémité de l'axe métallique à la Vétédine® avant de le retirer. Retirer doucement l'axe du genou et l'éliminer.
2. Retirer l'animal du masque d'anesthésie et administrer en injection sous-cutanée une dose de Buprecare® à la dose de 100 µl/20 g de poids. Placer l'animal sur une plaque chauffante à 37°C et surveiller le réveil.
5. Toutes les 24 heures jusqu'au sacrifice, renouveler une injection de Buprecare® en sous cutanée à la dose de 100 µl/20 g de poids.

Fiche technique n° 10 : Test de réparation membranaire sur fibres isolées

Principe :

Ce test permet l'étude du processus de réparation membranaire *in cellulo* de manière indirecte. Il est basé sur l'observation de la migration d'un marqueur fluorescent à l'intérieur d'une fibre après lésion de sa membrane. Ce marqueur, le FM1-43, n'est fluorescent que lorsqu'il se fixe à des lipides pour lesquels il est très afin ; il est donc incolore à l'extérieur de la fibre et devient fluorescent en se fixant à des lipides en pénétrant dans la fibre. Cette fixation empêche sa diffusion dans la fibre. Pour le test, le sarcolemme de fibres musculaires isolées de *Flexor Digitorum Brevis* de souris, un muscle très fin se trouvant sous la patte postérieure de la souris, est troué par un tir laser. La fluorescence due à l'entrée du marqueur, présent dans le milieu, dans la fibre est alors mesurée au cours du temps. Lors d'un processus de réparation actif et efficace très peu de fluorescence est détecté alors que lorsque ce processus n'est pas fonctionnel, le marqueur va pénétrer en continu faisant augmenter d'autant la fluorescence de la fibre.

Méthode :

Isolation des fibres musculaires :

Le Flexor Digitorum Brevis (FDB) est prélevé extemporanément sur les souris et mis en solution de DMEM + Collagénase à 1%, sous agitations douces, à 37°C pendant 3 heures pour séparer les fibres.

Les fibres obtenues sont lavées 4-5 fois en PBS1X sans calcium par des cycles courts de sédimentation des fibres / élimination du milieu / remise en suspension en PBS. Les fibres sont finalement reprises dans 2 ml de PBS1X sans calcium. Le marqueur, FM1-43 (à concentration finale de 4 µM), est ajouté au dernier moment dans le milieu.

Les fibres ainsi préparées sont ensuite déposées dans des coupelles à fond en lamelle de verre (Lab-tek) afin d'effectuer le test de réparation membranaire à proprement parler.

Lésion induite par tirs laser :

La mise au point pour l'observation et l'acquisition au cours du temps se fait en position un photon du multiphoton à la longueur d'onde du marqueur, soit 488 nm. Pour induire une lésion, une région de la membrane de la fibre musculaire est irradiée pendant une seconde à pleine puissance avec le laser 2-photons. Le microscope multiphoton est composé d'une tête de lecture

Radiance 2100 MP (Biorad) équipée d'un système laser Titanium-Sapphire (Coherent Verdi-Mira) de 10W à une longueur d'onde d'excitation de 800 nm cadencée à 76 MHz, capable de pulse de 100fs . Le microscope est un Nikon TE300 (Nikon Istech Co) inversé muni d'objectifs Nikon (dry CFI Plan APO, 20× NA0.75). L'acquisition de la cinétique est faite avec le logiciel LaserSharp2000 de Biorad, avec une prise d'image toutes les 7 secondes sur des périodes de 2 à 5 minutes.

Analyse des images de réparation membranaire :

Les différentes séries réalisées sont traitées sous ImageJ (software libre de droit). Ce logiciel permet l'élimination du bruit de fond spécifique à chaque série et de mesurer, dans une zone choisie pour chaque série, l'intensité intégrée associée au marqueur. Les résultats sont transposés sous forme de graphique ce qui permet d'évaluer le niveau d'efficacité du processus de réparation membranaire.

Fiche technique n° 11 : Logiciels de Bioinformatique

Analyse des éléments régulant l'épissage :

RegRNA :	http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/
HumanSpliceFinder :	http://www.umd.be/HSF/
CLC Bio:	http://www.clcbio.com/
Splice predictor :	http://bioservices.usd.edu/splicepredictor/

Analyse de la structure des protéines:

SMART :	http://smart.embl-heidelberg.de/
PFAM:	http://pfam.sanger.ac.uk/
Prosite:	http://prosite.expasy.org/

Analyse et manipulation de séquence

Sequencher (genecodes.com)

VNTI (Invitrogen)

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Fiche technique n° 12 : Analyses statistiques

Les données sont présentées en moyenne de n expérimentations \pm erreur standard de la moyenne (S.E.M, *Standard Error of the Mean*) ou l'écart-type. Les moyennes individuelles entre deux groupes sont comparées en utilisant le test non paramétrique Mann-Whitney. Ce test est utilisé pour montrer une significativité entre deux populations dans l'index de centronucléation et les quantifications de surface relatives de Bleu Evans. Pour les analyses de réparation membranaire, les différentes populations sont comparées entre elles par le test de Student. Dans toutes les analyses statistiques, les différences sont considérées significatives à $p < 0,05$ (*) et très significative à $p < 0,01$ (**).

Fiche technique n° 13 : Marquages histologiques, Immunomarquages et Imagerie

Marquages histologiques

Coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) et Rouge Sirius :

L'HPS est une coloration simple utilisée en routine histopathologique permettant de mettre en évidence spécifiquement les différentes structures tissulaires et cellulaires. L'hématéine (colorant basique) colore les acides nucléiques en bleu noir tandis que la phloxine (colorant acide) colore en rouge plus ou moins intense les cytoplasmes et certaines structures extracellulaires, qui sont dits « éosinophileés ». Enfin, le safran colore les fibres de collagène en jaune-orangé. Le Rouge Sirius se fixe de façon empirique sur les fibres de collagène et de réticuline, et permet de mettre en évidence la fibrose d'un tissu.

Des cryosections (8 ou 10 μm d'épaisseur) ont été préparées à partir de muscles squelettiques et cardiaques. Elles ont été colorées à l'hématoxyline de Harris (Sigma) pendant 3 minutes. Après lavage à l'eau, les lames ont été plongées dans une solution d'alcool chlorhydrique à 0,2% (v/v) afin d'éliminer l'excédent de colorant. Après un nouveau lavage à l'eau, les tissus ont été bleuis dans l'eau de Scott (solution à 0,5 g/l de bicarbonate de sodium et 20 g/l de sulfate de magnésium) pendant une minute avant d'être de nouveau rincés à l'eau et colorés à la phloxine 1% (m/v) (Sigma) pendant 30 secondes. Après rinçage à l'eau, les coupes ont été déshydratées à l'éthanol 70° pendant une minute (maximum), puis rincées dans l'éthanol absolu. Les tissus ont ensuite été colorés au safran 1% (v/v dans de l'éthanol absolu) pendant 3 minutes et rincés à l'éthanol absolu. Pour finir, les coupes ont été égouttées et éclaircies dans deux bains d'Histosol (2x2 minutes). Puis les lames ont été montées en milieu Eukitt.

La fibrose des cœurs a été marquée avec le rouge Sirius. Après réhydratation, les coupes ont été recouvertes avec du rouge Sirius pendant 30 minutes. Les préparations microscopiques ont été rincées dans de l'eau distillée avant déshydratation et montage en milieu Eukitt.

Immunomarquages fluorescents d'ANO5 :

Les lames sont sorties du congélateur et mises à sécher à température ambiante pendant 10 minutes. Pour visualiser ANO5, il est nécessaire avant le marquage de faire bouillir les lames 10 minutes dans du PBS, puis de les tremper dans un bain à température ambiante après avoir fait sécher les lames. Les coupes sont ensuite mises à saturer pendant 20 minutes à température ambiante dans du sérum de chèvre + Triton 0,1%, puis hybridées avec l'anticorps anti-ANO5 (Eurogentec, dilution 1:50) sur la nuit à 4°C en chambre humide. Une série de trois lavages de 5 minutes en PBS 1X est réalisée, et les coupes sont hybridées avec la solution d'anticorps secondaire de chèvre anti_lapin (Vector, BA-1000; dilution 1:100) pendant 45 minutes à température ambiante. Une autre série de trois lavages de 5 minutes en PBS 1X est effectuée avant de réaliser la troisième hybridation avec la streptavidine couplé au fluorochrome Alexa 594 (Invitrogen, 1:1000) durant 20 minutes à température ambiante en chambre humide. Les coupes sont lavées dans une dernière série de trois lavages de 5 minutes en PBS 1X avant d'être montées sous une lamelle en Dapi-fluoromount G (SouthernBiotech). L'observation des marquages est faite avec le microscope confocal Leica. Les images numériques des coupes correspondant à la partie médiane du muscle ont été acquises avec un objectif 63X et une caméra CCD (Sony).

BIBLIOGRAPHIE |

- Aartsma-Rus, A., K. H. Singh, et al. (2010). "Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies?" Eur J Hum Genet **18**(8): 889-894.
- Achanzar, W. E. and S. Ward (1997). "A nematode gene required for sperm vesicle fusion." J Cell Sci **110 (Pt 9)**: 1073-1081.
- Akiva, P., A. Toporik, et al. (2006). "Transcription-mediated gene fusion in the human genome." Genome Res **16**(1): 30-36.
- Aldana-Masangkay, G. I. and K. M. Sakamoto (2011). "The role of HDAC6 in cancer." J Biomed Biotechnol **2011**: 875824.
- Almaca, J., Y. Tian, et al. (2009). "TMEM16 proteins produce volume-regulated chloride currents that are reduced in mice lacking TMEM16A." J Biol Chem **284**(42): 28571-28578.
- Ampong, B. N., M. Imamura, et al. (2005). "Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor." Acta Myol **24**(2): 134-144.
- Anderson, L. V., K. Davison, et al. (1999). "Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development." Hum Mol Genet **8**(5): 855-861.
- Anderson, L. V., R. M. Harrison, et al. (2000). "Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies)." Neuromuscul Disord **10**(8): 553-559.
- Armarego, W. L., D. Randles, et al. (1984). "Dihydropteridine reductase (DHPR), its cofactors, and its mode of action." Med Res Rev **4**(3): 267-321.
- Azakir, B. A., S. Di Fulvio, et al. (2012). "Modular dispensability of dysferlin C2 domains reveals rational design for mini-dysferlin molecules." J Biol Chem **287**(33): 27629-27636.
- Azakir, B. A., S. Di Fulvio, et al. (2010). "Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle." PLoS One **5**(4): e10122.
- Babychuk, V. S., A. Draeger, et al. (2000). "Smooth muscle actomyosin promotes Ca²⁺-dependent interactions between annexin VI and detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membrane domains." Acta Biochim Pol **47**(3): 579-589.
- Balci, B., G. Uyanik, et al. (2005). "An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene." Neuromuscul Disord **15**(4): 271-275.
- Ballinger, M. L., A. R. Blanchette, et al. (1997). "Delaminating myelin membranes help seal the cut ends of severed earthworm giant axons." J Neurobiol **33**(7): 945-960.
- Bansal, D. and K. P. Campbell (2004). "Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy." Trends Cell Biol **14**(4): 206-213.
- Bansal, D., K. Miyake, et al. (2003). "Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy." Nature **423**(6936): 168-172.
- Barreau, C., L. Paillard, et al. (2006). "Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions." Biochimie **88**(5): 515-525.
- Bashir, R., S. Britton, et al. (1998). "A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B." Nat Genet **20**(1): 37-42.
- Bashir, R., T. Strachan, et al. (1994). "A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p." Hum Mol Genet **3**(3): 455-457.
- Beaton, A. R., J. Rodriguez, et al. (2002). "The membrane trafficking protein calpactin forms a complex with bluetongue virus protein NS3 and mediates virus release." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13154-13159.
- Bedell, V. M., Y. Wang, et al. (2012). "In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system." Nature.
- Bejaoui, K., K. Hirabayashi, et al. (1995). "Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14." Neurology **45**(4): 768-772.

- Belanto, J. J., S. V. Diaz-Perez, et al. (2010). "Dexamethasone induces dysferlin in myoblasts and enhances their myogenic differentiation." *Neuromuscul Disord* **20**(2): 111-121.
- Benaud, C., B. J. Gentil, et al. (2004). "AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture." *J Cell Biol* **164**(1): 133-144.
- Bernatchez, P. N., A. Sharma, et al. (2009). "Myoferlin is critical for endocytosis in endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **297**(3): C484-492.
- Bibikova, M., K. Beumer, et al. (2003). "Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases." *Science* **300**(5620): 764.
- Bisceglia, L., S. Zoccolella, et al. (2010). "A new locus on 3p23-p25 for an autosomal-dominant limb-girdle muscular dystrophy, LGMD1H." *Eur J Hum Genet* **18**(6): 636-641.
- Bittner, R. E., L. V. Anderson, et al. (1999). "Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B." *Nat Genet* **23**(2): 141-142.
- Blandin, G., C. Beroud, et al. (2012). "UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene." *Hum Mutat* **33**(3): E2317-2331.
- Bolduc, V., G. Marlow, et al. (2010). "Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies." *Am J Hum Genet* **86**(2): 213-221.
- Bolognani, F. and N. I. Perrone-Bizzozero (2008). "RNA-protein interactions and control of mRNA stability in neurons." *J Neurosci Res* **86**(3): 481-489.
- Borgonovo, B., E. Cocucci, et al. (2002). "Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system." *Nat Cell Biol* **4**(12): 955-962.
- Bouquet, F., M. Cossee, et al. (2012). "Miyoshi-like distal myopathy with mutations in anoctamin 5 gene." *Rev Neurol (Paris)*.
- Bratkovic, T., G. Glavan, et al. (2012). "Exploiting microRNAs for cell engineering and therapy." *Biotechnol Adv* **30**(3): 753-765.
- Breen, M. A. and S. J. Ashcroft (1997). "A truncated isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II expressed in human islets of Langerhans may result from trans-splicing." *FEBS Lett* **409**(3): 375-379.
- Brockington, M., Y. Yuva, et al. (2001). "Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C." *Hum Mol Genet* **10**(25): 2851-2859.
- Brooks, Y. S., G. Wang, et al. (2009). "Functional pre- mRNA trans-splicing of coactivator CoAA and corepressor RBM4 during stem/progenitor cell differentiation." *J Biol Chem* **284**(27): 18033-18046.
- Bruzik, J. P. and T. Maniatis (1992). "Spliced leader RNAs from lower eukaryotes are trans-spliced in mammalian cells." *Nature* **360**(6405): 692-695.
- Budker, V., G. Zhang, et al. (1996). "Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes." *Gene Ther* **3**(7): 593-598.
- Bushby, K. (2009). "Diagnosis and management of the limb girdle muscular dystrophies." *Pract Neurol* **9**(6): 314-323.
- Cacciottolo, M., V. Belcastro, et al. (2011). "Reverse engineering gene network identifies new dysferlin-interacting proteins." *J Biol Chem* **286**(7): 5404-5413.
- Cai, C., H. Masumiya, et al. (2009). "MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery." *Nat Cell Biol* **11**(1): 56-64.
- Cai, C., N. Weisleder, et al. (2009). "Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin." *J Biol Chem* **284**(23): 15894-15902.
- Caputo, A., E. Caci, et al. (2008). "TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity." *Science* **322**(5901): 590-594.

- Casademont, J., S. Carpenter, et al. (1988). "Vacuolation of muscle fibers near sarcolemmal breaks represents T-tubule dilatation secondary to enhanced sodium pump activity." *J Neuropathol Exp Neurol* **47**(6): 618-628.
- Castle, J. C., C. Zhang, et al. (2008). "Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines." *Nat Genet* **40**(12): 1416-1425.
- Caudevilla, C., D. Serra, et al. (1998). "Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(21): 12185-12190.
- Cenacchi, G., M. Fanin, et al. (2005). "Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism." *J Clin Pathol* **58**(2): 190-195.
- Cermak, T., E. L. Doyle, et al. (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." *Nucleic Acids Res* **39**(12): e82.
- Cerny, J., Y. Feng, et al. (2004). "The small chemical vacuolin-1 inhibits Ca(2+)-dependent lysosomal exocytosis but not cell resealing." *EMBO Rep* **5**(9): 883-888.
- Chao, H., S. G. Mansfield, et al. (2003). "Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *Nat Med* **9**(8): 1015-1019.
- Chen, M. and J. L. Manley (2009). "Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(11): 741-754.
- Choi, E. R., S. J. Park, et al. (2010). "Early detection of cardiac involvement in Miyoshi myopathy: 2D strain echocardiography and late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance." *J Cardiovasc Magn Reson* **12**: 31.
- Chrobakova, T., M. Hermanova, et al. (2004). "Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome." *Neuromuscul Disord* **14**(10): 659-665.
- Clement, E. M., C. Godfrey, et al. (2008). "Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant." *Arch Neurol* **65**(1): 137-141.
- Coady, T. H., T. D. Baughan, et al. (2008). "Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts." *PLoS One* **3**(10): e3468.
- Coady, T. H. and C. L. Lorson (2010). "Trans-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy." *J Neurosci* **30**(1): 126-130.
- Coady, T. H., M. Shababi, et al. (2007). "Restoration of SMN function: delivery of a trans-splicing RNA re-directs SMN2 pre-mRNA splicing." *Mol Ther* **15**(8): 1471-1478.
- Cocquet, J., A. Chong, et al. (2006). "Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts." *Genomics* **88**(1): 127-131.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2007). "Enlargeosome traffic: exocytosis triggered by various signals is followed by endocytosis, membrane shedding or both." *Traffic* **8**(6): 742-757.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2004). "Enlargeosome, an exocytic vesicle resistant to nonionic detergents, undergoes endocytosis via a nonacidic route." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5356-5368.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2008). "The regulated exocytosis of enlargeosomes is mediated by a SNARE machinery that includes VAMP4." *J Cell Sci* **121**(Pt 18): 2983-2991.
- Confalonieri, P., L. Oliva, et al. (2003). "Muscle inflammation and MHC class I up-regulation in muscular dystrophy with lack of dysferlin: an immunopathological study." *J Neuroimmunol* **142**(1-2): 130-136.
- Couet, J., M. M. Belanger, et al. (2001). "Cell biology of caveolae and caveolin." *Adv Drug Deliv Rev* **49**(3): 223-235.
- Couet, J., S. Li, et al. (1997). "Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins." *J Biol Chem* **272**(10): 6525-6533.
- Coussens, L., P. J. Parker, et al. (1986). "Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways." *Science* **233**(4766): 859-866.

- Daboussi, F., M. Zaslavskiy, et al. (2012). "Chromosomal context and epigenetic mechanisms control the efficacy of genome editing by rare-cutting designer endonucleases." *Nucleic Acids Res* **40**(13): 6367-6379.
- Dallinger, G., M. Puttaraju, et al. (2000). "Collagen 17A1 gene correction using spliceosome mediated RNA trans-splicing (SMaRTtrade mark) technology." *J Invest Dermatol* **115**(2): 332.
- Dallinger, G., M. Puttaraju, et al. (2003). "Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases." *Exp Dermatol* **12**(1): 37-46.
- Das, A. and V. Bellofatto (2003). "RNA polymerase II-dependent transcription in trypanosomes is associated with a SNAP complex-like transcription factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 80-85.
- Das, S., Y. Hahn, et al. (2008). "Topology of NGEF, a prostate-specific cell:cell junction protein widely expressed in many cancers of different grade level." *Cancer Res* **68**(15): 6306-6312.
- Dautry-Varsat, A. (1986). "Receptor-mediated endocytosis: the intracellular journey of transferrin and its receptor." *Biochimie* **68**(3): 375-381.
- Davis, D. B., A. J. Delmonte, et al. (2000). "Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **9**(2): 217-226.
- Davis, D. B., K. R. Doherty, et al. (2002). "Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains." *J Biol Chem* **277**(25): 22883-22888.
- de Luna, N., E. Gallardo, et al. (2006). "Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro"." *J Biol Chem* **281**(25): 17092-17098.
- De Mello, W. C. (1973). "Membrane sealing in frog skeletal-muscle fibers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**(4): 982-984.
- de Morree, A., M. Droog, et al. (2012). "Self-regulated alternative splicing at the AHNK locus." *FASEB J* **26**(1): 93-103.
- de Morree, A., P. J. Hensbergen, et al. (2010). "Proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity." *PLoS One* **5**(11): e13854.
- Demonbreun, A. R., J. P. Fahrenbach, et al. (2011). "Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **20**(4): 779-789.
- Demonbreun, A. R., K. A. Lapidos, et al. (2010). "Myoferlin regulation by NFAT in muscle injury, regeneration and repair." *J Cell Sci* **123**(Pt 14): 2413-2422.
- Demonbreun, A. R., A. D. Posey, et al. (2010). "Myoferlin is required for insulin-like growth factor response and muscle growth." *FASEB J* **24**(4): 1284-1295.
- Deschauer, M., P. R. Joshi, et al. (2011). "[Muscular dystrophy due to mutations in anoctamin 5 : Clinical and molecular genetic findings]." *Nervenarzt* **82**(12): 1596-1603.
- Di Fulvio, S., B. A. Azakir, et al. (2011). "Dysferlin Interacts with Histone Deacetylase 6 and Increases alpha-Tubulin Acetylation." *PLoS One* **6**(12): e28563.
- Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy, et al. (2003). "Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover." *Nat Cell Biol* **5**(5): 410-421.
- Doherty, K. R., A. Cave, et al. (2005). "Normal myoblast fusion requires myoferlin." *Development* **132**(24): 5565-5575.
- Dong, B., H. Nakai, et al. (2010). "Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector." *Mol Ther* **18**(1): 87-92.
- Dorn, R., G. Reuter, et al. (2001). "Transgene analysis proves mRNA trans-splicing at the complex mod(mdg4) locus in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9724-9729.
- Duan, D., Y. Yue, et al. (2001). "Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison." *Mol Ther* **4**(4): 383-391.
- Duan, R. and P. J. Gallagher (2009). "Dependence of myoblast fusion on a cortical actin wall and nonmuscle myosin IIA." *Dev Biol* **325**(2): 374-385.

- Dunckley, M. G., D. J. Wells, et al. (1993). "Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo." *Hum Mol Genet* **2**(6): 717-723.
- Duran, C., Z. Qu, et al. (2012). "ANOs 3-7 in the anoctamin/Tmem16 Cl⁻ channel family are intracellular proteins." *Am J Physiol Cell Physiol* **302**(3): C482-493.
- Eddleman, C. S., C. M. Godell, et al. (1995). "Fluorescent labeling of the glial sheath of giant nerve fibers." *Biol Bull* **189**(2): 218-219.
- England, S. B., L. V. Nicholson, et al. (1990). "Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin." *Nature* **343**(6254): 180-182.
- Epinat, J. C., S. Arnould, et al. (2003). "A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **31**(11): 2952-2962.
- Erijman, A., A. Dantes, et al. (2011). "Transfer-PCR (TPCR): a highway for DNA cloning and protein engineering." *J Struct Biol* **175**(2): 171-177.
- Evesson, F. J., R. A. Peat, et al. (2010). "Reduced plasma membrane expression of dysferlin mutants is attributed to accelerated endocytosis via a syntaxin-4-associated pathway." *J Biol Chem* **285**(37): 28529-28539.
- Fairclough, R. J., A. Bareja, et al. (2011). "Progress in therapy for Duchenne muscular dystrophy." *Exp Physiol* **96**(11): 1101-1113.
- Fiskaa, T. and A. B. Birgisdottir (2010). "RNA reprogramming and repair based on trans-splicing group I ribozymes." *N Biotechnol* **27**(3): 194-203.
- Flouriot, G., H. Brand, et al. (2002). "Natural trans-spliced mRNAs are generated from the human estrogen receptor-alpha (hER alpha) gene." *J Biol Chem* **277**(29): 26244-26251.
- Fra, A. M., E. Williamson, et al. (1995). "De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8655-8659.
- Francis, V. G., M. A. Majeed, et al. (2012). "Recovery of functionally active recombinant human phospholipid scramblase 1 from inclusion bodies using N-lauroyl sarcosine." *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**(7): 1041-1048.
- Frenkel-Morgenstern, M., V. Lacroix, et al. (2012). "Chimeras taking shape: potential functions of proteins encoded by chimeric RNA transcripts." *Genome Res* **22**(7): 1231-1242.
- Frosk, P., T. Weiler, et al. (2002). "Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene." *Am J Hum Genet* **70**(3): 663-672.
- Galindo, B. E. and V. D. Vacquier (2005). "Phylogeny of the TMEM16 protein family: some members are overexpressed in cancer." *Int J Mol Med* **16**(5): 919-924.
- Gallardo, E., N. de Luna, et al. (2011). "Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy." *PLoS One* **6**(12): e29061.
- Galvin, J. E., D. Palamand, et al. (2006). "The muscle protein dysferlin accumulates in the Alzheimer brain." *Acta Neuropathol* **112**(6): 665-671.
- Garg, A. (2011). "Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders." *J Clin Endocrinol Metab* **96**(11): 3313-3325.
- Geisler, A., A. Jungmann, et al. (2011). "microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors." *Gene Ther* **18**(2): 199-209.
- Gerke, V., C. E. Creutz, et al. (2005). "Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(6): 449-461.
- Gerke, V. and S. E. Moss (2002). "Annexins: from structure to function." *Physiol Rev* **82**(2): 331-371.
- Gingeras, T. R. (2009). "Implications of chimaeric non-co-linear transcripts." *Nature* **461**(7261): 206-211.
- Glover, L. E., K. Newton, et al. (2010). "Dysferlin overexpression in skeletal muscle produces a progressive myopathy." *Ann Neurol* **67**(3): 384-393.
- Godfrey, C., E. Clement, et al. (2007). "Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan." *Brain* **130**(Pt 10): 2725-2735.

- Godfrey, C., D. Escolar, et al. (2006). "Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy." *Ann Neurol* **60**(5): 603-610.
- Gonzalez, L. J., E. Gibbons, et al. (2009). "The influence of membrane physical properties on microvesicle release in human erythrocytes." *PMC Biophys* **2**(1): 7.
- Greenberg, S. A., M. Salajegheh, et al. (2012). "Etiology of limb girdle muscular dystrophy 1D/1E determined by laser capture microdissection proteomics." *Ann Neurol* **71**(1): 141-145.
- Groer, G. J., M. Haslbeck, et al. (2008). "Structural characterization of soluble E-Syt2." *FEBS Lett* **582**(28): 3941-3947.
- Grose, W. E., K. R. Clark, et al. (2012). "Homologous Recombination Mediates Functional Recovery of Dysferlin Deficiency following AAV5 Gene Transfer." *PLoS One* **7**(6): e39233.
- Gruber, C., I. K. Gratz, et al. (2011). "Spliceosome-mediated RNA trans-splicing facilitates targeted delivery of suicide genes to cancer cells." *Mol Cancer Ther* **10**(2): 233-241.
- Grummt, I. (1999). "Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **62**: 109-154.
- Guieysse, A. L., D. Praseuth, et al. (1995). "Oligonucleotide-directed switching of DNA polymerases to a dead-end track." *Biochemistry* **34**(28): 9193-9199.
- Gundesli, H., B. Talim, et al. (2010). "Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy." *Am J Hum Genet* **87**(6): 834-841.
- Haase, H. (2007). "Ahnak, a new player in beta-adrenergic regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel." *Cardiovasc Res* **73**(1): 19-25.
- Han, R. and K. P. Campbell (2007). "Dysferlin and muscle membrane repair." *Curr Opin Cell Biol* **19**(4): 409-416.
- Han, R., E. M. Frett, et al. (2010). "Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice." *J Clin Invest* **120**(12): 4366-4374.
- Harms, M. B., R. B. Sommerville, et al. (2012). "Exome sequencing reveals DNAJB6 mutations in dominantly-inherited myopathy." *Ann Neurol* **71**(3): 407-416.
- Hartzell, H. C., K. Yu, et al. (2009). "Anoctamin/TMEM16 family members are Ca²⁺-activated Cl⁻ channels." *J Physiol* **587**(Pt 10): 2127-2139.
- Hashimoto, T., M. Amagai, et al. (1993). "Desmoyokin, a 680 kDa keratinocyte plasma membrane-associated protein, is homologous to the protein encoded by human gene AHNAK." *J Cell Sci* **105** (Pt 2): 275-286.
- Hauser, M. A., S. K. Horrigan, et al. (2000). "Myotilin is mutated in limb girdle muscular dystrophy 1A." *Hum Mol Genet* **9**(14): 2141-2147.
- He, B., R. H. Tang, et al. (2012). "Enhancing Muscle Membrane Repair by Gene Delivery of MG53 Ameliorates Muscular Dystrophy and Heart Failure in delta-Sarcoglycan-deficient Hamsters." *Mol Ther*.
- Heidrych, P., U. Zimmermann, et al. (2008). "Rab8b GTPase, a protein transport regulator, is an interacting partner of otoferlin, defective in a human autosomal recessive deafness form." *Hum Mol Genet* **17**(23): 3814-3821.
- Hengge, U. R. (2008). "SMaRT technology enables gene expression repair in skin gene therapy." *J Invest Dermatol* **128**(3): 499-500.
- Hicks, D., A. Sarkozy, et al. (2011). "A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy." *Brain* **134**(Pt 1): 171-182.
- Ho, M., E. Gallardo, et al. (2002). "A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy." *Ann Neurol* **51**(1): 129-133.
- Ho, M., C. M. Post, et al. (2004). "Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency." *Hum Mol Genet* **13**(18): 1999-2010.
- Holman, G. D., I. J. Kozka, et al. (1990). "Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bi-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipose cells by insulin and phorbol ester." *J Biol Chem* **265**(30): 18172-18179.

- Horiuchi, T., E. Giniger, et al. (2003). "Alternative trans-splicing of constant and variable exons of a *Drosophila* axon guidance gene, *lola*." *Genes Dev* **17**(20): 2496-2501.
- Houseley, J. and D. Tollervey (2010). "Apparent non-canonical trans-splicing is generated by reverse transcriptase in vitro." *PLoS One* **5**(8): e12271.
- Huang, F., J. R. Rock, et al. (2009). "Studies on expression and function of the TMEM16A calcium-activated chloride channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(50): 21413-21418.
- Huang, Y., A. de Morree, et al. (2008). "Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle." *Hum Mol Genet* **17**(12): 1855-1866.
- Huang, Y., S. H. Laval, et al. (2007). "AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration." *FASEB J* **21**(3): 732-742.
- Huang, Y., P. Verheesen, et al. (2005). "Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display." *Eur J Hum Genet* **13**(6): 721-730.
- Huber, H. E., J. M. McCoy, et al. (1989). "Human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase. Template binding, processivity, strand displacement synthesis, and template switching." *J Biol Chem* **264**(8): 4669-4678.
- Humphrey, G. W., E. Mekhedov, et al. (2012). "GREG cells, a dysferlin-deficient myogenic mouse cell line." *Exp Cell Res* **318**(2): 127-135.
- Idone, V., C. Tam, et al. (2008). "Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis." *J Cell Biol* **180**(5): 905-914.
- Illa, I., C. Serrano-Munuera, et al. (2001). "Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype." *Ann Neurol* **49**(1): 130-134.
- Illarioshkin, S. N., I. A. Ivanova-Smolenskaya, et al. (2000). "Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy." *Neurology* **55**(12): 1931-1933.
- Imamura, M., Y. Mochizuki, et al. (2005). "Epsilon-sarcoglycan compensates for lack of alpha-sarcoglycan in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy." *Hum Mol Genet* **14**(6): 775-783.
- Izzedine, H., I. Brocheriou, et al. (2006). "Loss of podocyte dysferlin expression is associated with minimal change nephropathy." *Am J Kidney Dis* **48**(1): 143-150.
- Jaiswal, J. K., G. Marlow, et al. (2007). "Patients with a non-dysferlin Miyoshi myopathy have a novel membrane repair defect." *Traffic* **8**(1): 77-88.
- Jarry, J., M. F. Rioux, et al. (2007). "A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12." *Brain* **130**(Pt 2): 368-380.
- Jensen, N. M., T. Dalsgaard, et al. (2011). "An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms." *J Biomed Sci* **18**: 10.
- Jimenez, J. L. and R. Bashir (2007). "In silico functional and structural characterisation of ferlin proteins by mapping disease-causing mutations and evolutionary information onto three-dimensional models of their C2 domains." *J Neurol Sci* **260**(1-2): 114-123.
- Johnson, C. P. and E. R. Chapman (2010). "Otoferlin is a calcium sensor that directly regulates SNARE-mediated membrane fusion." *J Cell Biol* **191**(1): 187-197.
- Kaisto, T. and K. Metsikko (2003). "Distribution of the endoplasmic reticulum and its relationship with the sarcoplasmic reticulum in skeletal myofibers." *Exp Cell Res* **289**(1): 47-57.
- Kawahara, G., P. R. Serafini, et al. (2011). "Characterization of zebrafish dysferlin by morpholino knockdown." *Biochem Biophys Res Commun* **413**(2): 358-363.
- Kennedy, M. B. (1995). "Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains." *Trends Biochem Sci* **20**(9): 350.
- Khrameeva, E. E., A. A. Mironov, et al. (2012). "Spatial proximity and similarity of the epigenetic state of genome domains." *PLoS One* **7**(3): e33947.
- Kierlin-Duncan, M. N. and B. A. Sullenger (2007). "Using 5'-PTMs to repair mutant beta-globin transcripts." *RNA* **13**(8): 1317-1327.

- Kikumori, T., G. J. Cote, et al. (2001). "Promiscuity of pre-mRNA spliceosome-mediated trans splicing: a problem for gene therapy?" *Hum Gene Ther* **12**(11): 1429-1441.
- Klinge, L., A. Aboumoussa, et al. (2010). "New aspects on patients affected by dysferlin deficient muscular dystrophy." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **81**(9): 946-953.
- Klinge, L., S. Laval, et al. (2007). "From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis." *FASEB J* **21**(8): 1768-1776.
- Koller, U., V. Wally, et al. (2011). "A novel screening system improves genetic correction by internal exon replacement." *Nucleic Acids Res* **39**(16): e108.
- Konarska, M. M., J. Vilardell, et al. (2006). "Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome." *Mol Cell* **21**(4): 543-553.
- Krahn, M., C. Beroud, et al. (2009). "Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients." *Hum Mutat* **30**(2): E345-375.
- Krahn, M., N. Wein, et al. (2010). "A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy." *Sci Transl Med* **2**(50): 50ra69.
- Krause, T. L., H. M. Fishman, et al. (1994). "Extent and mechanism of sealing in transected giant axons of squid and earthworms." *J Neurosci* **14**(11 Pt 1): 6638-6651.
- Kudryashova, E., I. Kramerova, et al. (2012). "Satellite cell senescence underlies myopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2H." *J Clin Invest* **122**(5): 1764-1776.
- Lachmann, N., S. Brenning, et al. (2012). "Efficient in vivo regulation of cytidine deaminase expression in the haematopoietic system using a doxycycline-inducible lentiviral vector system." *Gene Ther*.
- Lai, Y., D. Li, et al. (2008). "Design of trans-splicing adeno-associated viral vectors for Duchenne muscular dystrophy gene therapy." *Methods Mol Biol* **433**: 259-275.
- Lai, Y., Y. Yue, et al. (2006). "Synthetic intron improves transduction efficiency of trans-splicing adeno-associated viral vectors." *Hum Gene Ther* **17**(10): 1036-1042.
- Lai, Y., Y. Yue, et al. (2005). "Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors." *Nat Biotechnol* **23**(11): 1435-1439.
- Lambert, O., V. Gerke, et al. (1997). "Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy." *J Mol Biol* **272**(1): 42-55.
- Lange, S. J., D. Maticzka, et al. (2012). "Global or local? Predicting secondary structure and accessibility in mRNAs." *Nucleic Acids Res* **40**(12): 5215-5226.
- Lankes, W. T. and H. Furthmayr (1991). "Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8297-8301.
- Lederkremer, G. Z. (2009). "Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation." *Curr Opin Struct Biol* **19**(5): 515-523.
- Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *EMBO J* **23**(20): 4051-4060.
- Lek, A., F. J. Evesson, et al. (2012). "Ferlins: regulators of vesicle fusion for auditory neurotransmission, receptor trafficking and membrane repair." *Traffic* **13**(2): 185-194.
- Lek, A., M. Lek, et al. (2010). "Phylogenetic analysis of ferlin genes reveals ancient eukaryotic origins." *BMC Evol Biol* **10**: 231.
- Lennon, N. J., A. Kho, et al. (2003). "Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing." *J Biol Chem* **278**(50): 50466-50473.
- Leung, C., S. Utokaparch, et al. (2011). "Proteomic identification of dysferlin-interacting protein complexes in human vascular endothelium." *Biochem Biophys Res Commun* **415**(2): 263-269.
- Li, B. L., X. L. Li, et al. (1999). "Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) gene organization and evidence that the 4.3-kilobase ACAT-1 mRNA is produced from two different chromosomes." *J Biol Chem* **274**(16): 11060-11071.

- Li, H., V. Haurigot, et al. (2011). "In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia." *Nature* **475**(7355): 217-221.
- Lim, L. E., F. Duclos, et al. (1995). "Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12." *Nat Genet* **11**(3): 257-265.
- Lin, P., H. Zhu, et al. (2012). "Nonmuscle myosin IIA facilitates vesicle trafficking for MG53-mediated cell membrane repair." *FASEB J.*
- Lisanti, M. P., P. E. Scherer, et al. (1994). "Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis." *Trends Cell Biol* **4**(7): 231-235.
- Liu, J., M. Aoki, et al. (1998). "Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy." *Nat Genet* **20**(1): 31-36.
- Liu, L. A. and E. Engvall (1999). "Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle." *J Biol Chem* **274**(53): 38171-38176.
- Liu, X., Q. Jiang, et al. (2002). "Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *Nat Biotechnol* **20**(1): 47-52.
- Liu, X., M. Luo, et al. (2005). "Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells." *Hum Gene Ther* **16**(9): 1116-1123.
- Lorain, S., C. Peccate, et al. (2010). "Exon exchange approach to repair Duchenne dystrophin transcripts." *PLoS One* **5**(5): e10894.
- Lorusso, A., C. Covino, et al. (2006). "Annexin2 coating the surface of enlargeosomes is needed for their regulated exocytosis." *EMBO J* **25**(23): 5443-5456.
- Lostal, W., M. Bartoli, et al. (2010). "Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer." *Hum Mol Genet* **19**(10): 1897-1907.
- Lostal, W., M. Bartoli, et al. (2012). "Lack of Correlation between Outcomes of Membrane Repair Assay and Correction of Dystrophic Changes in Experimental Therapeutic Strategy in Dysferlinopathy." *PLoS One* **7**(5): e38036.
- Magri, F., R. D. Bo, et al. (2012). "Frequency and characterisation of anoctamin 5 mutations in a cohort of Italian limb-girdle muscular dystrophy patients." *Neuromuscul Disord.*
- Mahjneh, I., J. Jaiswal, et al. (2010). "A new distal myopathy with mutation in anoctamin 5." *Neuromuscul Disord* **20**(12): 791-795.
- Mahjneh, I., G. Marconi, et al. (2001). "Dysferlinopathy (LGMD2B): a 23-year follow-up study of 10 patients homozygous for the same frameshifting dysferlin mutations." *Neuromuscul Disord* **11**(1): 20-26.
- Manley, J. L. and A. R. Krainer (2010). "A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins)." *Genes Dev* **24**(11): 1073-1074.
- Manoury, B., A. Tamuleviciute, et al. (2010). "TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells." *J Physiol* **588**(Pt 13): 2305-2314.
- Mansfield, S. G., H. Chao, et al. (2004). "RNA repair using spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *Trends Mol Med* **10**(6): 263-268.
- Mansfield, S. G., R. H. Clark, et al. (2003). "5' exon replacement and repair by spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *RNA* **9**(10): 1290-1297.
- Mansfield, S. G., J. Kole, et al. (2000). "Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *Gene Ther* **7**(22): 1885-1895.
- Matsuda, C., Y. K. Hayashi, et al. (2001). "The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle." *Hum Mol Genet* **10**(17): 1761-1766.
- Matsuda, C., K. Kameyama, et al. (2005). "Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma." *J Neuropathol Exp Neurol* **64**(4): 334-340.
- McManus, C. J., M. O. Duff, et al. (2010). "Global analysis of trans-splicing in Drosophila." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(29): 12975-12979.

- McManus, C. J. and B. R. Graveley (2011). "RNA structure and the mechanisms of alternative splicing." Curr Opin Genet Dev **21**(4): 373-379.
- McNeil, P. L. (2002). "Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue." J Cell Sci **115**(Pt 5): 873-879.
- McNeil, P. L. and T. Kirchhausen (2005). "An emergency response team for membrane repair." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(6): 499-505.
- McNeil, P. L. and R. A. Steinhardt (2003). "Plasma membrane disruption: repair, prevention, adaptation." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 697-731.
- Mellgren, R. L., K. Miyake, et al. (2009). "Calcium-dependent plasma membrane repair requires m- or mu-calpain, but not calpain-3, the proteasome, or caspases." Biochim Biophys Acta **1793**(12): 1886-1893.
- Mercer, T. R., M. E. Dinger, et al. (2010). "Regulated post-transcriptional RNA cleavage diversifies the eukaryotic transcriptome." Genome Res **20**(12): 1639-1650.
- Meznaric, M., L. Gonzalez-Quereda, et al. (2011). "Abnormal expression of dysferlin in skeletal muscle and monocytes supports primary dysferlinopathy in patients with one mutated allele." Eur J Neurol **18**(7): 1021-1023.
- Milenkovic, V. M., M. Brockmann, et al. (2010). "Evolution and functional divergence of the anoctamin family of membrane proteins." BMC Evol Biol **10**: 319.
- Milone, M., T. Liewluck, et al. (2011). "Amyloidosis and exercise intolerance in ANO5 muscular dystrophy." Neuromuscul Disord.
- Milone, M., T. Liewluck, et al. (2012). "Amyloidosis and exercise intolerance in ANO5 muscular dystrophy." Neuromuscul Disord **22**(1): 13-15.
- Min, S. W., W. P. Chang, et al. (2007). "E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 3823-3828.
- Minetti, C., F. Sotgia, et al. (1998). "Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy." Nat Genet **18**(4): 365-368.
- Mitchell, L. G. and G. J. McGarrity (2005). "Gene therapy progress and prospects: reprogramming gene expression by trans-splicing." Gene Ther **12**(20): 1477-1485.
- Miyake, N., K. Miyake, et al. (2011). "Global gene transfer into the CNS across the BBB after neonatal systemic delivery of single-stranded AAV vectors." Brain Res **1389**: 19-26.
- Miyoshi, K., H. Kawai, et al. (1986). "Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case." Brain **109** (Pt 1): 31-54.
- Mizuta, K., S. Tsutsumi, et al. (2007). "Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia." Biochem Biophys Res Commun **357**(1): 126-132.
- Moreira, E. S., T. J. Wiltshire, et al. (2000). "Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin." Nat Genet **24**(2): 163-166.
- Muchir, A., G. Bonne, et al. (2000). "Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B)." Hum Mol Genet **9**(9): 1453-1459.
- Murauer, E. M., Y. Gache, et al. (2011). "Functional correction of type VII collagen expression in dystrophic epidermolysis bullosa." J Invest Dermatol **131**(1): 74-83.
- Nagaraju, K., R. Rawat, et al. (2008). "Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B." Am J Pathol **172**(3): 774-785.
- Nalefski, E. A. and J. J. Falke (1996). "The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity." Protein Sci **5**(12): 2375-2390.
- Nelson, S. F., R. H. Crosbie, et al. (2009). "Emerging genetic therapies to treat Duchenne muscular dystrophy." Curr Opin Neurol **22**(5): 532-538.

- Nguyen, K., G. Bassez, et al. (2007). "Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes." *Arch Neurol* **64**(8): 1176-1182.
- Nigro, V., E. de Sa Moreira, et al. (1996). "Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene." *Nat Genet* **14**(2): 195-198.
- Nishikawa, S., J. L. Brodsky, et al. (2005). "Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD)." *J Biochem* **137**(5): 551-555.
- Noguchi, S., E. M. McNally, et al. (1995). "Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy." *Science* **270**(5237): 819-822.
- Odelberg, S. J., R. B. Weiss, et al. (1995). "Template-switching during DNA synthesis by *Thermus aquaticus* DNA polymerase I." *Nucleic Acids Res* **23**(11): 2049-2057.
- Ousingsawat, J., P. Kongsuphol, et al. (2011). "CFTR and TMEM16A are separate but functionally related Cl⁻ channels." *Cell Physiol Biochem* **28**(4): 715-724.
- Ousingsawat, J., J. R. Martins, et al. (2009). "Loss of TMEM16A causes a defect in epithelial Ca²⁺-dependent chloride transport." *J Biol Chem* **284**(42): 28698-28703.
- Padgett, R. A. (2012). "New connections between splicing and human disease." *Trends Genet* **28**(4): 147-154.
- Palenzuela, L., A. L. Andreu, et al. (2003). "A novel autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 1F) maps to 7q32.1-32.2." *Neurology* **61**(3): 404-406.
- Papaioannou, I., J. P. Simons, et al. (2012). "Oligonucleotide-directed gene-editing technology: mechanisms and future prospects." *Expert Opin Biol Ther* **12**(3): 329-342.
- Paradas, C., L. Gonzalez-Quereda, et al. (2009). "A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset." *Neuromuscul Disord* **19**(1): 21-25.
- Park, S. H., H. K. Chung, et al. (2011). "Overexpression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the C-terminal cytosolic domain of mouse anoctamin 1." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **67**(Pt 10): 1250-1252.
- Parsons, M., R. G. Nelson, et al. (1984). "Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence." *Cell* **38**(1): 309-316.
- Parton, R. G. (1996). "Caveolae and caveolins." *Curr Opin Cell Biol* **8**(4): 542-548.
- Passos-Bueno, M. R., R. Bashir, et al. (1995). "Confirmation of the 2p locus for the mild autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy gene (LGMD2B) in three families allows refinement of the candidate region." *Genomics* **27**(1): 192-195.
- Patel, P., R. Harris, et al. (2008). "Solution structure of the inner DysF domain of myoferlin and implications for limb girdle muscular dystrophy type 2b." *J Mol Biol* **379**(5): 981-990.
- Patel, R., M. Lin, et al. (1996). "Formation of chimeric DNA primer extension products by template switching onto an annealed downstream oligonucleotide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(7): 2969-2974.
- Penisson-Besnier, I., J. P. Saint-Andre, et al. (2012). "Myopathy caused by anoctamin 5 mutations and necrotizing vasculitis." *J Neurol*.
- Penttila, S., J. Palmio, et al. (2012). "Eight new mutations and the expanding phenotype variability in muscular dystrophy caused by ANO5." *Neurology* **78**(12): 897-903.
- Pepio, A. M., X. Fan, et al. (1998). "The role of C2 domains in Ca²⁺-activated and Ca²⁺-independent protein kinase Cs in aplysia." *J Biol Chem* **273**(30): 19040-19048.
- Perez-Cornejo, P., A. Gokhale, et al. (2012). "Anoctamin 1 (Tmem16A) Ca²⁺-activated chloride channel stoichiometrically interacts with an ezrin-radixin-moesin network." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(26): 10376-10381.
- Perretti, M. and R. J. Flower (2004). "Annexin 1 and the biology of the neutrophil." *J Leukoc Biol* **76**(1): 25-29.
- Philippi, S., A. Bigot, et al. (2012). "Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy." *PLoS Curr* **4**: RRN1298.
- Piccolo, F., S. A. Moore, et al. (2000). "Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies." *Ann Neurol* **48**(6): 902-912.

- Pierce, E. A., Q. Liu, et al. (2003). "Oligonucleotide-directed single-base DNA alterations in mouse embryonic stem cells." *Gene Ther* **10**(1): 24-33.
- Posey, A. D., Jr., A. Demonbreun, et al. (2011). "Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth." *Curr Top Dev Biol* **96**: 203-230.
- Posey, A. D., Jr., P. Pytel, et al. (2011). "Endocytic recycling proteins EHD1 and EHD2 interact with fer-1-like-5 (Fer1L5) and mediate myoblast fusion." *J Biol Chem* **286**(9): 7379-7388.
- Potgieter, M., E. Pretorius, et al. (2011). "Histological assessment of SJL/J mice treated with the antioxidants coenzyme Q10 and resveratrol." *Micron* **42**(3): 275-282.
- Pramono, Z. A., P. S. Lai, et al. (2006). "Identification and characterization of a novel human dysferlin transcript: dysferlin_v1." *Hum Genet* **120**(3): 410-419.
- Pramono, Z. A., C. L. Tan, et al. (2009). "Identification and characterisation of human dysferlin transcript variants: implications for dysferlin mutational screening and isoforms." *Hum Genet* **125**(4): 413-420.
- Puttaraju, M., J. DiPasquale, et al. (2001). "Messenger RNA repair and restoration of protein function by spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *Mol Ther* **4**(2): 105-114.
- Puttaraju, M., S. F. Jamison, et al. (1999). "Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy." *Nat Biotechnol* **17**(3): 246-252.
- Qian, Z. M., H. Li, et al. (2002). "Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway." *Pharmacol Rev* **54**(4): 561-587.
- Qiao, C., Z. Yuan, et al. (2011). "Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver." *Gene Ther* **18**(4): 403-410.
- Racchetti, G., R. D'Alessandro, et al. (2012). "Astrocyte stellation, a process dependent on Rac1 is sustained by the regulated exocytosis of enlargeosomes." *Glia* **60**(3): 465-475.
- Racchetti, G., A. Lorusso, et al. (2010). "Rapid neurite outgrowth in neurosecretory cells and neurons is sustained by the exocytosis of a cytoplasmic organelle, the enlargeosome." *J Cell Sci* **123**(Pt 2): 165-170.
- Radley, H. G., M. J. Davies, et al. (2008). "Reduced muscle necrosis and long-term benefits in dystrophic mdx mice after cV1q (blockade of TNF) treatment." *Neuromuscul Disord* **18**(3): 227-238.
- Ragot, T., N. Vincent, et al. (1993). "Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice." *Nature* **361**(6413): 647-650.
- Ranganathan, R. and E. M. Ross (1997). "PDZ domain proteins: scaffolds for signaling complexes." *Curr Biol* **7**(12): R770-773.
- Rappsilber, J., U. Ryder, et al. (2002). "Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome." *Genome Res* **12**(8): 1231-1245.
- Rezvanpour, A., L. Santamaria-Kisiel, et al. (2011). "The S100A10-annexin A2 complex provides a novel asymmetric platform for membrane repair." *J Biol Chem* **286**(46): 40174-40183.
- Richard, I., O. Broux, et al. (1995). "Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A." *Cell* **81**(1): 27-40.
- Rintala-Dempsey, A. C., A. Rezvanpour, et al. (2008). "S100-annexin complexes--structural insights." *FEBS J* **275**(20): 4956-4966.
- Rio, D. C., M. Ares, Jr., et al. (2010). "Removal of DNA from RNA." *Cold Spring Harb Protoc* **2010**(6): pdb prot5443.
- Rios, E., J. J. Ma, et al. (1991). "The mechanical hypothesis of excitation-contraction (EC) coupling in skeletal muscle." *J Muscle Res Cell Motil* **12**(2): 127-135.
- Roberds, S. L., F. Leturcq, et al. (1994). "Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy." *Cell* **78**(4): 625-633.
- Robinson, J. M., D. D. Vandre, et al. (2009). "Placental proteomics: a shortcut to biological insight." *Placenta* **30** Suppl A: S83-89.

- Roche, J. A., L. W. Ru, et al. (2011). "Unmasking potential intracellular roles for dysferlin through improved immunolabeling methods." *J Histochem Cytochem* **59**(11): 964-975.
- Rochlin, K., S. Yu, et al. (2010). "Myoblast fusion: when it takes more to make one." *Dev Biol* **341**(1): 66-83.
- Rock, J. R., W. K. O'Neal, et al. (2009). "Transmembrane protein 16A (TMEM16A) is a Ca²⁺-regulated Cl⁻ secretory channel in mouse airways." *J Biol Chem* **284**(22): 14875-14880.
- Rodriguez-Martin, T., K. Anthony, et al. (2009). "Correction of tau mis-splicing caused by FTDP-17 MAPT mutations by spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *Hum Mol Genet* **18**(17): 3266-3273.
- Rodriguez-Martin, T., M. A. Garcia-Blanco, et al. (2005). "Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: implications for tauopathies." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15659-15664.
- Roginsky, V. V., A. L. Ivanov, et al. (2010). "Recurring gnathodiaphyseal dysplasia in two Russian brothers." *Int J Oral Maxillofac Surg* **39**(4): 397-401.
- Romanenko, V. G., M. A. Catalan, et al. (2010). "Tmem16A encodes the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells." *J Biol Chem* **285**(17): 12990-13001.
- Romani, A., E. Guerra, et al. (2003). "Detection and analysis of spliced chimeric mRNAs in sequence databanks." *Nucleic Acids Res* **31**(4): e17.
- Roostalu, U. and U. Strahle (2012). "In Vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma." *Dev Cell* **22**(3): 515-529.
- Rosales, X. Q., J. M. Gastier-Foster, et al. (2010). "Novel diagnostic features of dysferlinopathies." *Muscle Nerve* **42**(1): 14-21.
- Rosales, X. Q., S. J. Moser, et al. (2011). "Cardiovascular magnetic resonance of cardiomyopathy in limb girdle muscular dystrophy 2B and 2I." *J Cardiovasc Magn Reson* **13**: 39.
- Roux, I., S. Safieddine, et al. (2006). "Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse." *Cell* **127**(2): 277-289.
- Roux, M., H. Leveziel, et al. (2006). "Cotranscription and intergenic splicing of the PPARG and TSEN2 genes in cattle." *BMC Genomics* **7**: 71.
- Sakuma, T., M. A. Barry, et al. (2012). "Lentiviral vectors: basic to translational." *Biochem J* **443**(3): 603-618.
- Salani, S., S. Lucchiari, et al. (2004). "Developmental and tissue-specific regulation of a novel dysferlin isoform." *Muscle Nerve* **30**(3): 366-374.
- Sancho, M., A. Garcia-Pascual, et al. (2012). "Presence of the Ca²⁺-activated chloride channel anoctamin 1 in the urethra and its role in excitatory neurotransmission." *Am J Physiol Renal Physiol* **302**(3): F390-400.
- Schapiro, A. L., V. Valpuesta, et al. (2009). "Plasma membrane repair in plants." *Trends Plant Sci* **14**(12): 645-652.
- Schessl, J., W. Kress, et al. (2012). "Novel ANO5 mutations causing hyper-CK-emia, limb girdle muscular weakness and miyoshi type of muscular dystrophy." *Muscle Nerve* **45**(5): 740-742.
- Schreiber, R., I. Uliyakina, et al. (2010). "Expression and function of epithelial anoctamins." *J Biol Chem* **285**(10): 7838-7845.
- Schroeder, B. C., T. Cheng, et al. (2008). "Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit." *Cell* **134**(6): 1019-1029.
- Schug, N., C. Braig, et al. (2006). "Differential expression of otoferlin in brain, vestibular system, immature and mature cochlea of the rat." *Eur J Neurosci* **24**(12): 3372-3380.
- Schulte, C., G. Racchetti, et al. (2010). "A new form of neurite outgrowth sustained by the exocytosis of enlargeosomes expressed under the control of REST." *Traffic* **11**(10): 1304-1314.
- Selcen, D., G. Stilling, et al. (2001). "The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy." *Neurology* **56**(11): 1472-1481.
- Sepulveda, J. L. and C. Wu (2006). "The parvins." *Cell Mol Life Sci* **63**(1): 25-35.
- Serra, M. and K. Scotlandi (2009). "Caveolins in the development and diseases of musculoskeletal system." *Cancer Lett* **284**(2): 113-121.

- Shababi, M. and C. L. Lorson (2012). "Optimization of SMN trans-splicing through the analysis of SMN introns." J Mol Neurosci **46**(3): 459-469.
- Shammas, F. V., R. Heikkila, et al. (2001). "Fluorescence-based method for measuring and determining the mechanisms of recombination in quantitative PCR." Clin Chim Acta **304**(1-2): 19-28.
- Sharma, A., C. Yu, et al. (2010). "A new role for the muscle repair protein dysferlin in endothelial cell adhesion and angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(11): 2196-2204.
- Shin, O. H., W. Han, et al. (2005). "Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca²⁺ binding properties." J Biol Chem **280**(2): 1641-1651.
- Shtivelman, E., F. E. Cohen, et al. (1992). "A human gene (AHNAK) encoding an unusually large protein with a 1.2-microns polyionic rod structure." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5472-5476.
- Sigismund, S., T. Woelk, et al. (2005). "Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2760-2765.
- Sims, R. J., 3rd, S. S. Mandal, et al. (2004). "Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription." Curr Opin Cell Biol **16**(3): 263-271.
- Sinnreich, M., C. Therrien, et al. (2006). "Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy." Neurology **66**(7): 1114-1116.
- Slot, J. W., H. J. Geuze, et al. (1991). "Immuno-localization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat." J Cell Biol **113**(1): 123-135.
- Smith, M. K. and B. T. Wakimoto (2007). "Complex regulation and multiple developmental functions of misfire, the *Drosophila melanogaster* ferlin gene." BMC Dev Biol **7**: 21.
- Smith, P. J., C. Zhang, et al. (2006). "An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers." Hum Mol Genet **15**(16): 2490-2508.
- Sorrentino, V. (2011). "Sarcoplasmic reticulum: structural determinants and protein dynamics." Int J Biochem Cell Biol **43**(8): 1075-1078.
- Spuler, S., M. Carl, et al. (2008). "Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis." Ann Neurol **63**(3): 323-328.
- Starling, A., F. Kok, et al. (2004). "A new form of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy (LGMD1G) with progressive fingers and toes flexion limitation maps to chromosome 4p21." Eur J Hum Genet **12**(12): 1033-1040.
- Stephan, A. B., E. Y. Shum, et al. (2009). "ANO2 is the cilia calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(28): 11776-11781.
- Stohr, H., J. B. Heisig, et al. (2009). "TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals." J Neurosci **29**(21): 6809-6818.
- Stover, N. A., M. S. Kaye, et al. (2006). "Spliced leader trans-splicing." Curr Biol **16**(1): R8-9.
- Sun, N., J. Liang, et al. (2012). "Optimized TAL effector nucleases (TALENs) for use in treatment of sickle cell disease." Mol Biosyst **8**(4): 1255-1263.
- Suzuki, J., M. Umeda, et al. (2010). "Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F." Nature **468**(7325): 834-838.
- Suzuki, N., T. Akiyama, et al. (2012). "Continuous administration of poloxamer 188 reduces overload-induced muscular atrophy in dysferlin-deficient SJL mice." Neurosci Res **72**(2): 181-186.
- Tae, H., M. G. Casarotto, et al. (2009). "Ubiquitous SPRY domains and their role in the skeletal type ryanodine receptor." Eur Biophys J **39**(1): 51-59.
- Tahara, M., R. G. Pergolizzi, et al. (2004). "Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency." Nat Med **10**(8): 835-841.
- Takekura, H., N. Fujinami, et al. (2001). "Eccentric exercise-induced morphological changes in the membrane systems involved in excitation-contraction coupling in rat skeletal muscle." J Physiol **533**(Pt 2): 571-583.

- Terasaki, M., K. Miyake, et al. (1997). "Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca²⁺-dependent vesicle-vesicle fusion events." *J Cell Biol* **139**(1): 63-74.
- Therrien, C., S. Di Fulvio, et al. (2009). "Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides." *Biochemistry* **48**(11): 2377-2384.
- Tian, Y., R. Schreiber, et al. (2012). "Anoctamins are a family of Ca²⁺ activated Cl⁻ channels." *J Cell Sci*.
- Togo, T., J. M. Alderton, et al. (1999). "The mechanism of facilitated cell membrane resealing." *J Cell Sci* **112** (Pt 5): 719-731.
- Topisirovic, I., Y. V. Svitkin, et al. (2011). "Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression." *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**(2): 277-298.
- Tsutsumi, S., H. Inoue, et al. (2005). "Molecular cloning and characterization of the murine gnathodiaphyseal dysplasia gene GDD1." *Biochem Biophys Res Commun* **331**(4): 1099-1106.
- Tsutsumi, S., N. Kamata, et al. (2004). "The novel gene encoding a putative transmembrane protein is mutated in gnathodiaphyseal dysplasia (GDD)." *Am J Hum Genet* **74**(6): 1255-1261.
- Udd, B. (1992). "Limb-girdle type muscular dystrophy in a large family with distal myopathy: homozygous manifestation of a dominant gene?" *J Med Genet* **29**(6): 383-389.
- Udd, B. (2012). "Distal myopathies--new genetic entities expand diagnostic challenge." *Neuromuscul Disord* **22**(1): 5-12.
- Vafiadaki, E., A. Reis, et al. (2001). "Cloning of the mouse dysferlin gene and genomic characterization of the SJL-Dysf mutation." *Neuroreport* **12**(3): 625-629.
- van Haagen, H. H., P. A. t Hoen, et al. (2011). "In silico discovery and experimental validation of new protein-protein interactions." *Proteomics* **11**(5): 843-853.
- Vandre, D. D., W. E. t. Ackerman, et al. (2007). "Dysferlin is expressed in human placenta but does not associate with caveolin." *Biol Reprod* **77**(3): 533-542.
- Viles, K. D. and B. A. Sullenger (2008). "Proximity-dependent and proximity-independent trans-splicing in mammalian cells." *RNA* **14**(6): 1081-1094.
- Vincent, N., T. Ragot, et al. (1993). "Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene." *Nat Genet* **5**(2): 130-134.
- von der Hagen, M., S. H. Laval, et al. (2005). "The differential gene expression profiles of proximal and distal muscle groups are altered in pre-pathological dysferlin-deficient mice." *Neuromuscul Disord* **15**(12): 863-877.
- Waddell, L. B., F. A. Lemckert, et al. (2011). "Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch." *J Neuropathol Exp Neurol* **70**(4): 302-313.
- Wahl, M. C., C. L. Will, et al. (2009). "The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine." *Cell* **136**(4): 701-718.
- Walls, Z. F., M. Puttaraju, et al. (2008). "A generalizable strategy for imaging pre-mRNA levels in living subjects using spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *J Nucl Med* **49**(7): 1146-1154.
- Wally, V., M. Brunner, et al. (2010). "K14 mRNA reprogramming for dominant epidermolysis bullosa simplex." *Hum Mol Genet* **19**(23): 4715-4725.
- Wally, V., A. Klausegger, et al. (2008). "5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene." *J Invest Dermatol* **128**(3): 568-574.
- Wally, V., E. M. Murauer, et al. (2012). "Spliceosome-Mediated Trans-Splicing: The Therapeutic Cut and Paste." *J Invest Dermatol*.
- Wang, B., Z. Yang, et al. (2010). "Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression." *J Appl Physiol* **109**(3): 901-905.
- Wang, Y., M. Ma, et al. (2012). "Intronic splicing enhancers, cognate splicing factors and context-dependent regulation rules." *Nat Struct Mol Biol* **19**(10): 1044-1052.

- Weiler, T., R. Bashir, et al. (1999). "Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s)." *Hum Mol Genet* **8**(5): 871-877.
- Weiler, T., C. R. Greenberg, et al. (1996). "Limb-girdle muscular dystrophy and Miyoshi myopathy in an aboriginal Canadian kindred map to LGMD2B and segregate with the same haplotype." *Am J Hum Genet* **59**(4): 872-878.
- Wein, N., A. Avril, et al. (2010). "Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping." *Hum Mutat* **31**(2): 136-142.
- Wein, N., M. Krahn, et al. (2010). "Immunolabelling and flow cytometry as new tools to explore dysferlinopathies." *Neuromuscul Disord* **20**(1): 57-60.
- Welch, E. M., E. R. Barton, et al. (2007). "PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations." *Nature* **447**(7140): 87-91.
- Weller, A. H., S. A. Magliato, et al. (1997). "Spontaneous myopathy in the SJL/J mouse: pathology and strength loss." *Muscle Nerve* **20**(1): 72-82.
- Wenzel, K., C. Geier, et al. (2007). "Dysfunction of dysferlin-deficient hearts." *J Mol Med (Berl)* **85**(11): 1203-1214.
- Wenzel, K., J. Zabojszcza, et al. (2005). "Increased susceptibility to complement attack due to down-regulation of decay-accelerating factor/CD55 in dysferlin-deficient muscular dystrophy." *J Immunol* **175**(9): 6219-6225.
- Williams, T. M. and M. P. Lisanti (2004). "The caveolin proteins." *Genome Biol* **5**(3): 214.
- Wu, Z., H. Yang, et al. (2010). "Effect of genome size on AAV vector packaging." *Mol Ther* **18**(1): 80-86.
- Xiao, Q., K. Yu, et al. (2011). "Voltage- and calcium-dependent gating of TMEM16A/Ano1 chloride channels are physically coupled by the first intracellular loop." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(21): 8891-8896.
- Xu, L., S. Pallikkuth, et al. (2011). "Dysferlin forms a dimer mediated by the c2 domains and the transmembrane domain in vitro and in living cells." *PLoS One* **6**(11): e27884.
- Xu, Z., Y. Yue, et al. (2004). "Trans-splicing adeno-associated viral vector-mediated gene therapy is limited by the accumulation of spliced mRNA but not by dual vector coinfection efficiency." *Hum Gene Ther* **15**(9): 896-905.
- Yamaji, S., A. Suzuki, et al. (2004). "Affixin interacts with alpha-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction." *J Cell Biol* **165**(4): 539-551.
- Yan, Z., Y. Zhang, et al. (2000). "Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(12): 6716-6721.
- Yang, J., W. Zhou, et al. (1999). "Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination." *J Virol* **73**(11): 9468-9477.
- Yang, L., H. Lochmuller, et al. (1998). "Adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer improves muscle strength in adult dystrophic (MDX) mice." *Gene Ther* **5**(3): 369-379.
- Yang, Y. and C. E. Walsh (2005). "Spliceosome-mediated RNA trans-splicing." *Mol Ther* **12**(6): 1006-1012.
- Yang, Y. D., H. Cho, et al. (2008). "TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance." *Nature* **455**(7217): 1210-1215.
- Yasunaga, S., M. Grati, et al. (2000). "OTOF encodes multiple long and short isoforms: genetic evidence that the long ones underlie recessive deafness DFNB9." *Am J Hum Genet* **67**(3): 591-600.
- Yasunaga, S., M. Grati, et al. (1999). "A mutation in OTOF, encoding otoferlin, a FER-1-like protein, causes DFNB9, a nonsyndromic form of deafness." *Nat Genet* **21**(4): 363-369.
- Yu, K., C. Duran, et al. (2012). "Explaining calcium-dependent gating of anoctamin-1 chloride channels requires a revised topology." *Circ Res* **110**(7): 990-999.
- Zayed, H., L. Xia, et al. (2007). "Correction of DNA protein kinase deficiency by spliceosome-mediated RNA trans-splicing and sleeping beauty transposon delivery." *Mol Ther* **15**(7): 1273-1279.
- Zhang, P., C. Wong, et al. (1999). "p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step." *Genes Dev* **13**(2): 213-224.

ANNEXES |

I. Annexe I : Protéines impliquées dans les LGMD

A. Les formes autosomiques dominantes des LGMD

La LGMD1A est due à des anomalies dans la myotiline, une protéine du disque Z impliquée dans l'assemblage des myofibrilles. La LGMD1B est liée à des mutations du gène LMNA, codant les lamines A/C, constituantes de la lamina nucléaire et assurant le maintien du noyau. La LGMD1C est due à des mutations du gène CAV3 et aux altérations de cavéoline-3 qui en découlent. La cavéoline-3 est une protéine retrouvée au niveau des cavéoles, de petites invaginations de la membrane des cellules impliquées dans le trafic vésiculaire et la distribution du cholestérol. La LGMD1D a récemment été associée à la cardiomyopathie dilatée de type 1F (cardiomyopathy, dilated 1F, CMD1F) car elle est due à des mutations présentes au niveau du gène DES codant la desmine. La desmine est une protéine des filaments intermédiaires. Elle participe au réseau liant l'enveloppe nucléaire aux disques Z des sarcomères et à la membrane plasmique. La LGMD1E est due à des mutations dans le gène DNAJB6, qui code pour une protéine chaperonne membre de la famille des HSP40/DNAJ, dont le rôle est de prévenir l'agrégation de certaines protéines en cours de synthèse. Pour les LGMD1F, 1G et 1H, seule les régions du génome où se trouvent les gènes impliqués dans leur survenue sont connues.

B. Les formes autosomiques récessives des LGMD

Les LGMD récessives forment un groupe de maladies plus vaste que celui des formes dominantes, avec 16 LGMD2 distinctes répertoriées. Quatre groupes peuvent être établis selon le mécanisme physiopathologique impliqué dans la maladie

LGMD2 dues à une instabilité de la membrane plasmique :

Un grand groupe réunit des protéines impliquées directement ou indirectement dans la stabilité et la résistance mécanique de la membrane cellulaire. Les myopathies des ceintures 2C, 2D, 2E et 2F (sarcoglycanopathies) sont ainsi liées à des mutations dans les gènes qui codent respectivement la gamma-sarcoglycane, l'alpha-sarcoglycane, la bêta-sarcoglycane et la delta-sarcoglycane. Ces 4 protéines forment un complexe situé à la membrane des cellules musculaires qui concourt à la stabilité et à la résistance mécanique de la membrane grâce à son interaction avec le réseau d'actine *via* la dystrophine. Un déficit en une seule des quatre sarcoglycanes

entraîne la disparition du complexe entier à la membrane. Les myopathies des ceintures 2I, 2K, 2M, 2N et 2O sont dues à des anomalies dans les gènes qui codent des enzymes, respectivement FKRP, POMT1, la fukutine, POMT2 et POMGnT1. Ces cinq protéines sont impliquées dans la glycosylation et le bon fonctionnement de l'alpha-dystroglycane. La présence des sucres apportés directement ou indirectement par ces enzymes est nécessaire à l'interaction entre l'alpha-dystroglycane et des protéines de la matrice extracellulaire. L'alpha-dystroglycane est connu pour jouer un rôle dans la stabilité et la résistance mécanique de la membrane de la cellule lors des contractions du muscle.

LGMD2 dues à des défauts de réparation membranaire :

Les LGMD2B et 2L sont liées à des défauts de la réparation de la membrane plasmique. La LGMD2B est due à des anomalies dans le gène DYSF, provoquant l'absence ou la traduction d'une dysferline non fonctionnelle, connue pour sa participation à la réparation de la membrane lésée. La LGMD2L est due à des mutations du gène ANO5 (ou TMEM16E). La fonction supposée de l'anoctamine 5 est d'être un canal chlore calcium dépendant. Des tests de réparation membranaire menés sur des cellules de malades ont révélés une incapacité à réparer leur membrane suite à une lésion.

LGMD2 dues à une sénescence des cellules satellites :

La LGMD2H est due à un déficit en enzyme TRIM32 codée par le gène éponyme, une enzyme de type E3-ubiquitine ligase adressant les protéines ubiquitinylées vers le protéasome. Récemment, il a été montré que l'absence de TRIM32 dans le muscle provoquait le vieillissement prématuré de la population de cellule satellite, réduisant d'autant la capacité de régénération du muscle (Kudryashova, Kramerova et al. 2012).

LGMD2 dues à une déstructuration du sarcomère :

Les LGMD2G et 2J sont dues respectivement à des anomalies dans le gène de la TCAP et TTN. Ils codent la téléthonine et la titine qui sont des protéines du sarcomère. La titine est une protéine géante structurant et renforçant le sarcomère, grâce à sa taille et son élasticité. La téléthonine permet l'encrage de la partie N-terminale de la titine au niveau du disque Z. La LGMD2A est due à des anomalies dans le gène CAPN3, codant la calpaïne 3. La calpaïne 3 est une protéase spécifique du muscle squelettique, qui prend part dans l'organisation du sarcomère, la régulation du cytosquelette et l'apoptose. Une des capacités de la calpaïne 3 est de couper la titine. La LGMD2Q est provoquée par des mutations dans PLEC1, codant la plectine. La plectine permet le lien des

trois composés majeurs du cytosquelette : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Elle lie également le disque-Z avec les filaments intermédiaires.

II. Annexe II : Les protéines de la famille des Ferlines.

A. La myoferline

La Myoferline est une protéine de 230 kDa, qui comme la dysferline contient un domaine transmembranaire carboxy-terminal et sept domaines C2. Elle est homologue à 56% (et similaire à 72%) à la dysferline (EMBOSS Needle - Alignement, www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle). La myoferline est exprimée dans le placenta, le cœur, les poumons, les cellules endothéliales et à un niveau moindre dans les muscles squelettiques adultes (Davis, Delmonte et al. 2000). L'expression de la myoferline est forte dans les myoblastes, en particulier en cours de différenciation, puis diminue au stade myotube, ce qui est l'inverse de ce qui est observé pour la dysferline (Figure 1) (Davis, Delmonte et al. 2000; Doherty, Cave et al. 2005). A maturité, la myofibrille exprime la myoferline qui se retrouve pour partie à la membrane plasmique mais également à la membrane nucléaire (Davis, Delmonte et al. 2000). Aucun rôle n'a été identifié à ce jour pour cette myoferline périnucléaire, seulement qu'il peut s'agir de molécules en cours de maturation ou présente dans des vésicules intracellulaires. De façon très nette en revanche, lors de la fusion nécessaire à la différenciation, la myoferline est enrichie sur les sites où les myoblastes sont en contact l'un avec l'autre. Elle est également très présente au niveau d'une lésion membranaire (Doherty, Cave et al. 2005). Elle partage aussi avec la dysferline un rôle dans le trafic d'IGF1 ainsi qu'une participation au processus d'endocytose (Bernatchez, Sharma et al. 2009; Demonbreun, Posey et al. 2010). Il est intéressant de noter qu'une caractérisation récente du promoteur myoferline montre qu'il est régi par les facteurs de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), liant l'expression de cette protéine à l'activation du système immunitaire (Demonbreun, Lapidos et al. 2010).

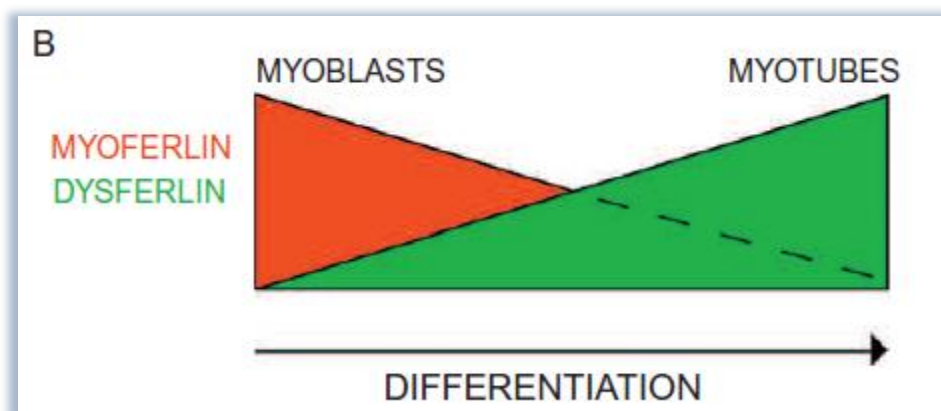


Figure 1: niveau d'expression de la myoferline et de la dysferline au cours de la différenciation des myoblastes en myotubes.

Les myoblastes expriment la myoferline, qui est progressivement remplacée par la dysferline au cours de la différenciation musculaire (Issue de (Posey, Demonbreun et al. 2011)).

B. L'otoferline

L'otoferline est codée par le gène OTOF composé de 48 exons (Yasunaga, Grati et al. 2000). Deux isoformes ont été caractérisées pour cette protéine chez l'Homme : une protéine majoritaire d'environ 227 kDa codée par l'intégralité des 48 exons du gène, et une isoforme courte d'environ 149 kDa codée uniquement par les exons 20 à 48 (Figure 2) (Yasunaga, Grati et al. 2000). L'isoforme longue ne compte que six domaines C2 (absence du domaine C2E identifié sur la dysferline), et possède les motifs FerI et FerB, mais pas le domaine FerA. L'isoforme courte porte uniquement 3 domaines C2 (C2D, C2F, C2G) et aucun des domaines Fer. L'otoferline n'est pas proche de la dysferline en terme de séquence, l'isoforme longue ne présente en effet que 31% d'identité avec cette dernière.

L'otoferline est exprimée dans le muscle, le cerveau, et le système auditif, en particulier dans le système vestibulaire et la cochlée. Elle est très exprimée dans les cellules sensorielles, précisément à la membrane présynaptique des cellules ciliées internes (Yasunaga, Grati et al. 1999; Yasunaga, Grati et al. 2000). Au niveau du cerveau humain, seule l'isoforme longue est retrouvée. L'isoforme courte est présente dans le muscle et le système auditif. Il est intéressant de noter que chez la souris, quel que soit le tissu, seule l'isoforme longue existe et qu'elle présente des épissages alternatifs des exons 6, 31 et 47 qui lui sont spécifiques (Yasunaga, Grati et al. 2000).

L'otoferline est impliquée dans la forme de surdité autosomique récessive DFNB9 (OMIM : 601071) qui fait partie des 20 DFNB répertoriées à ce jour (DFN pour Deafness, B pour autosomique récessive). Des mutations sont répertoriées sur de multiples exons et introns, sans qu'aucun « hot spot » ne puisse être identifié (Figure 2). Les souris déficientes en otoferline sont sourdes, avec un défaut quasi-total de l'exocytose calcium-dépendante de neurotransmetteur dans les synapses des cellules de la cochlée (Roux, Safieddine et al. 2006). L'otoferline est plus généralement impliquée dans le trafic v sriculaire au travers de son interaction avec la protéine typique des endosomes EEA1, la protéine du golgi GM130 et la GTPase Rab8a par exemple

(Schug, Braig et al. 2006; Heidrych, Zimmermann et al. 2008) ou encore les protéines de la famille des SNARE (Johnson and Chapman 2010).

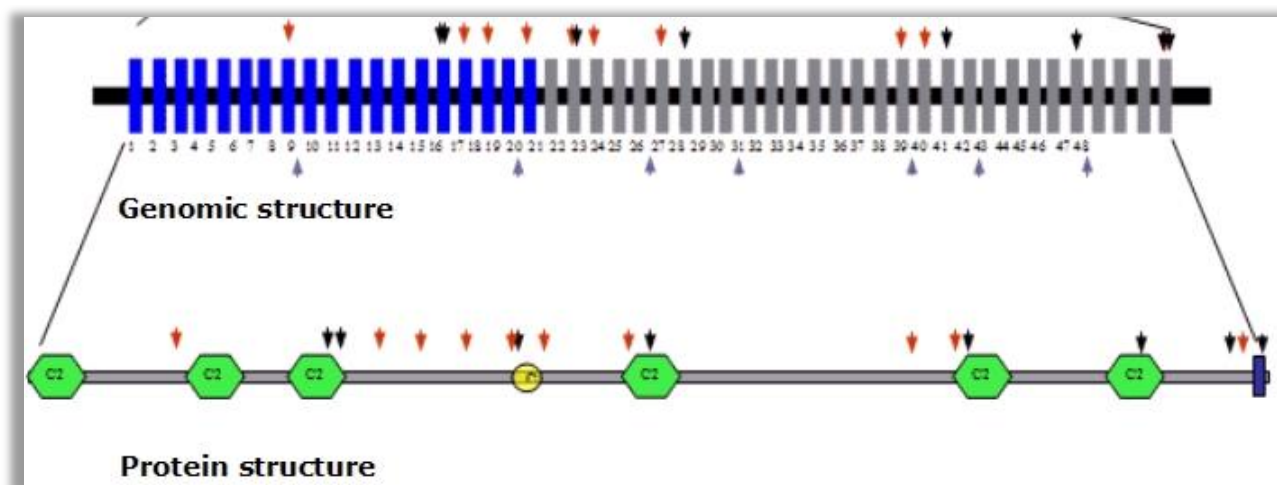


Figure 2: Représentation des mutations répertoriées sur OTOF.

La grande isoforme de l'otoferline est codée par les 48 exons de OTOF. L'isoforme courte ne comporte que les exons 20 à 48 (gris). Les mutations connues, représentées par des flèches, sont présentes à de multiples endroits de l'ADNg et affectent aussi bien les domaines C2 (vert) et FerB (jaune) que d'autres régions de la protéine. Flèche grise : mutation de site d'épissage ; flèche rouge : mutation non-sens ; flèche noire : mutation faux-sens. (Adapté de GeneReviews)

C. Fer1-L4, Fer1-L5 et Fer1-L6

L'analyse du génome humain a permis, sur la base de leur ressemblance avec la DYSF, MYOF et OTOF, de déterminer trois autres gènes codant pour des ferlines. De ces trois autres ferlines prédites, seule Fer1-L5 a été caractérisée à ce jour.

Fer1-L5 est une protéine de 2038 AA codée par un ARNm de 6117b, et dont la taille est estimée à 236 kDa (Posey, Pytel et al. 2011). Elle porte 6 domaines C2, et un domaine transmembranaire en C-ter. Le C2B est capable de fixer EHD1 et EHD2, des protéines impliquées dans le recyclage des vésicules endocytotiques. EHD2 est nécessaire à la bonne localisation à la membrane de Fer1-L5. La réduction de EHD1 ou de d'EHD2 provoque l'incapacité de fusion des myoblastes. Parallèlement, l'étude de Fer1-L5 dans les C2C12 a montré que son expression est réduite aux seuls myotubes portant de 2 à 4 noyaux. Sachant qu'EHD2 fait également partie des partenaires de la myoferline, ces données montrent un rôle de Fer1-L5 dans le recyclage des vésicules issues de l'endocytose durant les premiers stades de fusion des myoblastes.

III. Annexe III : Les protéines partenaires de la Dysferline.

A. AHNAK

AHNAK interagit avec le domaine C2A de la dysferline par son extrémité C-ter et peut également interagir avec le domaine C2A de la myoferline (Huang, Laval et al. 2007). Ces domaines d'interactions ont été déterminés par un test de précipitation par GST après l'identification d'AHNAK comme partenaire de la dysferline. Cette protéine a été identifiée par immunoprécipitation de la dysferline dans des broyats de muscle humain puis analyse par spectrométrie de masse des complexes protéiques obtenus. La dysferline et AHNAK colocalisent également au niveau du sarcolemme et dans les tubules-T. L'absence de dysferline provoque une perte secondaire d'AHNAK dans le muscle, qui n'est donc plus présent à ces localisations, mais se retrouve dans le cytoplasme.

AHNAK (également appelée Desmoyokine (Hashimoto, Amagai et al. 1993)) est une protéine d'environ 700 kDa initialement identifiée comme associée à des tumeurs (Shtivelman, Cohen et al. 1992). Cette protéine de 5643 acides aminés a initialement été décrite comme sans isoforme et codée par un gène mono-exonique situé sur le chromosome 11q12-13 (Haase 2007). Une récente étude menée par de Morrée (de Morree, Droog et al. 2012) conclut que le gène AHNAK est en fait composé d'un exon géant flanqué de multiples petits exons. Il en résulte deux isoformes de AHNAK de tailles très différentes : L-AHNAK, 700kDa et S-AHNAK, 17kDa), qui sont capables de se dimériser. AHNAK a été montré comme acteur dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et la régulation de l'exocytose. AHNAK est uniformément répartie sur la membrane plasmique de cellules squelettique, bien que l'analyse structurale ne fournisse aucune preuve de la présence de domaine transmembranaire. AHNAK est également retrouvée dans les enlargeosomes (Cocucci, Racchetti et al. 2004), et plus particulièrement dans la lumière de ces vésicules. S-AHNAK est capable de se transloquer au noyau où il interagit avec le spliceosome pour réguler la transcription de son propre gène (de Morree, Droog et al. 2012).

B. Calpaine3

Une interaction entre la calpaine 3 (C3) et la dysferline a été conclue sur la base d'une co-immunoprécipitation de ces deux protéines dans un extrait de muscle humains (Huang, Verheesen et al. 2005). Cette interaction directe peut toutefois être remise en cause. En effet, la dysferline et C3 ont un partenaire commun, AHNAK, qui pourrait jouer le rôle d'intermédiaire dans ce complexe. L'interaction C3 - AHNAK a été identifiée par un test de précipitation de

fraction de protéine AHNAK fusionné à la GST (Huang, de Morree et al. 2008). Cela a permis d'identifier la partie C-ter de AHNAK comme suffisante à cette liaison mais aussi de montrer que AHNAK est un substrat de la C3 qui peut couper AHNAK en 5 endroits ; deux sites de coupure sont sur sa partie C-terminale et trois sur sa partie N-ter (Huang, de Morree et al. 2008). Le clivage de AHNAK par C3 provoque une réduction secondaire de son expression, et empêche son interaction avec la dysferline et la myoferline.

La calpaïne 3 est une protéase à cystéine de la famille des calpaïnes. Elle est retrouvée principalement au niveau du tissu musculaire. Sa fonction précise n'est pas connue, mais son absence ou son inactivité est responsable de la LGMD2A, une dystrophie des ceintures. Il semblerait donc qu'elle soit nécessaire à l'intégrité du tissu musculaire. Sa présence dans un complexe Dysferline-AHNAK-C3 pourrait également faire poser l'hypothèse de sa participation dans le maintien de la membrane (de Morree, Droog et al. 2012), cependant l'analyse des souris déficientes en C3 n'ont pas montré des capacités de réparation membranaire altérés (Mellgren, Miyake et al. 2009). De façon très intéressante, il a été observé sur biopsie de patients que la réduction en dysferline cause une réduction secondaire en AHNAK et C3 (Anderson, Harrison et al. 2000), alors qu'une perte en C3 provoque au contraire une accumulation de cette même protéine au sarcolemme (Chrobakova, Hermanova et al. 2004).

C. Annexines A1 et A2

L'annexine A1 et l'annexine A2 sont des protéines de 38kDa faisant partie de la famille des annexines (Lennon, Kho et al. 2003). Cette interaction a été déterminée par co-immunoprécipitation des Annexines A1 et A2 avec la dysferline dans des broyats de muscle de souris SWR/J. L'expérience inverse (immunoprécipitation de chacune des annexines et immunomarquage de la dysferline dans l'éluât obtenu) a également donné le même résultat. Cette observation *in vitro* est corroborée par un comarquage au sarcolemme de la Dysferline et des annexines A1 et A2 (Lennon, Kho et al. 2003).

Les annexines forment une grande famille de protéines caractérisées par leur capacité à se fixer aux phospholipides d'une façon calcium dépendante. Elles sont en effet constituées d'un domaine très riche en hélice alpha dont la conformation change lorsqu'il lie un ion calcium. Ce changement de conformation expose un domaine hydrophobe leur permettant d'interagir avec des membranes phospholipidiques (Rintala-Dempsey, Rezvanpour et al. 2008). En outre, les annexines A1 et A2, contiennent une région N terminale spécifique qui est elle aussi exposée après fixation d'un ion calcium (Rintala-Dempsey, Rezvanpour et al. 2008). Les annexines sont

impliquées dans divers processus intracellulaires tels que la structuration de la membrane, le trafic et l'agencement des vésicules, l'exocytose et l'endocytose ainsi que la formation de canaux d'ions calcium par leur homomultimérisation (Gerke, Creutz et al. 2005). Les Annexines ont également été trouvés dans l'espace extracellulaire où elles ont été impliquées dans la fibrinolyse, la coagulation et l'inflammation. Pour ce dernier processus, l'annexine A1 joue un rôle particulièrement prépondérant (Perretti and Flower 2004). Plus particulièrement, les annexines A1 et A2 sont capables d'agréger des vésicules intracellulaires et des « radeaux lipidiques » d'une manière calcium dépendante à la surface cytosolique de la membrane plasmique (Lambert, Gerke et al. 1997; Babiychuk, Draeger et al. 2000).

L'annexine A2 s'associe par sa région N-terminale à S100A10 en présence de calcium (Gerke and Moss 2002; Rezvanpour, Santamaria-Kisiel et al. 2011). La famille de protéines S100 forme un groupe de 25 membres, observé uniquement chez les vertébrés. Comme les annexines, elles sont capables d'interagir avec plusieurs types de molécules après la fixation d'un ion calcium. Elles interviennent directement dans la phosphorylation des protéines, la croissance cellulaire et la motilité, et la transcription des gènes et sont retrouvées dans un grand nombre de complexe protéique. Le complexe annexine A2/S100A10 peut se lier à des protéines comme l'actine pour réguler la dynamique du cytosquelette (Hayes, Shao et al. 2006), NS3 une protéine impliquée dans l'export de particule virale du virus de la fièvre catarrhale (Beaton, Rodriguez et al. 2002), et AHNAK pour réguler les interactions membranes- cytosquelette (Benaud, Gentil et al. 2004). Il est à noter que l'annexine 2 ne peut se lier à AHNAK qu'en présence de S100A10.

D. L'alpha tubuline

L'alpha tubuline interagit avec la dysferline en se liant, en présence ou absence de calcium, au niveau de ses domaines C2A et C2B (Azakir, Di Fulvio et al. 2010). L'identification de l'alpha tubuline comme partenaire a été obtenue par analyse par spectrométrie de masse des protéines coprécipitées avec une dysferline recombinante fusionnée à un motif histidine dans un broyat d'un muscle de souris. La caractérisation des domaines d'interaction a été obtenue par un test de précipitation par GST de chacun des domaines C2 de la dysferline. *In vivo*, la dysferline et la tubuline-alpha colocalisent à la région périnucléaire et dans les structures vésiculaires des myoblastes.

L'alpha tubuline polymérise avec la beta tubuline pour former les microtubules. Ces structures constituantes du cytosquelette sont des structures dynamiques qui polymérisent/dépolymérisent continuellement et sont impliquées dans la motilité cellulaire, le

transport intracellulaire de protéines et vésicules, la mitose et la détermination de la morphologie cellulaire. Il existe un grand nombre de protéines associées aux microtubules (MAP) ayant un rôle soit dans leur stabilisation, soit dans l'activité physiologique qui leur est associée. Parmi ces dernières, les kinésines se déplacent sur les microtubules vers l'extrémité positive et les dynéines vers l'extrémité négative. L'interaction dysferline / alpha tubuline pourrait avoir un lien avec le dynamisme des microtubules et avec le transport vésiculaire.

E. HDAC6

HDAC6 (Histone déacétylase) interagit avec le C2D de la dysferline (Di Fulvio, Azakir et al. 2011). Cette interaction a été déterminée par un test Ni-NTA pull down avec l'utilisation de mutant dysferline ayant perdu chacun des 7 domaines C2. Seul le C2D a été montré comme nécessaire à la fixation de HDAC6. Cette interaction est largement diminuée en l'absence des domaines C2A et C2B et de l'alpha tubuline qui s'y fixe.

HDAC6 fait partie de la famille des histones déacétylase, composée de 11 protéines à l'heure actuelle. HDAC6 est classée, avec HDAC 10, dans les HDAC de type IIB en raison de sa localisation essentiellement cytoplasmique, alors que les autres HDAC sont prioritairement nucléaire. Cette spécificité peut venir de la présence sur sa séquence d'un domaine d'exclusion nucléaire. Elle possède également un domaine à doigt de zinc spécialisé dans la reconnaissance des protéines ubiquitinées, deux domaines de déacétylation et un domaine de rétention cytoplasmique. Ces domaines spécifiques lui permettent d'assurer son rôle de régulation de l'acétylation de l'alpha-tubuline et sa participation dans l'adressage au protéasome des protéines ubiquitinées *via* un de ses substrats, HSP90. HDAC6 est beaucoup étudié pour son implication dans le processus cancéreux puisqu'il joue un rôle oncogène en activant HSF1, un rôle dans la survie cellulaire par son action sur les protéines ubiquitinées, et un rôle en favorisant la motilité et l'implantation de métastases (Aldana-Masangkay and Sakamoto 2011).

F. Cavéoline-3

La cavéoline-3 coimmunoprécipite avec la dysferline et inversement (Matsuda, Hayashi et al. 2001). Une analyse de la séquence de la dysferline a permis de prédire 7 sites potentiels de fixation de la cavéoline-3 sur la dysferline (Couet, Li et al. 1997; Matsuda, Hayashi et al. 2001) avec en particulier des sites d'interaction dans les domaines DysF. Les sites prédits n'ont cependant pas été vérifiés expérimentalement. L'interaction cavéoline-3/dysferline est toutefois étayé par leur comarquage sur des coupes transversale de muscle humains (Matsuda, Hayashi et al. 2001). De façon intéressante, la cavéoline-3 est exprimée spécifiquement dans le muscle

(Williams and Lisanti 2004). Des mutations dans le gène CAV3 sont responsables de LGMD1C (Minetti, Sotgia et al. 1998). La perte de cavéoline-3 associée à la LGMD1C ne provoque pas de diminution de la quantité de dysferline exprimée mais une localisation anormale de celle-ci (Cai, Weisleder et al. 2009). Elle est ainsi redistribuée dans des structures intracellulaires, principalement dans l'appareil de Golgi (Matsuda, Hayashi et al. 2001). Ces observations étayent là aussi l'existence d'un complexe cavéoline-3 / dysferline.

La cavéoline-3 appartient à la famille des cavéolines composée d'uniquement de trois membres chez les vertébrés. Les cavéolines 1 et 2 sont exprimées dans de nombreuses cellules différenciées tandis que la cavéoline-3 est exprimée spécifiquement dans les cellules musculaires. Ces protéines forment des oligomères qui s'associent au cholestérol et aux sphingolipides sous la membrane cellulaire, formant ainsi de petites invaginations au niveau de la membrane, les cavéoles. En plus de leur rôle structurel dans la formation des cavéoles, les cavéolines participent à l'endocytose, à l'homéostasie du cholestérol et à la transduction de signaux (Williams and Lisanti 2004).

G. Mitsugumine 53

La mitsugumine 53 (MG53) a été identifiée comme partenaire de la dysferline par une expérience de coimmunoprécipitation de protéines recombinantes. Elle avait été décrite comme intervenant dans la réparation de lésions du sarcolemme (Cai, Masumiya et al. 2009) et comme partenaire de la cavéoline-3 ; elle a donc fait l'objet d'une recherche ciblée d'interaction avec la dysferline. Les marquages IHF de MG53 sur les muscles humains sont très hétérogènes et vont du marquage uniforme du sarcolemme à un marquage très diffus du cytoplasme (Waddell, Lemckert et al. 2011). Les auteurs de cette étude précisent que la raison de cette variabilité dans la localisation de MG53 n'est pas connue mais qu'elle n'est pas incompatible avec l'idée d'un recrutement rapide de MG53 à la membrane plasmique lors d'une lésion. Elle empêche toutefois de pouvoir conclure à une colocalisation des deux protéines *in vivo*.

MG53, aussi appelée TRIM72, est une protéine spécifique du muscle appartenant à la très grande famille des protéines à motif tripartite (60 membres répertoriés chez l'homme à l'heure actuelle). C'est une protéine de 53 kDa qui contient une région N-terminale commune à toutes les TRIM et un domaine SPRY dans sa partie C-terminale. Les domaines SPRY sont encore mal connus mais ils permettent de lier les régions riches en résidus basiques, comme il en existe sur la sous unité $\alpha 1$ du DHPR ou la toxine de scorpion (Tae, Casarotto et al. 2009). MG53 est capable d'interagir avec les phosphatidylsérines, lipides typiquement retrouvés à la surface cytosolique de la membrane.

Elle s'associe également avec les vésicules intracellulaires qui fusionnent avec les membranes du sarcolemme lors du processus de réparation membranaire (Cai, Masumiya et al. 2009). MG53 permet le recrutement de la dysferline aux sites de lésions membranaire grâce à son interaction avec la myosine IIA (Cai, Weisleder et al. 2009; Lin, Zhu et al. 2012). Elle initie en présence de calcium l'assemblage d'un complexe de réparation membranaire comprenant la Dysferline, et la cavéoline-3 (Cai, Masumiya et al. 2009). Un modèle murin déficient en MG53 présente une myopathie progressive, une capacité à l'exercice réduite et un défaut de réparation membranaire (Cai, Weisleder et al. 2009). Une observation de ses muscles après exercice a montré une accumulation de vésicule sous-sarcolemmique prouvant l'importance de MG53 pour leur transport à la membrane. L'administration de MG53 à un modèle de hamster déficient en δ -sarcoglycane a également permis de mettre en évidence une amélioration de leur phénotype avec l'observation d'une capacité de réparation de la membrane renforcée (He, Tang et al. 2012). En outre, la surexpression de MG53 dans ce modèle provoque une surexpression de la dysferline et facilite son trafic à la membrane avec la participation de la cavéoline-3.

H. DHPR

Le récepteur au dihydropyrimidine (DHPR, dihydropyridine receptor) interagit avec la dysferline au niveau des tubules-T, l'immuno-précipitation du DHPR entraîne en effet en même temps la dysferline (Ampong, Imamura et al. 2005). Cette observation est étayée par l'existence d'un marquage réticulé de la dysferline dans le cytoplasme des cellules musculaires humaines et le fait de la retrouver dans la fraction spécifique aux membranes interne d'un sous fractionnement cellulaire. De plus, un comarquage partiel de ces deux protéines peut être observé sur des coupes de muscle (Ampong, Imamura et al. 2005; Roche, Ru et al. 2011). Le DHPR interagit également avec une autre protéine partenaire de la dysferline : la cavéoline-3. Le DHPR est un complexe protéique multimérique de cinq sous unités, formant un canal calcium voltage dépendant (Armarego, Randles et al. 1984). Il a une grande implication dans le couplage excitation-contraction. Dans le muscle squelettique, le DHPR remplit la double fonction de canal calcique de type L (L pour Lent) et de détecteur de dépolarisation membranaire. Cette protéine est en effet sensible à la variation de voltage membranaire résultant du potentiel d'action musculaire apporté par un motoneurone. Son interaction directe avec RyR permet l'ouverture des canaux calciques rapides de ces protéines et donc l'augmentation rapide de la concentration en calcium intracellulaire nécessaire à la contraction de la fibre.

I. Affixine

L'affixine (ou β -parvine) a été identifiée comme partenaire de la dysferline dans une expérience de co-immuno-précipitation (Matsuda, Kameyama et al. 2005). L'utilisation de mutant dysferline dans cette expérience a permis de déterminer la région C-terminale de la dysferline comme nécessaire à cette interaction. Des marquages de coupes de muscle sain humain et murin montrent que l'affixine colocalise avec la dysferline au sarcolemme. Sur des muscles de patients MM ou LGMD2B, le niveau d'affixine à la membrane est largement réduit, bien que la quantité totale observée par WB soit maintenue.

L'affixine est une protéine de 47 kDa du groupe des parvines. Les parvines sont une famille de protéines impliquées dans la liaison d'intégrines et de protéines associées à la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine et de l'adhésion, la motilité et la survie cellulaire. Les parvines n'ont pas d'activité catalytique et leur action ne se fait que par l'intermédiaire de leurs partenaires. La β -parvine se fixe à α PIX (activateur de la protéine de contrôle de la division cellulaire (CDC42), impliquée dans la régulation du cycle cellulaire) et à l' α -actinine et régule par ce biais la prolifération cellulaire (Sepulveda and Wu 2006). Son interaction avec l' α -actinine permet également d'organiser le réseau d'actine sous membranaire afin de maintenir la morphologie de la cellule (Yamaji, Suzuki et al. 2004). Un autre partenaire de β -parvine est une kinase liée aux intégrines (ILK, integrin-linked kinase-binding protein). Lorsqu'elles sont complexée, ILK devient inactive ce qui diminue la capacité de fixation de cellules. Ce rôle est important dans le processus cancéreux.

J. Myoferline

La myoferline, membre de la famille des ferlines très proche de la dysferline en terme de taille et de structuration et présenté plus haut apparait être un partenaire directe de la dysferline (de Morree, Hensbergen et al. 2010). Cette interaction a été mise en évidence par une IP de la dysferline sur des extraits de myoblastes, de myotubes et de lysat de muscle squelettique humain. Les protéines coprécipitées avec la dysferline ont été identifiées par spectrométrie de masse. L'interaction dysferlin-myoferline a également été confirmée par WB. En revanche, le site d'interaction n'a pas été déterminé, ni sur l'une ni sur l'autre des protéines.

K. Partenaires potentiels

Plusieurs études ont porté sur la prédiction ou la recherche à grande échelle de partenaires potentiels de la dysferline. Les prédictions se basent sur des comparaisons de séquence ou

l'analyse des données bibliographiques (Cacciottolo, Belcastro et al. 2011; van Haagen, t Hoen et al. 2011) alors que deux techniques ont été employée pour identifier le maximum de protéines interagissant avec la dysferline : l'IP dysferline avec analyse des complexes récupérés par spectrométrie de masse et une large recherche pour double hybride (de Morree, Hensbergen et al. 2010; Cacciottolo, Belcastro et al. 2011; Leung, Utokaparch et al. 2011; van Haagen, t Hoen et al. 2011).

Les travaux menés par Van Haagen (van Haagen, t Hoen et al. 2011) ont consisté à établir un modèle informatique permettant de regrouper les informations présentes dans la littérature, les bases de données de structure des protéines et d'expression des ARN. Le recoupement de ces informations a permis de proposer quelques 25 036 nouvelles protéines présentant potentiellement une interaction avec la dysferline. Des partenaires déjà validés sont trouvés parmi les 50 plus hauts scores d'interaction (cavéoline3, calpaïne3, myoferline), montrant la fiabilité de l'analyse. Par ailleurs, d'autres protéines impliquées dans d'autres LGMD sont présente dans cette liste (la titine, téléthonine, α -sarcoglycane, et myotiline) ainsi que l'otoferline, un autre membre de la famille des ferlines. Parmi les nouveaux partenaires potentiel ont été identifié RYR1 et RYR2, des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique ; la desmine, une protéine du réseau de filaments intermédiaires maintenant l'intégrité du sarcomère ; l' α -actinine2, une autre protéine du cytosquelette, se liant à l'actine ; la cavéoline1, une protéine, comme la cavéoline3, impliquée dans la formation et la circulation des cavéoles ; ou encore la protéine présentant le plus haut score de prédiction, le facteur de transformation de croissance β 1 (TGF β 1, transforming growth factor β 1), une protéine de la famille de cytokine, régulant la prolifération, la différenciation, l'adhérence, et la migration dans de nombreux types cellulaires.

L'étude de Cacciottolo (Cacciottolo, Belcastro et al. 2011) est basée sur l'étude de l'expression d'un gène par rapport à chacun des autres gènes de l'intégralité du génome humain. Cette analyse est menée par un algorithme développé à cet effet, qui relie les données expérimentales sur l'expression de chaque gène présentes dans les bases de données. Les gènes DYSF et AHNAK ont été choisis comme référent dans cette étude, ce qui a permit de déterminer nombre de gènes dont ils modulent l'expression. La relation d'expression de ces gènes permet de supposer une interaction des protéines qu'ils codent. Des familles de protéines connues comme partenaire de la dysferline sont retrouvées dans l'analyse menée avec le gène DYSF : les annexines et les protéines S100. Ce sont toutefois les seuls partenaires référents retrouvés dans les 95 gènes répertoriés. En considérant qu'AHNAK et la dysferline sont des partenaires avérés, les deux listes de gènes identifiés pour AHNAK et DYSF ont été recoupées. Il en ressort que 32 gènes

apparaissent comme conjointement régulés par DYSF et AHNAK. Les auteurs ont choisis 3 protéines parmi cette liste et montré que pour deux d'entre elles, la moésine et le facteur de relâchement de la polymérase I (PTRF, polymérase I transcript release factor) qu'elles sont surexprimée en cas d'absence de dysferline. Des expérimentations d'IP ont permis de montrer une interaction directe de la dysferline avec chacune de ces deux protéines. La moésine est une protéine du cytosquelette capable de lier la membrane plasmique au cytosquelette d'actine grâce à son interaction avec cette protéine. Elle est impliquée dans la structuration de la membrane et la mobilité cellulaire (Lankes and Furthmayr 1991). PTRF est impliqué dans la transcription, mais également dans la formation des cavéoles. Des mutations dans ce gène se soldent par une lipodystrophie généralisée et une dystrophie musculaire (Garg 2011).

De Morree a réalisé des IP de la dysferline avec des anticorps de lama et a ainsi identifié de nombreuses protéines co-précipitant avec cette proie (de Morree, Hensbergen et al. 2010). La spécificité de cette méthode a permis de tester plusieurs échantillons et d'identifier des complexes autour de la dysferline différents selon l'échantillon analysé (myoblastes, myotubes et biopsie de muscle humain). Les protéines co-précipitées ont été analysées par WB et spectrométrie de masse. L'analyse par WB confirme AHNAK, Calpaïne 3, annexine A2, alpha tubuline, β -parvine et DHPR comme partenaire dans les myoblastes et les myotubes. L'annexine A2 et DHPR sont en revanche absent des IP menées sur le broyat de muscle. L'analyse par spectrométrie de masse a identifié 521 protéines co-précipitée dans les myoblastes, 344 dans les myotubes et 229 dans le muscle, 115 étant communes aux trois listes. Parmi les plus hauts scores se trouvent la titine, la laminine A/C, le facteur d'initiation de la traduction EIF3B, ou la vinculine. D'autres protéines connues valident les résultats obtenus (myoferline, annexine A2 et MG53). L'interaction entre la vinculine et la dysferline a été choisie par les auteurs pour être validée par WB et marquage IHF. Les données obtenues permettent de conclure que la dysferline interagit avec le vinculine.

L'analyse par précipitation de dysferline fusionnée à la GST a permis à Leung d'identifier également des protéines co-sédimentant avec cette proie (Leung, Utokaparch et al. 2011). Les cellules analysées étaient des cellules endothéliales vasculaires humaines HUVEC, connues pour exprimer la dysferline. L'analyse par spectrométrie de masse des complexes récupérés a révélé deux partenaires connus (annexine A2 et S100 A10) et 18 nouveaux partenaires potentiels parmi les protéines identifiées, dont des sous unités de l'ATP synthétase des mitochondries. Il a par ailleurs été montré que les mitochondries présentent une morphologie anormale chez les patients présentant une déficience en dysferline (de Luna, Gallardo et al. 2006). Comme une des

sous unité identifiée par Leung (sous unité d) est responsable de l'assemblage et de la stabilisation des autres protéines de l'ATP synthétase, il est possible que les malformations observées chez les patients soient dues à un défaut provoqué par l'absence de la dysferline.

IV. Annexe IV : Les modèles murins déficients en Dysferline.

A. Les souris SJL/J :

Cette lignée est un mutant naturel de la dysferline (Weller, Magliato et al. 1997). Ces souris présentent une délétion de 141 pb au début de l'intron 45 provoquant l'exclusion de l'exon 45 lors de l'épissage de l'ARN pré-messager (ARNpm) (Figure 1) (Bittner, Anderson et al. 1999; Vafiadaki, Reis et al. 2001). Cette partie de l'ARNm code les acides aminés 1628 à 1685 de la protéine ; son absence conduit à l'élimination d'une grande partie du domaine C2E. La protéine dysferline, de l'ordre de 10% par rapport à la normale, est malgré tout retrouvée dans le muscle de ces souris (Bittner, Anderson et al. 1999; Ho, Post et al. 2004). Cette protéine peut être due à certains événements d'épissage conventinel (incluant l'exon 45) de l'ARNpm malgré la mutation, ou bien résulter de l'expression d'une forme tronquée de la dysferline. En effet, les exons 44 et 46 sont en phases et l'absence d'exon 45 pourrait malgré tout coder une protéine seulement raccourcie des aminés 1628 à 1685.

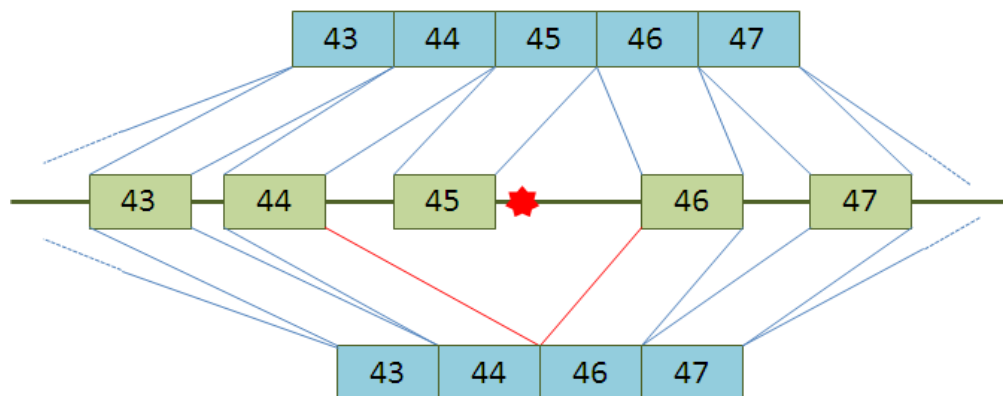


Figure 1: mutation de DYSF sur le modèle SJL/J.

La délétion de 141 pb présente au niveau du site donneur de l'intron 45 du gène DYSF (étoile rouge) provoque le saut d'épissage de l'exon 45. La résultante est un ARNm dysferline excluant l'exon 45.

Le modèle développe une nécrose des fibres musculaires, de la centronucléation, de l'inflammation, l'élévation de la créatinine kinase sérique, et dans certains muscles une infiltration graisseuse. Les premiers symptômes histologiques apparaissent à un mois, essentiellement de la centronucléation. Une dystrophie prononcée est détectable vers 6-8 mois touchant préférentiellement les muscles proximaux. Le profil s'aggrave ensuite avec une atrophie détectable à 10 mois, conduisant à un remplacement de 50% du muscle par des infiltrats graisseux à 16 mois.

Ce modèle est sur un fond génétique très hétérogène. Il porte d'autres mutations dans son génome (dans les gènes : Ahr, aryl-hydrocarbon receptor ; Ceacam1, carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 ; Il2, interleukin 2 ; Pde6b, phosphodiesterase 6B, cGMP, rod receptor, beta polypeptide ; Rmcf, resistance to MCF virus). Une lignée possédant la même mutation dans DYSF mais sur un fond génétique de souris C57Bl/10 a été générée par croisement successif (von der Hagen, Laval et al. 2005). La lignée B10.SJL-Dysf^{fm}/AwaJ résultante possède les mêmes caractéristiques d'évolution de la maladie que les SJL/J d'origine, et peuvent être comparés au C57Bl/10.

B. Les souris Dysf -/- (Delta ex45) de R.Brown :

Cette lignée artificielle a été obtenue par une délétion ciblée de l'exon 45, conduisant à l'absence totale de protéine (Ho, Post et al. 2004). La mutation provoquée par recombinaison homologue a permis la délétion de 1,8 kb englobant l'exon 45 sur l'ADNg murin (Figure 2). Ce modèle, peu utilisé, est sur un fond génétique de 129SvJ et C57Bl/6J mélangé. Les symptômes sont très similaires à ceux observés pour le modèle SJL/J, avec une atteinte dès 2 mois des muscles proximaux et abdominaux, et une myopathie active à 6 mois.

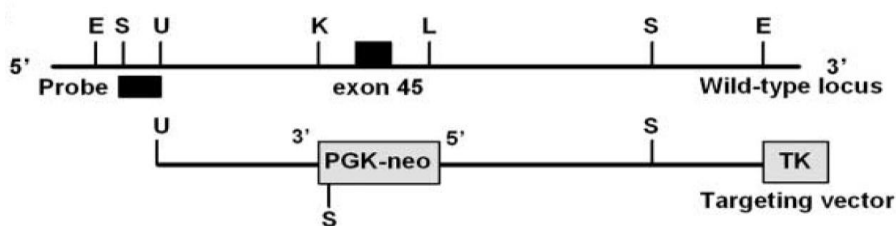


Figure 2: construction du modèle Dysf -/- delta exon45.

Le vecteur cible est composé de grande région homologue de la zone ciblée, flaquant le gène de sélection PGK. Il permet le remplacement de l'exon 45 du gène DYSF murin par PGK. (Figure issue de (Ho, Post et al. 2004))

C. Les souris A/J et Bla/J :

Cette lignée consanguine porte une mutation naturelle du gène DYSF. Un retrotransposon de 5 à 6 kb a été détecté dans ce qui correspond à l'intron 4 du gène (Ho, Post et al. 2004) (Figure 3). L'incapacité à détecter l'ARNm de la dysferline par northern blot montre que la présence de l'élément transposable dans l'ARNpm provoque sa très grande instabilité. La protéine dysferline est totalement absente.

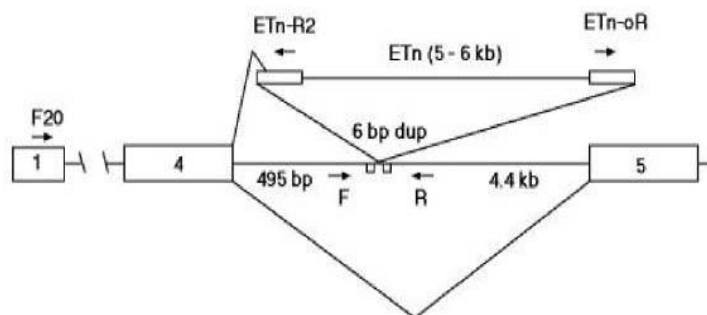


Figure 3: mutation de DYSF sur le modèle A/J.

Représentation schématique de la séquence génique des souris A/J montrant le positionnement de l'élément transposable dans l'intron 4 du gène DYSF (figure issue de (Ho, Post et al. 2004)).

La progression de la maladie est légèrement plus lente que dans la lignée SJL/J. Malgré une détection d'un taux de CK élevé dès le premier mois, les premiers signes histologiques de la dystrophie n'apparaissent pas avant 4-5 mois et la faiblesse musculaire progresse lentement. Cette observation peut être reliée au fait que cette lignée montre un niveau d'activité motrice spontanée beaucoup plus faible que de nombreuses autres souches des souris. Les muscles abdominaux sont les plus gravement touchés, suivis par les muscles proximaux et distaux.

Comme le modèle SJL/J, cette lignée n'a pas de contrôle sains approprié, en raison de multiples mutations sur d'autres gènes qui conduisent à d'autres observations comme la perte d'audition liée à l'âge, une incidence élevée de cancers du poumon, le manque du facteur 5 du complément, et la résistance au diabète (les gènes : *Ahr*, aryl-hydrocarbon receptor; *Cdh23*, cadherin 23 (otocadherin); *Hc*, hemolytic complement; *Il3ra*, interleukin 3 receptor, alpha chain; *Micr1*, microwave induced increase in complement receptor B cells; *Naip5*, NLR family, apoptosis inhibitory protein 5; *Nrg3*, neuregulin 3; *Rmcf*, resistance to MCF virus; *Wnt9b*, wntless-type MMTV integration site 9B; *ahl4*, age related hearing loss 4).

Deux stratégies ont été utilisées pour purifier le fond génétique des souris A/J : le croisement successif avec des souris C57Bl/6J pour créer la souche Bla/J (*B6.A-Dysf^{f^{rm}d}/GeneJ*) et la substitution du chromosome 6 (porteur du gène DYSF murin) de la lignée C57Bl/6J par celui de la lignée A/J pour créer la souche Chr6-A/J (*C57BL/6J-Chr6^{A/J}/NaJ*). La progression de la maladie dans ces deux modèles est similaire à celle observée chez les souris A/J.

D. Les souris B6.129-Dysf^{tm1Kcam}/J (lignée Dysf^{-/-} Campbell) :

Cette lignée a été générée par recombinaison homologue en remplaçant une partie du gène DYSF par un gène de résistance à la néomycine (Figure 4) (Bansal, Miyake et al. 2003). Les 12kpb

remplacés codent les trois derniers exons du gène DYSF codant les acides aminés 1983 à 2080 de la protéine et incluant le domaine transmembranaire. Aucune protéine dysferline n'est détectée sur ce modèle.

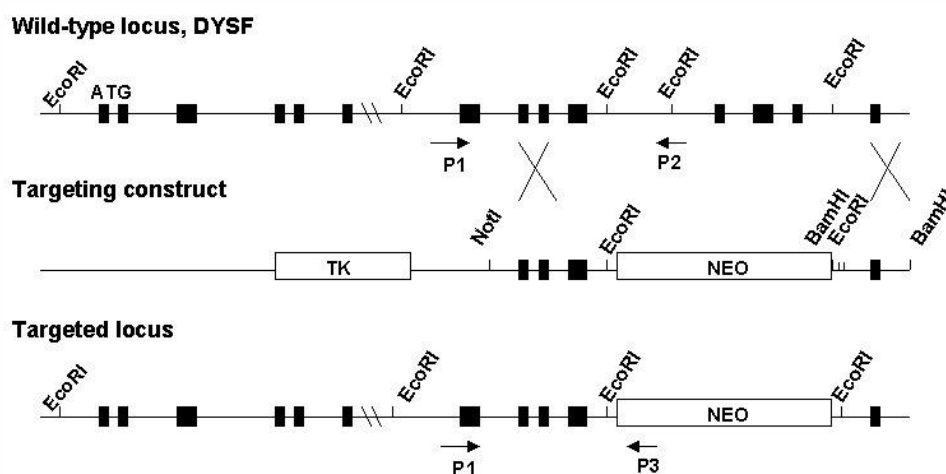


Figure 4: construction du modèle B6.129-*Dysftm1Kcam*/J

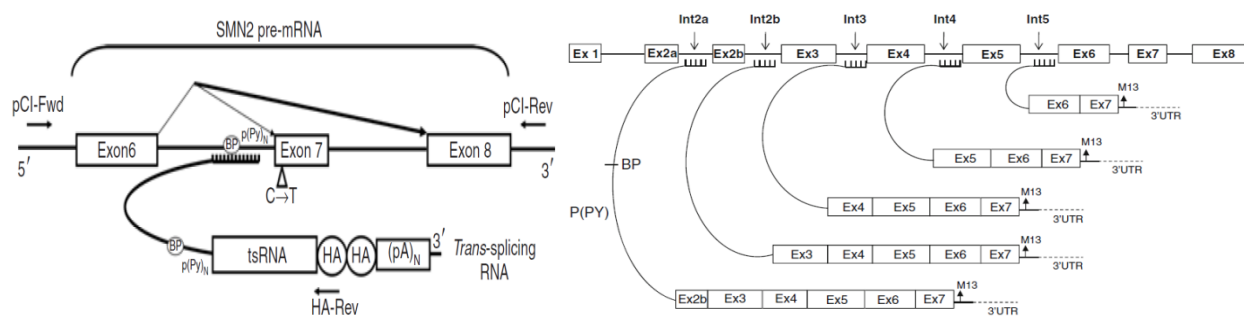
Le vecteur cible est composé de grande région homologue de la zone ciblée, flaquant le gène de sélection NEO. Il permet le remplacement des trois derniers exons du gène DYSF murin par NEO. (Figure issue de (Bansal, Miyake et al. 2003))

Les premiers symptômes dystrophiques n'apparaissent pas avant l'âge de 2 mois. Quelques souris présentent alors des fibres nécrotiques et centronucléées dans le muscle. A 8 mois, le modèle présente toutes les caractéristiques pathologiques d'une dystrophie musculaire, avec des infiltrations de macrophages et de tissus graisseux dans le muscle. La progression de la pathologie est similaire à celle observée dans les SJL/J, et légèrement plus rapide que dans les A/J. Cette lignée est sur un fond mélangé de souris 129SvJ et de C57Bl/6. Une lignée sur fond génétique C129SvJ à été générée par croisement successifs (129-*Dysftm1Kcam*/J).

V. Annexe V : Principales preuves de principe établies par *trans*-épissage :

A. Amyotrophie spinale : Preuves de principe établies par 3'TS

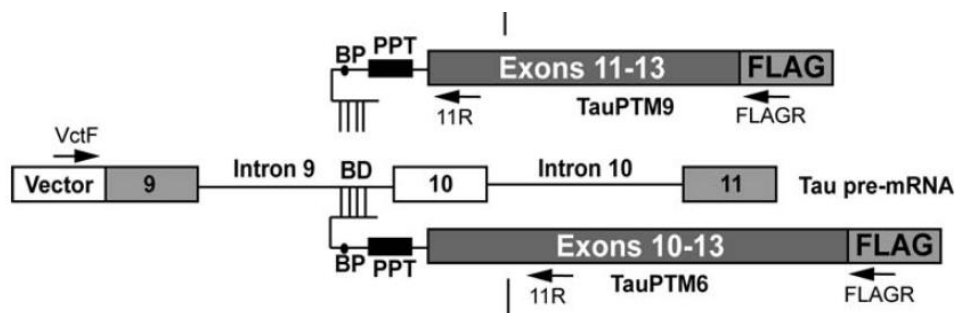
Plusieurs publications traitent de l'**amyotrophie spinale**, maladie liée à une mutation dans le gène SMN1 codant la protéine SMN. Une copie de SMN1, **SMN2**, est présente dans le génome mais code une protéine non fonctionnelle en raison d'une mutation provoquant le saut d'épissage de l'exon 7. L'utilisation d'un minigène, codant la région génomique des exons 6 à 8 de SMN2, et d'un RTM, visant l'intron 6 de ce minigène et portant l'ADNc codant pour la fin de SMN, a permis de démontrer au niveau ARN et protéique l'efficacité du SMaRT pour cette maladie (Coady, Shababi et al. 2007). Ce modèle a été amélioré en favorisant l'épissage en *trans* au détriment de l'épissage en *cis*, grâce à l'utilisation d'un oligonucléotide antisens empêchant l'épissage en *cis* entre l'exon 6 et 8 (observé *in vivo* pour SMN2) (Coady, Baughan et al. 2008). L'injection directe d'un plasmide codant ce RTM et de cet oligonucléotide antisens dans les ventricules cérébraux des souris modèles SMA a montré une augmentation significative de la protéine SMN dans la moëlle épinière et une augmentation de la survie de ce modèle de l'ordre de 70% (Coady and Lorson 2010). Enfin, un large criblage de PTM arborant différents BD a été mené par Shababi qui a ainsi obtenu un RTM optimal en ciblant l'intron 3 de SMN2 (Shababi and Lorson 2012). Ce RTM, optimisé aussi par un oligonucléotide antisens empêchant l'épissage en *cis* entre l'exon 3 et 4, restaure SMN *in vivo* dans le système nerveux central.



Approches développées par Coady et Shababi (Coady, Shababi et al. 2007; Shababi and Lorson 2012).

B. Démence frontotemporale avec syndrome parkinsonien : Preuve de principe établie par 3'TS

La démence frontotemporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (FTDP-17) est due à des mutations dans le gène **MAPT**, codant la protéine tau. La plupart de ces mutations entraînent un défaut d'épissage alternatif conduisant à un excès d'inclusion de l'exon 10 dans l'ARNm final. La co-transfection d'un minigène tau et de RTM visant l'intron 9 et apportant les exons 10 à 13 ou 11 à 13 montre une capacité du *trans*-épissage en 3' à maîtriser l'inclusion ou l'exclusion de l'exon 10. L'efficacité du *trans*-épissage démontrée au niveau ARN est de 34%. L'efficacité du SMaRT n'est, de plus, pas régulée par la force des éléments régulateurs portés par l'ARNpm cible (Rodriguez-Martin, Garcia-Blanco et al. 2005; Rodriguez-Martin, Anthony et al. 2009).

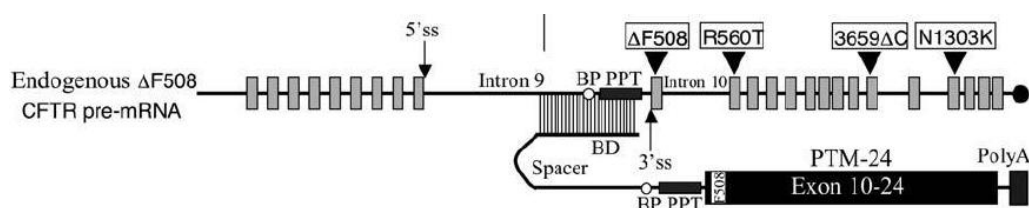


Approche développée par Rodriguez-Martin (Rodriguez-Martin, Anthony et al. 2009)

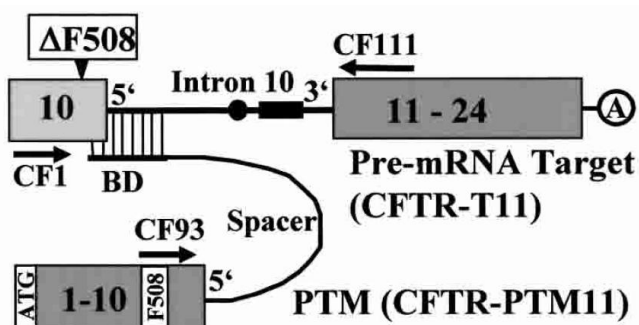
C. Mucoviscidose : Preuve de principe établie par 3'TS et 5'TS

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive due à des mutations dans le gène **CFTR** (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). Des RTM ont été développés aussi bien pour un SMaRT en 3' (Mansfield, Kole et al. 2000; Liu, Jiang et al. 2002; Liu, Luo et al. 2005) qu' en 5' (Mansfield, Clark et al. 2003). Les RTM provoquant un *trans*-épissage en 3' apportent tous les 14 derniers exons de CFTR (exons 10 à 24). La cotransfection d'un minigène et d'un 3'RTM dans des cellules 293T permet la restauration d'une protéine CFTR totale (Mansfield, Kole et al. 2000). La transduction de cellules épithéliales bronchiques humaines mutantes ($\Delta F508$) par un AAV codant le 3'RTM permet une récupération fonctionnelle à 16% du niveau normal de l'activité du canal chlore formé par la protéine CFTR. De la même façon, des cellules épithéliales humaines ont été infectées avec des AAV 2 et 5 codant le RTM. L'efficacité du SMaRT observée est similaire dans les deux cas et montre une restauration d'environ 13% de la conductance épithéliale (Liu, Luo et al. 2005). L'utilisation du 5'RTM sur un minigène de CFTR permet effectivement le *trans*-

épissage en 5' des exons 1 à 10, détecté au niveau ARN. Un test mesurant le mouvement des anions montre une amélioration provoquée par la présence du RTM. Le développement d'un système de gène rapporteur sur ce modèle a également permis de mesurer l'efficacité de *trans*-épissage de chaque RTM (Mansfield, Clark et al. 2003).



Approche développée par Liu (Liu, Luo et al. 2005)

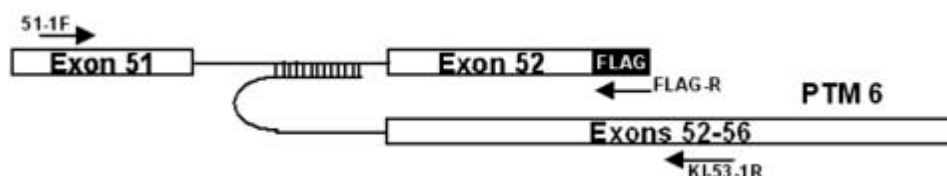


Approche développée par Mansfield (Mansfield, Clark et al. 2003)

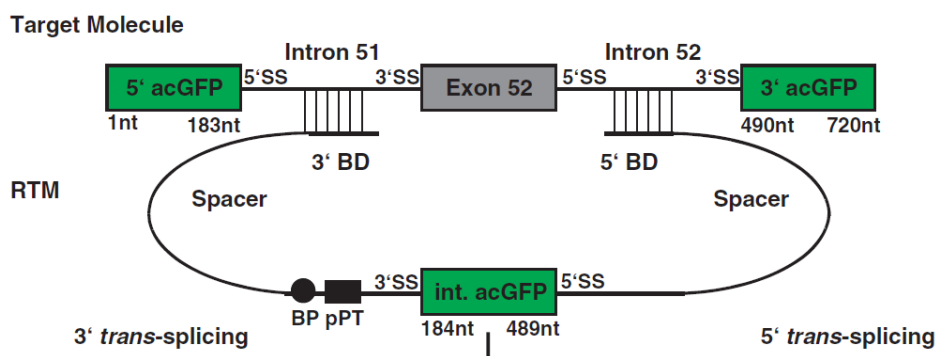
D. Épidermolyse bulleuse récessive liée à COL7A1 : 3'TS et DbITS

Une forme récessive de l'épidermolyse bulleuse est due à une altération du collagène VII, codé par le gène **COL7A1**. L'équipe de Bauer a montré avec un système de minigène/rapporteur que le SMaRT pouvait avoir lieu dans les kératinocytes humains, puis a testé le SMaRT avec un modèle minigène/RTM de COL7A1. Le remplacement de la partie 3' terminale de l'ARNm COL7A1 a été détecté par RT-PCR suite à une co-transfection d'un minigène mimant une partie de COL7A1 (ADNg exon 51 à 52) et d'un RTM provoquant un *trans*-épissage en 3' des exons 52 à 56 (Dallinger, Puttaraju et al. 2003). Ils ont également utilisé le modèle COL7A1 pour démontrer la faisabilité du double *trans* épissage. Un modèle utilisant le gène rapporteur GFP a d'abord été développé pour permettre le choix des meilleurs BD dans le but d'invertir l'exon 52 de COL7A1. Une analyse par cytométrie en flux a montré que 61% des cellules cotransfectées expriment une GFP complète. L'utilisation du meilleur RTM sur un minigène de COL7A1 (ADNg exon 51 à 53) provoque un double *trans*-épissage détectable par RT-PCR (Koller, Wally et al.

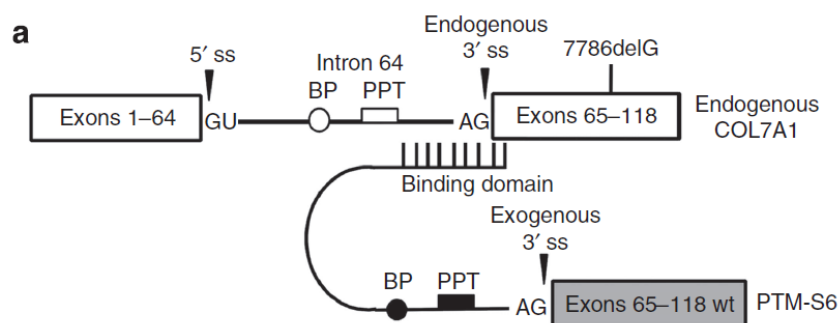
2011). Ils ont enfin utilisé un lentivirus pour transduire des kératinocytes de patients. L'intégration du lentivirus a permis la sélection d'un clone stable exprimant le RTM visant l'intron 64 et rapportant l'intégralité du reste de la séquence codante (exons 65 à 118). Le clone stable exprime l'ARN et la protéine collagène VII à des niveaux similaires aux cellules témoins. La localisation de la protéine est normale et la morphologie et la capacité de motilité des kératinocytes est restaurée (Murauer, Gache et al. 2011).



Approche développée par Dallinger (Dallinger, Puttaraju et al. 2003)



Approche développée par Koller (Koller, Wally et al. 2011)

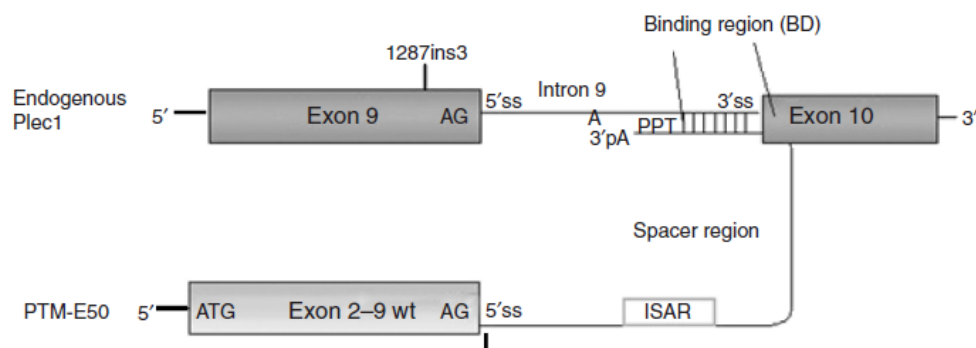


Approche développée par Murauer (Murauer, Gache et al. 2011)

E. Épidermolyse bulleuse récessive liée à PLEC1 : 5'TS

Une forme d'épidermolyse bulleuse peut également être causée par des mutations dans le gène **PLEC1**, codant la plectine 1. Plus particulièrement, une mutation dans l'exon 9 entraîne

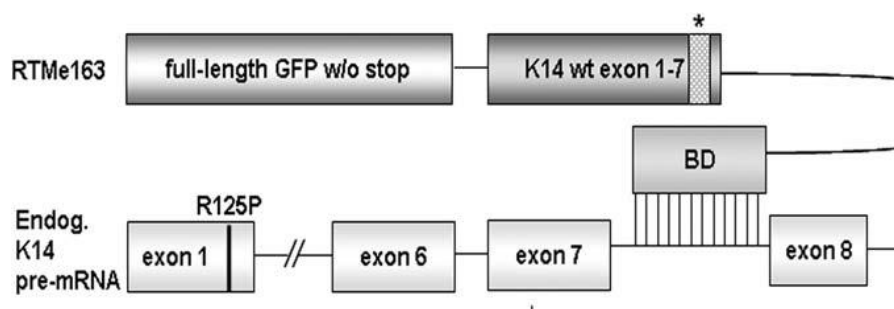
l'agrégation de plectine 1 et le syndrome d'épidermolyse bulleuse associée à des dystrophies musculaires (EBS-MD). Wally a montré que la transfection de fibroblastes de patients portant une mutation hétérozygote dans l'exon 9 du gène PLEC1 par un 5'RTM codant les exons 1 à 9 est efficace (Wally, Klausegger et al. 2008). Elle permet la restauration d'un ARNm non muté de PLEC1 et la production de la protéine plectine 1 à 60% du niveau normal, correctement localisée dans la cellule.



Approche développée par Wally (Wally, Klausegger et al. 2008)

F. Épidermolyse bulleuse dominante : 5'TS

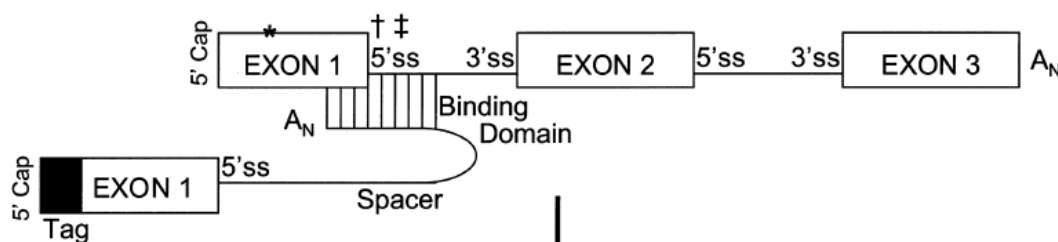
Une forme autosomique dominante de l'épidermolyse bulleuse est due à une altération de la kératine codée par le gène **K14**. Wally et ses collaborateurs ont choisi de construire un RTM responsable du *trans*-épissage en 5' des exons 1 à 7. Pour fabriquer le RTM le plus efficace, ils ont d'abord utilisé le RTM avec un gène rapporteur permettant de cribler des BD générés de façon aléatoire. Le meilleur RTM sélectionné et transfecté dans des cellules de patients permet de restaurer un niveau détectable d'ARN et de protéine kératine. Un test de motilité *in vitro* montre une réversion du phénotype malade (Wally, Brunner et al. 2010).



Approche développée par Wally (Wally, Brunner et al. 2010)

G. β -thalassémie : 5'TS

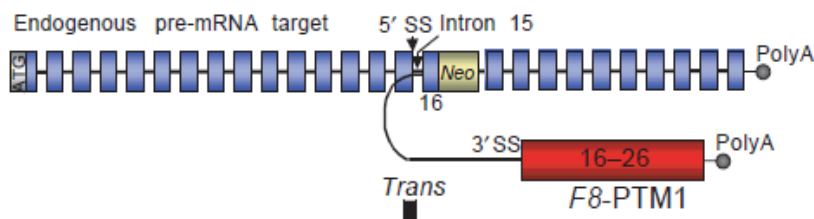
Des mutations dans le gène **HBB** provoquent la β -thalassémie, une maladie transmise de façon autosomique récessive. L'équipe de Sullenger a démontré la capacité de réparation de l'ARNm de **HBB** *in cellulo* par du SMaRT en 5' (Kierlin-Duncan and Sullenger 2007). Un RTM ciblant l'intron 1 et apportant l'exon 1 a été transduit dans des cellules HEK 293 exprimant un ARNm HBB normal. 36% des ARN issus des cellules transfectées par ce RTM portent la séquence tag en 5', marqueur du *trans*-épissage.



Approche développée par Kierlin-Duncan (Kierlin-Duncan and Sullenger 2007)

H. Hémophilie de type A : 3'TS

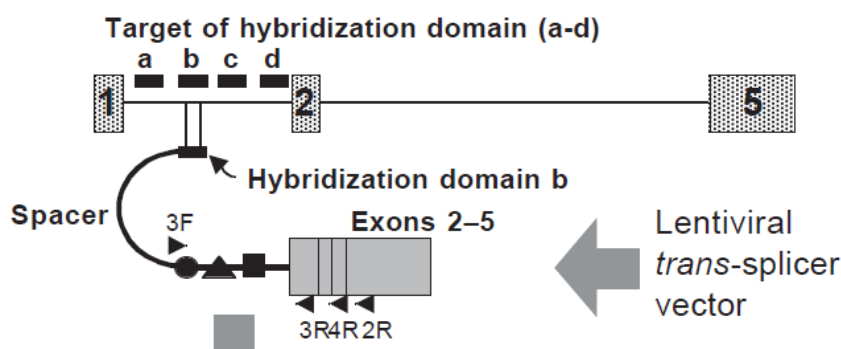
Le SMaRT a été directement évalué sur le modèle murin de l'hémophilie de type A, portant une mutation dans le gène **F8** codant pour le facteur VIII de coagulation. Le RTM développé provoque le *trans*-épissage en 3' des exons 16 à 26 en ciblant l'intron 15. Il a été injecté sous forme d'ADN nu dans la circulation hépatique, ce qui permet une expression transitoire du transgène (Budker, Zhang et al. 1996). Les souris ayant bénéficié de l'injection de ce RTM survivent à une section de leur queue, leur sang étant capable de coaguler au niveau de la plaie (Chao, Mansfield et al. 2003).



Approche développée par Chao (Chao, Mansfield et al. 2003)

I. Hyperimmunoglobulinémie liée à l'X : 3'TS

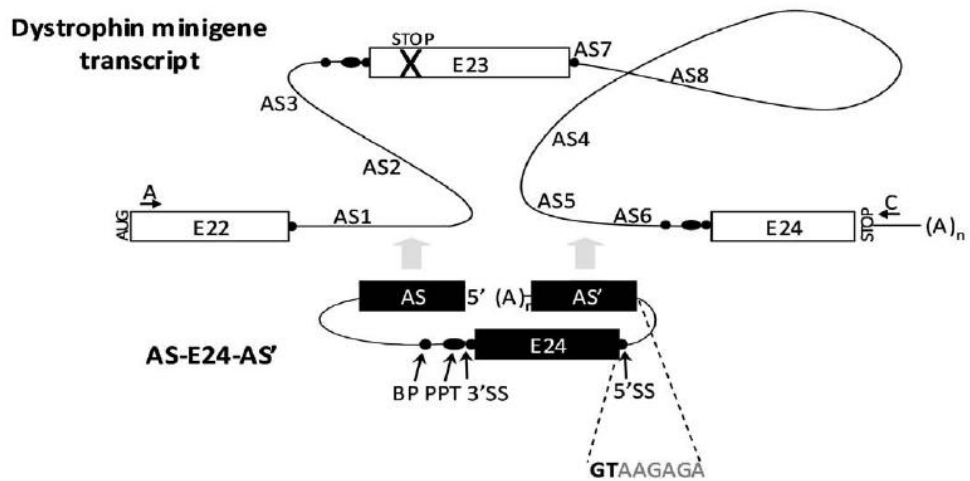
Le *trans*-épissage en 3' par le SMaRT a également été utilisé pour traiter un modèle murin de l'hyperimmunoglobulinémie liée à l'X (où immunodéficience liée à l'X avec excès d'IgM), entraînée par des mutations dans le gène **CD40L** codant un ligand exprimé au niveau des CD4+ activés (Tahara, Pergolizzi et al. 2004). Le test de l'efficacité thérapeutique a été mené de la façon suivante : les cellules de la moelle osseuse d'une souris mutante pour CD40L sont prélevées et modifiées *ex vivo* par un lentivirus codant le RTM ciblant l'intron 1 du gène et rapportant le reste de la séquence codant sauvage. Puis les cellules sont réinjectées dans la moelle osseuse de la souris prélevée. Les souris traitées montrent un ARNm de CD40L restauré, une atténuation de la sensibilité aux pneumonies liées aux pathogènes opportunistes, et une absence de prolifération anarchique des lymphocytes, 1 an après le traitement.



Approche développée par Tahara (Tahara, Pergolizzi et al. 2004)

J. Dystrophie Musculaire de Duchenne : Double TS

Des mutations dans le gène **DYS** codant la dystrophine provoque la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Cette pathologie a été choisie par Lorain et ses collaborateurs pour démontrer la faisabilité du double *trans*-épissage. L'exon 23 d'un minigène mimant l'ADNg **DYS** des exons 22 à 24 a été courtement remplacé par l'exon 23 d'un 5'-3'RTM (Lorain, Peccate et al. 2010). Le RTM construit permet d'envisager le traitement du modèle murin de la DMD, qui porte une mutation dans l'exon 23 provoquant un codon STOP prématuré.



Approche développée par Lorain (Lorain, Peccate et al. 2010)

VI. Annexe VI : Liste des oligonucléotides utilisés dans ce rapport

Partie I: BrainDysferlin

Construction du pAAV-BrainDysferlin

ForBrainDysf pEGFP	GAC TGG TAC CAT GCT CGG GAG ATT GAG CCT AG
BacBrainDysf pEGFP	GAT AGC GGC CGC TTA GCT GAA GGG CTT CAC CAG CTT C

Vérification de l'isoforme dysferline exprimée dans le cerveau

L'analyse complète de la séquence de la dysferline a été réalisée avec des couples hDysfFx/hDysfRx+1 des amorces présentées ci-dessous :

Amorces sens	séquence 5'-3'	exon DYSF ciblé
hDysF1	ATG CTG AGG GTC TTC ATC CTC TAT GC	1 (ATG)
hDysF2	CCT ACT CCT CTG GAG CCC TCC	5
hDysF3	CTT GTT TGA CTC TCC TGG GGA GC	8
hDysF4	GAA CTT GGT GGA CCC CTT TGT GG	13
hDysF5	CAC AGA GCT CAA CAC AGG CAA GG	18/19
hDysF6	GAG ACT CAG AAC CAG CTG CTT GG	21
hDysF7	CGT CAT CTG GAT GCT GCA GGG	24
hDysF8	CAC CTG AGC TTC GTG GAA GAG G	27
hDysF9	CAC CTC GAG TAC CGC AAG ACA G	30
hDysF10	GGG ACC AGA CGC TCA TCT TCT ACG	33

hDysF11	GTT ACC AGC TGG CCA ACA TCT CC	38
hDysF12	GGA AGA GTT CAT CGA TTG GTG GAG C	41
hDysF13	GGA TAA CTA CAT CCC CTG CAC GC	44
hDysF14	GAT CCC AAA CCC ACA CCT GGG	47
hDysF15	TTC GAC TAC CTG CCA GCT GAG C	50
hDysF16	CAT GAA CCC TAA GCT TGA GGA CCC	53
Amorces antisens	séquence 5'-3'	exon DYSF ciblé
hDysfR1	CAT CGT CTC ATG GTC TTT GAC CAC C	3
hDysfR2	CTG CGG TTT GTC TGA CAG CAG C	6
hDysfR3	CTT TTC TCT CCA GAG GCG CTT CG	11/12
hDysfR4	CAT ACT CAG GTA GGT GGT AGC CAC G	16
hDysfR5	CAT CAT CCA CAT CCT GCA GCA TGG	20
hDysfR6	GCT GGT ACA GGT ACT GGT CCA GG	23
hDysfR7	CAG CTT CCC CTC AGC AAA CTG G	25
hDysfR8	GCT ATA CTC CCA GCC TTG CTC ATC G	28/29
hDysfR9	GTG GGT CTG TTC ACA CCG AAG C	31
hDysfR10	GAG CTC AAA AGA GGC CAG CAG C	34
hDysfR11	CCA AAC TGG CGG TTA TCG ATG ACC	39
hDysfR12	GGA TCT TCT GTC TCC TCC TGC GTC	42
hDysfR13	GAC AGC AGC CTG TTC TCC AGG	45
hDysfR14	CAG GAA AAA CCT TCT GGC TCT CCG	48/49

hDysfR15	GGA GCA CTT CTT GGC TGT CTT GG	52
hDysfR16	CTA GGA GGT CTG GAG GAG CTC G	3'UTR

Recherche de la séquence spécifique à la BrainDysferlin

Fbd5' :	AAG CGA TTC TCT GGC CTC AGC
Fbd-cds :	ATG CTC GGG AGA TTG AGC CTA G

Partie II: Ano5

Caractérisation des isoformes murines

mAno5-5UTR.F	CTCTGGTGCTCCAGATGCCTCTGG
mAno5Ex1.F	GGTGGAGCAGGAAGGCTTAACAGCC
mAno5Ex4.F	CCTGAGAAGCGATTCAATTTGTTCCCTGAG
mAno5Ex6.F	GAAGACGAGAGTTTGAACAAAATCTCAGAAAAACAG
mAno5Ex15.F	CGCCTGTCAGTCTTTGCCACTTTTG
mAno5Ex19.F	GTTTGCCACGCTGTTTGTGGCC
mAno5Ex4.R	CGCCTCCTCAGGAACAAATTGAATCG
mAno5Ex6.R	GTCTTCTGTTTCCAAGTCAAGACCTGTTTTTCTGAG
mAno5Ex14.R	CAAAGTACCATGGGATGCGATGGC
mAno5Ex18.R	GGTCATGATCTTGCTCCCAACGACTGTAC
mAno5Ex22.R	GACTGTAGTTTTAGCCTTCAGGGAATTGTCTTCATC

mAno5-3UTR.R GAGGGAGACAGAAAACACTCAGCAGGAGAC

Caractérisation des isoformes humaines

hAno5-5UTR.F GGAGCGCTACCGGCTGAGG
hAno5Ex1.F GGCGACCCGGATCTCCTG
hAno5Ex4.F CTGCAAAGCGATTCAATTTGTTCC
hAno5Ex11.F TGCCCACTCTGTGATCAAGTGTGTG
hAno5Ex19.F GTGGATGCCTGGAACTTACCACTC
hAno5Ex4.R GCCGCCTCAGGAACAAATTG
hAno5Ex6.R GTCTTCTATTTCCAACCTCAAGACCTGTTTTTC
hAno5Ex14.R GGAATACGCGTGTATAGAGGCATGTAAG
hAno5Ex22.R GCTGTGCTTTGTTTTCTCAATCATG
hAno5-3UTR.R GAAGCAGAGAAGTAGTACATTTCCAACATCAC

clonage du pAAV-hANO5

TMEM16EhFatg ATG GGC GAC CCG GAT CTC CTG GAA G
TMEM16EhRstop TTA GAG TGT TGA TTT AGC CAG CTG TGC

Partie III: Trans-épissage

Identification des cellules exprimant la dysferline

les amorces hDysF14 et hDysR15 décritent plus haut ont été utilisées

Validation du modèle Dysf-/-

Fex48hDysf	CCT TCA ACA TCA CCC CAC GGA GAG C
Bex49hDysf	CAG GTC ATC CAG GAT CAC ATC TCT GG

Trans-épissage de la dysferline humaine

Fex47hdysf	CTG GCA GGA TCC CAA ACC CAC ACC
Fex48hDysf	CCT TCA ACA TCA CCC CAC GGA GAG C
Fex49hDysf	CCT GGA TGA CCT GAG CCT CAC G
BacV5	CCG AGG AGA GGG TTA GGG ATA GGC
BacFLAG-hdysf	CCT TGT CAT CGT CAT CCT TGT AGT CGC

Trans-épissage de la dysferline murine

Forex48-mdysf	GAC CTC CCT TCA ACA TCA CCC CAC G
ForEx49-mDysf	GAT GTG ATC TTG GAT GAC CTC AGT CTC AC
BacEx52-mDysf	CTT CTT CTC GCC CTC CTC TGT CAC AC
BacV5	CCG AGG AGA GGG TTA GGG ATA GGC

RTM DysfOpti

Forex49OptiDysf	CCT GGA CGA TCT GTC TCT GAC C
-----------------	-------------------------------

PCR sur les origine de répliation des plasmides

OriF1F AGCTGGCGTAATAGCGAAGAG

OriF1B GCCGAAATCGGCAAAATCCC

Amplification du 3'UTR de la dysferline humaine

FhDysf-3'UTR GGACTCTCCTGCCCTGTAG

RhDysf-3'UTR GGTTCCAACGTGTTTTATAC

ARTICLE |

Résumé

Les dysferlinopathies sont des maladies musculaires dues à une déficience en protéine dysferline, codée par le gène DYSF. Dans ce travail de thèse, trois approches thérapeutiques ont été évaluées pour ces pathologies, sur des modèles cellulaires et murins.

Un variant transcriptionnel court de la dysferline a été vectorisé dans un AAV8r et injecté dans le modèle murin Bla/J, déficient en dysferline. L'analyse des muscles des animaux traités montre une augmentation de la résistance des fibres musculaires au stress mécanique, mais n'apporte pas de correction histologique. Cette étude souligne également la toxicité de cette miniprotéine.

L'anoctamine 5, impliquée dans des pathologies et des activités similaires à la dysferline, a été testée en tant que protéine compensatrice. L'anoctamine 5 surexprimée dans le modèle Bla/J ne permet pas la restauration d'un phénotype normal. La compensation de DYSF par ANO5 n'est donc pas une voie thérapeutique à exploiter pour les dysferlinopathies.

Enfin, une thérapie génique par chirurgie de l'ARN dysferline a été évaluée en utilisant le trans-épissage médié par le splicéosome (SMaRT). La preuve de principe de la reprogrammation d'un minigène dysferline a été faite (ARN et protéine *trans*-épissée obtenus *in vitro*). L'efficacité du SMaRT dans un contexte endogène s'est en revanche révélée faible, et n'a pas permis la restauration d'une protéine dysferline fonctionnelle dans des myoblastes humains. De plus, l'observation de l'expression de protéines directement à partir du RTM (RNA-trans-splicing molecule) a fait apparaître des limites à l'utilisation du SMaRT pour la thérapie génique, et en particulier pour les dysferlinopathies.

Abstract

Dysferlinopathies are muscular diseases due to mutations in DYSF gene, inducing dysferlin protein deficiency. In this thesis, three therapeutic approaches have been investigated for these pathologies, on cell or mice models.

A short transcriptional dysferlin variant has been injected into Bla/J dysferlin deficient mouse model, using AAV8r vector. Muscle fibers of treated animals displayed an increased resistance to mechanical stress without therapeutic benefit. These experiments also pointed out the toxicity of this strategy.

A protein compensation approach has been tested using anoctamin 5, known to be involved in pathologies and activities similar to dysferlin's ones. AAVr mediated Anoctamin 5 overexpression in Bla/J model does not rescue their muscle phenotype. Overexpression of ANO5 does not seem to be a valuable therapeutic strategy for dysferlin deficiency.

Dysferlin RNA surgery was evaluated as a possible genetic therapy using Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing (SMaRT). On a Minigene target, SMaRT is able to induce RNA reprogramming by *trans*-splicing, and produce the corresponding protein. But efficiency is by far decreased in endogenous context and not good enough to restore functional dysferlin in human myoblasts. Moreover, we described proteins resulting from RNA-trans-splicing molecule (RTM) self-expression, limiting the value of SMaRT as therapeutic strategy, especially for dysferlinopathies.