



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE 62 SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTE
U1251 MARSEILLE MEDICAL GENETICS

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur
Discipline : Pathologie Humaine
Spécialité : Génétique Humaine

Julie WARNEZ SOULIE

**Dystrophie musculaire des ceintures de type 2A : étude
de phénomènes inflammatoires et développement
d'outils de thérapie génique**

Numéro National de Thèse : 2018AIXM0424
Numéro local de thèse : 2018AIXM0424/104ED62

Soutenue le 01 octobre 2018 devant le jury composé de :

Ametz SAENZ PENA	Instituto Biodonostia Espagne	Rapporteur
Vincent MOULY	Institut de Myologie	Rapporteur
Fabrice RAYNAUD	Institut Universitaire de Recherche Clinique	Examineur
Robert MARSAULT	Micoralis	Président du jury
Marc BARTOLI	U1251	Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

Table des matières	1
Résumé de la thèse	5
Thesis abstract.....	7
REMERCIEMENTS.....	9
Liste des abréviations.....	12
CHAPITRE 1 : Généralités sur la calpaïnopathie, le gène <i>CAPN3</i> et la protéine calpaïne-3.....	14
A. Le Muscle squelettique	15
I. Anatomie du muscle squelettique	15
II. Caractéristiques fonctionnelles.....	16
III. Développement du muscle	16
IV. Organisation Cellulaire.....	17
1. Structure du sarcomère (FIG INTRO 1)	17
2. Contraction et relâchement du sarcomère	18
B. Calpaïnopathie ou LGMD2A (Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2A)	19
I. Les dystrophies musculaires des ceintures.....	19
1. Description.....	19
2. Fréquence	20
3. Causes	21
II. La calpaïnopathie ou LGMD2A	22
1. Tableau clinique (Angelini and Fanin, 2017b)	22
2. Diagnostic	23
3. Corrélations entre génotype et phénotype	26
4. Prévalence et fréquence	26
5. Prise en charge médicale de la calpaïnopathie.....	27
III. Génétique moléculaire de la calpaïnopathie.....	28
1. Structure du gène CAPN3	28
2. Variants pathogènes	29
IV. La protéine Calpaïne-3	32
1. Structure de la calpaïne-3	32
2. Localisation de la calpaïne-3	33

3. Activation Ca ²⁺ -indépendante et Na ⁺ -dépendante de la calpaïne-3	34
4. Caractéristiques uniques.....	35
5. Activités protéolytiques et non-protéolytiques de la calpaïne-3.....	36
6. Effets des mutations pathogènes sur l'activité de la calpaïne-3.....	38
7. Modèles murins.....	40

CHAPITRE 2 : ETUDE DE SUIVI LONGITUDINAL POUR LA DETERMINATION DE PHENOMENES INFLAMMATOIRES DANS LES MEMBRES INFERIEURS D'UN MODELE MURIN DE CALPAÏNOPATHIE..... 41

A. Généralités..... 42

<i>I. Principes de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire.....</i>	<i>42</i>
1. Définition et historique	42
2. Magnétisme et atome	42
3. Résonance et signal.....	43
4. Les relaxations longitudinale et transversale	45
5. Interprétation et applications.....	47
<i>II. Notions fondamentales en immunologie.....</i>	<i>48</i>
1. Définitions et généralités	48
2. Les leucocytes et leur rôle dans l'immunité.....	53
3. Réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative.....	56
4. Le réseau immunologique.....	58
5. L'immunité chez l'Homme et la souris.....	58

B. Hypothèse de travail..... 60

C. Résultats..... 61

<i>I. Observations histologiques et analyses par imagerie à résonance magnétique.....</i>	<i>62</i>
1. Absence d'infiltration d'éosinophiles ou de cellules inflammatoires dans les muscles des souris déficiente en calpaïne-3.....	62
2. L'étude longitudinale par IRM n'a pas mis en évidence de phénomène inflammatoire	63
<i>II. Analyses immunologiques en cytométrie en flux et PCR quantitative</i>	<i>68</i>
1. Pas de différence immunologique dans les muscles entre souris contrôle et souris déficiente en calpaïne-3	68
2. Les cytokines exprimées dans les muscles quadriceps de souris contrôle et Capn3-knock out.....	72

D. Discussion..... 73

E. Matériels et Méthodes..... 75

<i>I. Modèle animal et génotypage.....</i>	<i>75</i>
<i>II. Investigations par imagerie à résonance magnétique (IRM).....</i>	<i>75</i>

1. Préparation des animaux.....	76
2. Acquisition et traitement des images brutes IRM.....	76
3. Traitement des images pondérées en T ₂	76
III. Observations histologiques.....	76
IV. Analyses par PCR quantitative.....	77
V. Analyses en cytométrie en flux.....	79
1. Isolement des leucocytes à partir de tissu musculaire.....	79
2. Analyses des cellules sanguines.....	79
3. Cytométrie en flux.....	79
4. Anticorps.....	79
VI. Statistiques.....	80

CHAPITRE 3 : Analyse d'une cohorte de patients atteints de dystrophie musculaire des ceintures de type 2A..... 81

A. Analyse d'une cohorte de patients lgmd2a.....	82
I. Analyse du profil des patients LGMD2A.....	82
II. Analyses de l'impact des variants pathogènes sur la calpaïne-3.....	85
1. Analyse de l'impact des variants pathogènes sur l'expression de la calpaïne-3.....	85
2. Analyse de l'impact des variants pathogènes CAPN3 sur l'activité de la calpaïne-3.....	86
3. Analyses des variants exoniques CAPN3.....	88
4. Analyses des variants introniques du gène CAPN3.....	92
B. Conclusion.....	94

CHAPITRE 4 : Evaluations d'approches thérapeutiques pour la calpaïnopathie95

A. Outil développé sur le principe du phénomène iMOC de la calpaïne-3.....	96
I. Découverte de la complémentation intermoléculaire de la calpaïne-3.....	96
II. Mécanisme d'inactivation et d'activation de la calpaïne-3.....	97
III. Hypothèse de travail.....	98
IV. Matériels et Méthodes.....	99
1. Lignées immortalisées des myoblastes humains.....	99
2. Vecteurs d'expression pCMV p94:C58k-EGFP, p94:ΔIS1-EGFP et p94:C129S-EGFP.....	100
3. Immunofluorescence.....	102
4. Etude de prolifération.....	103
5. Western Blot.....	103
6. Anticorps.....	103

V. Résultat.....	104
1. étude de prolifération des myoblastes humains mutés et non mutés.....	104
2. Analyse qualitative de la formation des myotubes par immunofluorescence	105
B. Outil développé sur le <i>Trans</i>-épissage : technologie smart	112
I. Généralités sur l'épissage et la technologie SMaRT.....	112
1. Quelques rappels sur le cis-épissage	112
2. Principe de la technologie SMaRT	113
II. Hypothèse de travail.....	115
III. Conception des PTM pour nos travaux.....	115
1. Choix des séquences des domaines de liaison.....	115
2. Séquence d'ADNc de substitution.....	116
3. Séquences des autres composants du PTM	116
4. Vérification des séquences des PTM	118
5. Fabrication des vecteurs d'expression contenant les ptm	119
IV. Matériels et Méthodes.....	119
1. Culture des myoblastes humains	119
2. Constructions des ADNc plasmidiques	120
3. Transfection et différenciation des myoblastes humains	120
4. Expression des transcrits issus du trans-épissage	120
V. Résultats.....	121
C. Discussion et perspectives	125
BIBLIOGRAPHIE	128
ANNEXES.....	136
PUBLICATIONS.....	165

RESUME DE LA THESE

Etude de suivi longitudinal pour la détermination de phénomènes inflammatoires dans les membres inférieurs d'un modèle murin de calpainopathie

Nous avons signifié que de précédents travaux ont mis en évidence une myosite à éosinophiles ou des infiltrations inflammatoires riches en macrophages à des stades précoces chez certains patients souffrant de calpainopathie, avec un rôle important des éosinophiles dans les dommages musculaires observés lié à une déficience en calpaïne-3. Il est intéressant de faire remarquer que des phénomènes inflammatoires ont aussi été observés chez des modèles murins de LGMD2A. C'est pourquoi nous avons décidé de mener une étude préliminaire de suivi longitudinal de souris déficientes en calpaïne-3 âgées de 2 mois à 8,5 mois (souris C57BL6/J *Capn3*-knock out comparées à des souris contrôle C57BL6/J) ; d'une part, par Imagerie à Résonance Magnétique afin de visualiser l'apparition ou non d'une inflammation et si oui, de pouvoir évaluer sa progression dans les muscles des membres inférieurs des animaux âgés de 2, 4, 6 et 8,5 mois ; d'autre part, d'identifier et de quantifier les sous-populations leucocytaires par cytométrie en flux, ainsi qu'identifier et comparer les cytokines et/ou chimiokines exprimées dans un muscle sain et un muscle LGMD2A de ces mêmes souris âgées de 2 mois et 8,5 mois par une analyse en PCR quantitative.

Le but de cette étude est d'obtenir une vision générale des phénomènes inflammatoires et de la cinétique des leucocytes dans notre modèle murin de la calpainopathie afin de déterminer si l'utilisation de ce modèle dans des études immunologiques plus précises est judicieux.

Analyse de cohorte de patients LGMD2A ; Développement et évaluation d'outils en thérapie génique

Nous savons que les différentes mutations du gène *CAPN3* peuvent avoir un impact soit sur l'expression de la protéine calpaïne-3, soit sur son activité enzymatique entraînant ainsi des phénotypes plus ou moins sévères chez les patients. Du fait que l'hôpital la Timone à Marseille possède une cohorte de plus de 300 patients porteurs de mutations sur le gène *CAPN3*, réparties sur la totalité du gène, nous avons décidé de faire des analyses *in silico* de ces mutations, à savoir leur fréquence, leur pathogénicité, leur impact sur l'épissage, leur impact sur l'expression et l'activité de la protéine calpaïne-3 afin de cibler les outils de thérapie génique les plus appropriés pour restaurer l'expression et/ou les fonctions d'une calpaïne-3 fonctionnelle.

C'est pourquoi, en parallèle, nous avons décidé de développer et de tester des approches thérapeutiques sur des lignées immortalisées de myoblastes issus de biopsie musculaire de patients LGMD2A. Les deux approches que nous avons sélectionnées sont :

- **La compensation intermoléculaire** : en utilisant la propriété naturelle de la calpaïne-3 de s'autolysier en 2 fragments Cter et Nter pour former des hétérodimères capables d'une activité enzymatique pour lyser ses substrats, nous souhaitons pouvoir restaurer ou améliorer l'activité enzymatique de la calpaïne-3 en compensant l'absence ou le manque d'activité d'un des deux fragments autolytiques selon la mutation présente chez le patient (ici, selon la lignée cellulaire) à l'aide d'un vecteur d'expression approprié;

- **La technologie SMART** : pour rétablir l'expression et l'activité d'une calpaïne-3 fonctionnelle, nous voulons faire exprimer un ARNm chimère issu du *trans*-épissage ne comportant aucune mutation en déviant le *cis*-épissage grâce à l'apport de molécules de *trans*-épissage contenant les exons 5 à 24 de l'ARNm du gène **CAPN3** par transfection des cellules et évaluer dans un premier temps son expression dans ces lignées de myoblastes humains mutées.

THESIS ABSTRACT

Longitudinal follow-up study to determine inflammatory phenomena in the lower limbs of a mouse model of calpainopathy

Previous works highlighted an eosinophilic myositis or inflammatory rich-macrophages infiltrations in early stages in certain patients suffering from LGMD2A, with an important role of eosinophils in the observed muscular damage bound to a deficiency of calpain-3. It is interesting to point out that inflammatory phenomena were also observed in mouse models of LGMD2A.

That is why we decided to lead a preliminary longitudinal follow-up study of calpain-3 deficient mice from 2-months to 8,5 months of age (mouse C57BL6/J *Capn3*-knock out compared with mouse C57BL6/J as control) ; on one hand, by Magnetic Resonance Imaging to visualize the appearance or not of an inflammation and if yes, being able to estimate its progress in lower limbs muscles of animals at 2, 4, 6 and 8,5 months of age; on the other hand, to identify and quantify subpopulations of leukocytes by flow cytometry, as well as identify and compare cytokines and/or chemokines expressed in a healthy muscle and a LGMD2A muscle of these same 2-month-old mice and 8,5 month-old mice by a quantitative PCR analysis.

The purpose of this study is to obtain a general vision of the inflammatory phenomena and the kinetics of leukocytes in our mouse model of calpainopathy to determine if the use of this model in more precise immunological studies is sensible.

Analysis of LGMD2A patients' cohort; development and evaluation of tools in gene therapy

We know that the various mutations of *CAPN3* gene can have an impact either on the expression of the calpain-3 protein, or on its enzymatic activity so causing more or less severe phenotypes at patients.

Because Timone hospital in Marseille possesses a cohort of more than 300 patients carrying *CAPN3* gene mutations, distributed on all of gene; we decided to make *in silico* analyses of these mutations, worth knowing their frequency, their pathogenicity, their impact on splicing, their impact on expression and activity of calpain-3 to target tools of gene therapy the most suited to restore expression and/or functions of a functional protein.

That is why, in parallel, we decided to develop and to test therapeutic approaches on human immortalized myoblast lineages stemming from LGMD2A patients' muscular biopsy. Two approach that we selected are:

- **Intermolecular complementation:** By using the natural property of calpain-3 to autolyse in 2 Cter and Nter autolytic fragments to form heterodimer capable of an enzymatic activity for lyse its substrata, we wish we can restore or we improve enzymatic activity of calpain-3 by compensating for the absence or lack of activity of one of the two autolytic fragments according to mutation carried by patient (here, according to the cellular lineage) by means of an appropriate vector of expression.

- **SMART technology:** To restore expression and activity of a functional calpain-3, we want to make express a chimeric mRNA stemming from *trans*-splicing containing no mutation by diverting the *cis*-splicing thanks to the contribution of molecules of *trans*-splicing containing exons 5 - 24 of mRNA of *CAPN3* gene by transfection of the cells and to estimate at first its expression in these lineages of human myoblast carrying *CAPN3* mutations.

REMERCIEMENTS

Ces deux pages (parfois plus pour les plus bavards) de remerciements sont un incontournable des mémoires de thèse (je suis même persuadée que ce sont les pages les plus lues) et ont d'autant plus d'importance que ce sont elles en particulier qui ouvrent ce mémoire. Il ne faut donc surtout pas bâcler les remerciements... C'est pourquoi je vais m'y attarder aussi sérieusement que pour le reste de la rédaction de ma thèse et remercier qui de droit tout en restant naturelle et sincère 😊.

Tout d'abord, je remercie le Professeur Nicolas Levy d'avoir donné son accord pour que j'effectue ses trois années de thèse au sein de l'unité 1251. Au sein de cette unité, je remercie les membres avec lesquels j'ai pu discuter et partager, qui m'ont parfois apportée une aide précieuse pour me sortir de quelques petits soucis techniques (un petit rien peut apporter de beaux résultats !).

Je remercie aussi les Docteurs Benoit Giannesini et Sandrine Henri avec lesquels j'ai collaboré pour mon projet de thèse principal, m'apportant leur expertise technique et leurs connaissances scientifiques. Ces collaborations ont été très enrichissantes et instructives pour moi. Sans elles, ce projet n'aurait pas eu la qualité qu'il a aujourd'hui. Et un merci supplémentaire pour Benoit qui m'a confiée une partie d'un de ses propres projets. Je tenais aussi à remercier le Professeur Hiroyuki Sorimachi ; pour lequel j'ai une profonde pensée ; qui avait eu la gentillesse de m'accueillir au sein de son laboratoire à Tokyo pour réaliser un stage auprès du Docteur Yasuko Ono que je remercie également pour son aide précieuse sur le projet CAPiMOC, ainsi que tous les membres de la Calpain Project team qui ont été des hôtes adorables !

Ensuite, je remercie bien évidemment tous les membres de l'ex équipe de myologie translationnelle, les présents comme les absents. Le Docteur Aurélie Defour a été d'une grande aide et d'un grand soutien pour mes travaux grâce à son expérience en *in vitro* et sur le muscle en général ; Sébastien que je remercie pour m'avoir appris et guidée lors de toutes ces constructions de vecteurs d'expression (car il y en a eu pas mal !) ; Nathalie qui est une technicienne en or et une collègue de travail qui a toujours la pêche (surtout ne change pas !) et enfin Alexandra, toute nouvelle doctorante que j'ai soutenue et que je soutiens encore et à qui je souhaite une belle réussite. A tous, je vous remercie pour votre bonne humeur, votre gentillesse et votre soutien, autant scientifique que moral 😊. Je n'oublie pas non plus le Docteur Martin Krahn car ce sont ces précédents travaux de recherche qui sont à l'origine de cette thèse : une belle démonstration de la continuité et du lien entre la recherche clinique et la recherche fondamentale.

Plus sérieusement maintenant, je remercie tous les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'être présents le jour de ma soutenance, ainsi que d'en être rapporteur (les « malheureux ») ou examinateur (les « veinards »). Je vais commencer par les rapporteurs : je remercie les Docteurs Amets Sáenz Peña et Vincent Mouly d'avoir accepté ce rôle et ainsi d'accorder du temps à la lecture critique de ce mémoire et d'y apporter leur expertise sur la LGMD2A, la calpaïne-3 et la physiologie du muscle. Je remercie également le Docteur Fabrice Raynaud et le Professeur Robert Marsault d'avoir accepté le rôle d'examineur et de président de ce jury et d'apporter leur expertise sur les calpaines, l'immunologie et le génie génétique. Enfin, je remercie le Professeur Pierre Cau d'être aussi présent comme membre invité avec toutes les connaissances, l'expertise et le savoir en biologie cellulaire, et bien d'autres domaines, que de nombreuses années de recherche ont forgé. Je suis certaine que nous aurons tous une discussion riche et intéressante le jour de la soutenance.

Pour terminer (non je ne t'ai pas oublié Marc), je tenais à remercier mon directeur de thèse, le seul et unique 😊, Docteur Marc Bartoli, qui m'a guidée dans mes travaux de recherche, m'a soutenue durant ces trois années aussi bien dans l'aspect professionnel que l'aspect personnel car je peux dire que je fus sa « première » pour pas mal de critères : « première » doctorante extérieure à AMU, « première » doctorante ayant travaillé dans le privé, « première » doctorante pleinement autonome dès le démarrage de sa thèse (corrige-moi si je me trompe), « première » doctorante à finir une thèse en trois ans et « première » doctorante à avoir eu un enfant durant sa thèse. Bref, je pense lui avoir donné quelques sueurs froides 😊. Marc, je te remercie donc pour tout : ta bonne humeur, ton sens de l'humour, ta gentillesse et ton excellente expertise scientifique et technique (le plus dur étant d'arriver à te comprendre les premiers jours... car un marseillais qui parle vite, c'est dur à suivre 😊). Il faudrait que toutes les directrices et tous les directeurs de thèse soient comme toi !

Pour conclure ces remerciements, je tenais à dédicacer ce mémoire de thèse à ma fille Marianne, née le 9 avril 2018, qui m'aura accompagnée dès le début (merci les hormones de grossesse et leurs tracasseries quotidiennes) à la fin (changes, repas, jeux et nuits très courtes) de la rédaction de ce mémoire de thèse. Marianne est un vrai rayon de soleil parmi les difficultés rencontrées lors de cette troisième et dernière année. Marianne, tu es la plus belle expérience de « bio mol » que j'ai pu réaliser (inspiré du Pr Cau). Sans oublier une énorme pensée pour le papa et époux, Laurent, qui a toujours répondu présent lors des moments de doutes et les grandes difficultés.

LISTE DES ABREVIATIONS

- ✦ ADN : Acide DésoxyriboNucléique
- ✦ ADNc : Acide DésoxyriboNucléique Cyclique
- ✦ ADP : Adénosine DiPhosphate
- ✦ ARN : Acide RiboNucléique
- ✦ ASO : Allele-specific oligonucleotide
- ✦ ATP : Adénosine TriPhosphate
- ✦ BET : Bromure d'ETHidium
- ✦ Bp : Base paire (Paire de bases)
- ✦ BSA : Bovine Serum Albumine
- ✦ C3KO : *Capn3*-Knock Out
- ✦ CCL : Chemokine C-C ligand
- ✦ CBS : Ca²⁺-Binding Site(s)
- ✦ CD : Cluster de Différenciation
- ✦ CLP : Cellule Lymphoïde Précurseur
- ✦ CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- ✦ CMP : Cellule Myéloïde Précurseur
- ✦ CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
- ✦ CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)
- ✦ CSF : Colony Stimulation Factor
- ✦ CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
- ✦ DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
- ✦ EDTA : Acide Ethylène Di-amine Tétra-acétique
- ✦ eM : extraMoléculaire
- ✦ FACS : Fluorescent-Activated Cell Sorting
- ✦ FID : Free Induction Decay
- ✦ FITC : Fluorescéine IsoThyoCyanate
- ✦ GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
- ✦ GM-CSF : Granulocyte-Macropage Colony Stimulating Factor
- ✦ HE : Hétérozygote
- ✦ HO : Homozygote
- ✦ IFN : InterFéroN
- ✦ IL : InterLeukine
- ✦ iM : intraMoléculaire
- ✦ iMOC : Intermolecular Complementation (Complémentation intermoléculaire)
- ✦ IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
- ✦ IS1&2 :
- ✦ MGG : May-Grünwald Giemsa
- ✦ MHC : Major Histocompatibility Complex
- ✦ MIP : Macrophage Inflammatory Protein
- ✦ MSME : Multi6slice Multi-Echo
- ✦ PCR : Polymerase Chain Reaction
- ✦ PE : PhycoErythrine
- ✦ PLEIAD : Platform Element for Inhibition of Autolytic Degradation
- ✦ PTM : Pre-mRNA *Trans*-splicing Molecule (molécule pré-ARNm de trans-épissage)
- ✦ q-PCR : PCR quantitative
- ✦ RANTES : Regulation on Activation, Normal T cell Expressed
- ✦ RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- ✦ RNA : Ribo Nucleic Acid
- ✦ RPMI : Roswell Park Memorial Institute

- ✚ RQ : Relative Quantification (Expression Relative)
- ✚ shRNA : Short hairpin RNA
- ✚ SMaRT : Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing
- ✚ SVF : Sérum de Veau Fœtal
- ✚ TNF : Tumor Necrosis Factor
- ✚ CysPe : Calpain-type cysteine Protease conserved
- ✚ CBSW : Calpain-type Beta SandWich
- ✚ FL-CAPN3 : Full Length Calpaïne-3 ou calpaïne-3 entière
- ✚ nFL-CAPN3 : Calpaïne-3 entière autolysée (nicked Full Length Calpain-3)
- ✚ LGMD2A : Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 2A
- ✚ PC1&2 : Protease Core 1 & 2
- ✚ PEF : Penta E-F hand
- ✚ UA : Unité Arbitraire

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA
CALPAÏNOPATHIE, LE GENE *CAPN3* ET LA
PROTEINE CALPAÏNE-3

Pour commencer cette introduction, il est nécessaire de vous présenter brièvement l'organisation anatomique du muscle squelettique ainsi que ses caractéristiques fonctionnelles car c'est cet organe qui est affecté par la dystrophie musculaire des ceintures de type 2A.

A. LE MUSCLE SQUELETTIQUE¹

Le muscle squelettique représente environ 35% de la masse totale d'un individu adulte. Cet organe fournit à l'organisme la puissance nécessaire pour réaliser des mouvements, il est un lieu de stockage d'énergie et il est un système de thermorégulation. Le muscle squelettique possède aussi une capacité remarquable qui lui est caractéristique, à savoir une capacité de régénération grâce à une coordination de divers processus cellulaires qui sont impliqués dans les cycles de nécrose-régénération afin de restaurer le tissu musculaire. (Wosczyzna and Rando, 2018).

I. ANATOMIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

Le muscle squelettique est formé de faisceaux musculaires, eux-mêmes formés par des fibres musculaires, et il est inséré sur l'os par l'intermédiaire des tendons (tissu fibreux élastique et solide). Un groupe de muscles est enveloppé dans un tissu conjonctif, l'aponévrose, formant ainsi une loge musculaire. Les aponévroses sont extensibles en largeur, soutiennent les cellules musculaires et leur impose de se contracter dans un axe précis.

Le muscle est parcouru de fibres nerveuses, chaque fibre musculaire étant en contact avec une seule terminaison nerveuse qui va induire son activité. Les signaux émis sont transmis par les nerfs moteurs via le système nerveux permettant une contraction volontaire (contracter le biceps fait plier le bras) ou involontaire (mouvement du diaphragme pour maintenir la respiration) du muscle squelettique.

Pour finir, la vascularisation est indispensable au bon fonctionnement du muscle. Les nutriments et l'oxygène nourrissant le muscle sont transportés via les artères, tandis que les veines vont permettre l'élimination des déchets provenant du travail musculaire (acide lactique, dioxyde de carbone, etc.). Les vaisseaux sanguins vont former un fin réseau de capillaires qui va irriguer chaque myofibre.

Le muscle étant capable de régénération, des cellules aidant à la réparation vont emprunter ce réseau vasculaire pour accéder à l'espace interstitiel entre les fibres musculaires et ainsi assurer leur rôle de « nettoyeur ». Ainsi, à la suite d'une blessure du muscle squelettique, la première réponse cellulaire est l'infiltration de cellules immunitaires comme les macrophages qui sont majoritairement recrutés sur la zone blessée, ainsi que les éosinophiles puis plus tardivement un sous-type de cellules T et les neutrophiles (pour plus de détails sur le système immunitaire, se référer au chapitre 2.A.II) (Wosczyzna and Rando, 2018)

¹ Source : https://www.afm-teleton.fr/sites/default/files/le_muscle_squelettique_0306.pdf

II. CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES

Le muscle squelettique possède de nombreuses propriétés lui permettant d'assurer ses fonctions.

Il est excitable : il perçoit un stimulus et y répond. Ce stimulus est porté par un médiateur chimique, l'acétylcholine, libéré par la terminaison nerveuse d'un nerf moteur. En réponse, la myofibre va produire un potentiel d'action qui va se propager le long de sa membrane entraînant ainsi une contraction musculaire. Plus précisément, l'évènement déclenchant la contraction musculaire est une augmentation d'un facteur 1000 de la concentration cellulaire en calcium. Le couplage excitation-contraction correspond aux mécanismes permettant cette forte augmentation.

De plus, le muscle fait preuve d'élasticité. Lors d'une contraction, les myofibres se raccourcissent et lors du relâchement, elles reprennent leur longueur de repos. A l'inverse, lors d'un étirement, les myofibres vont être capables de s'étirer au-delà de la longueur de repos. Ces mécanismes assurent un rôle d'amortisseur lors des variations brutales de la contraction.

Pour finir, le muscle fait preuve de plasticité en adaptant sa structure selon le type d'entraînement et le travail qu'il doit effectuer. Il existe trois types de fibres musculaires :

- Les fibres de type I à contraction lente : sollicitées lors d'un exercice peu puissant et prolongé,
- Les fibres de type II à contraction rapide : utilisées lors d'un exercice bref et puissant,
- Les fibres de type IIa : varient selon les muscles de l'organisme et l'individu.

Ainsi, le rapport fibres lentes/fibres rapides va évoluer en fonction de l'entraînement et du type d'exercice pratiqué.

III. DEVELOPPEMENT DU MUSCLE

Lors du développement embryonnaire, le muscle squelettique trouve son origine dans le mésoderme. Lors de l'enfance et de la puberté, le volume musculaire moyen va augmenter d'environ 20 fois. Cette croissance n'est pas liée à l'augmentation du nombre de fibres musculaires, mais à l'augmentation de leur diamètre et de leur longueur grâce à la synthèse active de nouvelles myofibrilles. Ces modifications sont soumises à des facteurs nerveux, mécaniques et hormonaux.

A l'inverse, avec le vieillissement, les muscles s'amincissent et leur force diminue. Une atrophie musculaire, une perte de fibres musculaires et une diminution de leur taille peuvent être occasionnées dans le cas où le muscle n'est pas assez sollicité ou inutilisé. Le phénomène de régénération ainsi perturbé peut aboutir à une accumulation de graisse, et un aspect fibrotique. Nous pouvons ajouter que les dystrophies musculaires sont un exemple notable d'une perturbation du processus de nécrose-régénération aboutissant à ce genre de phénotype musculaire.

IV. ORGANISATION CELLULAIRE

La fibre musculaire, ou myofibre, est une cellule allongée qui peut mesurer jusqu'à plusieurs centimètres. Elle possède plusieurs noyaux (plurinucléée) disposés en périphérie de la cellule. Ces noyaux multiples résultent de la fusion de cellule mononucléée, soit des myoblastes, soit des cellules satellites.

En effet lors de la myogenèse, des cellules fusiformes à noyaux uniques, les myoblastes, vont fusionner entre eux pour former un myotube ; leurs noyaux vont s'accoler et former une chaîne centrale, les myofilaments se plaçant en périphérie. Les myotubes vont ensuite se différencier en fibre musculaire mature ; les noyaux prennent une position périphérique tandis que les myofilaments se localisent au centre de la fibre musculaire.

De plus, la fibre musculaire est entourée d'une membrane protectrice, le sarcolemme. Celui-ci présente des invaginations tubulaires, les tubules T, réparties régulièrement le long de la fibre. Son cytoplasme, nommé sarcoplasme, contient les organites nécessaires à son fonctionnement (réticulum sarcoplasmique très développé, mitochondries, etc.).

Quant au cytosquelette musculaire, il est composé essentiellement de myofibrilles. Chaque myofibrille est composée d'une chaîne d'unités contractiles répétitives responsables de la contraction des myofibres, les sarcomères.

1. STRUCTURE DU SARCOMERE² (FIG INTRO 1)

La répétition des sarcomères dessine, tout le long de la myofibrille, une striation régulière, visible au microscope. Chaque sarcomère est délimité par deux stries, les disques Z (de l'allemand *zwischen* « entre »), et est formé, notamment, par des filaments protéiques : les myofilaments fins d'actine, qui forment la bande I (pour isotropique) et les myofilaments épais de myosine, qui forment la bande H (de l'allemand *heller* « pâle »), incluant en son centre la mince ligne M (de l'allemand *mittel*, « centre »). La superposition des myofilaments d'actine et myosine forment la bande A (pour anisotropique).

Les principaux constituants du sarcomère sont :

- La protéine géante titine, qui va de la ligne Z à la ligne M, élastique et possédant de nombreux sites de liaison aux protéines du cytosquelette. Elle joue un rôle structural majeur au niveau du sarcomère, pour son assemblage et le maintien de sa structure.
- L'alpha-actinine qui constitue la ligne Z.
- Les filaments d'actine sont les composantes principales des bandes I et s'étendent jusqu'aux bandes A. Les molécules d'actine sont liées à la titine via l'alpha-actinine au niveau de la ligne Z.

² Sources : AFM Téléthon, [http://faculty.hcc-nd.edu/lunfried/WWW\(S2008\)/B105\(S08\)/StudentNotes/Chapter-12\(StudNotes\).pdf](http://faculty.hcc-nd.edu/lunfried/WWW(S2008)/B105(S08)/StudentNotes/Chapter-12(StudNotes).pdf)

- Les filaments de myosines se retrouvent à travers la bande A et se superposent dans la bande H et de la ligne M, au centre du sarcomère. Les molécules de myosines sont liées à la titine à ce niveau grâce aux protéines myomésines et protéines M.
- D'autres protéines importantes pour la stabilité de la structure du sarcomère se retrouvent dans la ligne Z et la bande M.

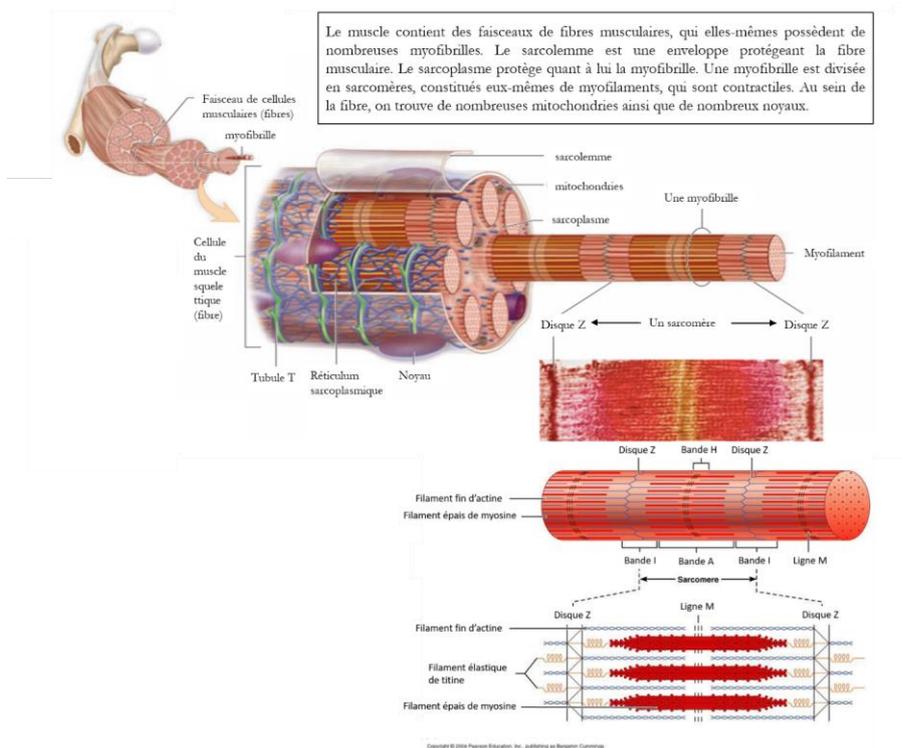


FIG INTRO 1 : Schématisation de la structure du muscle squelettique et d'un sarcomère

2. CONTRACTION ET RELACHEMENT DU SARCOMERE

La contraction du muscle est un mécanisme rendu possible grâce à l'interaction entre l'actine et la myosine dans la bande A, les myofilaments glissant les uns sur les autres. L'actine joue le rôle de la molécule « tractée » tandis que la myosine est le « moteur » moléculaire tirant les myofilaments d'actine vers la bande M. Ce mécanisme est réalisé par des milliers de têtes de myosine et permet de raccourcir un sarcomère de sa forme étirée à sa forme contractée. Pour plus de détails sur ce mécanisme, vous pouvez vous référer à l'Annexe 2.

Dans cette partie de l'introduction, je vais vous présenter très brièvement la grande famille des dystrophies musculaires des ceintures avant d'aborder plus en détails la pathologie qui est concernée par les travaux présentés dans ce mémoire.

B. CALPAÏNOPATHIE OU LGMD2A (LIMB GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY TYPE 2A)³

I. LES DYSTROPHIES MUSCULAIRES DES CEINTURES⁴

1. DESCRIPTION

Les dystrophies musculaires des ceintures font parties d'un groupe de maladies génétiques rares des dystrophies musculaires, et leurs tableaux cliniques sont très hétérogènes. Ces maladies vont provoquer une faiblesse et une atrophie des muscles des bras et des jambes ; les principaux muscles étant affectés sont les muscles proximaux (épaules, bras supérieur, région pelvienne et cuisse).

L'âge d'apparition de la maladie, la sévérité des symptômes et leur apparition varient selon sous-type de la dystrophie musculaire. Généralement, aux premiers stades de la dystrophie musculaire, les individus atteints peuvent avoir une démarche inhabituelle ou par exemple, utiliser leurs bras pour se maintenir debout. Comme les symptômes progressent, les personnes les plus sévèrement atteintes peuvent se retrouver en fauteuil roulant pour leur déplacement.

L'atrophie musculaire peut donc causer des modifications de la posture, de l'apparence des épaules ou d'autres régions du corps. En particulier, les muscles des épaules affaiblis ont tendance à faire se rapprocher les omoplates vers l'arrière, signe caractéristique (décollement des omoplates). Les individus LGMDs peuvent avoir le bas du dos anormalement courbé. Certains développent une rigidité musculaire pouvant limiter les mouvements des hanches, des genoux, des chevilles ou des coudes. D'autres formes peuvent présenter des hypertrophies de certains muscles, comme pour la LGMD2E (FIG INTRO 2).

Certaines formes de dystrophie musculaire des ceintures vont présenter des cardiomyopathies. Le cœur ne réalisant plus son travail de pompe efficacement, les poumons ne seront plus correctement transfusés et n'assureront plus leur fonction de ventilation correctement. De ce fait, les individus affectés vont avoir des troubles respiratoires sévères pouvant amener à l'utilisation de ventilation mécanique.

³ Sources principales de cette partie : Corrado Angelini, Marina Fanin. Calpainopathy – GeneReviews® [Internet] - NCBI Bookshelf ; 2005-2017 ; <https://www.afm-teleton.fr/>

⁴ Source : <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/limb-girdle-muscular-dystrophy>

Pour finir, l'intelligence n'est pas affectée par les dystrophies musculaires mais des patients affectés par de très rares formes peuvent présenter des troubles cognitifs.



FIG INTRO 2 : Signes cliniques fréquemment observés chez les patients LGMDs. **(a)** Signe de Gower dans la LGMD2A, **(b)** atrophie du muscle gastrocnémien dans la myopathie distale de Myoshi, **(c)** rétraction des tendons d'Achille dans la LGMD2A, **(d)** rapprochement des omoplates et atrophie des muscles scapulaires de la LGMD2A, **(e)** scoliose dans la LGMD1F, **(f)** sévère contraction des hanches et des genoux dans la LGMD2C et **(g)** hypertrophie du muscle de la langue dans la LGMD2E. (Angelini and Fanin, 2017a)

2. FREQUENCE

Du fait de la variabilité des symptômes et de leur sévérité plus ou moins importante, ainsi que certaines caractéristiques pouvant se mêler à d'autres troubles musculaires, il est difficile de déterminer une valeur exacte de la prévalence des LGMDs. Toutefois, celle-ci est estimée de 1 pour 14 500 à 1 pour 123 000 individus.

3. CAUSES

Les dystrophies musculaires des ceintures sont classées comme des maladies génétiques rares à transmission autosomique. Les dystrophies de type 1 sont à transmission dominantes. Par exemple, des mutations dans le gène *LMNA* (gène codant pour la lamine A/C) cause la LGMD1B.

Tandis que les dystrophies de type 2 sont à transmission récessive. Par exemple, la dysferlinopathie, ou LGMD2B, est causée par des mutations dans le gène codant pour la dysferline. Et concernant la pathologie d'intérêt de ces travaux, la calpainopathie, ou dystrophie musculaire des ceintures de type 2A ; elle est la plus commune des LGMDs comptant environ 30% des cas. Cette pathologie vous est présentée plus en détails ci-après.

	TYPE	GENE MUTE
Formes autosomiques dominantes	LGMD1A (myotilinopathie)	TTID
	LGMD1B (laminopathie)	LMNA
	LGMD1C (cavéolinopathie)	CAV3
	LGMD1D	DNAJB6
	LGMD1F	TNPO3
	LGMD1G	HNRPDL
	LGMD1H	Anomalie génétique localisée en 2010 dans la région 3p23-p25 du chromosome 3. Gène non identifié.
Formes autosomiques récessives	LGMD2A (calpainopathie)	CAPN3
	LGMD2B (dysferlinopathie)	DYSF
	LGMD2C (γ -sarcoglycanopathie)	SGCG
	LGMD2D (α -sarcoglycanopathie)	SGCA
	LGMD2E (β -sarcoglycanopathie)	SGCB
	LGMD2F (δ -sarcoglycanopathie)	SGCD
	LGMD2G	TCAP
	LGMD2H	TRIM32
	LGMD2I	FKRP
	LGMD2J	TTN
	LGMD2K	POMT1
	LGMD2L (anoctaminopathie)	ANO5
	LGMD2M	FKTN
	LGMD2N	POMT2
	LGMD2O	POMGNT1
	LGMD2P	DAG1
	LGMD2Q	PLEC1
	LGMD2R	DES
LGMD2S	TRAPPC11	
LGMD2T	GMPPB	
LGMD2U	ISPD	

Formes autosomiques récessives	LGMD2V	GAA
	LGMD2W	PINCH2
	LGMD2X	POPDC1
	LGMD2Y	LAP1
	LGMD2Z	POGLUT1

TABLEAU INTRO 1: Liste des LGMDs connues et les gènes mutés causant ces pathologies

II. LA CALPAÏNOPATHIE OU LGMD2A

1. TABLEAU CLINIQUE (ANGELINI AND FANIN, 2017B)

La calpaïнопathie ou dystrophie musculaire des ceintures de type 2A (en anglais, Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 2A LGMD2A) est une pathologie génétique rare, causée par des anomalies du gène *CAPN3* codant pour une protéine spécifique du muscle squelettique, la calpaïne-3 (cf. §B pour le gène et §C pour la protéine). Cette maladie est la plus fréquente des dystrophies musculaires des ceintures représentant 30% des cas et se caractérise par une faiblesse progressive et symétrique des muscles proximaux des ceintures pelvienne et scapulaire (Fardeau et al., 1996). L'apparition de ces symptômes s'étend sur une large période de la vie, de 2 ans à 40 ans, et les phénotypes intra- et interfamiliaux étudiés présentent des atteintes sévères à modérées.

A ce jour, trois phénotypes de la **calpaïнопathie à transmission autosomique récessive** (dite calpaïнопathie récessive) ont été identifiés et classés selon la répartition de la faiblesse musculaire et l'âge d'apparition des premiers symptômes :

- **Calpaïнопathie pelvifémorale (Leyden-Möbius LGMD) :** phénotype le plus fréquent se caractérisant d'abord par une faiblesse des muscles pelviens, puis plus tardivement, par une atteinte des muscles des épaules. L'apparition des premiers symptômes concerne soit les enfants de moins de 12 ans dans sa forme la plus précoce, soit les jeunes adultes entre 12 ans et 30 ans, soit les adultes après 30 ans dans sa forme la plus tardive.
- **Calpaïнопathie scapulohumérale (Erb LGMD) :** phénotype plutôt de sévérité modérée ; l'âge d'apparition des premiers symptômes est très variable, s'exprimant par une faiblesse musculaire affectant d'abord les épaules puis, plus tardivement, la région pelvienne.
- **HyperCKémie :** L'hyperCKémie est un taux plasmatique anormalement élevé de créatine kinase⁵. Elle est considérée comme un stade présymptomatique de la calpaïнопathie car l'hyperCKémie est principalement observée chez l'enfant ou le jeune adulte souffrant de calpaïнопathie à transmission autosomique récessive sans aucun autre symptôme apparent, le taux étant 5 à 80 fois supérieur à la normale (Urtasun et al., 1998).

⁵ Créatine kinase : protéine importante dans le métabolisme énergétique dont le rôle est de reconstituer les réserves en ATP, entre autres, lors d'un effort musculaire. Le taux normal dans le sang est de 15-190 UI/L et l'augmentation de ce taux peut indiquer une atteinte musculaire.

Concernant la **calpaïnopathie à transmission autosomique dominante** (dite calpaïnopathie dominante LGMD1L), plusieurs phénotypes ont été décrits, s'étendant d'un phénotype asymptomatique à celui entraînant une dépendance au fauteuil roulant après 60 ans pour un petit nombre de cas cliniques. Les symptômes dont souffrent ces derniers sont principalement des douleurs lombaires et une myalgie (ces symptômes sont présents chez 50% des individus porteurs du variant pathogène hétérozygote **c.643_663del21**) (Vissing et al., 2016). Dans les autres cas, une faiblesse musculaire apparaît en moyenne à 34 ans et généralement, le phénotype de la calpaïnopathie dominante est incontestablement plus modérée que celui de la calpaïnopathie récessive.

Majoritairement, les études ont montré que la calpaïnopathie présente aussi d'autres symptômes cliniques variés affectant :

- **La démarche :** marche sur la pointe des pieds, difficulté à courir, démarche chancelante ;
- **Le dos :** décollement scapulaire, légère hyperlordose⁶, scoliose⁷ ;
- **Les muscles et articulations :** faiblesse des muscles proximaux plus importante que celle des muscles distaux au niveau des membres, du tronc et de la région périscapulaire ; relâchement des muscles abdominaux, raccourcissement des tendons d'Achille, contractures articulaires.

En revanche, les individus atteints de cette pathologie ne souffrent pas d'atteintes cardiaques ou d'incapacités intellectuelles.

2. DIAGNOSTIC

Le diagnostic de la calpaïnopathie repose évidemment sur les observations cliniques citées ci-dessus, mais également sur le dosage plasmatique de la créatine kinase, les analyses génétiques et parfois histologiques.

i. INVESTIGATIONS CLINIQUES

Les consultations des individus réalisées par les cliniciens vont permettre dans un premier temps de déceler les différents symptômes physiques et morphologiques les affectant et permettre de dresser un premier tableau clinique. Pour établir un diagnostic initial, les examens cliniques et évaluations suivantes sont recommandés :

- *Évaluation clinique complète comprenant la force musculaire des muscles supérieurs, inférieurs, proximaux et distaux, ainsi que l'analyse des performances fonctionnelles.*
- *Examen orthopédique lorsque la posture est sévèrement atteinte.*
- *Quand la démarche est compromise, évaluation de thérapie physique et orthose, surtout dans les stades tardifs de la pathologie.*
- *Évaluation de la fonction pulmonaire (dont la capacité vitale) (Okere et al., 2013) et de la fonction cardiaque (échocardiogramme) (Narayanaswami et al., 2014).*
- *Consultation avec un généticien clinique et/ou conseiller en génétique.*

⁶ Hyperlordose : courbure excessive de convexité antérieure au niveau lombaire.

⁷ Scoliose : Déviation latérale de la colonne vertébrale.

Pour aller plus loin dans ce diagnostic initial, les cliniciens font aussi appel à des technologies d'imagerie médicale. Ainsi deux technologies ont fait leur place dans le parcours du diagnostic de la calpaïnopathie :

- *La tomodensitométrie⁸ va permettre de révéler l'étendu de la faiblesse musculaire au niveau du compartiment postérieur des cuisses, des hanches et des quadriceps (Fardeau et al., 1996; Urtasun et al., 1998). De plus, la répartition des muscles atteints entre la calpaïnopathie et autres LGMDs rend l'analyse par imagerie très importante pour différencier ces pathologies et poser un diagnostic clinique (ten Dam et al., 2012).*
- *L'imagerie par résonance magnétique (IRM) mettra en évidence des altérations type adéquate ainsi que le degré d'atrophie musculaire traduisant l'intensité de la sévérité de la pathologie (Degardin et al., 2010; Díaz-Manera et al., 2015).*

ii. INVESTIGATIONS GENETIQUES

Pour approfondir les investigations cliniques, le diagnostic de la calpaïnopathie s'appuie aussi sur l'identification d'une ou plusieurs anomalies génétiques présentes sur la séquence du **gène CAPN3**, qui, comme indiqué plus haut, code pour une enzyme protéolytique spécifique du muscle squelettique, **la calpaïne-3** (plus de détails au §C). Ces modifications génétiques peuvent être de différentes natures :

- *Variants pathogènes homozygotes ou hétérozygotes composites (variant unique, insertion, délétion, duplication) ;*
- *Variant pathogène hétérozygote avec effet de dominance pour la délétion de 21 paires de bases (pb) c.643_663del21, responsable de la calpaïnopathie dominante. Des études seront nécessaires pour comprendre le mécanisme pathologique de cette mutation.*

De ce fait, les approches de génétique moléculaire utilisées pour le diagnostic prennent toute leur importance. A ce jour, les suivantes peuvent être effectuées :

- **Le test d'un seul gène :** *ce test est celui historiquement utilisé, l'analyse de la séquence du gène CAPN3 était effectuée en première intention, suivie de celle d'autres gènes d'intérêt si seulement un ou aucun variant pathogène n'avait été identifié. Il est désormais recommandé quand l'analyse par panel de gènes ou l'analyse génomique ne sont pas disponibles et que le diagnostic de la calpaïnopathie paraît évident à la suite des investigations cliniques.*
- **L'analyse par panel de gènes :** *ce test inclus le gène CAPN3 ainsi que d'autres gènes d'intérêt pouvant être impliqués dans d'autres dystrophies musculaires. Ce sont les cliniciens qui vont déterminer ces gènes d'intérêt en s'appuyant sur leurs précédentes investigations afin d'identifier les causes génétiques de la pathologie. Ils vont y inclure les analyses de séquence et de délétion/duplication. C'est la méthode d'analyse la plus recommandée par les experts (Thompson and Straub, 2016).*

⁸ Tomodensitométrie : appelée aussi scanner dans le langage courant. Cette technologie consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus ; puis par traitement informatique, permet d'obtenir des images 2D ou 3D des structures anatomiques.

- **L'analyse génomique** : ce test consiste à analyser l'exome mais aussi le génome du patient afin d'augmenter l'identification de la cause de la pathologie musculaire cliniquement proche d'une calpaïnopathie quand un diagnostic précis n'a pas encore été précédemment bien défini.

iii. INVESTIGATIONS HISTOLOGIQUES ET IMMUNOLOGIQUES

A la demande du clinicien, une biopsie musculaire peut être pratiquée quand l'analyse génétique n'a pas été concluante ou pour confirmer le diagnostic de calpaïnopathie. Effectivement, les analyses histologiques permettent de mettre en évidence différentes modifications histologiques rapportées dans la littérature scientifique :

- Dans la majorité des cas, un processus dystrophique actif se caractérisant par une augmentation de la variabilité des tailles des fibres musculaires, de la fibrose et d'un phénomène de régénération-dégénération des fibres ; ainsi qu'un processus myopathique se traduisant par une augmentation du nombre de fibres musculaires centro-nucléées, du nombre de fibres disjointes et d'aspect lobulé avec une prédominance des fibres de type 1 ont été décrits (Hermanová et al., 2006; Keira et al., 2007; Luo et al., 2011; Vainzof et al., 2003).
- Certains cas d'individus présentant une myosite à éosinophiles transitoire au stade précoce de la calpaïnopathie ont été rapportés (Brown and Amato, 2006; Krabn et al., 2006, 2011), tout comme un cas de patient LGDM2A présentant une infiltration du muscle riche en macrophages (Schutz et al., 2017).
- Il a aussi été rapporté une atrophie notable des fibres musculaires corrélant avec la sévérité de la pathologie et affectant plus significativement les hommes que les femmes (Fanin et al., 2014).
- Dans le cas de la calpaïnopathie dominante, les modifications myopathiques sont modérées : augmentation du nombre des noyaux internes et de la variabilité de la taille des fibres musculaires ; occasionnellement, présence de fibres nécrotiques, de fibres en forme d'anneau et de fibrose (Vissing et al., 2016).

En parallèle de l'analyse histologique, une analyse de la calpaïne-3 par immunomarquage peut être effectuée pour appuyer encore plus le diagnostic de la calpaïnopathie. Des études menées ont rapporté qu'environ 70% à 80% des individus portant des variants pathogènes dans le gène *CAPN3* présentaient une absence totale ou une réduction importante de l'expression de la calpaïne-3, tandis que 20% à 30% avaient un taux normal d'expression mais avec une perte totale de la fonction protéolytique (Fanin et al., 2004; Groen et al., 2007; Milic et al., 2007; Perez et al., 2010; Talim et al., 2001).

Toutefois, les résultats de ces analyses par immunomarquage doivent être interprétés avec précaution car l'expression de la calpaïne-3 peut être impactée dans d'autres dystrophies musculaires comme la dysferlinopathie ou la titinopathie ; mais aussi tenir compte que même si la calpaïne-3 est extrêmement stable dans le muscle, sa quantité peut être partiellement réduite par une dégradation artificielle quand les échantillons de muscle sont conservés sous des conditions induisant son autolyse. Il est donc important de respecter les conditions de prélèvement et de stockage, ainsi que de procéder à une analyse protéique multiplex pour considérer le contexte pathologique (Anderson et al., 1998).

3. CORRELATIONS ENTRE GENOTYPE ET PHENOTYPE

A ce jour, il n'a pas été mis en évidence une corrélation cohérente entre génotype et phénotype pour la calpaïnopathie. Néanmoins, les individus porteurs de mutation tronquante homozygote présentent un phénotype sévère avec une absence totale de la calpaïne-3 dans le muscle.

4. PREVALENCE ET FREQUENCE

La calpaïnopathie est considérée comme la plus fréquente des dystrophies musculaires des ceintures car elle représente 30% des cas de LGMDs selon la région géographique (Angelini and Fanin, 2017b). Les études basées sur des données moléculaires ont permis de déterminer la fréquence⁹ de la calpaïnopathie selon les régions du globe, comme indiquée dans le tableau ci-dessous (TABLEAU Intro 2) :

Régions du globe	Fréquence de la calpaïnopathie sur tous les cas de LGMD (%)
Allemagne, Australie, Corée	6% - 8%
Etats-Unis	4% - 12%
Danemark	13%
Arabie Saoudite	16%
Mexique, Chine (nord)	17% - 18%
Pays-Bas	21%
Japon, Lituanie	21% - 26%
Iran	24%
Allemagne, Angleterre (nord), Italie	25% - 35%
Brésil	32%
République tchèque	33%
Bulgarie, Espagne, France, Inde, Slovénie, Turquie	40% - 50%
Pays Basque, Pologne, Russie	80%

TABLEAU Intro 2 : Fréquence de la calpaïnopathie sur tous les cas de dystrophies musculaires des ceintures (en pourcentage) selon les régions du globe.

⁹ Fréquence : pourcentage de cas d'une pathologie dans une population donnée.

Pour démontrer le lien entre le nombre d'individus souffrant de la calpainopathie et des régions précises dans le monde, plusieurs études génétiques ont été menées ces trois dernières décennies.

Par exemple, deux études génétiques épidémiologiques menées en Italie, la première au nord-est et la seconde au sud, ont estimé que la calpainopathie avait une prévalence¹⁰, respectivement de 1/100 000 habitants (soit une fréquence allélique d'environ 1/160) et de 1/42 700 habitants (soit une fréquence allélique de 1/11).

De plus, des études génétiques menées dans des petites communautés isolées ont démontré que le taux de prévalence y était plus élevé (TABLEAU Intro 3) :

Régions isolées ou communautés	Prévalence (par million)
Ile de la Réunion	48
Pays Basque	69
Communauté Mochène dans les Alpes	1900
Village Tlaxcala au Mexique	4300
Population Amish dans l'Indiana	13000

TABLEAU Intro 3 : Prévalence (par million) de la calpainopathie dans des régions ou communautés isolées

Il est intéressant de noter que d'autres études menées sur trois populations d'individus porteurs du variant pathogène le plus fréquent du gène *CAPN3*, **c.550delA**, ont estimé une fréquence allélique de 1/175 en Lituanie, 1/133 en Croatie et 1/124 en Pologne.

5. PRISE EN CHARGE MEDICALE DE LA CALPAÏNOPATHIE

i. TRAITEMENT DES MANIFESTATIONS SYMPTOMATIQUES

Une prise en charge thérapeutique appropriée et déterminée pour chaque individu peut améliorer la qualité de vie et prolonger la survie de chacun. Cette prise en charge se base sur la progression caractéristique de la calpainopathie de chaque cas clinique (histoire naturelle de la maladie). Selon les recommandations en vigueur dans les pays concernés, il peut être instauré :

¹⁰ Prévalence : nombre de cas d'une maladie à un instant donné ou une période donnée.

- *Un programme de thérapie physique passive (Oygaard et al., 2011) et des exercices d'étirements pour promouvoir la mobilité, prolonger la capacité de marche et ralentir la progression de la pathologie ; intégrer des exercices doux de renforcement musculaire (Sveen et al., 2013), comme l'aérobic à faible impact (natation, vélo stationnaire) qui vont améliorer les performances cardio-vasculaires, l'efficacité des muscles et diminuer la fatigue musculaire.*
- *D'éviter toute immobilité prolongée.*
- *L'utilisation d'appareils d'aide à la marche comme les cannes, les déambulateurs, les orthèses ou chaise roulante.*
- *Une intervention chirurgicale pour corriger les complications orthopédiques.*
- *Une aide respiratoire dans le dernier stade de la calpainopathie où peuvent apparaître une insuffisance respiratoire chronique afin de prolonger la survie (Norwood et al., 2007; Richard et al., 2016).*
- *Un support social et psychologique pour éviter le risque d'isolement social et améliorer la qualité de vie des patients (Eggers and Zatz, 1998).*
- *Un contrôle du poids pour éviter l'obésité ou inversement, une perte excessive de poids.*

Annuellement, les individus souffrant de calpainopathie devront réaliser des visites afin de contrôler tous les paramètres cliniques liés à la pathologie (force musculaire, fonction respiratoire, amplitude des mouvements articulaires) ainsi qu'un examen cardiaque dans les stades avancés de la maladie afin d'évaluer et anticiper les risques de comorbidité.

Malheureusement à ce jour, aucun traitement curatif n'est proposé aux patients.

ii. ESSAIS CLINIQUES

A ce jour, il n'y a pas d'essais cliniques en cours concernant la calpainopathie.

III. GENETIQUE MOLECULAIRE DE LA CALPAÏNOPATHIE

1. STRUCTURE DU GENE CAPN3

Le gène humain *CAPN3* est localisé sur le chromosome 15q15.1-q21.1 et couvre une région génomique d'environ 138kb (Ensembl gene ID ENSG00000092529). Ce gène est exceptionnel dans le fait d'être composé de plusieurs petits exons : 10 exons de seulement 58 à 86pb ; les exons 12, 15 et 14 encore plus courts avec respectivement 12bp, 18pb et 37pb. De plus, beaucoup d'introns ont une taille variant de 0,2kb à 2,6kb. De plus, les introns 18 et 20 sont eux aussi exceptionnels par leur taille proche de 100pb. Quant à l'intron 1, il couvre la moitié du gène avec sa taille importante de 24,3kb (<http://www.dmd.nl/> the calpain-3 gene).

Le produit du gène *CAPN3* le plus long et majoritaire est composé de 24 exons et couvre une région génomique de 53kb, correspondant à un transcrit composé de 3316pb. Cet ARNm est principalement exprimé au niveau des fibres à contraction lente et des fibres à contraction rapide du muscle squelettique adulte et il est nommé *CAPN3* p94 (Duguez et al., 2006). Une représentation schématique de l'isoforme *CAPN3* p94 vous est présenté ci-dessous (FIG Intro 3).

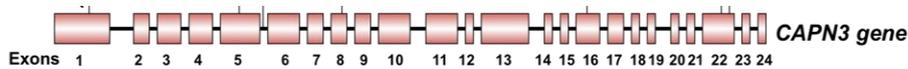


FIG Intro 3 : Isoforme majoritaire du gène *CAPN3* retrouvé dans le muscle squelettique adulte

Chez les mammifères, de nombreux variants ont été décrits, issus d'épissage alternatif aussi bien dans les tissus de l'Homme, de la souris, du rat et du lapin mais dont le niveau d'expression est 100 fois à 1000 fois inférieur (cf. ANNEXE 1) (Duguez et al., 2006). Nous pouvons par exemple citer le premier isoforme *CAPN3* découvert en 1998, Lp82, exprimé majoritairement dans le cristallin des rongeurs. Il est composé de l'exon 1B (appelé aussi AX1) qui permet la traduction d'un domaine N-terminal différent de celui de la forme du muscle squelettique adulte *CAPN3* p94 et ne possède pas les exons 6, 15 et 16 résultant en l'absence des domaines NS, IS1 et IS2 (cf. §C pour plus d'information sur la protéine calpaïne-3). Dans le muscle squelettique, il a été montré que le ratio des isoformes *CAPN3* par rapport au *CAPN3* p94 diminuait lors du processus de développement pour atteindre environ 1%, tandis que la proportion d'isoformes dans le cœur, le cerveau, les poumons, la rétine et d'autres tissus se maintenait à 10%-100% (Ono et al., 2016). La figure 2 ci-dessous vous présente l'expression du gène *CAPN3* dans différents tissus humains (FIG. Intro 4).

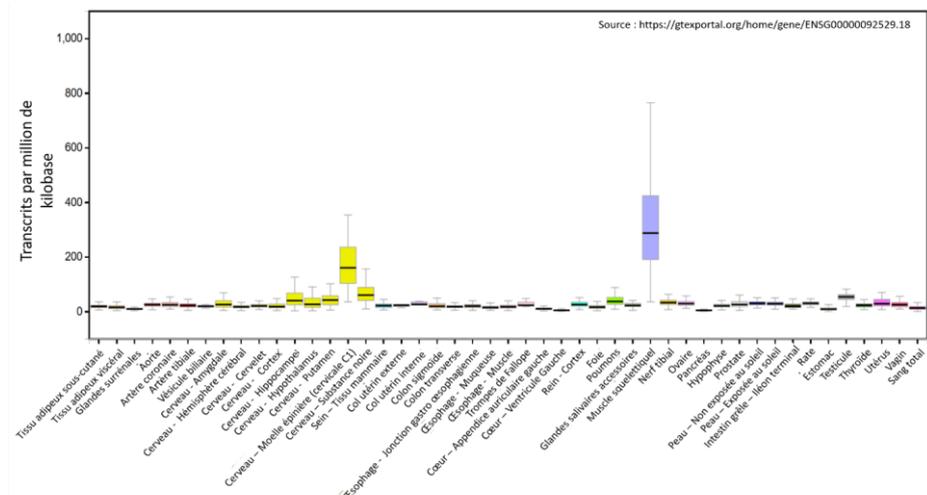


FIG. Intro 4 : Expression du gène *CAPN3* dans certains tissus humains (source de l'analyse des données : GTEx Analysis Release V7 'dbGaP Accession phs000424.v7.p2')

2. VARIANTES PATHOGENES

Selon la base de données Leiden Muscular Dystrophy Mutation, **497 variants pathogènes** ont été identifiés, se répartissant sur tout le gène *CAPN3* (dernière mise à jour du 24 juin 2017) (Angelini and Fanin, 2017b). Il est intéressant dans cette introduction d'approfondir l'état des connaissances concernant ces variants pathogènes afin de

situer par la suite nos travaux réalisés sur l'analyse *in silico* de notre cohorte de patients souffrant de calpainopathie (cf. Chapitre 3).

Tout d'abord, les mutations ponctuelles représentent la majorité des variants pathogènes : environ **70%** des allèles anormaux portent des **mutations faux sens**, les **30% restants** sont représentés par des variants **perte de fonction** comme de petite délétion ou insertion causant des décalages du cadre de lecture et l'apparition de codon stop, des **mutations non-sens** et des **variants situés sur les sites d'épissage**. De plus, **environ 25%** de ces variants pathogènes sont situés **au niveau des jonctions exon-intron** et causent des aberrations d'épissage.

Pour le diagnostic de la calpainopathie, il est très intéressant de noter que des variants pathogènes sont situés dans les régions introniques « profondes » et perturbent l'épissage. Malheureusement, ils sont négligés lors du séquençage de l'ADN génomique car leur identification nécessite le séquençage de l'ADNc total obtenu à partir de biopsie musculaire ou de prélèvement sanguin. En effet, des études ont rapporté que des variants situés sur une région intronique profonde causaient une pseudo-exonisation¹¹ d'une séquence intronique ; ainsi que de larges délétions exoniques, la plus fréquente identifiée est la délétion hors du cadre de lecture de 31 012bp des exons 2 à 8 **c.309+4469_c.1116-1204del**.

Occasionnellement, des cas de patients porteurs de réarrangements génomiques de séquence Alu¹² ont été décrits, ainsi qu'une délétion complète du gène *CAPN3* (Salem et al., 2012).

Dans le cas d'une forme dominante de calpainopathie, un seul variant pathogène a été décrit, la mutation en phase hétérozygote **c.643_663del21**. Pourtant, ce variant a été identifié dans certains cas de mutations hétérozygotes composites avec d'autres variants pathogènes *CAPN3*, incluant **c.2362_2363delinsTCATCT**, **c.550delA**, **p.Ala45Thr** et **p.Asp419Gly**, responsables de forme récessive de la calpainopathie.

Pour finir, de nombreux variants pathogènes ont été retrouvés selon les différentes populations étudiées mais le variant **c.550delA** se retrouve être l'allèle le plus répandu parmi les individus des pays Européens. Pour illustrer cette répartition des variants pathogènes selon les populations, nous vous proposons de consulter le tableau ci-après faisant état des variants récurrents chez des populations isolées, expliqués par la consanguinité associée à des facteurs historique, démographique ou culturel/religieux (cf. TABLEAU Intro 4).

¹¹ Exonisation : recrutement d'un nouvel exon à partir d'une séquence intronique

¹² Séquence Alu : court fragment d'ADN appartenant à la famille des petits éléments nucléaires intercalés ou SINE, caractérisé par la présence d'un site de restriction de l'endonucléase de restriction Alu (5'AGCT 3').

Régions isolées ou communautés	Variants pathogènes <i>CAPN3</i> récurrents
Ile de la Réunion, Océan Indien	c.946-1G>A
Ancienne communauté Amish, nord de l'Indiana (USA)	p.Arg769Gln
Russie, Croatie, Turquie, République tchèque, Bulgarie, Allemagne, Italie et Pologne	c.550delA
Province de Guipuzcoa, Pays Basque espagnol et Brésil	c.2362_2363delAGinsTCATCT
Japon	c.1795_1796insA
Village Chioggia, lagune vénitienne (Italie)	p.Arg490Gln
Communauté Mocheni, vallée de la rivière Fersina, Alpes italiennes	c.1193+6T>A
Communauté Agarwal, nord de l'Inde	p.Asp780His, c.2099-1G>T, c.2051-1G>T
Pays nord-européens incluant Royaume-Uni, Norvège, Suède, Danemark	c.643_663del21 (transmission dominante)
Village Tlaxcala, Mexico	p.Ala116Asp

TABLEAU Intro 4 : Variants pathogènes *CAPN3* les plus répandus selon les populations et communautés étudiées à travers le monde

En s'appuyant sur la base de données Leiden Muscular Dystrophy Mutation, nous pouvons dresser un tableau des dix variants pathogènes les plus rapportés dans la littérature, indépendamment des régions du globe ou des communautés étudiées (cf. TABLEAU Intro 5).

Variants pathogènes <i>CAPN3</i>	Modification protéique prédit	Nombre de rapports dans la littérature
c.550delA	p.Thr184Argfs*36	243 fois
c.2362_2363delinsTCATCT	p.Arg788Serfs*14	85 fois
c.1469G>A	p.Arg490Gln	46 fois
c.2242C>T	p.Arg748*	40 fois
c.1468C>T	p.Arg490Trp	39 fois
c.598_612del	p.Phe200_Leu204del	35 fois
c.946-1G>A	p.Thr316Glufs*2	31 fois
c.2243G>A	p.Arg748Gln	30 fois
c.706G>A	p.Ala236Thr	26 fois
c.245C>T	p.Pro82Leu	26 fois

TABLEAU Intro 5 : Les dix variants pathogènes *CAPN3* les plus rapportés dans la littérature scientifique

Comme nous l'avons indiqué auparavant, le gène *CAPN3* codant pour la protéine calpaïne-3 et ses différents isoformes, il est évident que les variants pathogènes *CAPN3* vont avoir des impacts sur la traduction de cette protéine et donc perturber son niveau d'expression et/ou son activité enzymatique (cf. Chapitre 4). Dans les paragraphes qui suivent, nous allons donc aborder les différentes caractéristiques et propriétés de la calpaïne-3, considérée comme une calpaïne malgré ses nombreuses spécificités développées ci-après.

IV. LA PROTEINE CALPAÏNE-3

1. STRUCTURE DE LA CALPAÏNE-3

La calpaïne-3, ou CAPN3 ou p94 selon la nomenclature, est une protéine de la famille des calpaïnes (**calcium**-dependent **papain**-like protease), des protéases à cystéine calcium-dépendantes. La structure primaire de la sous-unité catalytique des calpaïnes est composée d'une structure en multi-domaines (cf. FIG Intro 3) (Ono et al., 2016)¹³:

- *Domaine CysPc (Calpain-type cysteine Protease conserved) composé des sous-domaines PC1, permettant la fixation du sodium, et PC2 (Protease Core 1 et 2),*

¹³ Source : Revue « An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3 », ONO Y. et al ; 2016, *Biochimie* 122 (supplement C) 169-187.

- *Domaine CBSW (Calpain-type Beta SandWich) qui permet la reconnaissance du substrat ;*
- *Domaine PEF (Penta E-F hand), qui permet la fixation du calcium, la dimérisation et participe aussi à la reconnaissance du substrat.*

La calpaïne-3 possède évidemment cette sous-unité catalytique mais elle se démarque des autres calpaïnes par la présence au sein de sa structure primaire de régions distinctives :

- *Domaine NS en région N-terminale,*
- *Domaine IS1 situé entre les domaines PC1 et PC2 : responsable des activités autolytique et protéolytique, il est aussi impliqué dans l'activation sodium-dépendante ;*
- *Domaine IS2 situé entre les domaines CBSW et PEF : responsable de l'autolyse rapide de la protéine, il est aussi impliqué dans l'activation sodium-dépendante et sa protéolyse entraîne l'inactivation de la calpaïne-3.*

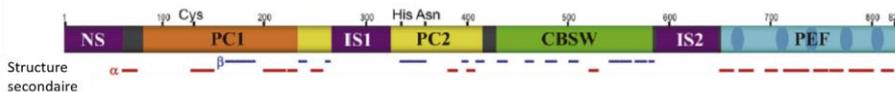


FIG. Intro 5 : Structure primaire schématisée de la calpaïne-3 (d'après (Ono et al., 2016))

La structure en trois dimensions de la calpaïne-3 n'a pas été résolue. Toutefois, à partir des connaissances actuelles, les études ont montré que p94 pouvait fixer quatre ions Ca^{2+} au niveau du domaine PEF, plus précisément sur EF1, EF2, EF3 mais aussi sur EF5 qui est utilisé chez les autres calpaïnes pour la dimérisation et non la fixation du calcium. Mais la calpaïne-3 est capable de se dimériser au niveau de sa région PEF avec les régions PEF d'autres protéines. Dans cette conformation, des études *in silico* placent les deux sites actifs à chaque opposé de la protéine. En revanche, des interactions entre deux molécules entières de calpaïne-3 n'ont jamais été rapportées dans la littérature scientifique.

2. LOCALISATION DE LA CALPAÏNE-3

Comme évoqué précédemment, la calpaïne-3 est une protéine spécifique du muscle squelettique des mammifères, exprimée en forte quantité, surtout dans les fibres rapides (type II). Mais elle est aussi présente dans d'autres tissus, et lors du développement humain elle apparaît relativement tard comparée à d'autres composants du muscle comme la titine ou les sarcoglycanes. Ces données sont aussi valables chez la souris.

Dans les myocytes, la calpaïne-3 se retrouve dans le cytosol, au niveau des bandes A, des lignes Z et M, autour du réticulum sarcoplasmique.

Au niveau des sarcomères, p94 est liée aux régions N2A et ligne M de la titine¹⁴. Lorsque le sarcomère est étiré, la calpaïne-3 s'accumule au niveau de la région N2A où un complexe protéique se forme en réponse à une stimulation mécanique. Il est intéressant de souligner que sa présence dans cette région est dépendante de la longueur du sarcomère : lorsque ce dernier s'étire, la calpaïne-3 se fait plus rare au niveau de la ligne M pour être plus abondante au niveau de la région N2A (cf. Annexe 2 pour plus de détails sur la contraction du sarcomère).

En revanche, malgré la séquence signal de translocation nucléaire présente dans le domaine IS2, la localisation nucléaire de la calpaïne-3 dans le muscle squelettique a rarement été observée.

3. ACTIVATION Ca^{2+} -INDEPENDANTE ET Na^+ -DEPENDANTE DE LA CALPAÏNE-3

La caractéristique la plus marquante de la calpaïne-3 est son activité d'autodégradation extrêmement rapide, exhaustive et apparemment indépendante du calcium. Cette autolyse extrêmement rapide dépend des domaines IS1 et IS2 et l'exhaustivité impliquerait d'autres protéases, ainsi que la capacité de la calpaïne-3 de subir une complémentation intermoléculaire (cf. Chapitre 3).

i. INDEPENDANCE AU CALCIUM

Des études ont montré que l'autolyse de la calpaïne-3 était apparue indépendante du calcium : un excès d'EDTA ne l'inhibait pas. En revanche, l'autolyse était activée par le sodium (Na^+), propriété unique dans la famille des calpaïnes.

Toutefois, en présence de concentrations de Na^+ intracellulaires physiologiques, p94 est activée par des concentrations intracellulaires physiologiques de Ca^{2+} mais à des niveaux plus faibles que ce qui est connu pour l'activation d'autres calpaïnes. Ce phénomène s'explique par les différences structurelles entre la calpaïne-3 et les autres calpaïnes. En effet, les calpaïnes conventionnelles forment des ponts de sel entre les domaines PC2 et CBSW, et un lien entre CBSW et PEF pour leur stabilité et activation. Les acides aminés correspondant à cette position sont différents chez p94, ce qui pourrait expliquer le faible niveau de Ca^{2+} nécessaire pour son activation. De plus, la stabilité et la sensibilité au calcium des calpaïnes-2 sont aussi régulées par leur région N qui interagit avec le domaine PEF ; mais encore une fois, cette région N est très différente chez la calpaïne-3 et contribuerait plutôt à augmenter la constante d'association K_a de la calpaïne-3 pour le calcium.

¹⁴ Titine : protéine élastique impliquée dans le contrôle de l'assemblage des protéines sarcomériques et qui régule l'élasticité du sarcomère. Dans le muscle, elle est liée aux filaments de myosine, et s'étend de la ligne Z de la bande I à la ligne M dans la bande H.

ii. DEPENDANCE AU SODIUM

Des études ont montré que la calpaïne-3 était activée *in vitro* par du sodium. Toutefois, nous pouvons noter qu'en l'absence d'autres ions, une concentration de Na⁺ à 100mM et une concentration de Ca²⁺ à 0,1mM sont nécessaires pour provoquer l'autolyse de p94. La calpaïne-3 s'avère donc être la première, et pour l'instant la seule, enzyme intracellulaire dépendante du sodium et à des niveaux physiologiques intracellulaires de Na⁺ indispensables pour son activation. D'après des analyses mutationnelles, la capacité de la calpaïne-3 à fixer le sodium impliquerait un site Ca²⁺-Binding Site(s) (CBS-1) situé dans le domaine PC1, mais non retrouvé au niveau du domaine PC2 (CBS-2) ; ainsi que les domaines IS1 et IS2. On peut donc en déduire que l'activité Na⁺-dépendante de la calpaïne-3 nécessite la coopération entre CBS-1, IS1 et IS2.

Lorsque la calpaïne-3 est activée par le sodium, les substrats potentiels découverts sont la tropomyosine¹⁵, la LIM-domain-binding protein 3 (LDB3)¹⁶ et l' α -actinine-3¹⁷ ; ces trois protéines étant localisées sur la ligne Z du muscle. De plus, la calpaïne-3 localisée sur la ligne Z en se liant à l' α -actinine-2 indiquerait que la dépendance de p94 au Na⁺ jouerait un rôle essentiel pour ses fonctions au niveau de cette région.

4. CARACTERISTIQUES UNIQUES

Hormis les caractéristiques que nous avons abordées ci-dessus, la calpaïne-3 possède d'autres particularités atypiques, qui ne sont pas complètement résolues à ce jour. Nous pouvons citer ici les plus notables :

- Sa capacité à se « réactiver » après inactivation grâce au phénomène de complémentation intermoléculaire entre deux fragments autolytiques de la calpaïne-3 pour reconstituer un domaine protéase actif (cf. Chapitre 3).
- Sa possibilité à être phosphorylée sur les résidus S629 et S636 situés dans le domaine IS2. La forme phosphorylée de la calpaïne-3 (P-p94) est majoritairement présente dans les myofibrilles, capacité qui peut être

¹⁵ Tropomyosine : protéine fibreuse dimérique s'enroulant autour du microfilament d'actine pour le stabiliser et jouant un rôle de régulation en masquant les sites de liaison actifs entre la tête de la myosine et l'actine.

¹⁶ LDB3 : protéine impliquée dans le maintien et l'intégrité structurale des sarcomères durant la contraction musculaire.

¹⁷ α -actinine-3 : protéine de liaison aux multiples rôles, exprimée spécifiquement dans le muscle squelettique, et aide à l'ancrage des filaments d'actine myofibrillaires.

reliée avec une mécano-transduction du signal avec la titine. Ainsi, P-p94 aurait une meilleure affinité pour les myofibrilles et s'y accumulerait (FIG. Intro 6, d'après Ono et al.).

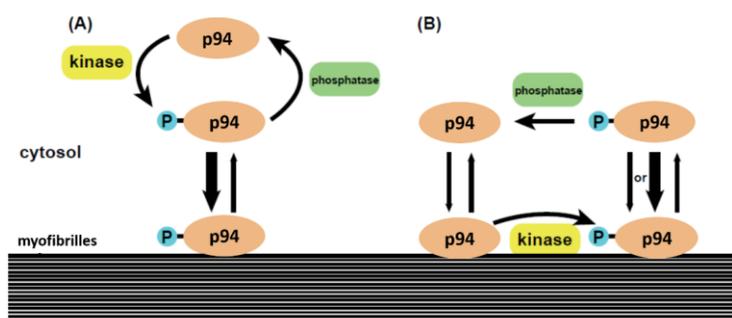


FIG Intro 6 : Mécanismes possibles de l'ancrage de p94 sur les myofibrilles. En (A), P-p94 est recrutée sur les myofibrilles par augmentation de son affinité pour ces mêmes myofibrilles. En (B), p94 est recrutée et phosphorylée par une kinase, qui peut ou non augmenter l'affinité de la molécule pour les myofibrilles. Dans les deux cas, P-p94 dissociée est rapidement déphosphorylée par des phosphatases dans le cytosol, augmentant l'accumulation de P-p94 dans la fraction des myofibrilles.

- Une fonction non-protéolytique qui est indépendante de ses fonctions protéolytiques. La calpaïne-3 interagit avec des protéines localisées près du réticulum sarcoplasmique sans pour autant les protéolyser. Cette fonction permet la régulation du largage de calcium au niveau du réticulum sarcoplasmique. Ce double caractère pourrait expliquer le large panel de symptômes des personnes souffrant de LGMD2A (Ojima et al., 2011).
- Son rôle essentiel dans le remodelage des sarcomères après un exercice a été démontré. La calpaïne-3 s'active durant et immédiatement après l'exercice qui déclenche une transduction mécanique, son activité de protéase ayant encore été détectée jusqu'à six jours après l'exercice. De plus, une déficience en calpaïne-3 conduit à des sarcomères anormaux, une insuffisance de la capacité contractile du muscle et la mort des fibres musculaires (Duguez et al., 2006).

5. ACTIVITES PROTEOLYTIQUES ET NON-PROTEOLYTIQUES DE LA CALPAÏNE-3

i. FONCTIONS PROTEOLYTIQUES

A ce jour, les diverses fonctions protéolytiques de la calpaïne-3 n'ont pas encore été élucidées. Toutefois, des études menées *in vitro* ont pu mettre en évidence certains rôles de p94.

Nous pouvons citer ici qu'une étude a démontré que la calpaïne-3 avait un rôle dans le cycle cellulaire en inhibant l'expression de p53, ainsi que l'expression des gènes médiateurs par p53 (Tao et al., 2013).

Une autre étude a pu mettre en avant un rôle de la calpaïne-3 et sa localisation nucléaire possible comme étant liée au métabolisme des ARN, sachant que la transcription des ARN ribosomiques et la construction des ribosomes se réalisent à l'intérieur du noyau (Ono et al., 2013).

Pour finir, une autre étude remarquable réalisée *in vivo* a mis en évidence que p94 était colocalisée avec certains de ses substrats sur des sites variés le long du cytosquelette. La calpaïne-3 agirait comme un régulateur du cytosquelette musculaire en clivant ces protéines qui permettraient ainsi une réponse adaptative des cellules musculaires à un stimuli externe et/ou interne (Taveau et al., 2003)

ii. MOLECULES EN INTERACTION AVEC LA CALPAÏNE-3

Étant donné sa rapide autolyse et sa stabilité très faible en dehors d'une structure musculaire, la calpaïne-3 reste difficile à étudier au niveau de sa structure mais aussi de ses interactions avec ses partenaires et ses différents substrats. Beaucoup d'études sont donc menées *in vitro* afin d'identifier les potentiels partenaires de p94 et certaines études par mutation permettent d'en identifier malgré tout *in vivo*.

Ainsi, comme nous l'avons brièvement décrit auparavant, la calpaïne-3 est liée à la titine. La titine fut le premier partenaire identifié de p94. En effet, la titine possède au moins trois sites de liaison à p94 dont au moins un au niveau de sa région N2A, cette configuration inhibant l'autolyse rapide de la calpaïne-3 (Hayashi et al., 2008). De plus, *in vitro*, la calpaïne-3 pourrait cliver la titine au niveau de sa région M10 mais aussi au niveau extrême de la région C-terminale.

Toutefois, d'autres protéases peuvent effectuer ces clivages, comme la calpaïne-2, ce qui rend difficile d'en faire la preuve *in vivo* (Charton et al., 2015).

Au niveau de la ligne M, une protéine nommée myospryne (CMYA5) lie à la fois p94 et la région C-terminale de la titine. *In vitro*, cette protéine semble pouvoir être protéolysée par la calpaïne-3 et sa liaison à cette dernière diminuerait légèrement l'autolyse de la calpaïne-3.

Une diminution du taux de la calpaïne-3 a été rapportée dans les cas de patients souffrant de LGMD2B (dysferlinopathie), pathologie causée par des mutations du gène *DYSF* codant pour la dysferline¹⁸. De plus, des études biochimiques ont montré que p94 interagit directement avec la dysferline, ainsi qu'avec un partenaire de cette dernière, la desmoyokine¹⁹ (Huang et al., 2008).

La calpaïne-3 est capable d'hydrolyser la desmoyokine et ainsi réguler le complexe dysferline (Sarparanta et al., 2010).

D'autres études d'interactions protéomiques ont mis en évidence une molécule nommée PLEIAD, pour Platform Element for Inhibition of Autolytic Degradation of CAPN3, qui modère à la fois l'activité protéase et autolytique de la calpaïne-3. La localisation cellulaire de PLEIAD est surtout cytosolique mais parfois localisée au niveau des bandes I du sarcomère. De plus, la région N-terminale de PLEIAD interagit aussi avec un régulateur de transcription, CTPB1 (C-Terminal Binding Protein 1) qui est un bon substrat pour les calpaïnes, y compris la calpaïne-3.

¹⁸ Dysferline : protéine localisée dans la membrane de la fibre musculaire, impliquée dans le bon fonctionnement des cellules musculaires, et notamment dans des processus de réparation de la membrane de la cellule musculaire.

¹⁹ Desmoyokine : protéine géante ubiquitaire de 5890 résidus amino-acides. Elle se distribue au niveau de la membrane des cellules et participe à l'architecture de la membrane cellulaire en régulant l'organisation du réseau d'actine.

iii. FONCTIONS NON PROTEOLYTIQUES

Les fonctions non-protéolytiques de la calpaïne-3 sont totalement indépendantes de ses fonctions protéolytiques décrites ci-dessus. Ces fonctions non-protéolytiques ont été mises en évidence en comparant des souris knock-out pour le gène *Capn3* avec des souris contrôles.

Ainsi, une étude a démontré que la calpaïne-3 avait un rôle important dans le maintien des cellules musculaires matures. En effet, à partir de biopsie musculaire de souris déficientes en calpaïne-3, des modifications ultra-structurelles ont été observées. Les sarcomères étaient désorganisés et avaient une mauvaise incorporation de la MHC (myosin heavy chain) adulte ; les disques Z étaient immatures et la distribution de l' α -actinine était diffuse dans les myotubes. (Kramerova et al., 2004). Ces résultats indiquent donc que p94 est indispensable au maintien de l'architecture des sarcomères car son absence aboutit donc à des sarcomères anormaux qui pourraient causer une diminution de la force des fibres musculaires liée à un défaut de la contraction de ces fibres.

Une autre étude a mis en évidence que la calpaïne-3 était essentielle pour la localisation de l'aldolase A au niveau des triades, où ce complexe protéique interagit avec le récepteur ryanodine (RyR) dans le réticulum sarcoplasmique (RS) (Kramerova et al., 2008). Plus précisément, c'est le domaine IS2 de la calpaïne-3 qui interagit avec RyR, le réticulum sarco/endoplasmique Ca^{2+} -ATPase, la calsequestrine-1 et la triadine ; toutes localisées à proximité du RS (Ojima et al., 2011). Il est intéressant de noter que la calpaïne-3 ne protolyse pas ces protéines *in vitro*. De plus, il a été constaté chez les souris déficiente en calpaïne-3 que les myotubes présentaient une diminution de leur réponse à la caféine, un agoniste de RyR ; tandis que le largage de calcium depuis le RS des fibres musculaires étaient réduit alors que l'absorption de Ca^{2+} vers le RS n'est pas affecté. (Kramerova et al., 2008). En revanche, chez les souris exprimant le mutant inactif de la calpaïne-3 CAPN3:C129S, la localisation du RyR et l'aldolase A ainsi que les flux de calcium demeurent intactes (Ojima et al., 2011). Grâce à ces observations, nous pouvons affirmer que la calpaïne-3 possède une propriété structurale responsable de la régulation du largage du calcium du RS.

6. EFFETS DES MUTATIONS PATHOGENES SUR L'ACTIVITE DE LA CALPAÏNE-3

Nous savons que les mutations responsables de l'inactivation de la calpaïne-3 sont à l'origine de la dystrophie musculaire des ceintures de type 2A. Mais tous les mutants *CAPN3* associés à la LGMD2A ne perdent pas leur activité protéolytique. De ce fait, cinq états déficients de la calpaïne-3 ont été catégorisés, présentés ci-après (Ono et al., 2016).

i. MUTATIONS ENTRAINANT UNE INACTIVATION TOTALE

Les mutations qui vont affecter les acides aminés du domaine CysPc hautement conservés dans l'évolution sont les plus susceptibles d'inactiver la calpaïne-3. Cette inactivation permet de stabiliser la protéine quand elle est exprimée de manière ectopique dans des cellules en culture *in vitro*. En revanche, ce phénomène n'est pas toujours retrouvé *in vivo* car la calpaïne-3 V354G est perdue. Cela suggère donc l'existence d'une ou plusieurs protéases dégradant les mutants p94 qui sont présents dans le muscle squelettique mais pas dans des cellules non musculaires. Il s'avère que c'est aussi le cas pour certaines mutations retrouvées en dehors du domaine CysPc : par exemple, l'acide aminé D607 du domaine IS2 est très conservé du poisson à l'Homme et la mutation D607A atténue l'activité de la calpaïne-3. De

plus, des études de criblage par capture de p94 ont permis de détecter des mutants à l'activité atténuée comme I603T, F604L/S, V605A et D607N ; ainsi qu'une mutation proche S606L responsable de LGMD2A.

ii. MUTATIONS PERTURBANT L'ACTIVATION EXTRAMOLECULAIRE

Quelques mutations identifiées dans le domaine IS1, comme Y274A, sont responsables du défaut de coupure de ce domaine entraînant des désordres de l'activation extramoléculaire de la calpaïne-3. Par exemple, le domaine IS1 comporte une hélice α qui est interrompue par la mutation I.286P.

iii. MUTATIONS ACCELERANT L'AUTOLYSE

Lorsque l'autolyse de la calpaïne-3 est accélérée, celle-ci n'aura pas le temps d'accomplir ses fonctions. Ce sont certaines mutations affectant le domaine PEF qui vont être responsables de cette rapide autolyse, comme les mutations S744G et R769Q. En effet, certaines mutations responsables de calpaïnopathies ont été identifiées comme accélérant l'autolyse de la protéine : T417M, D419E, E435K, R490W et G496R.

Des études sur des souris *Capn3*-KO avec une expression transgénique de p94 ou de ces mutants ont démontrées que les mutations R448H et D705G se dégradent plus rapidement dans les extraits musculaires que les formes sauvages de p94, probablement due à leur incapacité à se lier à la titine (Ermolova et al., 2011).

iv. MUTATIONS PERTURBANT LA RECONNAISSANCE DU SUBSTRAT

Chez les calpaïnes conventionnelles, les domaines CBSW et PEF sont très importants pour la reconnaissance du substrat. Les acides aminés en position P3, P5 à P10 du domaine CBSW sont responsables de cette interaction avec les substrats, tandis que le domaine PEF aide à la reconnaissance des protéines liant la calmoduline (CaM-binding protéines) comme substrat. De ce fait, les mutations qui vont interrompre ou modifier la conformation de ces domaines vont compromettre la capacité propre de la calpaïne-3 à reconnaître ses substrats. Par exemple, nous pouvons citer les mutations R490W et R572Q qui peuvent à peine entraîner la protéolyse de la calpastatine ou le mutant p94:C129S inactif mais protéolysable qui est un bon substrat pour les calpaïnes-3 non mutées.

v. MUTATIONS INTERFERANT DANS LES FONCTIONS NON PROTEOLYTIQUES

Les études sur le modèle murin p94:C129S-KI ont montré que son phénotype se situait entre celui d'un modèle murin sauvage et du modèle murin *Capn3*-KO, menant à la reconnaissance de deux fonctions indépendantes de la calpaïne-3 : protéolytique et non-protéolytique. Par exemple, le mutant C129S n'a pas d'activité protéolytique mais ses fonctions non protéolytiques restent intactes. De plus, certaines mutations situées dans des régions non impliquées dans des fonctions protéolytiques peuvent compromettre les fonctions non-protéolytiques sans impact sur les premières. Nous pouvons citer la mutation A702V identifiée chez un patient homozygote ayant des fonctions et niveau d'expression normaux de la calpaïne-3.

7. MODELES MURINS

Il existe plusieurs modèles murins de calpaïnopathie :

- *Souris knock-out pour le gène Capn3 (Capn3-KO) ;*
- *Souris transgéniques exprimant un mutant inactif de la calpaïne-3, le mutant CAPN3:C129S-Tg où la cystéine 129, un des trois acides aminés de la triade formant le site actif de la protéine est remplacé par une sérine ;*
- *Souris transgéniques exprimant un variant d'épissage, le variant Capn3:Δex6-Tg et Capn3:Δex15-Tg où les exons 6 et 15 codant respectivement pour IS1 et IS2 ont été supprimés ;*
- *Souris transgéniques exprimant le mutant CAPN3:C129S au lieu de la forme sauvage de la calpaïne-3 (Capn3-knock in).*

Tous ces modèles présentent un phénotype de myopathie mais avec des atteintes de sévérité différentes, du plus bénin au plus sévère comme suit : CAPN3:C129S-Tg < CAPN3:C129SKI < *Capn3*-KO < *Capn3*:Δex15-Tg < *Capn3*:Δex6-Tg ; ce qui implique que la calpaïne-3 et ses variants d'épissage possèdent des fonctions complexes dans le muscle.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons décidé de travailler avec le modèle murin *Capn3*-KO qui a été parfaitement caractériser dans la littérature scientifique (Bartoli et al., 2006; Fougerousse et al., 2003a; Richard et al., 2000) et que nous avons pu obtenir dans le cadre d'une collaboration.

CHAPITRE 2 : ETUDE DE SUIVI
LONGITUDINAL POUR LA
DETERMINATION DE PHENOMENES
INFLAMMATOIRES DANS LES
MEMBRES INFERIEURS D'UN
MODELE MURIN DE
CALPAÏNOPATHIE

A. GENERALITES



Avant de vous présenter les données et les résultats qui seront décrits dans ce chapitre, je tenais à vous présenter d'une part, les principes fondamentaux de l'imagerie par résonance magnétique nucléaire, et d'autre part, quelques notions fondamentales en immunologie.

I. PRINCIPES DE L'IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE²⁰

1. DEFINITION ET HISTORIQUE

L'Imagerie à Résonance Magnétique nucléaire (**IRM**) est une technologie dont le phénomène physique a été conceptualisé en 1946 par Bloch et Purcell, prix Nobel de physique en 1952. Son utilisation s'est largement répandue chez les chimistes puis chez les biologistes. En constant développement depuis environ cinquante ans, les réelles prémices de l'IRM datent de 1973, mais c'est en 1979 que les premières images ont été réalisées chez l'Homme. De nos jours, et cela après quinze ans d'intenses évolutions, l'IRM a su se faire une place majeure dans le diagnostic médical et elle est encore appelée à évoluer de nos jours.

Ainsi, l'IRM est définie comme une méthode de diagnostic médical puissante avec laquelle on obtient des images tridimensionnelles et en coupe de grande précision anatomique. C'est une technique non invasive et sans effets secondaires connus, basée sur le phénomène physique de la **résonance magnétique nucléaire** (RMN) décrit ci-après.

2. MAGNETISME ET ATOME

Un atome est composé d'un noyau et d'un ou plusieurs électrons, particules chargées négativement qui gravitent autour de ce noyau. Le noyau lui-même est constitué de **protons**, particules chargées positivement, et de neutrons, particules neutres.

Les protons ont cette particularité de posséder leur propre champ magnétique avec un pôle sud et un pôle nord et de tourner autour de leur propre axe comme le fait la Terre. Ce dipôle magnétique s'exprime par une grandeur nommée **moment magnétique de spin μ** . En absence de champ magnétique, les moments magnétiques ne sont pas orientés (FIG Principe IRM1).

²⁰ Sources : http://chimie.sup.pagesperso-orange.fr/IRM.html#_ftn1 ; <http://www.cea.fr/comprendre/PublishingImages/Pages/sante-sciences-du-vivant/essentiel-sur-imagerie-medicale/irm-anat180413def.jpg> ; <http://www.arcagy.org/infocancer/en-savoir-plus/imagerie-medicale/l-imagerie-en-resonance-magnetique.html>

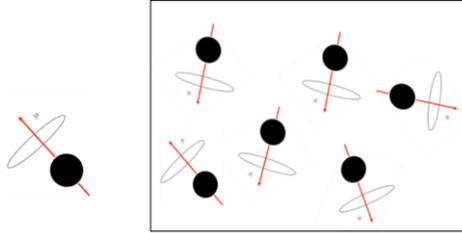


FIG. Principe IRM1 : Moment magnétique de spin μ et son orientation en l'absence de champ magnétique.

Le corps humain étant composé de 65% d'eau (soit 45L pour une personne de 70kg)²¹, le proton ^1H est naturellement abondant. Cette particule est très sensible à la RMN et l'IRM est une technique qui va permettre d'observer la RMN des protons de l'eau contenue dans les tissus, c'est-à-dire la réponse des noyaux soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique.

Dans un premier temps, les atomes d'hydrogène du corps humain (ou animal) vont être placés dans un **champ magnétique statique intense B_0** . Les moments magnétiques de spin μ vont alors prendre deux orientations correspondantes à deux états d'énergie différents en s'alignant avec B_0 . Les moments magnétiques associés à ces deux états d'énergie se mettent en mouvement et décrivent deux cônes de précession. C'est la somme de ces moments magnétiques qui donne une **aimantation mesurable**. (FIG Principe IRM2).

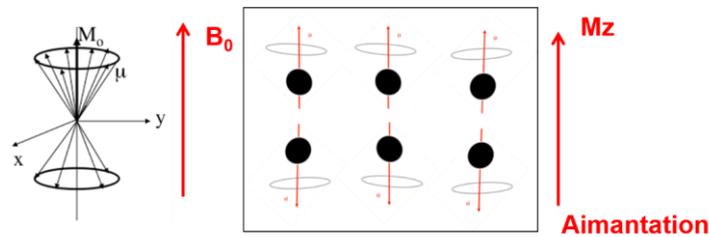


FIG. Principe IRM2 : Polarisation ou « alignement » des moments magnétiques de spin μ avec le champ magnétique B_0

3. RESONANCE ET SIGNAL

Dans un second temps, pour observer une résonance, un **champ magnétique radiofréquence (RF) B_1** d'intensité 10^6 fois plus faible que le champ magnétique B_0 est appliqué à l'aide d'une antenne excitatrice. Ce champ magnétique B_1 est perpendiculaire à B_0 , tournant autour de celui-ci à une vitesse angulaire variable. Ce nouveau champ magnétique RF va fournir une énergie suffisante pour que les noyaux passent de leur **état fondamental E_1** vers un **état excité E_2** .

²¹ <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/usages/eauOrga.html>

Au moment où la fréquence de rotation de B_1 est égale à la fréquence de précession de spin, il y a un phénomène de résonance entraînant le passage du spin vers un niveau d'énergie supérieur. On représente les protons alignés dans le champ magnétique par un vecteur de magnétisation M qui a deux composantes : la **magnétisation longitudinale** M_z et la **magnétisation transversale** M_{xy} (FIG Principe IRM3).

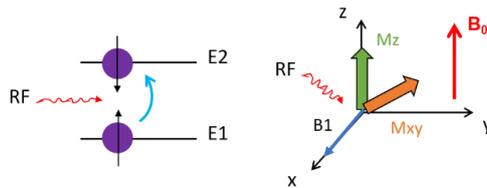


FIG Principe IRM3 : Excitation des protons de l'état fondamental E_1 vers l'état excité E_2 et représentation des protons alignés dans le champ magnétique par le vecteur de magnétisation M aux deux composantes M_z et M_{xy}

Après un temps déterminé lors du paramétrage de l'appareil IRM, le champ magnétique RF B_1 est interrompu. Le vecteur de magnétisation M va revenir à sa position initiale pour se retrouver colinéaire à l'axe z . Les deux composantes M_y et M_x vont se déphaser et tendre vers une valeur égale à 0, tandis que M_z va croître. La décroissance exponentielle M_y va induire un courant situé sur l'axe y . C'est ainsi que nous obtenons un signal qui va être amplifié et capté par une bobine de détection située dans l'antenne émettrice/réceptrice, appelé **signal de précession libre** ou plus communément, signal **Free Induction Decay (FID)**. Ce signal se présentant sous la forme de plusieurs sinusoïdes amorties en fonction du temps est rendu compréhensible en le transformant en signal fonction de la fréquence qui correspondra au spectre RMN final (FIG Principe IRM4).

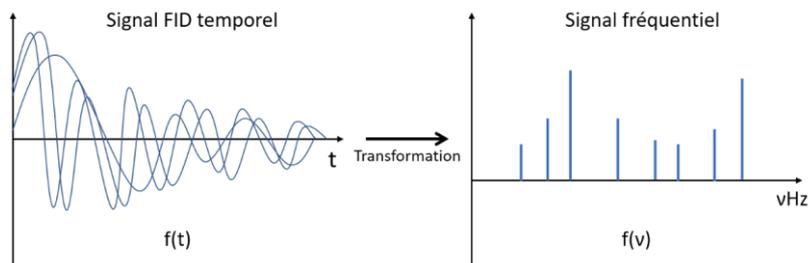


FIG Principe IRM4 : Signaux FID temporel et spectre RMN final fréquentiel

4. LES RELAXATIONS LONGITUDINALE ET TRANSVERSALE

iv. LA RELAXATION LONGITUDINALE

Nous venons de voir que le vecteur de magnétisation M est constitué de deux composantes vectorielles M_x et M_z . A l'état d'équilibre (état fondamental E1), la composante M_z est égale au vecteur M_0 (situé sur l'axe z). L'application du champ magnétique RF B_1 va exciter les protons qui vont se retrouver dans un état excité E2, entraînant le basculement de M_z qui sera égal à 0. Quand la stimulation par le champ magnétique RF B_1 est interrompue, la composante M_z revient à sa valeur de départ M_0 de façon exponentielle, qui s'écrit mathématiquement par la formule $M_z(t) = M_0 (1 - e^{-t/T_1})$.

Ce phénomène de basculement vers un retour à un équilibre du système après excitation est appelé **relaxation longitudinale**, ou encore la relaxation spin-réseau. Plus couramment, on la nomme **relaxation T1**. Du fait que le phénomène soit exponentiel, il a été déterminé que la constante T1 correspondrait au **temps nécessaire pour que les protons atteignent les deux tiers de leur aimantation** (FIG Principe IRM5).

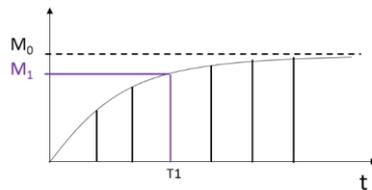
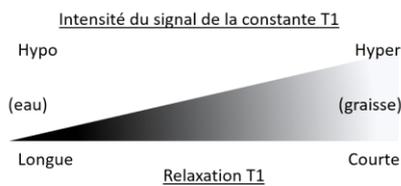


FIG Principe IRM5 : Mesure de la constante T1

Cette constante de relaxation T1 va dépendre de la mobilité des atomes d'hydrogène ou de celle des molécules dans lesquelles ils sont engagés, ainsi que de la densité de protons au sein du tissu. Les substances ayant naturellement un T1 court (soit un hypersignal en T1) sont celles qui contiennent une quantité importante de graisse ou de protéines. En revanche, l'eau libre ou l'eau extracellulaire possède une constante T1 longue (hyposignal) avec une valeur de 2500ms à 1,5 Tesla. D'autres valeurs de constante T1 pour certains tissus ou substances du corps humain sont présentées ci-dessous²² (FIG Principe IRM6).

²² « Interprétation du signal et du contraste en IRM », E. de Kerviler et A. Leroy-Willig.



Substances anatomiques	Valeur T1 (ms) à 1Tesla
Graisse	240
Muscle	730
Substance blanche	680
Substance grise	809

FIG Principe IRM6 : Hypo et hyper signal T1 et valeur T1 de certains tissus dans un champ magnétique de 1 Tesla.

iii. RELAXATION TRANSVERSALE

A contrario, nous avons vu qu'à l'état d'équilibre, la composante M_{xy} du vecteur de magnétisation M est égale à 0. Après apport d'énergie par le champ magnétique RF B_1 , la composante M_{xy} bascule pour s'aligner sur le vecteur M_0 . Quand la stimulation est interrompue, la composante M_{xy} va revenir à sa valeur de 0 de manière exponentielle, qui s'écrit mathématiquement par la formule $M_{xy}(t) = M_0 e^{-t/T_2}$.

Ce phénomène de décroissance de la composante transversale M_{xy} est appelée **relaxation transversale** ou relaxation spin-spin, mais plus couramment nommée **relaxation T2**. Cette relaxation T2 se fait généralement plus rapidement que la relaxation T1. Le phénomène étant exponentiel, il a été déterminé que **le signal T2 est égal à la valeur d'intensité qui aura atteint un tiers de la valeur initiale** (FIG Principe IRM 7).

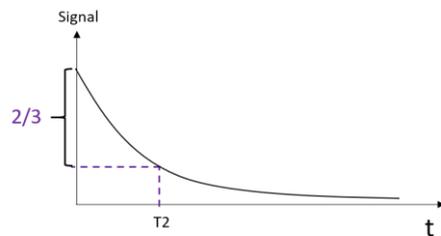
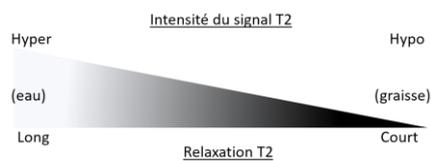


FIG Principe IRM 7 : Mesure de la valeur T2

Du fait que la relaxation T2 se fasse plus rapidement que la relaxation T1, sa valeur sera toujours inférieure à la constante de relaxation T1. La valeur T2 va elle aussi dépendre de la mobilité des atomes d'hydrogène des molécules dans lesquelles ils sont engagés, ainsi que de la densité des protons dans le tissu.

Les substances ayant naturellement un signal T2 long (hypersignal) sont l'eau libre et l'eau extracellulaire avec une valeur T2 de 150 ms³. Nous pouvons aussi citer les tissus et substances suivant leur valeur de T2 (FIG Principe IRM 8).



Substances anatomiques	Valeur T2 (ms) à 1Tesla
Graisse	84
Muscle	47
Substance blanche	92
Substance grise	101

FIG Principe IRM 8 : Hypo et hyper signal T2 et valeur T2 de certains tissus dans un champ magnétique de 1 Tesla

5. INTERPRÉTATION ET APPLICATIONS

L'interprétation des images IRM obtenues pourra se faire en utilisant les mêmes images **pondérées en T1 et/ou pondérées en T2** selon ce qui est recherché pour poser le diagnostic médical. Il est donc important de garder en tête que les temps de relaxation T1 et T2 des tissus vont dépendre de la mobilité des noyaux d'hydrogène composant le tissu dans lequel ils sont présents. Les temps de relaxation vont donc augmenter ou diminuer selon l'état d'hydratation de ces tissus.

Dans une revue de 2016, Carlier et collaborateurs ont fait l'état de l'utilisation de l'IRM en clinique, mais aussi en préclinique, comme indicateur de résultats dans le muscle squelettique (Carlier et al., 2016). Une étude similaire réalisée sur notre campus a montré l'utilité de la RMN en tant que biomarqueur (Fatehi et al., 2017). Ainsi, pour nos investigations en imagerie du petit animal, il a été intéressant de noter que les progrès de la technologie IRM et les études menées précédemment offrent des possibilités considérables pour la caractérisation de la composition du muscle squelettique, de ses fonctions et métabolisme. Actuellement, trois indicateurs de mesure en IRM sont fréquemment utilisés :

- *Évaluer la trophicité musculaire²³ en mesurant la surface et/ou le volume du muscle ;*
- *Évaluer l'ampleur des modifications dégénératives chroniques dans les muscles par le pourcentage du signal de la graisse infiltrée dans le muscle ;*
- *Estimer l'activité de la maladie avec le temps de relaxation T2 de l'eau du muscle comme un indice dans des pathologies connues pour être progressive.*

Commenté [BM1]: ?

En prenant en compte tous ces éléments, les bénéfices de l'imagerie quantitative en IRM pour les troubles musculaires sont multiples : une meilleure appréciation de la sévérité de la maladie, la possibilité de suivre l'évolution des modifications dans le temps et surtout, évaluer les réponses du muscle squelettique à un traitement thérapeutique.

Chez l'animal, les études ont identifié que le tissu musculaire des modèles animaux de dystrophie musculaire avait un signal T2 élevé : pour le modèle de souris *mdx*, la moyenne du signal T2 était significativement plus élevée que celui du groupe contrôle mais aussi un pic était atteint lorsque les souris *mdx* étaient âgées de 4 mois et 8 mois (Vohra

²³ Trophicité musculaire : ensemble des mécanismes et des processus qui participent à la nutrition et au développement complet et harmonieux du muscle.

et al., 2016). De plus, une autre étude ayant pour but de caractériser une inflammation aigue dans le muscle squelettique de souris a aussi montré une augmentation du signal T2 dans le muscle inflammé (Bryant et al., 2014).

Nous avons vu que la quantification du signal T2 de l'eau du muscle comme indicateur de l'activité d'une maladie s'avérait être une variable très pertinente, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal. Récemment, il a été montré que le signal T2 de l'eau du muscle était anormalement élevé chez des patients souffrant de la dystrophie de Duchenne mais pas chez des patients souffrants de la dystrophie de Becker (Wokke et al., 2016). De plus, en 2010, Lebel et Wilman ont proposé un modèle de signal multi-coupe multi-écho (en anglais, multi-slice multi-echo MSME) qui permet de préciser plus finement la relaxométrie T2, permettant ainsi de tirer avantage d'une large différence entre l'eau et la graisse en séparant les deux composantes (Lebel and Wilman, 2010). Ce que nous avons appliqué lors des sessions IRM sur notre modèle animal (voir Matériels et méthodes).

Pour conclure, les dystrophies musculaires présentent un mécanisme pathologique complexe qui résulte en une désorganisation progressive du tissu musculaire. Cette perte de la structure normale du muscle semble être reflétée par les anomalies de dispersion de l'intensité du signal RMN du muscle squelettique. Ainsi, le suivi longitudinal de notre modèle animal de LGMD2A par IRMN prend tout son sens pour suivre l'évolution de la pathologie, en utilisant les indicateurs cités plus haut nécessaires pour nos investigations.

II. NOTIONS FONDAMENTALES EN IMMUNOLOGIE²⁴

1. DEFINITIONS ET GENERALITES

i. HEMATOPOÏESE

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes qui permet de produire tout au long d'une vie des cellules spécialisées en quantité très importante pour assurer le renouvellement, d'une part des **cellules lymphoïdes** : lymphocytes, cellules Natural Killer (NK) et certaines sous-catégories de cellules dendritiques ; et d'autre part, les **cellules myéloïdes** : érythrocytes, mastocytes (production de plaquettes sanguines), polynucléaires et monocytes, ainsi qu'une sous-catégorie de cellules dendritiques.

²⁴ Sources : « Immunologie », J. Kuby, 7ème édition 2014, Editions Dunod. « Hématologie », Société française d'hématologie, 2ème édition, 2014, Editions Elsevier Masson.

A l'origine de tous ces éléments figurés du sang se trouvent les **cellules souches hématopoïétiques (CSH)** qui assurent deux fonctions : leur autorenewement et la production des **cellules myéloïdes progénitrices (CMP)** et des **cellules lymphoïdes progénitrices (CLP)**. La cascade hématopoïétique comprend trois compartiments : les **progéniteurs hématopoïétiques**, les **précurseurs** et les **cellules différenciées**. Ces différentes cellules vont exprimer à leur surface des antigènes et/ou des récepteurs qui sont spécifiques de leur stade de différenciation, de maturation et d'activation (FIG Principe IMM 1).

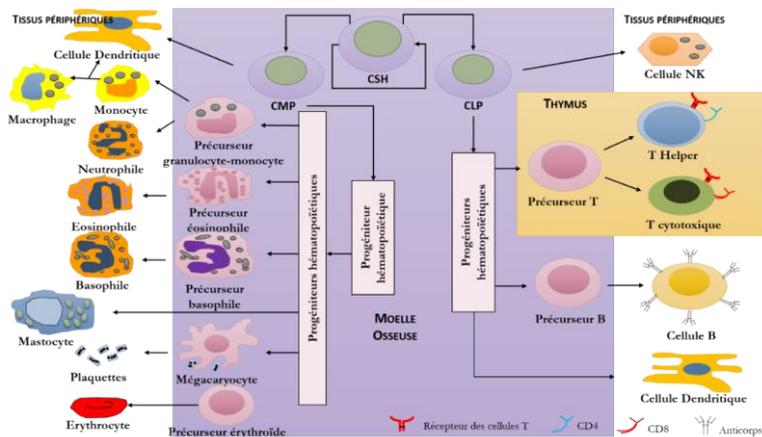


FIG Principe IMM 1 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse (modifié d'après « Immunologie », J. Kuby)

Les CSH sont une sous-population très minoritaire de progéniteurs immatures multipotents capables de reconstituer à long terme une hématopoïèse complète (lymphoïde et myéloïde) et sont peu sujettes à la mitose, étant majoritairement dans un état quiescent.

Les **progéniteurs hématopoïétiques** expriment à leur surface la sialomucine CD34 et représentent 1% des cellules mononuclées médullaires. L'absence de CD38 caractérise la fraction des progéniteurs les plus immatures (**cellules CD34+ CD38-**). Les progéniteurs ne sont pas identifiables morphologiquement et leur quantification nécessite des techniques spécialisées de culture cellulaire, dont les caractéristiques morphologiques des colonies obtenues *in vitro* à partir de ces progéniteurs vont permettre de les caractériser.

Au terme de leur différenciation, les précurseurs deviennent des cellules matures spécialisées qui quittent le compartiment médullaire et rejoignent la circulation sanguine et les tissus périphériques.

La production médullaire est très finement régulée pour permettre une adaptation de chaque lignée en fonction de ses besoins propres. Cette régulation très complexe fait intervenir principalement des facteurs cellulaires (interaction avec les cellules stromales) et moléculaires (facteurs de croissance hématopoïétiques).

ii. L'IMMUNITÉ

Généralement, l'**immunité** est définie comme **l'état de protection d'un organisme contre d'autres organismes ou substances étrangères**, nommés des antigènes. En biologie, l'immunité fait référence à une notion d'état d'équilibre : posséder toutes les défenses biologiques adéquates pour lutter contre une infection, une maladie ou autre invasion biologique indésirable, tout en maintenant une tolérance adéquate pour éviter l'allergie ou la maladie auto-immune.

Nous pouvons distinguer **deux types d'immunité** selon les agents de défense immunitaire engagés pour lutter contre les 4 catégories de pathogènes référencés (virus, champignons, parasites et bactéries) :

- L'immunité cellulaire (aussi appelée **réponse immune Th1**) dont les agents majeurs de défense immunitaire sont les lymphocytes spécifiques d'antigènes et les cellules capables d'induire la réponse Th1 afin d'éradiquer les pathogènes (FIG Principe IMM 3).

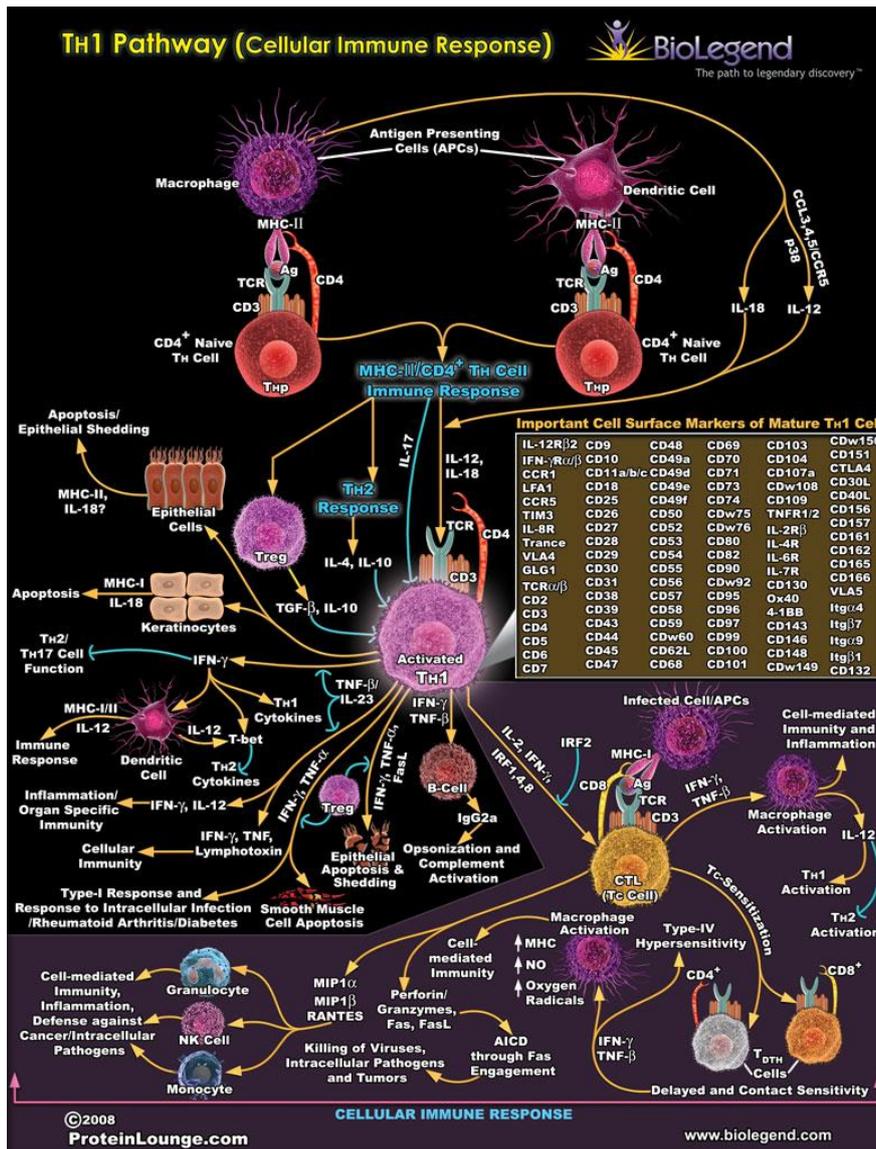
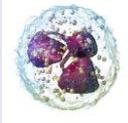


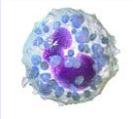
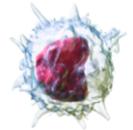
FIG Principe IMM 3: Schéma de la réponse immunitaire cellulaire (réponse Th1), BioLegend

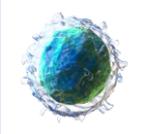
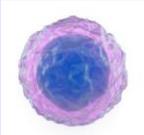
Pour finir, afin de lutter contre les maladies auto-immunes, le processus de tolérance du soi a pour rôle d'éviter le système immunitaire de détruire les propres tissus de l'hôte.

2. LES LEUCOCYTES ET LEUR ROLE DANS L'IMMUNITE

La sous-population hématopoïétique qui nous intéresse ici sont les **leucocytes**, appelés vulgairement « globules blancs ». Ce sont les cellules nucléées du sang qui jouent un **rôle essentiel dans l'immunité**. Morphologiquement, on distingue les **granulocytes (ou polynucléaires)** sur les caractéristiques de leur noyau (bi- ou pluri-segmenté) et de leur cytoplasme contenant de nombreuses granulations ; et les **cellules dites mononuclées** (monocytes et lymphocytes) dont le noyau est arrondi ou peu segmenté. **Tous les leucocytes expriment** l'antigène de surface **CD45 (cellules CD45+)** et sont divisés en plusieurs sous-populations selon leur différenciation caractérisée par les antigènes et/ou récepteurs de surface qu'ils vont exprimer lors de ces différents stades jusqu'à leur maturation (Tableau Principe IMM 1).

	MORPHOLOGIE - PARTICULARITES	IMMUNITE – ROLE ET CARACTERISTIQUES
<p>Polynucléaires neutrophiles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Diamètre 12-15µm. • Noyau polylobé (2 à 5 segments). • Cytoplasme à fines granulations : granules primaires azurophiles et granules secondaires neutrophiles. • 50.10⁹ cellules fabriquées/jour chez l'Homme. • Durée de vie : 24h dans le sang. 	<ul style="list-style-type: none"> • Fonction essentielle de défense antibactérienne. • Combattre les infections après pénétration dans les tissus et requérant des propriétés de mobilité par chimiotactisme, de phagocytose, de bactéricidie et de digestion. • Ne survivent pas après phagocytose.
<p>Polynucléaires éosinophiles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Diamètre 12-14µm. • Noyau bi- ou trilobé. • Cytoplasme rempli de grosses granulations possédant une structure cristalline interne (un seul type de granules). • Expression de protéines contenues dans les granulations : Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Peroxidase (EPX), Eosinophil Cationic Protein (ECP), Eosinophile-Derived Neurotoxin (EDN). 	<ul style="list-style-type: none"> • Migration vers les tissus cibles sous influence de facteurs chimiotactiques spécifiques (éotaxines) ou non spécifiques (leucotriènes, C5a, C3a, cytokines). • Fonction principale de phagocytose des œufs de parasites (helminthes) et neutralisation des réactions d'hypersensibilité immédiate (allergie) par libération d'histaminase. • Libérer plusieurs types de médiateurs inflammatoires altérant les cellules endothéliales, augmentant la perméabilité vasculaire et de

	<ul style="list-style-type: none"> • Trois cytokines essentielles à l'éosinophilopoïèse : l'Interleukine-5 (IL5), l'Interleukine-3 (IL3) et le GM-CSF. 	contractions des fibres musculaires lisses.
<p>Polynucléaires basophiles</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Diamètre 12µm. • Noyau généralement bilobé. • Nombreuses granulations basophiles abondantes et volumineuses. • Granules contenant des médiateurs de l'inflammation (dont histamine et 5-hydroxytryptamine). • Production intramédullaire contrôlée par IL3 et GM-CSF. • Le SCF a un rôle clé pour la différenciation, prolifération, activation et survie des basophiles tissulaires. 	<ul style="list-style-type: none"> • Expression des récepteurs pour les fragments Fc des IgE et des IgG. • Rôle important dans les réactions inflammatoires locales et hypersensibilité immédiate. • Dégranulation provoquée par le contact des IgE présentes sur leur membrane avec des allergènes, libérant histamine, 5-hydroxytryptamine, mais aussi IL5 attirant les éosinophiles.
<p>Monocytes</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Diamètre 15-40µm. • Noyau encoché non polylobé. • Cytoplasme dit « gris ciel d'orage » contenant fines granulations azurophiles. • Circulent dans le sang avant de pénétrer les tissus pour devenir des macrophages ou cellules dendritiques. 	<ul style="list-style-type: none"> • Macrophages capables de phagocytose, capables d'y survivre. • Cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, surtout au niveau des organes lymphoïdes et sont à la phase initiale de la réponse immunitaire. Elles sécrètent de nombreuses cytokines impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire • Monocytes capables d'éliminer les bactéries par phagocytose grâce à des granulations lysosomales.
<p>Lymphocytes</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Morphologie quelque peu variable : petites cellules avec noyau arrondi et quantité variable de cytoplasme avec parfois quelques granules azurophiles. • Distinction cellules B et cellules T par leur immunophénotype car phénotype proche. 	<ul style="list-style-type: none"> • Eléments essentiels de l'immunité. • Lymphocytes T et B matures « naïfs » (aucun contact avec un antigène) quittent la moelle osseuse pour circuler dans le sang à la recherche d'antigène : développer la réponse immune appropriée à l'antigène en cause.

<p>Cellules B</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Prolifération des CLP à l'origine des lymphocytes B et T selon différents stades de différenciations caractérisés par expression d'antigènes spécifiques. • <u>Lymphopoïèse B</u> dans la moelle osseuse : cellules pro-B (CD34+ CD19+ CD10+) → pré-B (CD19+ CD10+, chaîne μ intracytoplasmique) → cellules B immatures (CD19+ CD20+ avec IgM de surface) → cellules B matures (CD19+ CD20+ avec IgM et IgD de surface). 	<ul style="list-style-type: none"> • 10% de lymphocytes B « naïfs » circulant. • Contact des lymphocytes B naïfs avec un antigène : phase de prolifération avec modification d'expression des gènes d'Ig puis maturation, soit sous forme de lymphocytes mémoire (réponse plus rapide à une nouvelle stimulation), soit sous forme de cellules préplasmocytaires qui migrent dans la moelle osseuse et se différencient en plasmocytes (sécrétion des Ig spécifiques de l'antigène en cause, avec des caractéristiques adaptées à cet antigène : IgG opsonisantes pour la lutte antibactérienne, IgA sécrétoires, IgE pour la lutte antiparasitaire ou l'allergie, etc.)
<p>Cellules T</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • <u>Lymphopoïèse T</u> dans le thymus : prothymocytes (CD2+ CD7+ CD4- CD8-) → thymocytes corticaux (CD4+ CD8+) et thymocytes médullaires (CD3+ CD4+ CD8- ou CD3+ CD4- CD8+). Toutes ces cellules expriment le récepteur T (TCR) dont il existe 2 variétés : une majoritaire, $T\alpha\beta$, et l'autre minoritaire, $T\gamma\delta$. Les lymphocytes $T\alpha\beta$ comprennent lymphocytes CD3+ CD4- CD8+ et CD3+ CD4+ CD8-. 	<ul style="list-style-type: none"> • 70-80% de lymphocytes T circulants. • Les lymphocytes CD3+ CD4- CD8+ reconnaissent les antigènes associés aux molécules HLA de classe I. • Les lymphocytes CD3+ CD4+ CD8- reconnaissent les antigènes associés aux molécules HLA de classe II. • Rôle majeur des lymphocytes T dans la modulation de la réponse immunitaire. Les TCD4+ coopèrent avec les cellules B pour la synthèse d'anticorps, tandis que les TCD8+ sont cytotoxiques.

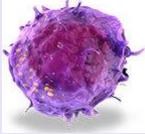
<p style="text-align: center;">Natural Killer</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Environ 10% de grands lymphocytes NK (Natural Killer) avec granulations azurophiles présents dans le sang. • Les NK sont CD3- CD16+ CD56+. 	<ul style="list-style-type: none"> • Implication des NK dans l'élimination des cellules étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable.
--	---	--

TABLEAU Principe IMM 1 : Description des différentes sous-populations leucocytaires présentes dans l'organisme.

3. REPONSE IMMUNITAIRE INNEE ET REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE

Nous avons pu voir dans le tableau ci-dessus que les leucocytes étaient impliqués soit dans une réponse rapide de l'immunité par l'intermédiaire des granulocytes, NK et certaines catégories de cellules B et T avec majoritairement un phénomène de phagocytose ; soit dans une réponse extrêmement adaptée à un antigène déjà connu par l'intermédiaire d'autres catégories de cellules B et T avec libération d'anticorps. L'organisme des vertébrés est donc capable de « répondre rapidement » ou bien de « s'adapter » à une agression extérieure par **deux types de réponses immunitaires interconnectées** entre elles mais aussi avec les immunités humorale et cellulaire : la **réponse immunitaire innée** et la **réponse immunitaire adaptative**, détaillées dans le tableau ci-dessous (TABLEAU Principe IMM 2).

REPONSE IMMUNITAIRE INNEE	REPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE
Prévenir les infections ou éliminer rapidement les envahisseurs courants.	Lutter plus efficacement et spécifiquement à des « petites » différences moléculaires de pathogènes.
Réponse en quelques minutes à plusieurs heures.	Réponse dans les 5 à 6 jours.
Réponse identique à des infections répétées.	Réponse plus rapide et efficace à chaque nouvelle exposition (cellules mémoires).
Spécificité limitée et fixée.	Spécificité élevée, s'adaptant sans cesse lors du déroulement de la réponse.
<p>Composants majeurs :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Barrières physiques et chimiques (ex. peau) ; • Cellules myéloïdes (granulocytes, macrophages et cellules dendritiques) ; <ul style="list-style-type: none"> • Phagocytose ; • Molécules de reconnaissance de motifs ; <ul style="list-style-type: none"> • Système du complément. 	<p>Composants majeurs :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cellules lymphoïdes (lymphocytes T et B) ; <ul style="list-style-type: none"> • Récepteurs spécifiques ; <ul style="list-style-type: none"> • Anticorps.
Aide à diriger le développement de la réponse adaptative.	Seconde ligne de défense plus exhaustive, informée par les luttes engagées par le système innée.

Tableau Principe IMM 2 : Distinction entre réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative

Du fait de leur interconnexion, la **communication** entre réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative est très importante et se réalise **par contacts cellulaires** et **par messagers solubles** (abordés dans le TABLEAU Principe IMM 1) : les **cytokines** qui sont des facteurs de croissance, les **chimiokines** et d'**autres facteurs solubles** produits par les cellules immunitaires elles-mêmes. Cette communication va permettre le recrutement des cellules sur le site de l'infection et/ou de leur donner des instructions précises via des protéines solubles importantes. Ainsi, l'éradication du pathogène se fera depuis l'intérieur du site infectieux.

Les cellules qui ont un rôle central pour la communication entre les deux réponses sont les **cellules présentatrices d'antigènes (CPA)** professionnelles myéloïdes (FIG Principe IMM 4).

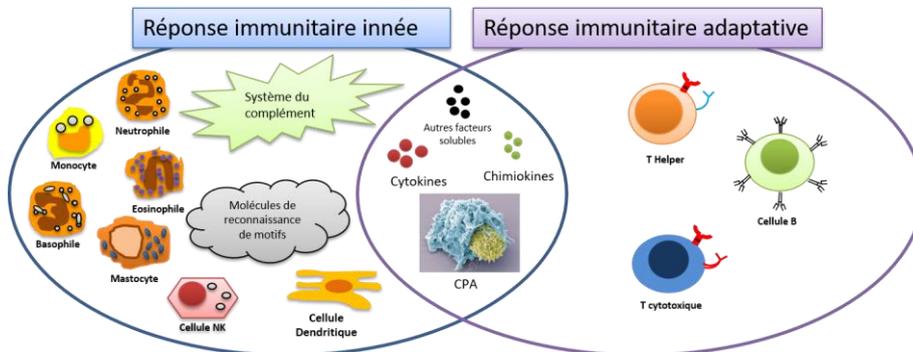


FIG Principe IMM 4 : Schématisation de la communication entre réponse immunitaire innée et réponse immunitaire adaptative et les cellules/agents immunitaires engagés

4. LE RESEAU IMMUNOLOGIQUE

Comme décrit dans les paragraphes précédents, le réseau immunologique est très complexe du fait des nombreuses types de réponses immunitaires (Th1, Th2, innée et adaptative et d'autres non citées), nous ne pourrions rentrer dans tous les détails. Nous vous invitons donc à consulter les annexes 3 et 4 représentant le réseau immunologique dans son ensemble (Annexe 3) et un schéma récapitulatif du réseau des cytokines avec leurs cellules cibles (Annexe 4) afin de vous aider dans la compréhension des choix effectués pour nos investigations immunologiques (leucocytes ciblés et cytokines/chimiokines analysées en qPCR).

5. L'IMMUNITÉ CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS

Toutes les explications apportées jusqu'à présent concernent l'Homme mais notre modèle de recherche est le modèle murin. Il est important de connaître les différences immunologiques entre la souris et l'Homme avant de réaliser des investigations poussées en immunologie et de les prendre en compte. Globalement, le système immunitaire de la souris est équivalent à celui de l'Homme mais quelques différences existent, notamment la numération de la formule sanguine variant quelque peu entre Homme et souris ; les lymphocytes étant plus majoritairement présents chez cette dernière (TABLEAU Principe IMM 3).

	HOMME	SOURIS C57BL/6 (M)/(F)
Erythrocytes (10⁶/μL)	5,0	9,48 / 9,24
Plaquettes (10⁵/μL)	2,5	13,5 / 11,6
Leucocytes (10³/μL)	7,3	8,90 / 8,44
Neutrophiles	3,7 – 5,1 (50% – 70%)	0,53 – 3,09 / 0,42 – 2,55 (7,3% - 28,6%) / (7,4% - 22,7%)
Lymphocytes	1,5 – 3,0 (20% - 40%)	3,2 – 11,2 / 2,9 – 10,9 (61,3% - 87,2% / (70,2% - 87,8%))
Monocytes	1 – 4,4 (1% – 6%)	0,2 – 0,9 / 0,2 – 0,7 (2,2% - 11,0%) / (2,2% - 7,1%)
Eosinophiles	1 – 2,2 (1% - 3%)	0,01 – 0,42 / 0,01 – 0,5 (0,1% - 4,4%) / (0,2% - 4,5%)
Basophiles	< 0,13 < 1%	0,03 / 0,03 (0,38%) / (0,38%)

TABLEAU Principe IMM 3 : Numération de la formule sanguine chez l'Homme et la souris C57BL/6

Nous intéressent principalement aux éosinophiles dans ce projet de recherche, nous nous sommes particulièrement attachés aux différences existantes entre l'Homme et la souris concernant cette sous-population leucocytaire, et à leurs potentiels impacts sur nos investigations. Malgré quelques différences minimes rapportées dans diverses études, les nombreuses et importantes similitudes entre les éosinophiles humain et murin permettent d'obtenir des éclaircissements importants quant à leur rôle dans la santé et les maladies, et ainsi démontrer l'utilité des études sur le modèle murin avec une possible extrapolation valable à la compréhension et au traitement de patients (Lee et al., 2012). Et en considérant notre objectif d'avoir une première vision globale de la cinétique des leucocytes dans notre modèle murin de la calpainopathie, nous pouvons considérer que ces différences n'impacteront pas les données et résultats obtenus.

B. HYPOTHESE DE TRAVAIL

Pour rappel de certains éléments clés abordés dans le chapitre 1 de ce mémoire, il est important de retenir ici que la calpaïnopathie est la plus commune des dystrophies musculaires des ceintures à transmission autosomique récessive, causée par des anomalies dans le gène *CAPN3* qui code pour la calpaïne-3, une protéine spécifiquement exprimée dans le muscle squelettique.

Le diagnostic de cette pathologie est basé sur des manifestations cliniques telles qu'une atrophie symétrique des muscles de la région pelvienne et scapulaire, une dégénérescence progressive de ces mêmes muscles occasionnant une diminution de la force musculaire, une augmentation de la concentration sérique de créatine kinase et un aspect de nécrose-régénération des fibres musculaires observées sur des biopsies de muscles. De plus, nous avons pu signaler que des phénomènes inflammatoires, myosites à éosinophiles (ME) et infiltration de macrophages, avaient été rapportées chez des cas de patients souffrant de calpaïnopathie.

La ME constitue une entité pathologique rare caractérisée par une infiltration d'éosinophiles dans le muscle squelettique. Elle est parfois associée à une hyperéosinophilie du sang périphérique ou de la moelle osseuse. Son diagnostic est basé sur une analyse histologique pour observer l'aspect des fibres musculaires : noyaux centraux et infiltration d'éosinophiles en sont les caractéristiques principales. Habituellement, la ME est associée à des infections parasitaires, des désordres systémiques ou la prise de certains médicaments ou de L-tryptophane. Mais l'exclusion de toutes ces causes définit le spectre de la ME idiopathique (Selva-O'Callaghan et al., 2014).

En 2006, de précédents travaux au sein de l'unité ont rapporté pour la première fois des ME idiopathiques causées par des mutations du gène *CAPN3* chez six patients enfants et adultes, sans aucun lien de parenté (Krahn et al., 2006). Ce lien entre des mutations de *CAPN3* et la ME a été confirmé par une étude rétrospective incluant cinq nouveaux cas pédiatriques et adultes sans lien de parenté. Ces découvertes ont suggéré que l'infiltration à éosinophiles est un stade « précoce » de la calpaïnopathie (Krahn et al., 2006, 2011). Par ailleurs, d'autres leucocytes jouent un rôle clé lors du phénomène d'infiltration à éosinophiles comme les lymphocytes-T et les macrophages, composants majeurs des lésions inflammatoires proches des fibres musculaires (Brown and Amato, 2006). Il est intéressant de noter que deux autres cas de ME causées par des mutations génétiques ont été rapportés : en 2009, le premier cas était lié à une mutation homozygote du gène codant pour le γ -sarcoglycane (Baumeister et al., 2009) et en 2015, le second cas rapporté était celui d'un patient souffrant de dystrophie myotonique de type 2 (Meyer et al., 2015).

Et récemment, le diagnostic d'un patient LGMD2A avec une myosite riche en macrophages a été rapporté, suggérant une évolution du phénotype inflammatoire (Schutz et al., 2017).

En prenant ensemble toutes ces observations et données, nous pouvons suggérer que la ME et le phénotype inflammatoire sont des stades présymptomatiques de LGMD2A, apparaissant à la petite enfance et disparaissant à l'âge adulte. En plus de cela, ce phénomène inflammatoire peut causer des dommages aux fibres musculaires parce que les éosinophiles sont connus pour larguer des granules cristalloïdes et des vésicules sécrétrices contenant plusieurs médiateurs avec des effets toxiques (Davoine and Lacy, 2014). Il est donc possible que cet environnement délétère jouerait un rôle dans le phénomène de nécrose-régénération des fibres musculaires chez les patients LGMD2A.

Nous estimons dès lors qu'apporter un traitement thérapeutique durant cette phase présymptomatique inhiberait et/ou diminuerait le phénotype inflammatoire des muscles des patients souffrant de calpaïnopathie, l'évolution de la maladie pourrait ainsi être ralentie et la sévérité des symptômes pourrait être réduite. Mais, dans un premier temps, nous avons besoin de déterminer si le modèle murin déficient en calpaïne-3 est un modèle pertinent pour étudier les mêmes désordres inflammatoires dans les muscles avant d'évaluer cette hypothèse dans une large étude préclinique.

Dans le cadre de mes travaux de thèse et de cette étude, nous avons suivi l'évolution du stade présymptomatique de la calpaïnopathie chez des souris déficientes en calpaïne-3. En effet, des observations concernant des infiltrations de cellules inflammatoires ont été rapportées chez des modèles murins avec des mutations du gène *Capn3* (Bartoli et al., 2006; Kramerova et al., 2004). D'une part, nous avons conçu une étude de suivi longitudinal utilisant l'imagerie par résonance magnétique nucléaire afin d'observer les muscles des membres inférieurs de deux groupes de souris (contrôle et *Capn3*-knock out) à différents âges (2, 4, 6 et 8,5 mois). Nous avons vu que l'IRM est un outil très sensible pour révéler de probables modifications de la structure musculaire et l'apparition ou non d'infiltration inflammatoire.

D'autre part, nous avons voulu déterminer si les troubles immunologiques apparaissent durant ce stade présymptomatique dans les muscles quadriceps et psoas, ainsi que dans le sang, de ces mêmes modèles de souris aux mêmes âges. Pour se faire, nous avons décidé de réaliser une analyse en cytométrie en flux à chaque temps de mesure après extraction et isolation des leucocytes à partir des muscles. Pour compléter notre exploration, nous voulions savoir si des modifications d'expression des cytokines et/ou chimiokines inflammatoires pouvaient être observées dans ces mêmes muscles de souris âgés de 2 mois et 8,5 mois.

C. RESULTATS

Dans les paragraphes qui vont suivre, je vais exposer les résultats obtenus à la suite de nos investigations histologiques et en imagerie du petit animal. Notre choix s'est porté sur ces deux méthodes, car d'une part, elles sont complémentaires et d'autre part, la première (histologie) peut permettre de visualiser des cellules inflammatoires, en particulier les éosinophiles, au sein d'un tissu grâce à une coloration May-Grünwald Giemsa (MGG), très utilisée en routine et diagnostic de pathologies à éosinophiles ; et la seconde (imagerie du petit animal), permet de visualiser des désordres anatomiques à l'échelle macro- voir microscopiques selon la sensibilité de la technique d'imagerie choisie. Ici, nous avons opté pour l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) permettant de visualiser des phénomènes inflammatoires ou modifications anatomiques minimes grâce à sa grande sensibilité, et étant non invasive et sans effets secondaires, elle nous a permis de réaliser une étude longitudinale sur les mêmes animaux. De plus, nous avons eu la possibilité de réaliser les sessions d'IRM dans un scanner 7 Tesla équipé d'une crysonde qui multiplie la sensibilité par 2,5 et permet d'effectuer une IRM pour des pathologies avec des lésions microscopiques.

I. OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES ET ANALYSES PAR IMAGERIE A RESONNANCE MAGNETIQUE

1. ABSENCE D'INFILTRATION D'EOSINOPHILES OU DE CELLULES INFLAMMATOIRES DANS LES MUSCLES DES SOURIS DEFICIENTE EN CALPAÏNE-3

Tout d'abord, nous avons procédé à des observations histologiques des muscles psoas. Nous les avons prélevés sur les souris contrôle et les souris *Capn3*-knock out âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois. Ensuite, des cryosections transversales de ces muscles ont été réalisées et colorées par la méthode MGG. Puis, les images des coupes ont été obtenues grâce à un scanner de lames. Après quoi, nous avons balayé les images à la recherche de cellules inflammatoires et/ou d'éosinophiles pour les deux groupes de souris à chaque temps de mesure. Finalement, aucune infiltration visible de cellules inflammatoires ou bien d'éosinophiles entre les myofibres n'a été constatée pour le groupe des souris *Capn3*-knock out, comparé au contrôle comme le montre les images représentatives de la figure FIG RESULTATS Histo

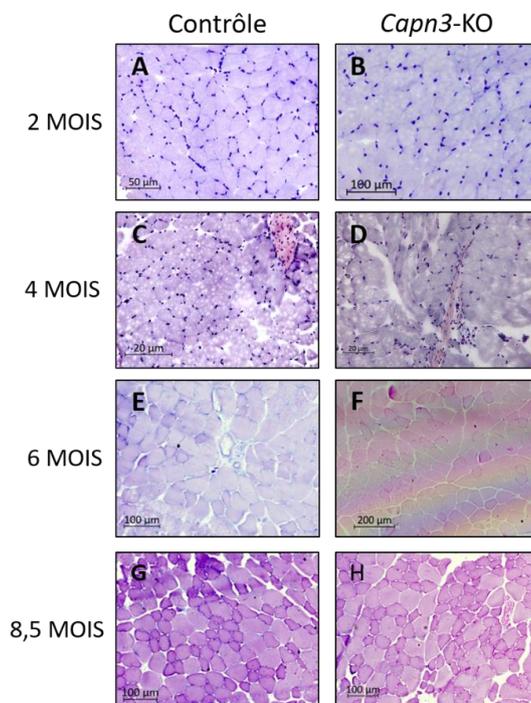


FIG RESULTATS Histo : Coupes histologiques représentatives colorées en MGG de muscle posas de souris contrôle (A, C, E et G) et de souris *Capn3*-knock out (B, D, F et H) âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois.

En parallèle, grâce à une collaboration avec le docteur Benoit GIANNESINI au CRMBM (Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale) nous avons mené une étude exploratoire longitudinale *in vivo* grâce à l'imagerie du petit animal, plus spécifiquement en faisant appel à l'IRM. Cette étude longitudinale a été réalisée sur les deux mêmes groupes : un groupe contrôle de 12 souris C57BL/6 et un groupe pathologique de 12 souris déficientes en calpaïne-3. Le suivi a été réalisé entre 2 mois et 8,5 mois d'âge et les sessions d'IRM ont été menées lorsque les souris étaient âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois.

2. L'ETUDE LONGITUDINALE PAR IRM N'A PAS MIS EN EVIDENCE DE PHENOMENE INFLAMMATOIRE

Après les différentes sessions d'IRM réalisées à 2, 4, 6 et 8,5 mois d'âge, nous avons obtenu des images brutes en signal T2 issues des régions supérieure, médiane et inférieure des membres inférieurs (au-dessus et en-dessous du genou) des souris contrôle et des souris *Capn3*-knock out. Ci-après, nous vous présentons une illustration des images

en signal T2 obtenues pour chaque temps de mesure, chaque groupe et chaque positionnement de la coupe transversale en ne sélectionnant qu'un animal par point (FIG RESULTATS IRM 1).

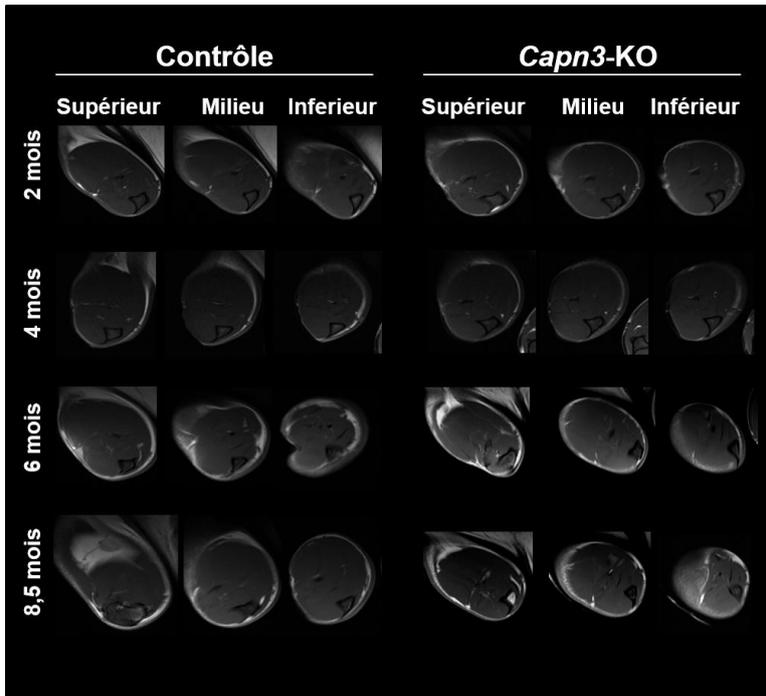


FIG RESULTATS IRM 1 : Images IRM brutes représentatives en signal T2 des membres inférieurs aux niveaux supérieur, milieu et inférieur de la région cuisse/genou/mollet de souris contrôle et *Capn3*-knock out âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois.

Avant de pouvoir exploiter nos données en IRM, chaque lot d'images brutes en signal T2 a été traité informatiquement pour obtenir des images pondérées en T2. Pour se faire, nous avons délimité manuellement les régions anatomiques d'intérêt sur ces coupes axiales de muscle, ce qu'on appelle la **segmentation**, avant de procéder au traitement informatique. Nous avons donc « segmenté » les muscles comme suit : muscle entier (ME), compartiment musculaire antérieur (CMA) (incluant le tibialis antérieur, l'extensor digitorum longus, le flexor hallucis et le flexor digitorum), le tibia (T) et la graisse sous-cutanée (GSC). Vous pouvez voir une illustration de cette procédure dans la figure FIG RESULTATS IRM 2 ci-après.

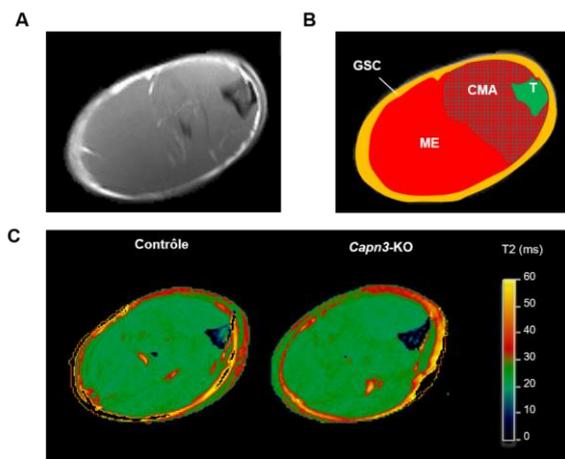


FIG RESULTATS IRM 2 : Illustration de la segmentation (B) à partir de l'image IRM pondérée en T2 d'une coupe axiale brute obtenue à 8,5 mois d'âge (A) et de l'obtention des cartes T2 calculées après traitement informatique en niveau d'intensité de signal T2 (C) d'une souris contrôlée et d'une souris *Capn3*-knock out.

Après avoir réalisé les segmentations et le traitement de ces images segmentées, nous avons obtenu des cartes en niveau d'intensité de signal T2 que nous avons exploitées. *De visu*, nous n'avons pas observé de différence anatomique entre nos deux groupes de souris. D'où l'importance de réaliser des analyses informatiques plus précises sur ces images dans le but de comparer l'évolution de ces valeurs du signal T2 des régions d'intérêt sélectionnées.

A la suite d'une analyse informatique réalisée sur les zones d'intérêt à l'aide d'un script conçu pour ce projet par Arnaud LETROTIER, nous avons obtenu les valeurs T2 des zones d'intérêt délimitées auparavant pixel par pixel et avons réalisé des analyses statistiques sur deux régions qui nous intéressaient plus particulièrement : le muscle entier (ME) et le compartiment musculaire antérieur (CMA). Les résultats obtenus sont présentés dans la figure FIG RESULTATS IRM 3 ci-dessous.

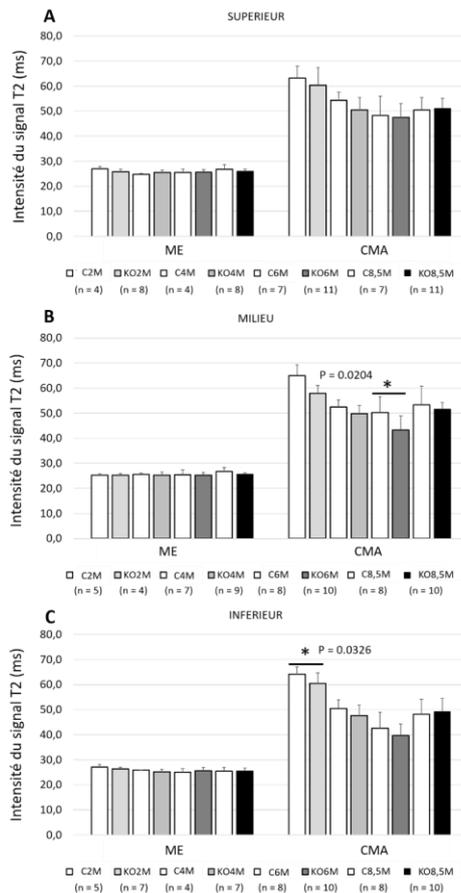


FIG RESULTATS IRM 3 : Evolution du signal T2 (en ms) dans les régions segmentées muscle entier (ME) et compartiment musculaire antérieur (CMA) pour les niveaux supérieur (A), médian (B) et inférieur (C) des membres inférieurs région cuisse/genou/mollet des souris contrôle (CxM) et *Capn3*-knock out (KOxM) âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois.

Dans le détail, pour le niveau supérieur, les résultats n'ont pas mis en évidence de différence entre les valeurs de T2 de ces deux régions pour les deux groupes de souris (FIG RESULTATS IRM 3A). En revanche, concernant le niveau milieu des membres inférieurs des souris, nous avons observé une diminution significative pour le CMA chez les souris *Capn3*-knock out comparé aux souris contrôle lorsqu'elles étaient âgées de 6 mois, avec respectivement, des valeurs T2 de 43,3 ms et 50,2 ms ($P = 0,0204$). Mais aucune différence significative n'a été relevée pour le compartiment ME (FIG RESULTATS IRM 3B). Concernant le niveau inférieur des membres inférieurs, nous avons constaté les mêmes résultats : une baisse significative des valeurs du signal T2 du CMA pour les souris déficientes en calpaïne-3 comparées au groupe contrôle lorsqu'elles étaient âgées de 2 mois, avec respectivement 60,5 ms et 64,1 ms ($P = 0,0326$), et aucune différence pour la région ME (FIG RESULTATS IRM 3C).

Pour aller plus loin dans nos analyses statistiques, nous avons jugé pertinent de calculer le rapport des surfaces (en UA) entre le muscle entier et la graisse sous-cutanée (ME/GSC), ainsi que le rapport entre le compartiment musculaire antérieur et le muscle entier (CMA/ME) car ce sont des régions anatomiques qui sont particulièrement impactées par la pathologie dans le temps.

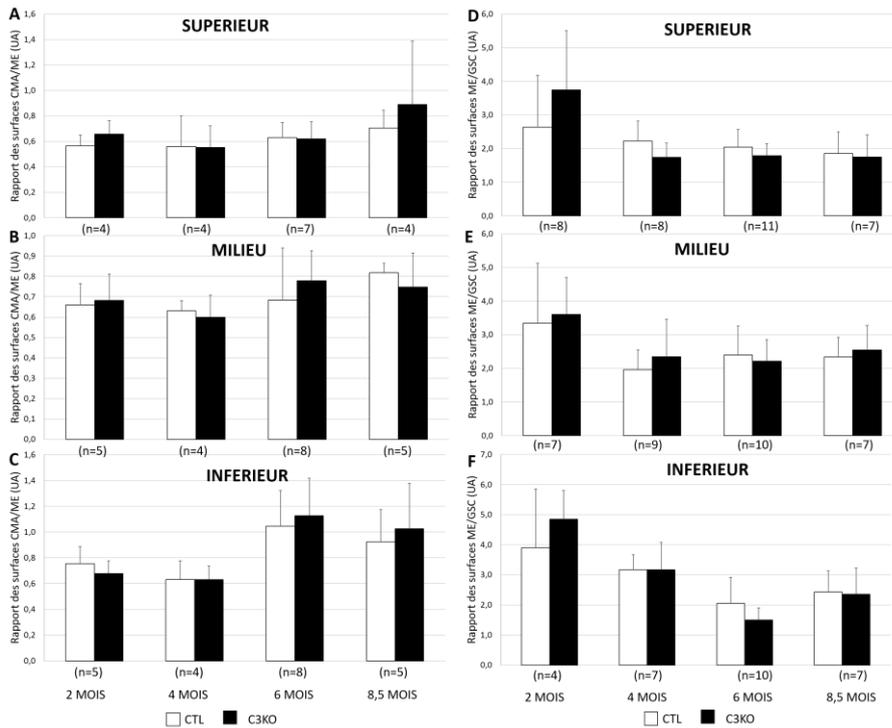


FIG RESULTATS IRM4 : Evolution dans le temps du (A, B et C) rapport des surfaces entre le compartiment musculaire antérieur et le muscle entier (CMA/ME) et du (D, E et F) rapport des surfaces entre le muscle entier et la graisse sous-cutanée (ME/GSC) dans les membres inférieurs des animaux contrôle (CTL) et *Capn3*-knock out (KO) âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure FIG RESULTATS IRM4 ci-dessus. Ainsi, nous avons comparé l'évolution du rapport CMA/ME dans le temps pour les niveaux (A) supérieur, (B) médian et (C) inférieur des membres inférieurs niveau cuisse/genou/mollet des deux groupes de souris contrôle (noté CTL) et *Capn3*-knock out (noté KO) à 2, 4, 6 et 8,5 mois d'âge ; ainsi que l'évolution dans le temps du rapport des surfaces ME/GSC pour les niveaux (D) supérieur, (E) médian et (F) inférieur des membres inférieurs niveau cuisse/genou/mollet au même temps de mesure. Les résultats n'ont montré aucune différence significative.

II. ANALYSES IMMUNOLOGIQUES EN CYTOMETRIE EN FLUX ET PCR QUANTITATIVE

Les observations histologiques et les analyses effectuées à partir des images traitées pondérées en T2 obtenues en IRM nous ont donné des indications sur la présence ou l'absence de modifications anatomiques au niveau des muscles des membres inférieurs des souris âgées de 2 à 8,5 mois ; mais à aucun cas nous n'aurions pu procéder à des analyses cellulaires et moléculaires grâce à ces deux méthodes. C'est pourquoi il nous a paru évident de procéder à des investigations immunologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire dans le tissu musculaire, ainsi que dans le sang. Nous avons donc décidé de réaliser des analyses immunologiques en cytométrie en flux afin d'identifier et de quantifier certaines sous-populations leucocytaires (cellules CD45+) dans le muscle et le sang de nos deux groupes de souris aux mêmes âges que ceux atteints lors des sessions d'IRM ; et aussi d'effectuer des analyses moléculaires par PCR quantitative pour identifier certaines chimiokines et cytokines impliquées dans les réponses immunitaires innée et adaptative. Pour le choix des antigènes de surface ciblés selon nos sous-populations leucocytaires d'intérêt, ainsi que les cytokines/chimiokines recherchées, vous pouvez vous référer aux annexes 6 et 7 respectivement.

1. PAS DE DIFFERENCE IMMUNOLOGIQUE DANS LES MUSCLES ENTRE SOURIS CONTROLE ET SOURIS DEFICIENTE EN CALPAÏNE-3

La première étape de nos investigations à l'échelle cellulaire et moléculaire fut l'analyse immunologique en cytométrie de flux. Pour nous aider dans cette partie de l'étude, nous avons collaboré avec Sandrine HENRI du CIML (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, France) qui possèdent toutes les compétences techniques et scientifiques pour le bon déroulement des expériences. Nous avons donc planifié les différentes sessions selon l'âge des animaux pour réaliser les prélèvements et analyses des muscles psoas et quadriceps de nos deux groupes de souris, contrôle et *Calp3*-knock out âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois.

Tout d'abord, chez les souris âgées de 2 mois, les leucocytes ont été isolés à partir du tissu musculaire et les sous-populations cibles ont été identifiées par une analyse en FACS. A ce moment-là, nous avons décidé de n'identifier et ne quantifier que les éosinophiles, les monocytes et les neutrophiles ; en nous basant sur notre hypothèse de travail qui était que la phase présymptomatique débutait avec une infiltration des éosinophiles dans le muscle. Mais les résultats obtenus après cette première analyse n'ont montré aucune différence significative entre les souris contrôle et les souris déficientes en calpaïne-3 à cet âge. Par conséquent, nous avons décidé dans un second temps d'élargir nos explorations à d'autres sous-populations leucocytaires incluant les natural killer (NK), les cellules T (cellules T CD4+ et CD8+) et les cellules B pour les temps de mesure à 4, 6 et 8,5 mois. Les résultats obtenus sont présentés sur l'histogramme ci-dessous de la figure FIG RESULTATS IMM 1.

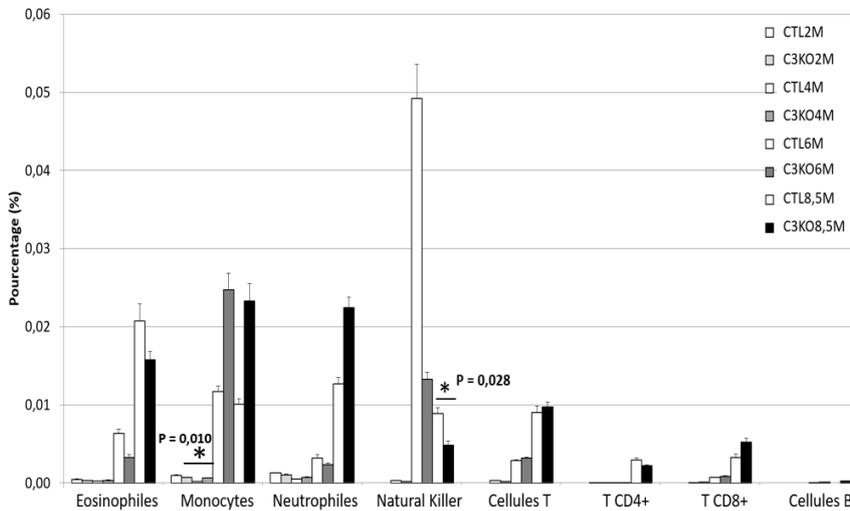


FIG RESULTATS IMM 1 : Evolution dans le temps de la proportion (en %) de sous-populations leucocytaires par rapport au nombre total de cellules vivantes dans les muscles psoas et quadriceps de souris contrôle (CTL_xM) et de souris *Capn3*-knock out (C3KO_xM) âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois.

De façon à pouvoir comparer les résultats entre les différentes analyses en FACS, nous avons standardisé les données en calculant le rapport moyen de chaque sous-population sur le nombre total de cellules vivantes isolées à partir des muscles pour les deux groupes de souris. En parallèle, nous avons aussi calculé le rapport du nombre total de leucocytes vivants (cellules CD45+) sur le nombre total de cellules vivantes pour comparer la proportion de leucocytes présente dans les muscles entre chaque groupe et pour chaque temps de mesure. Les résultats sont présentés dans la figure FIG RESULTATS IMM 2 ci-après.

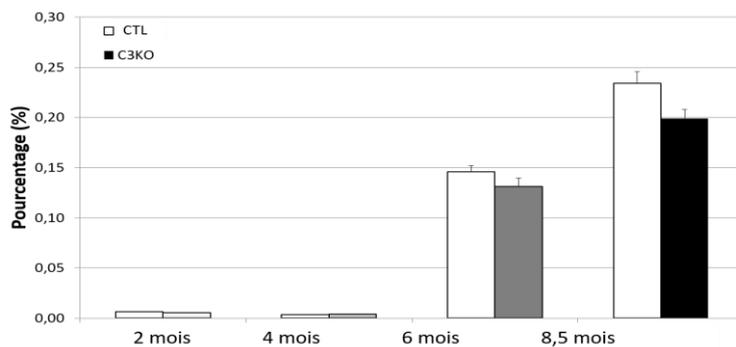


FIG RESULTATS IMM 2 : Evolution dans le temps de la proportion (en %) de leucocytes vivants (cellules CD45+) par rapport au nombre total de cellules vivantes dans les muscles psoas et quadriceps de souris contrôle (CTL) et de souris *Capn3*-knock out (C3KO) âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois.

La même standardisation et les mêmes calculs ont été effectués pour les diverses sous-populations de leucocytes dans le sang, à la différence que l'analyse en FACS ici nous a directement indiqué le nombre de cellules CD45+ vivantes car les autres cellules non leucocytaires ont été éliminés lors du traitement du sang avec le kit fournisseur (voir Matériels et Méthodes). De ce fait, nous avons calculé la proportion des sous-populations leucocytaires selon le nombre total de cellules CD45+ vivantes dans 30µL de sang et le nombre total de cellules CD45+ vivantes dans 30µL de sang (résultats présentés respectivement dans les figures FIG RESULTATS IMM 3 et FIG RESULTATS IMM 4 ci-après).

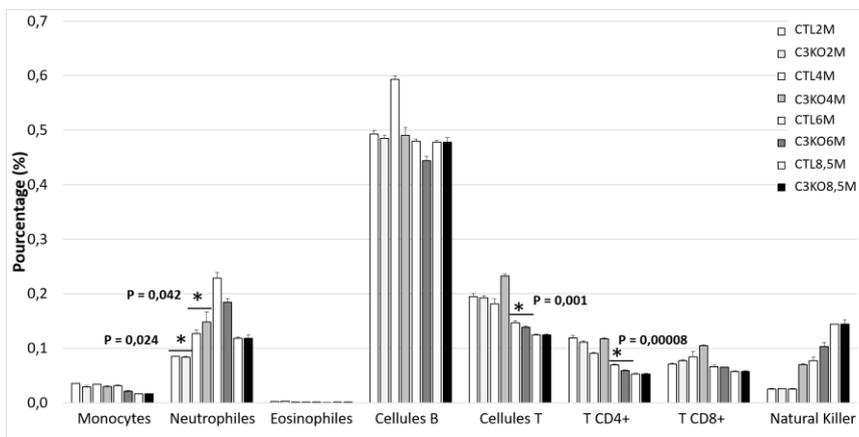


FIG RESULTATS IMM 3 : Evolution dans le temps de la proportion (en %) de sous-populations leucocytaires par rapport au nombre total de cellules CD45+ vivantes dans le sang de souris contrôle (CTLxM) et de souris *Capn3*-knock out (C3KOxM) âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois

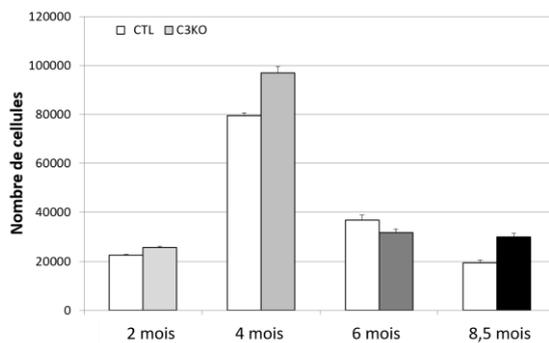


FIG RESULTATS IMM 4 : Evolution dans le temps du nombre de leucocytes vivants (cellules CD45+) dans le sang de souris contrôle (CTL) et de souris *Capn3*-knock out (C3KO) âgées de 2, 4, 6 et 8,5 mois

Pour revenir aux résultats obtenus lors de ces différentes analyses, nous avons pu constater que la proportion de cellules CD45+ augmentaient graduellement dans les muscles des souris contrôle et *Capn3*-knock out entre 2 et 8,5

mois d'âge (de 0,0060% à 0,20% en moyenne) et que la proportion de leucocytes restait très faible (FIG RESULTATS IMM 2). Nous n'avons pas noté de différence significative.

Concernant les analyses du sang, nous avons observé un pic d'augmentation du nombre de cellules CD45+ vivantes pour les souris âgées de 4 mois, environ 80 000 leucocytes pour les souris contrôle et environ 100 000 leucocytes pour les souris déficientes en calpaïne-3. Pour les autres temps de mesure, le nombre de leucocytes présents se maintenait aux alentours de 30 000 cellules vivantes, et aucune différence significative n'a été relevée à 2, 4, 6 et 8,5 mois d'âge (FIG RESULTATS IMM 4).

Pour entrer plus dans les détails de nos résultats présentés dans la figure FIG RESULTATS IMM 1, nous avons pu observer une augmentation générale de toutes les sous-populations leucocytaires pour les deux groupes de souris âgées de 2 à 8,5 mois, excepté pour les NK et les cellules B ; tout en maintenant une proportion très faible de ces sous-populations sur le nombre total de cellules vivantes dans les muscles (moins de 0,025%). En ne considérant que les éosinophiles, nous n'avons pas observé de différence significative entre le groupe de souris contrôle et celui des souris *Capn3*-knock out et cela pour tous les âges ; nous avons observé le même constat pour les neutrophiles et les cellules T.

A l'opposé, en ce qui concerne les monocytes nous avons pu noter une augmentation significative chez les souris *Capn3*-knock out comparées aux souris contrôle lorsqu'elles étaient âgées de 4 mois, avec respectivement 0,00065% et 0,00020% ($P = 0,010$). Pour les autres temps de mesure, aucune différence n'a été découverte. Etonnement, nous avons souligné une augmentation quasiment significative pour les NK chez les souris âgées de 8,5 mois avec une valeur de 0,0891% pour les souris contrôle comparées aux souris déficientes en calpaïne-3, avec une valeur de 0,0486% ($P = 0,058$). En outre, malgré l'écart notable de la proportion des NK à 6 mois entre souris contrôle (0,0490%) et souris *Capn3*-knock out (0,01328%), nous n'avons pas relevé de significativité ($P > 0,05$). Nous pouvons expliquer cela par le fait que le nombre de cellules NK ou de monocytes comptés était faible comparé au nombre total de cellules vivantes et que les variations intra-groupes pouvaient être importantes dans les muscles des souris.

Pour finir avec les résultats concernant les muscles, il était aussi intéressant de noter que les cellules B étaient vraiment très rares dans les muscles (0% à 0,0024%) pour chaque temps de mesure.

Inversement, les résultats observés pour le sang (FIG RESULTATS IMM 3) nous ont montré que les cellules B étaient la sous-population leucocytaire majoritairement présente à chaque temps de mesure (environ 0,50%), sans toutefois relever de différence significative. Et à la différence de ce que nous avons observé dans les muscles, la proportion des monocytes était maintenue dans le temps (environ 0,03%, $P > 0,05$) et la proportion des NK augmentait légèrement chez les souris âgées de 2 à 8,5 mois (respectivement 0,025% à 0,12%, $P > 0,05$).

Concernant les cellules T, nous avons pu relever une différence significative à 6 mois d'âge ($P = 0,001$), la proportion de ces cellules étant plus faible chez les souris déficientes en calpaïne-3 (0,1462%) comparées aux souris contrôle (0,2325%) ; qui concernaient plus exactement les cellules CD4+ (contrôle = 0,1176% et *Capn3*-knock out = 0,0690% ; $P = 0,0008$).

En portant notre attention sur les neutrophiles, nous avons pu constater une augmentation entre 2 et 6 mois d'âge (contrôle de 0,085% à 0,15% et *Capn3*-knock out de 0,083% à 0,23%) suivi d'une baisse à 8,5 mois d'âge (contrôle

= 0,18% et *Capn3*-knock out = 0,12%). Nous avons noté une différence significative à 2 mois d'âge ($P = 0,024$), la proportion de neutrophiles étant légèrement plus faible chez les souris déficientes en calpaine-3 (0,08339%) que chez les souris contrôle (0,08529%) et inversement, la proportion des neutrophiles étant plus élevée chez les souris *Capn3*-knock out (0,1268%) que chez les souris contrôle (0,0960%) âgées de 4 mois, avec une différence significative ($P = 0,042$).

In fine, nous avons observé la rare présence des éosinophiles dans le sang à chaque temps de mesure, aussi bien chez les souris contrôle que les souris *Capn3*-knock out (environ 0,001%), sans différence significative.

2. LES CYTOKINES EXPRIMEES DANS LES MUSCLES QUADRICEPS DE SOURIS CONTROLE ET CAPN3-KNOCK OUT

La seconde partie de nos investigations immunologiques a concerné l'analyse de l'expression de certaines molécules impliquées dans les réponses immunitaires en tant que messenger, les cytokines et chimiokines, dans les muscles quadriceps des souris contrôle et souris *Capn3*-knock out. Nous avons décidé de cibler 14 cytokines/chimiokines différentes, jouant des rôles dans la réponse immunitaire innée et/ou adaptative et ciblant les sous-populations que nous avons étudié lors des analyses en FACS (se référer à l'annexe 5 pour plus de détails).

De la sorte, après avoir extrait l'ARN total à partir des quadriceps des souris et procéder à une PCR après transcription inverse, nous avons regroupé les ADNc de trois souris contrôle et trois souris déficientes en calpaine-3, un pool pour celles âgées de 2 mois et un pool pour celles âgées de 8,5 mois. Ensuite, nous avons effectué une PCR quantitative ciblant les 14 cytokines/chimiokines d'intérêt (voir Matériels et Méthodes) et nous avons reproduit cette expérience trois fois. Les résultats sont présentés ci-dessous (FIG RESULTATS QPCR).

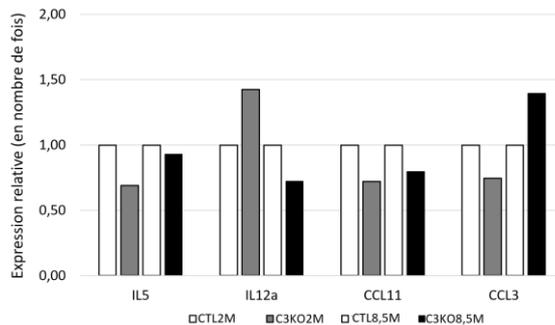


FIG RESULTATS QPCR : Expression relative (en nombre de fois) des transcrits de cytokines (IL5 et IL12a) et de chimiokines (CCL11 et CCL3) exprimées dans les muscles quadriceps de souris contrôle (CTLxM) et *Capn3*-knock out (C3KOxM).

Nous avons pu constater que deux cytokines et deux chimiokines sur les quatorze ciblées étaient exprimées dans le muscle quadriceps pour les deux groupes de souris : l'interleukine 5 (IL-5), l'interleukine 12a (IL-12a), C-C motif chemokine 11, connue sous le nom éotaxine 1 (CCL11/éotaxine 1) et la macrophage inflammatory protein 1 α

(MIP1 α /CCL3). Toutefois, les expressions de ces messagers ne différaient pas significativement entre les deux groupes de souris ($0,5 < RQ < 2,0$).

D. DISCUSSION

Chez l'Homme, quelques études ont rapporté des cas de phénomènes inflammatoires chez des patients souffrant de myopathies héréditaires ((Baumeister et al., 2009), (Krahn et al., 2011) (Schutz et al., 2017)) : comme l'infiltration d'éosinophiles se manifestant par des myosites à éosinophiles ou l'infiltration de macrophages dans le tissu musculaire. Dans notre étude, nous avons voulu savoir si le modèle murin déficient en calpaïne-3 était un bon sujet d'étude pour des analyses immunologiques et ainsi, comprendre les mécanismes pouvant être impliqués dans ces troubles inflammatoires. Cela dans le but de déterminer si les myosites à éosinophiles ou bien les infiltrations à macrophages sont un stade présymptomatique de la calpaïnopathie en étudiant potentiellement ce phénomène chez la souris *Capn3*-knock out.

Dans un premier temps, nos observations histologiques n'ont pas montré de différence macroscopique entre les muscles psoas de souris contrôle et ceux de souris déficientes en calpaïne-3, qu'elles soient âgées de 2, 4, 6 ou 8,5 mois ; aucune infiltration de cellules inflammatoires n'a été constatée entre les myofibrilles.

Puis dans un second temps, nous avons approfondi nos explorations anatomiques en réalisant une étude longitudinale par imagerie à résonance magnétique. Cette fois encore, nos résultats n'ont révélé aucune zone inflammatoire dans les muscles des membres inférieurs des souris déficientes en calpaïne-3 comparées aux souris contrôle pour chaque âge de mesure (2, 4, 6 et 8,5 mois). Toutefois, il est intéressant de souligner que nous avons observé une diminution significative de la valeur du signal T2 dans le compartiment musculaire antérieur des membres inférieurs des souris *Capn3*-knock out au niveau de la coupe « inférieure » lorsqu'elles étaient âgées de 2 mois et au niveau de la coupe « milieu » lorsqu'elles étaient âgées de 6 mois. Il est bien connu que les muscles sont des organes riches en protéines et en fibre de collagène, ce qui se traduit en IRM par un signal T2 assez court. Nous pouvons donc supposer qu'une modification de l'architecture musculaire se produit en défaveur des souris déficientes en calpaïne-3 avec le temps, de la région distale vers la région proximale au niveau des membres inférieurs, affectant potentiellement la composition en protéines. Pour les souris, cette propagation distale vers proximale pourrait s'expliquer par une posture de quadrupède et non de bipède comme chez l'Homme. De plus, un rôle majeur de la calpaïne-3 a été démontré dans la régulation des sarcomères (Duguez et al., 2006); appuyant ainsi notre hypothèse sur ces possibles modifications de la composition en protéines qui se traduirait par une augmentation de la surface du compartiment musculaire antérieur. Néanmoins, nous ne pouvons savoir quelles sont exactement les protéines concernées et si cela affecte aussi les protéines de la matrice extracellulaire comme les fibres de collagène. C'est pourquoi une étude sur la composition et la localisation des protéines musculaires pourrait être nécessaire pour une meilleure compréhension des désordres architecturaux constatés chez les patients souffrant de LGMD2A.

Maintenant, considérons aussi les résultats que nous avons observés lors de nos investigations immunologiques. L'identification et la quantification de sous-populations de leucocytes (cellules CD45+) impliquées dans la réponse immunitaire innée (éosinophiles, neutrophiles, natural killer, monocytes et certain immunophénotype

de cellules T) ou bien dans la réponse immunitaire adaptative (monocytes, cellules B et cellules T) ne nous ont révélé aucune différence significative en termes de proportion de leucocytes dans le muscle ou de leur nombre total dans le sang entre les souris contrôle et les souris *Capn3*-knock out.

Cependant, il est intéressant d'attirer l'attention sur le fait que la cinétique du nombre de cellules CD45+ est différente dans le muscle et dans le sang : la proportion de leucocytes augmentait dans les muscles psoas et quadriceps en même temps que les souris vieillissaient ; tandis que dans le sang, le nombre de leucocytes atteignait un pic maximal lorsque les souris étaient âgées de 4 mois puis diminuaient avec l'âge. Nous pouvons supposer que l'augmentation constante des leucocytes dans le muscle est liée au mécanisme de stress des fibres musculaires qui se fait de plus en plus intense, à la suite de l'activité physique et la croissance des souris entre 2 mois et 8,5 mois ; imposant ainsi un phénomène important de nécrose-régénération des myofibres. Le système immunitaire doit donc jouer son rôle de « nettoyeur » plus efficacement pour permettre le renouvellement du tissu musculaire. En effet, nos investigations ont montré que les monocytes étaient la sous-population la plus présente dans le tissu musculaire, tout comme les éosinophiles, à compter de 6 mois. Ces résultats n'étaient prévisibles au début de notre étude, nous attendant à constater des infiltrations à éosinophiles ou autres cellules inflammatoires. Mais ils évoquaient quand même une implication active du système immunitaire dans le tissu musculaire. Et nos résultats obtenus à l'échelle moléculaire concernant certaines cytokines et chimiokines ont montré que seulement 2 cytokines et 2 chimiokines étaient exprimées chez les souris contrôle et les souris *Capn3*-knock out à 2 et 8,5 mois :

- *L'interleukine 5 qui est impliquée dans la croissance et la différenciation des cellules B, ainsi que dans le maintien de la survie et des fonctions des éosinophiles chez la souris (Takatsu, 2011) ;*
- *L'interleukine 12 qui induit la différenciation des cellules T CD4+ naïves en cellules Th1, et joue aussi un rôle dans l'activation des natural killer et des cellules dendritiques (Sun et al., 2015) ;*
- *L'éotaxine 1 (CCL11) qui permet le recrutement spécifique des éosinophiles par chimiotactisme sur les sites inflammatoires (Davoine and Lacy, 2014) ;*
- *MIP1a (CCL3) qui est impliquée dans l'inflammation aigue en permettant le recrutement et l'activation des granulocytes, mais aussi l'attraction des macrophages, monocytes et neutrophiles (Alam, 1992; Wolpe, 1988).*

Une fois de plus, ces résultats consolident le fait que seule la réponse immunitaire innée est engagée, plus précisément la réponse inflammatoire et les cellules jouant un rôle de « nettoyage ».

En extrapolant ces résultats à l'Homme et en supposant que la cinétique des leucocytes est similaire ; l'Homme étant aussi sujet à l'activité physique et à la croissance entre la petite enfance et l'âge adulte ; nous pouvons suggérer que la présence majoritaire des éosinophiles et des monocytes dans le muscle pourrait expliquer l'apparition des myosites à éosinophiles ou des infiltrations riches en macrophages qui ont été observées chez des patients souffrant de LGMD2A durant leur petite enfance. De plus, nous pouvons préciser que le rôle majeur de la calpaïne-3 dans la régénération musculaire a été prouvé par des investigations menées chez 22 patients souffrant de LGMD2A (Hauerslev et al., 2012). En considérant ce rôle clé, nous pouvons supposer qu'un évènement intrinsèque ou externe, associé à un déficit en calpaïne-3, pourrait causer d'importants désordres des mécanismes de la réponse immunologique et un emballement de la production et de l'activation de ces deux sous-populations leucocytaires, éosinophiles et monocytes, dans le tissu musculaire. Nous devons aussi rappeler que les éosinophiles sont connus pour larguer des composants cytotoxiques comme les protéines EPX ou MBP1, et que les monocytes sont connus pour jouer un rôle clé dans la

réparation tissulaire, la régénération et la fibrose (Wynn and Vannella, 2016). Ces phénomènes d'infiltration inflammatoire pourraient donc ne pas être une phase présymptomatique mais plutôt une conséquence indirecte de la calpaïnopathie, plus précisément, une altération des mécanismes de la réponse immunologique liée au déficit de la calpaïne-3. Il serait donc intéressant de rechercher ces protéines dans le muscle, murin ou humain. Cependant, les souris ne sont pas sujettes aux myosites à éosinophiles idiopathiques (MEI) comme les Hommes et ne peuvent donc reproduire spontanément ce phénomène observé chez certains patients souffrant de LGMD2A. En outre, il n'y a, à ce jour, aucun modèle murin de MEI.

Pour conclure, notre étude a montré que le modèle murin déficient en calpaïne-3 ne reproduisait pas spontanément les mêmes désordres immunologiques dans le muscle que ceux décrits chez certains patients atteints de calpaïnopathie et ce modèle ne semble donc pas approprié pour des investigations plus élaborées afin de clarifier et comprendre exactement les mécanismes immunologiques impliqués dans ces phénomènes inflammatoires. Finalement, il serait nécessaire de considérer un autre modèle animal plus pertinent pour explorer cette hypothèse. Désormais, les avancées technologiques portées par les outils de modification génique disponibles nous permettent d'imaginer d'obtenir ces animaux modèles dans un futur proche. Nous pourrions également réaliser une étude de cohorte dans le but d'analyser des biopsies musculaires de jeunes patients et d'adultes souffrant de LGMD2A.

E. MATERIELS ET METHODES

I. MODELE ANIMAL ET GENOTYPAGE

Les souris contrôle sont de souches C57BL/6/J commandées chez Charles River Laboratories (Les Oncins, France). La construction et la caractérisation du modèle murin déficient en calpaïne-3 (groupe *Capn3*-knock out) a été décrite précédemment ((Richard et al., 2000), (Fougerousse et al., 2003b)). Toutes les souris ont été hébergées selon les recommandations européennes pour la protection des manipulateurs et l'utilisation des animaux en expérimentation animale.

Le génotypage des souris *Capn3*-knock out a été réalisé comme décrit précédemment (Richard et al., 2000).

II. INVESTIGATIONS PAR IMAGERIE A RESONANCE MAGNETIQUE (IRM)

Les explorations des animaux ont été conduites dans le scanner préclinique 70/16 Pharmascan possédant un aimant à résonance horizontal de 7 Tesla (Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) et équipé d'une cryosonde à hydrogène (¹H-IRM) refroidie en permanence par du nitrogène (CryoProbe, Bruker Biospin).

1. PREPARATION DES ANIMAUX

Chaque souris a été préalablement anesthésiée en chambre d'induction grâce à un flux constant d'un mélange air à 3L/min et isoflurane à 3%. Après cela, les cornées des animaux ont été protégées de la sécheresse avec une crème ophtalmique et l'animal anesthésié a été placé en décubitus dorsal sur un berceau à IRM intégrant un masque relié à une unité d'anesthésie (Univentor 400, UNO, Zevenaar, The Netherlands), qui est maintenue à 1,7-2,2% d'isoflurane dans 100% d'air (0.3 L/min). Le berceau est ensuite inséré dans le scanner à aimant en veillant à ce que les membres inférieurs soient localisés sous la crysonde. Durant toute la durée de l'expérience, la température corporelle est maintenue à un niveau physiologique en réchauffant l'animal grâce à un circuit d'eau chaude intégré au berceau et la fréquence respiratoire est contrôlée en permanence en utilisant un système commercial de monitoring (SA Instruments, Inc., New York, USA) et maintenue entre 70 et 90 cycles respiratoires par minute en modifiant manuellement la dose d'isoflurane.

2. ACQUISITION ET TRAITEMENT DES IMAGES BRUTES IRM

Dix coupes axiales consécutives non contiguës (1mm d'épaisseur, 1mm d'espacement) ont été sélectionnées au niveau des membres inférieurs incluant le pelvis. Les images pondérées en T2 en multi-coupes multi-échocs (en anglais, T2-weighted multi-slice multi-echo (MSME)) de ces coupes axiales ont été acquises avec les paramètres suivants : 16 échocs, un temps d'écho de 7,29ms, un temps de répétition de 2000ms, une cumulation, un champ de 20x30mm², une taille matricielle de 256x256 et une résolution spatiale de 78x117µm².

3. TRAITEMENT DES IMAGES PONDEREES EN T₂

Les images pondérées en T2 ont été traitées informatiquement dans leur ordre d'acquisition pour générer une carte T2 sur une base pixel par pixel en ajustant les données ¹H-IRM grâce à un programme d'analyses intégrant une fonction exponentielle unique développée sur mesure via l'environnement IDL (Interactive Data Language, Exelis Visual Information Solutions, Boulder, CO, USA). Les régions d'intérêt (ROI, Regions Of Interest) ont été dessinées sous le logiciel FSLView (FMRIB, Oxford University, UK ; <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl>) pour chaque coupe axiale en traçant à main levée les délimitations des aires anatomiques des compartiments antérieurs et postérieurs. La surface, la moyenne et écart type ont été déterminés pour chaque ROI en utilisant un script Python déterminé pour cela.

III. OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES

Des cryosections transversales de 8-10µm d'épaisseur ont été préparées à partir des muscles psoas et quadriceps et ont été colorées par la méthode May Grünwald-Giemsa (MGG), qui est une méthode de coloration tout à fait appropriée et utilisée en routine de diagnostic pour visualiser les leucocytes, plus particulièrement les éosinophiles, dans les tissus ((Jankowski et al., 2000), (Besançon-Watelet et al., 2002), (Schröder et al., 2013)). Les sections de muscle ont été observées avec le scanner de lames Axio Scan.Z1 (Zeiss) et l'acquisition des images a été réalisée sous un objectif Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 et une caméra Hitachi HV-F202SCL dont les paramètres étaient : temps

d'exposition de 200µs et taille de l'image 95251x19574 pixels. Les analyses d'images ont été effectuées sous le logiciel Zen (Zeiss).

IV. ANALYSES PAR PCR QUANTITATIVE

Les ARN totaux ont été extraits et purifiés à partir des muscles quadriceps prélevés sur les souris contrôle et les souris *Capn3* knock-out en respectant les étapes décrites dans le guide utilisateur du TriZol™ Reagent (réf. 15596026, Invitrogen). 200ng d'ARN total ont subi une transcription inverse avec le kit High Capacity cDNA Reverse Kit (réf. 4368814, Ambion) en utilisant des hexamères aléatoires selon le protocole du fournisseur. Les ADNc obtenus de 3 souris contrôle ou de 3 souris *Capn3*-knock out ont été regroupés par groupe et par temps de mesure à 2 mois et 8,5 mois d'âge.

Une analyse par PCR quantitative (q-PCR) a été réalisée sur l'appareil LightCycler 480® Real Time PCR System (Roche) selon les recommandations et le protocole du fournisseur du kit LightCycler 480® SYBER Green I Master (réf. 04707516001, Roche). Les conditions de la q-PCR ont été les suivantes : 95°C 5min, 45 cycles de (95°C 10sec, 55°C 10sec, 72°C 20sec). Les amorces ont été conçues pour chaque gène d'expression d'intérêt (voir tableau ci-dessous) et ont été ajoutées au tube réactionnel à une concentration finale de 100µM pour une concentration finale d'ADNc à 100ng. Les échantillons ont été déposés en triplicata dans une plaque 96 puits et l'expérience complète a été reproduite trois fois avant de procéder aux analyses statistiques. L'expression relative des gènes (notée RQ) a été calculée en utilisant la méthode standard basée sur les courbes Ct obtenues lors de la q-PCR en temps réel et en s'appuyant sur l'expression relative de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) comme contrôle interne de standardisation.

ADNC CIBLES (SOURIS)	OLIGONUCLEOTIDES (AMORCES SENS S ET AMORCES ANTISENS A + POSITION NUCLEOTIDIQUE)	TAILLE DE L'AMPLICON (BP)
IL1a	S1268: ATGCCAGTTGAGTAGGATAAAG A1330: GAGGTAGGAAAGATGTAGCTATTG	86
IL2	S464: AGTGCCAATTCGATGATGAG A534: GAGGGCTTGTGAGATGATG	90
IL4	S51: GAGCTATTGATGGGTCTCAAC A105: GATATGGCTCCTGGTACATTC	75
IL5	S193: GCTTCCTGTCCCTACTCATA A263: CCACGGACAGTTTGATTCTT	90
IL6	S423: TGGTCTTCTGGAGTACCATAG A483: GGACTCTGGCTTTGTCTTTC	80
IL10	S607: CACCTGCAGTGTGTATTGAG A683: CCAAGGAGTTGTTCCGTTAG	97
IL12a	S527: CTATGAGGACTTGAAGATGTACC A600: GCCCTTGTCTAGAATGATCTG	94
IL13	S264: TTCTGTGTAGCCCTGGATTC A329: GTTACAGAGGCCATGCAATATC	87
CCL5 (RANTES)	S319: TTGGAGATGAGCTAGGATAGAG A374: GGACTAGAGCAAGCAATGAC	75
CCL11 (EOTAXIN-1)	S95: GCTGAGATCCAAGCAGTAAC A154: GTGAGCAGCAGGAATAGAAG	79
CSF2 (GM-CSF)	S383: CATGTAGAGGCCATCAAAGAA A439: GACGACTTCTACCTCTTCATTC	78
TNF	S269: CCTCTTCTCATTCCTGCTTG A342: GGGAACTTCTCATCCCTTTG	93
IFN-g	S258: TCTTGGATATCTGGAGGAACT A322: CAAAGAGTCTGAGGTAGAAAGAG	87
CCL 3 (MIP1α)	S3020: TAACATCTGGAGCCTTTGTG A3093: GTTCTGTGAGTAGACGGAATAG	95
GAPDH	S200: TGACCTCAACTACATGGTCTA A273: ATGACAAGCTTCCCATTCTC	93

V. ANALYSES EN CYTOMETRIE EN FLUX

1. ISOLEMENT DES LEUCOCYTES A PARTIR DE TISSU MUSCULAIRE

Pour isoler les leucocytes à partir du tissu musculaire, les muscles psoas et quadriceps ont été découpés en petits morceaux et ensuite placés dans un milieu de digestion composé de milieu RPMI supplémenté à 5% de sérum de veau fœtal et additionné de collagénase II (Worthington) à 1mg/ml et de DNase à 0,25mg/ml (Sigma). Deux incubations de 30 minutes chacune sous agitation à 37°C ont été effectuées. Le tissu digéré a été homogénéisé après chaque période d'incubation en utilisant un tube C et l'appareil Gentle Macs Dissociator (Miltenyi Biotec). Les cellules à faible densité ont ensuite été purifiées par centrifugation dans un gradient de 40% à 70% de Percoll (GE Healthcare).

2. ANALYSES DES CELLULES SANGUINES

Le sang a été collecté dans un tube EDTA et les érythrocytes ont été lysés avec la BD FACS Lysing Solution (Becton Dickinson).

3. CYTOMETRIE EN FLUX

L'acquisition des cellules issues des muscles et du sang marquées par fluorescence a été réalisée sur les cytomètres en flux (ou dans le langage courant, en FACS pour Fluorescence-activated cell sorting) LSRII et CANTO respectivement et l'analyse effectuée sur le logiciel FlowJo (Tree Star). La viabilité des cellules a été évaluée en utilisant le Sytox (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. Les stratégies de sélection des leucocytes dans le muscle et dans le sang sous le logiciel FlowJo sont présentées en Annexe 6.

4. ANTICORPS

6clyFITC-couplé anti-Ly6C (Clone AL-21, BD Pharmingen), PE-couplé anti-CD3ε (Clone 145-2C11, BD Horizon), PE-CF594-couplé anti-SiglecF (E50-2440, BD Biosciences), PE-Cy5.5-couplé anti-CD8a (Clone 53-6.7, Invitrogen) PE-Cy7-couplé anti-Ly6G (Clone 1A8, BD Horizon), allophycocyanin A647-couplé anti-CD64 (Clone X54-5/7.1, Pharmingen), Alexa 700-couplé anti-MHCII (I-A/I-E) (M5/114.15.2, eBioscience), allophycocyanin Cy7-couplé anti-NK1.1 (PK136, Biolegend), BV421-couplé anti-CD45R/B220 (Clone RA3-6B2, BD Pharmingen), BV-650-couplé anti-CD4 (Clone RM4-5, Pharmingen), BV786-couplé anti-CD45 (clone 30-F11, BD Horizon), allophycocyanin Cy7-couplé anti-CD19 (6D5, Biolegend), BV711-couplé anti-CD11b (M1/70, BD Pharmingen), BV610/605-couplé anti-CD11c (N418, eBioscience), PE-Cy5.5-couplé anti-CD45.2 (104, eBioscience), allophycocyanin Cy7-couplé anti-CD19 (6D5, Biolegend), allophycocyanin Cy7-couplé anti-CD3 (17A2, Biolegend), BV650-couplé anti-CD24 (Clone M1/69, BD Pharmingen).

VI. STATISTIQUES

La significativité des différences entre les données des groupes d'animaux contrôle et *Capn3* knock-out a été déterminée en utilisant le test Mann-Whitney ou le test-t de Student après une analyse de la distribution des données par le test de Shapiro-Wilk. Une significativité statistique a été définie pour une valeur $p < 0,05$.

CHAPITRE 3 : ANALYSE D'UNE
COHORTE DE PATIENTS ATTEINTS DE
DYSTROPHIE MUSCULAIRE DES CEINTURES
DE TYPE 2A

Dans le chapitre 1 de ce mémoire, nous avons abordé les différents types de mutations pouvant affecter le gène *CAPN3* : soit des mutations impactant l'épissage du gène et aboutissant à une protéine non fonctionnelle ou exprimée insuffisamment ou absente ; soit des mutations modifiant la séquence en acides aminés de la calpaïne-3, aboutissant à une protéine inactive ou faisant défaut dans l'un de ses rôles principaux (activités autolytique et protéolytique ou activité non protéolytique comme l'aide au maintien de l'architecture du muscle, régénération musculaire, etc.). L'analyse d'une cohorte de patients souffrant de dystrophie musculaire des ceintures de type 2A (cf. chapitre 3) et ces notions importantes citées ci-dessus ont été à la base de notre réflexion pour un projet parallèle à notre projet principal concernant uniquement un aspect physiologique de la calpaïnopathie (cf. Chapitre 2). Ainsi, dans ce chapitre 3, nous vous présentons les résultats de l'analyse d'une cohorte de 336 patients LGMD2A de l'Hôpital la Timone à Marseille. Cette analyse a pour but de faire un bilan des variants exoniques et introniques identifiés affectant le gène *CAPN3*, leurs distribution, pathogénicité et impact(s) sur l'épissage des transcrits ou sur la traduction en protéine calpaïne-3.

A. ANALYSE D'UNE COHORTE DE PATIENTS LGMD2A

À l'hôpital de la Timone à Marseille, plus de 500 patients sont venus en consultation, soit pour un diagnostic initial, soit pour une consultation de suivi. Ainsi, nous avons pu étudier cette cohorte (en préservant l'anonymat des patients dont l'identité ne nous a pas été dévoilée) et en extraire des données intéressantes concernant les patients porteurs de variants du gène *CAPN3* pour lesquels le diagnostic de dystrophie musculaire des ceintures de type 2A a bien été établi. Après un premier tri pour ne conserver que ces derniers patients confirmés LGMD2A, nous avons pu exploiter les données de 336 patients.

Nous vous présentons ci-après les démarches effectuées et les résultats obtenus à la suite de l'analyse *in silico* des variants identifiés sur le gène *CAPN3*.

I. ANALYSE DU PROFIL DES PATIENTS LGMD2A

Pour commencer, nous avons effectué une analyse sur l'âge des patients en 2018, l'âge des patients lors de l'apparition des premiers symptômes de la calpaïnopathie ainsi que leur sexe afin de réaliser la répartition des cas selon ces critères. Sur les 336 patients initiaux, nous avons eu connaissance de la date de naissance pour 245 d'entre eux. Concernant l'âge d'apparition des premiers symptômes, celui-ci a été renseigné pour 82 d'entre eux.



FIG COHORTE 1: Âge moyen et âge moyen d'apparition des premiers symptômes des patients LGMD2A, ainsi que leur répartition par sexe et âge en 2018.

Comme rapporté dans différentes études, nous avons constaté que la dystrophie musculaire des ceintures de type 2A touchait indifféremment les hommes et les femmes (50% et 50%). L'âge moyen des patients reçus à l'hôpital était de 46 ans en 2018 et l'âge moyen d'apparition des premiers symptômes était de 21 ans.

Les 245 patients dont l'âge était connu ont ensuite été répartis selon ce dernier afin de classifier et dénombrer les cas pédiatriques (moins de 12 ans inclus), les cas adolescents (entre 13 ans et 19 ans inclus), les cas jeunes adultes (entre 20 ans et 30 ans inclus), les cas adultes (entre 31 ans et 60 ans inclus) et les cas séniors (plus de 61 ans). Ainsi, nous avons observé que les cas adultes représentaient la majorité des patients LGMD2A (66% des cas) pour un âge moyen de 47 ans, suivi par les cas séniors d'âge moyen de 73 ans (47%) et les adolescents (âge moyen 16 ans) et les jeunes adultes (âge moyen 25 ans) représentant chacun 6% des cas. En revanche, les cas pédiatriques étaient peu fréquents, seulement 1% des cas, avec un âge moyen de 7 ans.

En revanche, sur les 82 patients dont l'âge d'apparition des premiers symptômes était connu, les analyses ont montré que celui-ci se situait lors de la petite enfance (moins de 12 ans), représentant 35% des cas.

Ces proportions entre les différents stades de la maladie s'expliquent par le fait que la calpainopathie n'affecte pas l'espérance de vie des patients et que le profil type d'un patient LGMD2A est un cas d'apparition des premiers symptômes après l'âge de 10 ans avec une évolution progressive durant 20 ans à 30 ans vers une sévérité plus importante de la pathologie.

Concernant les variants identifiés et présents chez ces 336 patients, nous avons regroupé quelques données dans le tableau ci-dessous (TABLEAU 1 COHORTE) :

Nombre total de variants identifiés	644
Nombre total de variants différents identifiés	211
Nombre moyen de variants par patient	1,9
Nombre de variants à l'état homozygote	96
Nombre de variants à l'état hétérozygote	548

TABLEAU 1 COHORTE : Bilan des variants identifiés dans la cohorte de 336 patients LGMD2A.

Dans cette cohorte comptant un total de 336 patients LGMD2A, un total de 644 variants sur le gène *CAPN3* ont été identifiés, pathogènes ou non, sachant que 211 variants différents ont été retrouvés. Cela signifiait donc qu'un même variant a été retrouvé plusieurs fois parmi les patients. Nous avons constaté qu'un patient était porteur en moyenne de 1,9 variants affectant le gène *CAPN3*. En effet, chez certains patients un seul variant pathogène était détecté.

Majoritairement les patients étaient porteurs de variants à l'état hétérozygote composite, dénombrés 548 fois contre 96 variants portés à l'état homozygote. Nous pouvons donc en déduire que l'association de plusieurs variants pathogènes était plus fréquemment responsable de la dystrophie musculaire des ceintures de type 2A que la présence d'un unique variant pathogène retrouvé sur les deux allèles.

II. ANALYSES DE L'IMPACT DES VARIANTES PATHOGENES SUR LA CALPAÏNE-3

1. ANALYSE DE L'IMPACT DES VARIANTES PATHOGENES SUR L'EXPRESSION DE LA CALPAÏNE-3

Au sein de cette cohorte, une analyse de l'expression de la calpaïne-3, plus particulièrement de l'expression de la protéine entière p94 et de ses deux fragments autolytiques N31k et C58k, a été effectuée pour 111 patients. Ainsi, nous avons pu déterminer le nombre de patients présentant une déficience ou non dans la quantité de calpaïne-3 et rapporter ce résultat au(x) variant(s) pathogène(s) associé(s). Les résultats sont présentés ci-après (FIG COHORTE 2).

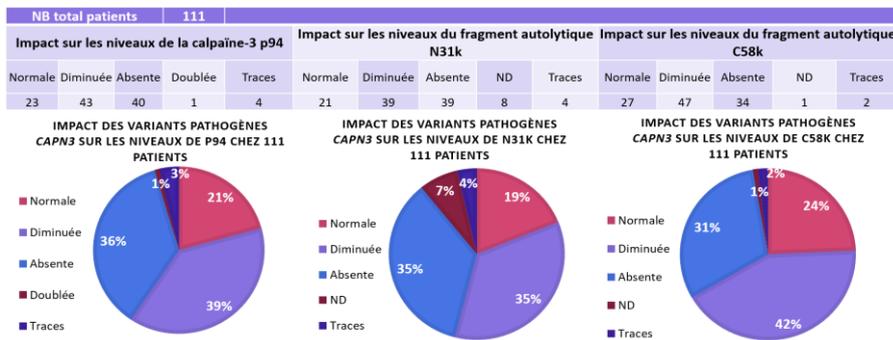


FIG COHORTE 2 : Analyse de l'impact des variants pathogènes sur la protéine calpaïne-3 entière (ou p94) et ses deux fragments autolytiques N31k et C58k chez 111 patients.

Plusieurs profils de la calpaïne-3 ont été observés, avec des conséquences soit uniquement sur les niveaux de p94 ou un des deux fragments autolytiques, soit sur la protéine entière et ses deux fragments, soit aucune conséquence sur les niveaux de la protéine et ses fragments autolytiques.

Premièrement, nous avons constaté que p94 était retrouvée à des niveaux **normaux** pour 21% des patients, le fragment autolytique N31k était retrouvé à des niveaux **normaux** pour 19% d'entre eux et le fragment C58k pour 24% des patients.

Majoritairement, nous avons observé que l'impact des variants pathogènes sur les niveaux de p94 et du fragment autolytique C58k était une **diminution** de la quantité de ce fragment (respectivement à 39% et à 42%). Concernant le fragment autolytique N31k, l'impact sur la quantité de protéine était à équivalence avec une **diminution** à 35% et une **absence** à 35%. Nous avons aussi noté que l'**absence** de p94 concernée 36% des patients et l'**absence** du fragment autolytique C58k concernée 31% des patients.

En revanche, nous avons observé pour quelques cas : que soit p94, soit le fragment autolytique N31k, soit le fragment autolytique C58k étaient retrouvés à l'état de **traces** (respectivement 3%, 4% et 2%) ; le fragment autolytique N31k étant le plus affecté.

Pour finir, il était intéressant de noter que pour 1 patient, la calpaïne-3 entière a montré une **quantité doublée**, le patient étant porteur de mutations hétérozygotes composites c.1465C>T et c.1801-1G>A.

2. ANALYSE DE L'IMPACT DES VARIANTS PATHOGENES CAPN3 SUR L'ACTIVITE DE LA CALPAÏNE-3

Dans le but de faire un parallèle avec l'impact des variants pathogènes *CAPN3* non pas uniquement sur l'expression de la calpaïne-3 et ses fragments autolytiques, mais aussi sur ses activités protéolytique et non protéolytique, nous avons retrouvé certaines mutations décrites dans le chapitre 1 §C.6. chez quelques patients de notre cohorte.

i. INACTIVATION DE LA CALPAÏNE-3

Dans le chapitre 1, nous avons cité plusieurs mutations qui sont responsables de l'inactivation de l'autolyse de la calpaïne-3 car elles sont situées dans le domaine CysPe, perturbant ainsi son activité protéolytique. Nous pouvons supposer que les niveaux protéiques de la calpaïne-3 ne sont pas forcément impactés par ce type de mutation.

- La mutation **p.Val354Gly** a été retrouvée chez un patient au sein de notre cohorte, portée à l'état hétérozygote (HE). Le profil protéique de ce patient présentait une diminution de la quantité de p94.
- La mutation **p.Val605Leu** a été retrouvée une fois mais l'analyse de la calpaïne-3 n'avait pas été effectuée, nous n'avons donc pas d'information sur son expression.
- La mutation **p.Ser606Leu** a été retrouvée 3 fois : une seule analyse de la calpaïne-3 a été réalisée qui présentait un niveau normal de p94 dans le cas de ce patient porteur de la mutation à l'état hétérozygote composite.

ii. ACTIVATION EXTRAMOLECULAIRE : DOMAINE IS1.

Aucune mutation de ce genre décrite dans le chapitre 1 n'a été identifiée au sein de notre cohorte.

iii. ACCELERATION DE L'AUTOLYSE

Dans le chapitre 1, nous avons cité plusieurs mutations qui sont responsables de l'accélération de l'autolyse de la calpaïne-3, perturbant probablement son activité protéolytique et supposant que ses niveaux en sont diminués lors des analyses en laboratoire.

- La mutation **p.Ser744Gly**, décrite comme accélérant l'autolyse, a été identifiée 5 fois. Chez un patient porteur de mutations hétérozygotes composites c.946-1G>A + p.Ile556Ile, le profil protéique est une p94 absente, N31k diminué et C58k diminué.

- La mutation **p.Arg769Gln** a été identifiée chez deux patients dont un cas de patient porteur de mutations hétérozygotes composites p.Met248Arg dont le profil protéique présentait une diminution de p94 et N31k mais l'absence de C58k.
- La mutation **p.Arg769Pro** a été retrouvée chez deux patients à l'état hétérozygote composite mais le profil protéique n'a pas été réalisé.
- La mutation **p.Thr417Met** a été la mutation la plus identifiée, pour un total de 13 patients. Dans un cas, elle était associée à la mutation p.Arg788delinsSerfsX14, portées à l'état hétérozygote composite dont le profil protéique présentait une expression normale de p94 mais l'absence des deux fragments autolytiques. Dans un autre cas, elle était associée à la mutation p.Pro20Gln56X, portées à l'état HE composite dont le profil protéique présentait une diminution de la quantité de p94 et du fragment autolytique C58k mais un niveau normal du fragment autolytique N31k. Pour un troisième patient, cette même p.Thr417Met était portée à l'état hétérozygote composite associée aux mutations p.Arg572Gln + c.1537-40C>G présentait un profil protéique montrant une diminution de la quantité de p94 et des deux fragments autolytiques. En revanche, chez un patient porteur de mutations HE composites, cette mutation associée à p.Pro20GlnfsX37 n'impactait pas la quantité de p94 et ces fragments autolytiques. Pour finir, dans la littérature, cette mutation a été décrite à l'état homozygote (HO) mais elle n'a pas été identifiée comme telle au sein de notre cohorte.
- La mutation **p.Glu435Lys** a été retrouvée chez deux patients à l'état HE composite dont 1 fois associée à d'autres mutations avec un profil protéique normal.
- La mutation **p.Arg448Gly** a été identifiée chez six patients dont 1 fois à l'état HE composite associée à p.Thr559AsnfsX33 dont le profil protéique montrait une absence totale de p94 et de ses deux fragments autolytiques. Dans un autre cas, cette mutation était associée à la mutation p.Gly234Arg dont le profil montrait l'absence de p94 et du fragment autolytique N31k et un niveau de C58k à l'état de traces. Dans un dernier cas, nous avons retrouvé cette mutation portée à l'état HO mais malheureusement le profil protéique n'avait pas été réalisé.
- Pour finir, la mutation **p.Arg448Cys** a été retrouvée chez deux patients dont un patient porteur de la mutation à l'état HO et présentant une absence totale de p94 et des deux fragments autolytiques.

iv. RECONNAISSANCE DU SUBSTRAT

Dans le chapitre 1, nous avons aussi cité plusieurs mutations qui sont responsables d'anomalie de la reconnaissance des substrats par la calpaïne-3, perturbant ainsi son activité protéolytique sans pour autant en diminuer son expression.

- La mutation **p.Arg490Trp** est connue pour être aussi responsable d'un défaut de reconnaissance des substrats en plus d'une accélération de l'autolyse. Nous l'avons identifiée chez cinq patients, porteurs de cette mutation associée à d'autres mutations à l'état HE composite. Pour deux d'entre eux dont le profil protéique a été réalisé, les niveaux de la calpaïne-3 et de ses deux fragments autolytiques étaient normaux.
- La mutation **p.Arg490Gln** est fréquente car elle a été retrouvée chez quinze patients. Associée à d'autres mutations portées à l'état HE composite, les profils protéiques de 4 patients ont présenté des niveaux normaux de la calpaïne-3 et de ses deux fragments autolytiques. En revanche, chez un patient qui portait cette même mutation à l'état HE et associée à une mutation p.Ala236Thr à l'état HO, le profil a démontré

un effondrement de la quantité de p94, N31k et C58k. Dans un autre cas, un patient étant porteur de cette mutation à l'état HE, ainsi que de la mutation p.Phe731_Lys732>ThrfsX44 à l'état HE composite et de la mutation p.Ala236Thr a montré un profil normal pour p94, diminué pour le fragment autolytique N31k et absent pour le fragment C58k. Un dernier patient présentait cette mutation associée à la mutation c.1194-9A>G qui a un effet sur l'épissage et dont le profil protéique indiquait un niveau normal de p94 et N31k mais diminué pour le fragment autolytique C58k.

- La mutation **p.Arg572Gly** citée elle aussi dans le chapitre 1 a été retrouvée chez un seul patient mais l'étude protéique n'a pas été réalisée.
- Quant à la mutation **p.Arg572Trp**, elle a été identifiée chez six patients dont un patient porteur de cette mutation et de la mutation p.Gly441Asp à l'état HE composite présentait une quantité diminuée pour p94 et le fragment autolytique N31k et une absence pour le fragment C58k.
- Pour finir, la mutation **p.Arg572Gln** connue pour entraîner un déficit de l'activité protéolytique a été identifiée chez cinq patients : un patient portait cette mutation à l'état HO avec un niveau protéique diminué pour la calpaïne-3 et ses deux fragments autolytiques. Chez un autre patient porteur de cette mutation associée aux mutations p.Thr417Met et c.1537-40C>G à l'état HE composite, le profil a montré une diminution de la calpaïne-3 et des fragments autolytiques.

v. FONCTIONS NON PROTEOLYTIQUES

Pour conclure cette partie, nous avons cité la mutation **p.Ala702Val** comme altérant les fonctions non protéolytiques de la calpaïne-3, tout en préservant ses fonctions protéolytiques.

Celle-ci a été retrouvée chez deux patients : un patient porteur de cette mutation associée à la mutation p.Lys613ArgfsX49 à l'état HE composite dont le profil protéique était normal ; et chez un patient porteur de cette mutation à l'état HO mais dont les études protéiques n'ont pas été réalisées.

3. ANALYSES DES VARIANTS EXONIQUES CAPN3

Nous avons procédé à une analyse *in silico* des variants exoniques du gène *CAPN3* identifiés au sein de notre cohorte afin d'en déterminer leur nature, leur pathogénicité et leur impact sur la protéine grâce au logiciel d'analyse en ligne UMD Predictor (<http://www.umd-predictor.eu/>). La liste de tous ces variants exoniques sont présentés en annexe 8, ainsi que les résultats de UMD Predictor, l'impact sur la protéine et le domaine protéique concernée, la nature de la mutation et l'évènement mutationnel associé.

Le variant exonique pathogène le plus retrouvé était la mutation **c.550delA**, identifiée chez 26 patients. Ensuite, nous avons retrouvé chez 16 patients la mutation **c.2362_2363delAGinsTCATCT** et pour finir, la mutation **c.1469G>A** identifiée chez 15 patients.

Quinze variants exoniques ont été classés en polymorphisme ou polymorphisme probable. Ils avaient été considérés comme non pathogènes mais intégrés à la liste car associés à d'autres mutations pathogènes au sein de la cohorte.

Nous avons réparti les 152 variants exoniques identifiés sur le gène *CAPN3* selon leur pathogénicité et leur distribution sur le gène, dont les résultats sont présentés ci-après (FIG COHORTE 3).

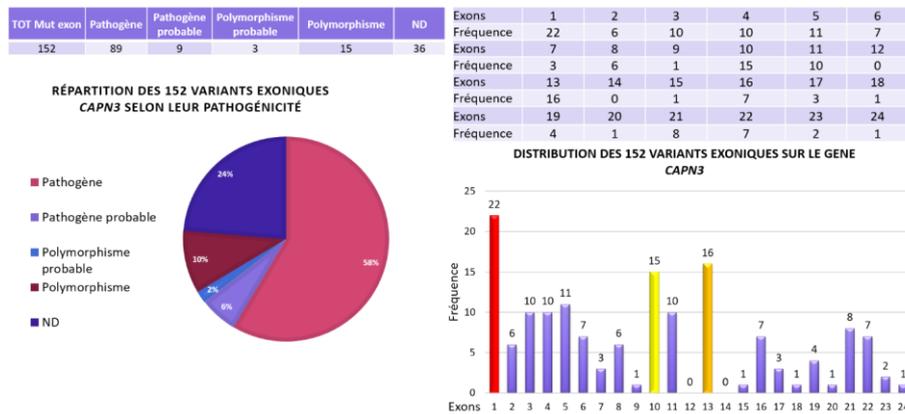


FIG COHORTE 3 : Répartition des 152 variants exoniques *CAPN3* selon leur pathogénicité et leur distribution sur le gène

Concernant la pathogénicité des variants exoniques, selon UMD Predictor, **58%** des variants exoniques *CAPN3* identifiés étaient indiqués comme **pathogènes** et **6%** des variants exoniques comme **pathogènes probables**. Il était intéressant de noter que la pathogénicité de **24%** des variants exoniques était restée **indéterminée**. **10%** des variants exoniques étaient considérés comme **polymorphisme** et **2%** comme **polymorphisme probable**.

Ensuite, nous avons constaté que l'exon 1 était l'exon le plus affecté par les mutations, présentant 22 variants différents ; puis l'exon 13 avec 16 variants différents et enfin l'exon 10, avec 15 variants différents. Nous avons pu faire un lien avec les analyses des profils protéiques de la calpaïne-3 réalisés pour certains patients de la cohorte : le fragment autolytique N31k était diminué ou absent, codé par les exons 1 à 6, ainsi que le fragment C58k qui avait un niveau le plus souvent diminué, codé par les exons 7 à 24. C'est pourquoi nous avons observé que p94 s'en retrouvait plus fréquemment diminuée.

Toutefois, nous avons jugé pertinent de procéder à l'analyse de la densité des mutations selon la taille des exons. Les résultats obtenus sont présentés ci-après (FIG COHORTE 4).

Exons	1	2	3	4	5	6
Fréquence	22	6	10	10	11	7
Taille exon (pb)	309	70	119	134	169	144
Densité (nb var/pb)	0,071	0,086	0,084	0,075	0,065	0,049
Exons	7	8	9	10	11	12
Fréquence	3	6	1	15	10	0
Taille exon (pb)	84	86	78	161	170	12
Densité (nb var/pb)	0,036	0,070	0,013	0,093	0,059	0,000
Exons	13	14	15	16	17	18
Fréquence	16	0	1	7	3	1
Taille exon (pb)	209	37	18	114	78	58
Densité (nb var/pb)	0,077	0,000	0,056	0,061	0,038	0,017
Exons	19	20	21	22	23	24
Fréquence	4	1	8	7	2	1
Taille exon (pb)	65	69	79	117	59	27
Densité (nb var/pb)	0,062	0,014	0,101	0,060	0,034	0,037

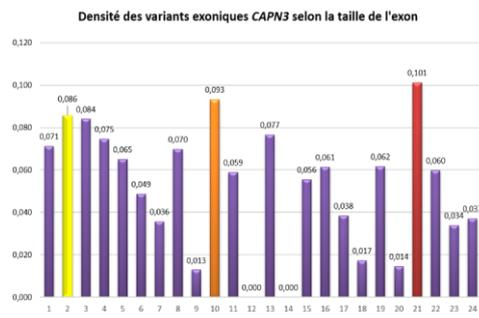


FIG COHORTE 4 : Densité des variants exoniques *CAPN3*

En effet, lorsque nous avons analysé la densité des variants exoniques, nous avons constaté que l'exon 21 possédait la densité la plus importante de mutations (**0,101 variants/pb** pour une taille de 79pb) suivi par l'exon 10 (**0,093 variants/pb** pour une taille de 161pb) et enfin l'exon 2 (**0,086 variants/pb** pour une taille de 70pb). *A contrario*, l'exon 1 qui est le plus grand avec 309pb avait une densité de seulement **0,071** ; et parmi les plus petits exons ; l'exon 12 avec 12pb et l'exon 14 avec 37pb présentaient une densité nulle et l'exon 15 avec 18pb présentait une densité faible, avec 0,056.

En prenant en compte les résultats obtenus pour la fréquence des mutations, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de lien direct entre la taille de l'exon et le nombre de mutations présentes sur cet exon. Nous pouvons supposer que certains exons seraient plus sensibles aux mutations, potentiellement par la présence de sites sensibles, tandis que d'autres seraient plus sujets à des variants type polymorphisme ou présentant des zones peu mutables (Cummings et al., 2017).

Par la suite, nous avons déterminé la nature de ces variants exoniques, ainsi que leur impact probable sur la transcription et la traduction de la protéine calpaïne-3. Les résultats sont présentés ci-dessous (FIG COHORTE 5).

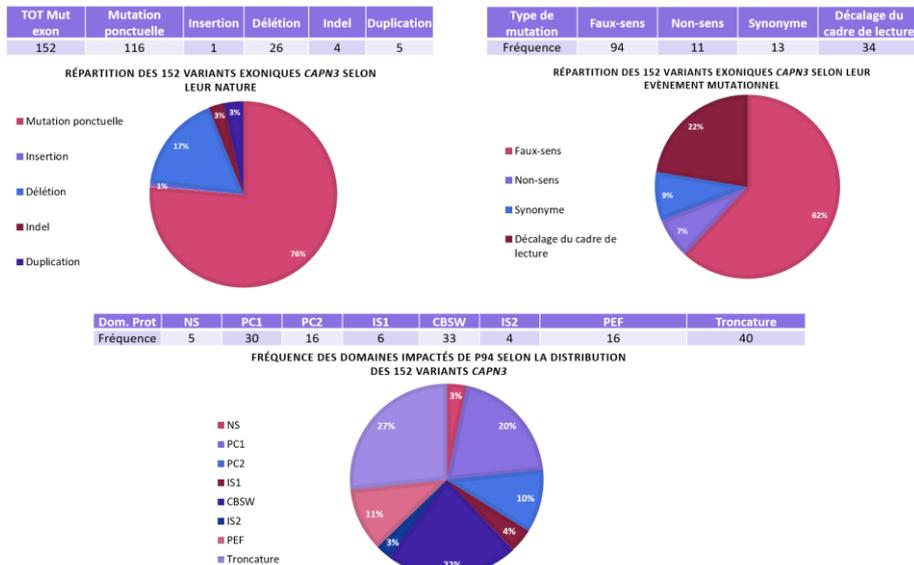


FIG COHORTE 5 : Nature des variants exoniques, leur probable impact sur la transcription du gène *CAPN3* et la traduction de la calpaïne-3 selon les domaines protéiques concernés

Premièrement, nous avons observé que la **mutation ponctuelle** était très majoritairement retrouvée au sein de notre cohorte, représentant **76%** des 152 variants exoniques identifiés. Suivie par les **délétions** qui représentaient **17%** des variants exoniques.

Concernant les mécanismes pathologiques de ces variants exoniques, **62%** d'entre eux étaient des **mutations faux-sens** qui vont donc entraîner généralement le remplacement d'un acide aminé ; suivies par des mutations entraînant un **décalage du cadre de lecture** pour **22%** des variants exoniques identifiés. Il faut aussi ici noter que dans certains cas, les mutations faux sens vont avoir un effet sur l'épissage et donc entraîner les formes anormales d'ARNm (Kergourlay et al.).

Pour finir, lorsque nous avons analysé l'impact des variants exoniques sur la traduction de la calpaïne-3, nous avons observé que majoritairement, les mutations pourraient entraîner la production d'une protéine p94 tronquée dans **27%** des cas à la suite de l'apparition d'un codon stop. Concernant les domaines protéiques les plus impactés par les variants exoniques, nous avons constaté que c'étaient les domaines CBSW dans **22%** des cas, PC1 dans **20%** des cas et PEF dans **11%** des cas qui étaient concernés. Tandis que les domaines NS, IS1 et IS2 étaient peu concernés par ces modifications mutationnelles (respectivement **3%**, **4%** et **3%**), probablement dû à leur petite taille. De ce fait, nous pouvons nous attendre à ce que ces mutations perturbent principalement l'activité protéolytique de la calpaïne-3 : défaut de la fixation du sodium (domaine PC1) ; de la reconnaissance du substrat (domaine CBSW et PEF) ; de la fixation du calcium et de la dimérisation (domaine PEF). L'activité autolytique serait quant à elle moins affectée (domaines IS1 et IS2).

4. ANALYSES DES VARIANTS INTRONIQUES DU GENE CAPN3

Tout comme pour les variants exoniques, nous avons aussi procédé à une analyse *in silico* des variants introniques du gène *CAPN3* identifiés au sein de notre cohorte afin d'en déterminer leur nature et leur impact sur l'épissage du gène *CAPN3* grâce au logiciel d'analyse en ligne Human Splicing Finder 3.1 développé par l'U1251 (<http://www.umd.be/HSF3/index.html>). La liste de tous ces variants introniques sont présentés en annexe 8, ainsi que les résultats de HSF, l'évènement mutationnel identifié, la nature de la mutation, les introns concernés et le statut HO ou HE.

Le variant intronique pathogène le plus retrouvé était la mutation **c.946-1G>A**, identifiée chez 23 patients. Ensuite, nous avons retrouvé chez 10 patients la mutation **c.802-9G>A** et pour finir, la mutation **c.1746-20C>G** identifiée chez 8 patients.

Dix-huit variants introniques ont été classés non pathogènes mais intégrés à la liste car ils étaient associés à d'autres mutations pathogènes au sein de la cohorte.

Nous avons réparti les 59 variants introniques identifiés sur le gène *CAPN3* selon leur effet sur l'épissage et leur distribution sur le gène *CAPN3* dont les résultats sont présentés ci-après (FIG COHORTE 6).



FIG COHORTE 6 : Classification des variants introniques selon leur impact sur l'épissage et leur fréquence selon l'intron concerné

Majoritairement, nous avons constaté que les variants introniques avaient comme impact délétère sur l'épissage une **altération d'un site accepteur** pour 29% des variants identifiés, puis une **altération de site donneur** pour 17% d'entre eux. Nous avons noté que pour 27% d'entre eux, leur effet sur l'épissage était **faible** (altération ou création d'un site ISS intronique) et 19% n'avaient **aucun effet**. Pour finir, 3% restaient avec un **effet indéterminé** sur l'épissage.

Concernant les introns les plus impactés par les mutations, nous avons constaté qu'il s'agissait de l'intron 12 puis des introns 9, 10 et 17.

Ensuite, nous avons classé les variants introniques selon l'évènement mutationnel associé et la nature de la mutation. Les résultats sont présentés ci-après (FIG COHORTE 7).

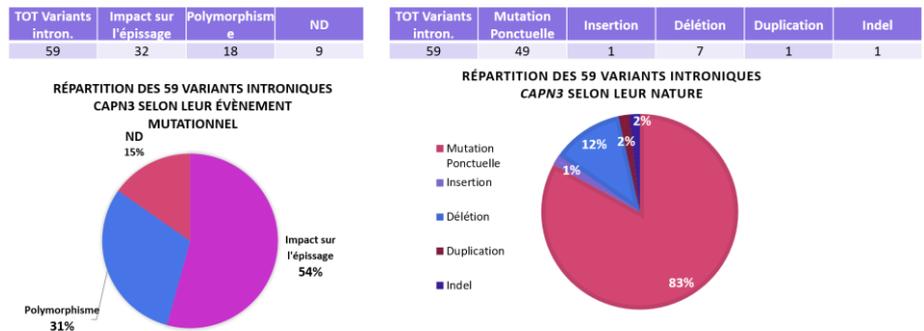


FIG COHORTE 7 : Evènement mutationnel et nature des mutations des variants introniques du gène *CAPN3*

Les évènements mutationnels (impact sur l'épissage, polymorphisme ou non déterminé ND) étaient renseignés par les cliniciens : nous avons constaté que **54%** des 59 variants introniques identifiés ont été classés comme ayant un **impact sur l'épissage**. De plus, l'analyse *in silico* HSF a déterminé que **48%** (somme des résultats « altération de site donneur » ou « accepteur » ou d'un « site de branchement ») avaient un **effet délétère** et **3%** un **effet modéré**, un total proche de ce qui a été déterminé par les cliniciens. En revanche, **31%** des variants ont été classés en **polymorphisme** par les cliniciens tandis que l'analyse HSF a classé **19%** des variants **sans effet**. Nous avons pu toutefois intégrer les 27% ayant un effet faible à ce quota qui nous rapprochait de la classification par les cliniciens. En revanche, le taux de variants introniques avec un effet indéterminé était plus faible après l'analyse HSF, passant de 15% à 3%. Nous avons donc constaté que l'analyse *in silico* était très proche de ce qui a été rapporté par les cliniciens s'appuyant sur leur expertise et la littérature scientifique concernant les variants introniques étudiés et déjà décrits.

Pour finir, en procédant à la répartition des variants introniques selon leur nature, nous avons remarqué que ce sont majoritairement des mutations ponctuelles (83%) suivies par les délétions (12%). A noter que ces résultats concernaient principalement des variants non pathogènes associés à des mutations pathogènes. Le variant pathogène le plus fréquent autre qu'une mutation ponctuelle était l'insertion-délétion **c.309+31+32delTTinsGTC** (retrouvé 5 fois).

B. CONCLUSION

L'analyse effectuée sur cette cohorte de patients LGMD2A nous a permis de constater que le profil type d'un patient souffrant de calpainopathie avait une apparition des premiers symptômes de la maladie lors de l'enfance avant l'âge de 13 ans, puis cette maladie évoluait progressivement tout au long de leur vie, les cas adultes représentant la majorité des patients suivis à ce jour. De plus, nous avons montré que la LGMD2A était principalement causée par plusieurs mutations hétérozygotes composites réparties sur le gène *CAPN3* plutôt qu'une unique mutation homozygote. Ces mutations pouvaient avoir plusieurs impacts sur la calpaïne-3 : soit diminuer son niveau protéique ou celui d'un ou des deux fragments autolytiques, soit potentiellement affecter son activité autolytique, protéolytique ou non-protéolytique sans pour autant en diminuer sa quantité. Ces mutations concernaient à la fois les exons et les introns : le variant exonique pathogène le plus fréquent était **c.550delA**, décrit dans la littérature comme le plus répandu dans les populations européennes ; et le variant intronique le plus fréquent était **c.946-1G>A**. En revanche, nous avons observé que le nombre de mutation affectant un exon était indépendant de la taille de celui-ci et que certains exons semblaient plus sensibles à un événement mutationnel, peut-être lié à la présence de site sensible. Et pour les variants exoniques ou introniques, ces événements mutationnels étaient majoritairement des mutations ponctuelles. Quant aux variants introniques pathogènes, ceux-ci sembleraient principalement altérer des sites accepteur, donneur ou un site de branchement au moment de l'épissage. Concernant la mutation dominante portée à l'état HE **c.643_663del21** rapportée par Vissing et al., celle-ci n'a pas été retrouvée au sein de notre cohorte. De plus, cette mutation a fait l'objet de controverse suite à un article suggérant une alternative possible d'une maladie digénique (Sáenz and López de Munain, 2017). Mais récemment, une nouvelle étude de séquençage à haut débit concernant 3 nouvelles familles portant cette même mutation a écarté cette possibilité de maladie digénique (MARTINEZ-THOMPSON et al., 2018). Le débat reste donc encore ouvert sur une possible transmission autosomique dominante de la calpainopathie.

En reprenant l'ensemble de ces données et de ces résultats, nous avons pu constater que la calpainopathie était une maladie complexe du point de vue génétique, de par la présence de nombreux cas de patients porteurs de mutations hétérozygotes composites réparties sur le gène *CAPN3*, et d'autre part par le fait qu'il n'y a pas seulement l'expression de la calpaïne-3 qui pouvait être affectée mais aussi ses fonctions protéolytique et non-protéolytique. C'est pourquoi nous suggérons que dans le cadre d'une thérapie génique, il serait plus judicieux de développer des outils qui puissent remplacer une grande partie du gène du fait de la présence de plusieurs mutations chez un même patient, ou bien de pouvoir compenser une activité défaillante de la calpaïne-3. La variété des mutations et leur mécanisme rendant plus complexe une approche basée sur les mutations individuelles. Cela permettra de pouvoir proposer une thérapie à la majorité des patients souffrant de LGMD2A avec un même système de soin curatif comme la thérapie génique par exemple. Ainsi, nos travaux de recherche se sont dirigés vers ces éventualités et nous avons présentés nos travaux et résultats dans le chapitre 4.

CHAPITRE 4 : EVALUATIONS D'APPROCHES THERAPEUTIQUES POUR LA CALPAÏNOPATHIE

Dans le chapitre 3 de ce mémoire, nous avons analysé une cohorte de 336 patients atteints de dystrophie musculaire des ceintures de type 2A. Grâce à ces résultats, nous avons jugé pertinent de développer des outils de thérapie et d'évaluer leur efficacité en agissant soit sur l'ARNm de la calpaïne-3, soit au niveau de l'activité protéique de la calpaïne-3. Ainsi, nous avons été amenés à tester deux outils précis de thérapie génique pouvant répondre à cette problématique et d'en évaluer leur efficacité sur des cellules musculaires humaines dont le gène *CAPN3* était non muté ou issues de patients porteurs de mutations sur le gène *CAPN3*.

D'une part, nous avons développé un outil de thérapie génique s'appuyant sur la capacité de la calpaïne-3 de se scinder en deux fragments autolytiques N-terminal (N31k) et C-terminal (C58k) dans le but de créer un nouveau dimère actif et ainsi remédier à des défauts fonctionnels de la protéine occasionnés par une ou des mutations dans le gène *CAPN3* (Partie A) ; d'autre part, en nous appuyant sur une technologie de thérapie génique en très fort développement actuellement, la technologie SMaRT, qui permet d'agir directement sur l'épissage d'un gène et éliminer les mutations affectant ce même gène en « déviant » la machinerie d'épissage vers une portion exogène du même gène dépourvu de toute mutation (Partie B).

Au fil des paragraphes qui vont suivre, nous allons donc vous présenter ces deux outils, leur conception et développement, puis vous présenter les travaux effectués et les premiers résultats obtenus.

A. OUTIL DEVELOPPE SUR LE PRINCIPE DU PHENOMENE IMOC DE LA CALPAÏNE-3

I. DECOUVERTE DE LA COMPLEMENTATION INTERMOLECULAIRE DE LA CALPAÏNE-3

En 2011, Sáenz et collaborateurs ont décrit deux cas de patients porteurs d'une même combinaison de mutations hétérozygotes composites (pG222R/pR748Q) présentant des symptômes étonnamment bénins comparés à deux patients porteurs de chacune de ces mutations faux-sens à l'état homozygote, dont le phénotype associé était sévère. Leurs travaux ont mis en évidence que le phénotype bénin observé avec la combinaison pG222R et pR748Q pouvait avoir un effet compensatoire à l'état hétérozygote des mutations ; les deux mutations possédant des effets différents sur l'activité protéolytique de la calpaïne-3 suggéraient une « complémentation moléculaire » expliquée par différentes théories en partie présentée par Sáenz et collaborateurs et repris ci-dessous (Sáenz et al., 2011).

A ce stade, il est important de rappeler que la calpaïne-3 est une protéase de la famille des calpaïnes, exprimée majoritairement dans le muscle squelettique et possédant une activité autolytique inhabituellement rapide et exhaustive. Les mutations dans le gène *CAPN3* influençant ses fonctions protéase sont responsables de la LGMD2A mais le lien entre l'activité autolytique de la calpaïne-3 et sa fonction enzymatique *in vivo* demeurent obscurs. Toutefois, en se basant sur les travaux déjà menés auprès de Sáenz en 2011, Ono et collaborateurs ont démontré en 2014 que l'activité protéase de la calpaïne-3 était reconstituée par une complémentation intermoléculaire (iMOC) entre ses deux fragments autolytiques. De plus, ils ont mis en évidence que l'activité d'une calpaïne-3 intégrale portant des mutations présentes

sur ses sites actifs pouvait être restaurée par iMOC avec des fragments autolytiques contenant la séquence d'acides aminés non mutés. Ainsi, ces résultats ont montré que la calpaïne-3 sauvage pouvait être reconstituée par iMOC à partir de deux calpaïne-3 porteuses de mutations différentes mais complémentaires. Pour finir, ces découvertes sur le « sauvetage » de l'activité de la protéine médiée par iMOC impliquaient un nouveau mécanisme à prendre en compte pour faire le lien entre génotype et phénotype de la LGMD2A (Ono et al., 2014) (TABLEAU Principe iMOC 1).

(i) Génotype du patient LGMD2A	(ii) Phénotype de la maladie	(iii) Mutant CAPN3 exprimé	(iv) Activité autolytique	(v) Mutation du fragment autolytique	
				N31k	C58k
Homozygote	G222R	CAPN3:G222R	+	+	-
	R748Q	CAPN3:R748Q	+++	-	+
Hétérozygote	G222R & R748Q	CAPN3:G222R & CAPN3:R748Q	++++*	+	-
				-	+

TABLEAU Principe iMOC 1: Tableau explicatif de la relation génotype-phénotype-activité autolytique de la calpaïne-3 chez des patients LGMD2A (d'après Ono et col., 2014)

II. MECANISME D'INACTIVATION ET D'ACTIVATION DE LA CALPAÏNE-3

Pour aller plus loin, en 2016, Ono et collaborateurs ont proposé que des mécanismes d'inactivation et d'activation, incluant ce phénomène étonnant de la complémentation intermoléculaire (iMOC), régulaient l'activité de la calpaïne-3 (Ono et al., 2016). A partir de leurs différents travaux, voici ce que nous pouvons décrire du fonctionnement de la calpaïne-3 (FIG Principe iMOC 1).

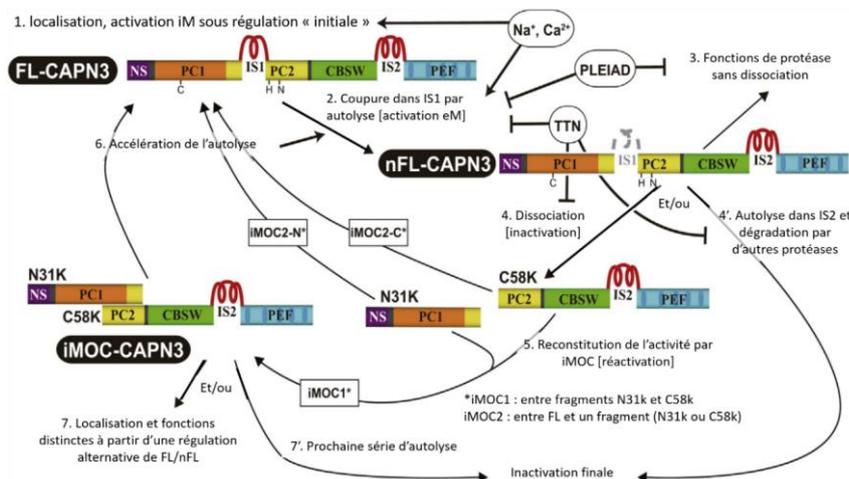


FIG Principe iMOC 1: Mécanismes d'activation et inactivation de la calpaïne-3 (d'après Ono et col., 2016)

- **Étape 1 :** activation intramoléculaire (iM) à la suite de la fixation de calcium Ca^{2+} ou de sodium Na^{+} sur la calpaïne-3 entière (FL-CAPN3). La protéine est ainsi capable d'hydrolyser des liaisons peptidiques. Cependant, l'encombrement stérique, avec la partie N terminale par exemple, empêche la calpaïne-3 de protéolyser ses substrats.
- **Étape 2 :** activation extramoléculaire (eM) à la suite de l'autolyse du domaine IS1 de la calpaïne-3. Les sites autolytiques du domaine IS1 sont localisés après Tyr274, Asn296 et Tyr322. Cette autolyse ne cause pas la dissociation de la protéine.
- **Étape 3 :** La calpaïne-3 autolysée (nFL-CAPN3) est activée et va ainsi pouvoir assurer ses fonctions de protéase, sans dissociation particulière, en pouvant entrer en contact avec ses substrats.
- **Étape 4 :** La dissociation et inactivation de la calpaïne-3 sont provoquées par la protéolyse du domaine IS2. Cette protéolyse peut être inhibée par la liaison de la calpaïne-3 avec la région N2A de la titine, empêchant la dissociation de la protéine en fragments autolytiques.
- **Étape 4' :** La dissociation des domaines de la calpaïne-3 est provoquée par la protéolyse du domaine IS2, entraînant son inactivation définitive et sa dégradation par d'autres protéases.

Dans quelques cas, les deux fragments C58k (région C-terminale de 58kDa) et N31k (région N-terminale de 31kDa) de la calpaïne-3 seulement clivés dans le domaine IS1 se dissocient et peuvent devenir actifs par un mécanisme spécifique de la calpaïne-3 appelé la compensation intramoléculaire (iMOC).

- **Étape 5 à 7' :** De novo, les fragments autolytiques provenant de deux calpaïne-3 distinctes peuvent reconstituer un domaine de protéase principal actif. Cette étape va permettre soit d'accélérer l'autolyse de la FL-CAPN3 (**étape 6**) par l'association du fragment autolytique N31k ou C58k avec la FL-CAPN3 (iMOC 2) ; soit deux fragments autolytiques N31k et C58k vont se dimériser pour former la iMOC-CAPN3 (iMOC1) afin de reconstituer l'activité de la calpaïne-3. Cette iMOC-CAPN3 va posséder une localisation et des fonctions distinctes de la FL-CAPN3 à partir d'une régulation alternative de FL/nFL-CAPN3 (**étape 7**). Il s'en suivra une série d'autolyse de la iMOC-CAPN3 pour l'inactiver définitivement quand cela sera nécessaire (**étape 7'**).

Il est important de rappeler que la calpaïne-3 possède des caractéristiques peu communes à la famille des calpaïnes, comme son extrême instabilité et la rapidité de son autodégradation et des propriétés incluant ce phénomène iMOC dont les significations physiologiques n'ont pas encore été établies et restent à ce jour un sujet de recherche passionnant.

III. HYPOTHESE DE TRAVAIL

En se basant sur les données cliniques indiquant une sévérité moindre du phénotype LGMD2A grâce à la complémentarité intermoléculaire naturelle de la calpaïne-3 lorsque le gène *CAPN3* contient des mutations hétérozygotes composites sur chaque séquence codante des fragments autolytiques N31k et C58k ; ainsi qu'en se basant sur les principes d'inactivation et d'activation de la calpaïne-3 médiées par iMOC, nous avons envisagé d'appliquer ce principe pour une approche thérapeutique.

En effet, en utilisant uniquement l'expression à partir d'un vecteur portant la séquence du fragment autolytique C58k, nous avons voulu savoir si d'une part, nous pouvions produire par les lignées immortalisées de myoblastes humains LGMD2A une protéine calpaïne-3 issue de l'association du fragment autolytique N31k endogène et du fragment autolytique exogène C58k et possédant une activité protéolytique ; et d'autre part, si la présence de cette protéine améliorerait le phénotype de ces mêmes cellules mutées lorsqu'elles se différenciaient en myotubes. Nous allons exposer l'avancée de nos travaux dans les paragraphes qui suivent.

IV. MATERIELS ET METHODES

1. LIGNEES IMMORTALISEES DES MYOBLASTES HUMAINS

i. CARACTERISTIQUES DES LIGNEES

Les quatre lignées immortalisées de myoblastes humains utilisées pour ces travaux ont été généreusement offertes par le Dr Vincent MOULY, Institut de Myologie (Paris). L'isolation et l'immortalisation des myoblastes issus de biopsie musculaire de patients sains ou atteints de LGMD2A ont été obtenues selon les démarches décrites dans la littérature (Mamchaoui et al., 2011).

Les lignées immortalisées de myoblastes humains possédaient les caractéristiques suivantes :

- **Lignée AB678C53Q** : myoblastes issus de biopsie de **quadriceps** d'une personne saine âgée de **53 ans**. Cette lignée a servi de comparaison en tant que **contrôle de la lignée 918***.
- **Lignée 7304** : myoblastes issus de biopsie de **quadriceps** d'une personne saine âgée de **19 ans**. Cette lignée a servi de comparaison en tant que **contrôle de la lignée mutée KM900***.
- **Lignée KM900*** : myoblastes issus de biopsie de **muscle jumeau** d'un patient âgé de **15 ans souffrant de LGMD2A** avec **mutation homozygote dans l'exon 13 c.1699G>T (p.Gly767Trp)**.
- **Lignée 918*** : myoblastes issus d'une biopsie de **vastus lateralis** d'un patient âgé de **56 ans souffrant de LGMD2A** avec **mutations hétérozygotes composites dans l'exon 6 c.865C>T (p.Arg289Trp) et l'exon 13 c.1638C>T (p.Arg546Leu)**.

NB : l'astérisque suivant le nom des lignées 918 et KM900 porteuses de mutations sur le gène *CAPN3* indique leur statut « muté » afin d'avoir un repère visuel simple pour la poursuite de la lecture et différencier les lignées contrôle des lignées à tester.

ii. CULTURE DES LIGNEES

Les lignées 7304, AB678C53Q, KM900* et 918* ont été mise en culture dans le milieu Skeletal Muscle Cell Basal Medium (PromoCell) et supplement pack (PromoCell) additionné de 20% SVF (Gibco) et de 1% d'un mélange antibiotique/antimycotique (GE Healthcare).

La différenciation des myoblastes en myotubes a été obtenue à partir des myoblastes en culture arrivés à confluence puis mis en culture dans du milieu DMEM additionné de gentamicine à 50mg/ml (Gibco) et d'insuline humaine à 5µg/ml (Sigma Aldrich).

2. VECTEURS D'EXPRESSION pCMV p94:C58K-EGFP, p94:ΔIS1-EGFP ET p94:C129S-EGFP

i. CONSTRUCTION DES VECTEURS D'EXPRESSION pCMV

Pour permettre l'expression soit du fragment autolytique p94:C58k ; soit d'une forme constitutivement active de la calpaïne-3 p94:ΔIS1, dont la séquence codante a été déléetée de l'exon 6 ; soit d'une forme mutée inactive (c.385T>A) de la calpaïne-3 p94:C129S, incapable d'autolyse (toutes les séquences codantes ont été couplées à celle de la EGFP qui sera traduite en position C-terminale) dans les lignées immortalisées des myoblastes ; la séquence codante correspondante a été sous-clonée à l'aide du kit de mutagénèse dirigée QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis (Agilent) dans le vecteur d'expression pCMV-GFP possédant un promoteur CMV (Addgene) selon les recommandations du fournisseur. Les représentations graphiques des vecteurs d'expression vous sont présentées ci-après (FIG iMOC 1) :

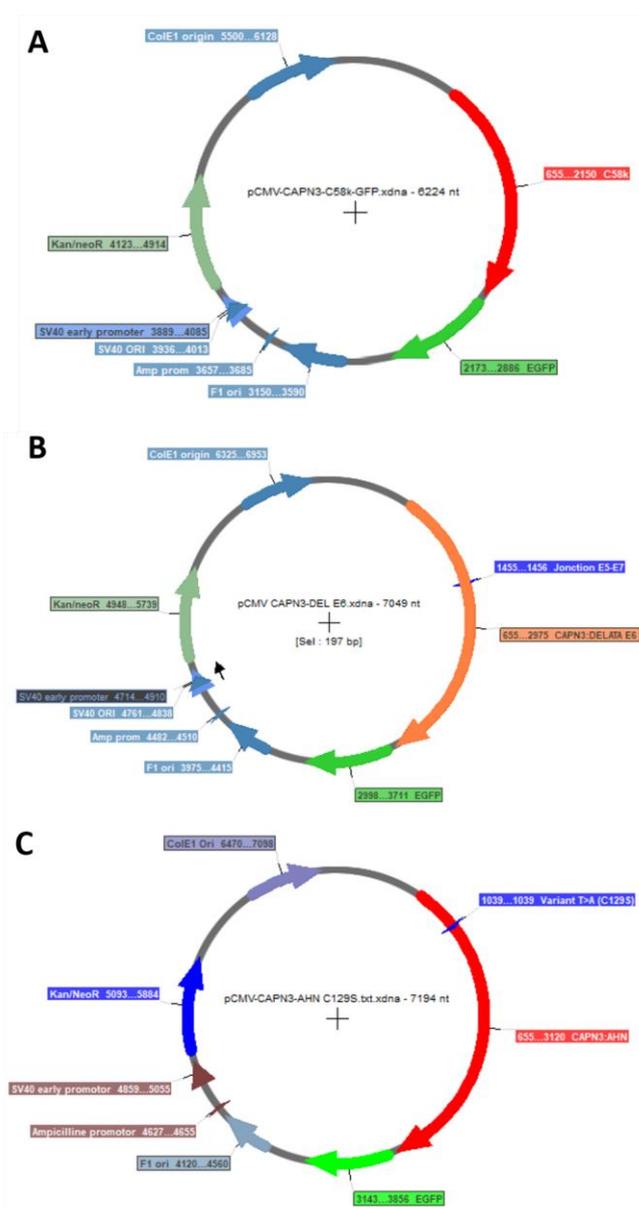


FIG iMOC_1: Représentations graphiques des vecteurs d'expressions pCMV (A) p94:C58k-EGFP, (B) p94:ΔIS1 et (C) p94:C129S.

ii. ISOLATION ET AMPLIFICATION DES VECTEURS D'EXPRESSION

Après traitement de chaque produit de PCR par l'enzyme de digestion DpnI pour éliminer le plasmide matrice, les vecteurs d'expression ont été amplifiés par transformation par choc thermique de bactéries compétentes *E. coli* selon le protocole et les recommandations du fournisseur en utilisant le kit XL10-Gold® Ultracompetent Cells (Stratagene). Un volume de 2µL d'ADNc plasmidique a été utilisé. Après sélection par kanamycine des colonies transformées en milieu LB solide, chaque colonie isolée a été repiquée dans 5mL de milieu LB liquide additionné de kanamycine pour permettre la multiplication des bactéries et amplification du plasmide. Pour purifier et isoler l'ADNc plasmidique d'intérêt, nous avons suivi le protocole et les recommandations du fournisseur en utilisant le kit QIAGEN® Plasmid Midi Kit (réf. 12143, QIAGEN). La quantité d'ADN plasmidique purifié a été dosée avec un lecteur NanoDrop avant utilisation et un séquençage a été effectué pour contrôler les séquences d'intérêt de chaque vecteur d'expression.

iii. TRANSFECTION ET DIFFERENCIATION DES MYOBLASTES HUMAINS

Chaque vecteur d'expression, p94:C58k, p94:ΔIS1 ou p94:C129S, préparé à une quantité finale de 1µg, a été transfecté dans les cellules en utilisant l'agent de transfection FuGeneHD (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Pour chaque condition de transfection, 80 000 cellules de chaque lignée ont été dénombrées et mises en suspension dans du milieu de culture puis réparties dans des puits de 3,5 cm de diamètre. Afin d'améliorer l'efficacité de la transfection, l'ajout du mélange de transfection contenant l'ADNc plasmidique s'est fait immédiatement dans le milieu de culture des cellules encore en suspension. Les cellules ont ensuite été placées dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂.

Pour les analyses en immunofluorescence, le même protocole a été suivi mais une lamelle recouverte de gélatine a été ajoutée au fond de chaque puits de 3,5 cm de diamètre afin d'améliorer l'adhérence des myotubes lors des différentes étapes de préparations des lamelles pour l'immunofluorescence.

3. IMMUNOFLUORESCENCE

Lorsque les myoblastes humains arrivaient à confluence, le milieu de croissance était changé par du milieu de différenciation afin d'obtenir des myotubes au bout de 5 à 6 jours d'incubation à 37°, 5% CO₂. Pour l'analyse en immunofluorescence, chaque puits contenant les lamelles avec myotubes adhérents a été lavé au DPBS1X (Gibco) puis les myotubes ont subi une fixation au paraformaldéhyde à 4% (sigma) pendant 10 min. Les anticorps primaires et secondaires ont été utilisés aux concentrations indiquées ci-dessous, avec une durée d'incubation de 1 heure à température ambiante pour chacun. Les lamelles ont été montées sur lames avec le kit Duolink *In situ* Mounting Medium with DAPI (Sigma) afin de permettre un marquage nucléaire après 15 minutes d'incubation à température ambiante. Les lamelles ont été analysées sur un microscope Axio Imager.Z2 (Zeiss) avec un objectif EC Plan-Neofluar 40x/0,75 M27 avec les filtres excitateurs pour le DAPI à 335-383 nm, GFP à 450-490nm et DsRED à 538-562nm et des temps d'exposition étant respectivement de 48ms, 700ms et 700ms. Les images obtenues ont été traitées informatiquement avec le logiciel ZEN lite (Zeiss) et les analyses quantitatives ont été effectuées avec le logiciel ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016).

4. ETUDE DE PROLIFERATION

80 000 cellules de myoblastes humains ont été mises en culture après avoir subi ou non une transfection avec le vecteur d'expression p94:C58k pour une durée de 24 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures. Après chaque temps de mesure, les myoblastes ont été récoltés dans 300µL et une numération des cellules vivantes de 100µL de chaque échantillon a été effectuée sur le cytomètre en flux Accuri C6 Flow Cytometer. Les données obtenues ont été traitées par le logiciel informatique BD Accuri C6.

5. WESTERN BLOT

Quarante-huit heures après transfection des myoblastes, chaque puits a été lavé au DPBS1X froid puis les cellules ont été suspendues dans du milieu de lyse et d'extraction RIPA (ThermoFisher Scientific) et lysées par sonication. Les protéines totales extraites ont été quantifiées par la méthode BC (acide bicinchoninique et réactif de Cooper).

Pour chaque condition, 20µg de protéines totales extraites ont été séparées par SDS/PAGE et transférées sur membrane nitrocellulose (Amersham). Les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires appropriés durant 2 heures à température ambiante sous agitation, suivie d'une incubation d'une durée d'une heure à température ambiante sous agitation avec les anticorps secondaires appropriés couplés à un fluorochrome (Li-Cor). Le signal émis a été détecté en utilisant un scanner Odyssey (Li-Cor). Les images scannées ont été traitées par le logiciel ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016).

6. ANTICORPS

Les anticorps utilisés pour cette étude étaient un anticorps monoclonal de souris anti-calpaïne-3 région 1-80AA (IF dilution au 1/100 ; réf. E6, Santa Cruz) ; un anticorps monoclonal de chèvre anti-calpaïne-3 région IS2 (IF dilution au 1/100 et WB dilution au 1/500 ; réf. COP-080048, Euromedex) ; un anticorps monoclonal de chèvre anti-EGFP (WB au 1/5000 ; réf. Ab5449, Abcam) ; un anticorps polyclonal d'âne anti-chèvre IRDye® 800CW/680LT (WB dilution au 1/10 000 ; Li-Cor) et anticorps polyclonal d'âne anti-souris IRDye® 800CW/680LT (WB dilution au 1/10 000 ; Li-Cor).

V. RESULTAT

1. ETUDE DE PROLIFERATION DES MYOBLASTES HUMAINS MUTES ET NON MUTEES

Les lignées de myoblastes humains 7304 et AB678C53Q ont été mises en culture sans avoir été transfectées car il s'agit des lignées contrôle, 7304 étant la référence de la lignée KM900* et AB678C53Q étant la référence de la lignée 918*. Les lignées KM900* et 918* ont été mises en culture sans ou avec transfection par le vecteur d'expression pCMV p94:C58k. Chaque lignée, et selon les conditions, ont été récupérées au bout de 24 heures, 48 heures, 72 heures et 96 heures afin de dénombrer les cellules vivantes en cytométrie en flux. Les résultats sont présentés ci-dessous (FIG iMOC 2).

Temps de mesure	7304	KM900* - C58k	KM900* + C58k	Temps de mesure	AB678C53Q	918* - C58k	918* + C58k
24h	23,6%	33,9%	46,7%	24h	29,3%	29,5%	15,4%
48h	46,9%	56,7%	77,2%	48h	51,3%	68,3%	55,1%
72h	71,0%	69,7%	88,8%	72h	64,4%	88,4%	77,2%
96h	40,2%	50,5%	50,1%	96h	55,5%	60,1%	61,4%

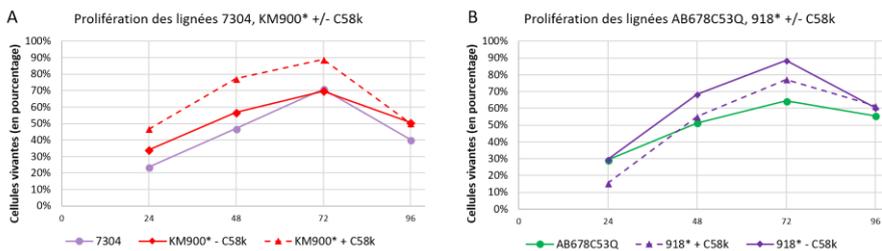


FIG iMOC 2 : Résultats de l'étude de prolifération des lignées de myoblastes humains (A) 7304 et KM900* avec ou sans transfection avec le vecteur d'expression pCMV p94:C58k et des lignées (B) AB678C53Q et 918* avec ou sans transfection avec le vecteur d'expression pCMV p94:C58k

Concernant les lignées 7304 et KM900*, nous avons observé que le profil de prolifération des deux lignées était identique, avec une augmentation du nombre de cellules vivantes entre 24h et 72h (respectivement 23,6% à 71% et 33,9% à 69,7%) puis une diminution à 96h (respectivement 40,2% et 50,5%), en notant que la lignée KM900* comportait plus de cellules vivantes que sa lignée contrôle 7304 à tous les temps avec 10% d'écart (de 33,3% à 50,5%), hormis pour le temps 96 heures avec un taux quasiment identique (69,7%). Après transfection, la lignée KM900* présentait aussi un profil de prolifération identique avec une augmentation du pourcentage de cellules vivantes entre 24h et 72h (46,7% à 88,8%) puis une diminution à 96h pour être au même taux que la lignée contrôle et la lignée non transfectée, à 50,1%. De plus, nous avons noté que le taux de cellules vivantes pour la lignée mutée après transfection était supérieur à la lignée contrôle 7304 ou KM900* non transfectée avec 13% à 20% de cellules vivantes en plus.

Concernant les lignées AB678C53Q et 918*, nous avons observé que le profil de prolifération des deux lignées était identique, avec une augmentation du nombre de cellules vivantes entre 24h et 72h (respectivement 29,3% à 64,4% et 29,5% à 88,4%) puis une diminution à 96h (respectivement 55,5% et 60,1%), en notant que la lignée 918* comportait

plus de cellules vivantes que sa lignée contrôle AB678C53Q à tous les temps avec 5% à 17% d'écart, hormis au temps 24h (29%). Après transfection, la lignée 918* présentait aussi un profil de prolifération identique avec une augmentation du pourcentage de cellules vivantes entre 24h et 72h (15,4% à 77,2%) puis une diminution à 96h pour être très proche de la lignée contrôle AB678C53Q et la lignée non transfectée 918* à 61,4%. En revanche, nous avons noté que le taux de cellules vivantes pour la lignée mutée après transfection était inférieur à la lignée contrôle AB678C53Q ou la lignée 918* non transfectée avec 11% à 14% de cellules vivantes en plus. Ce que nous pouvons expliquer par l'arrivée des cellules à confluence plus tôt que prévu et donc une augmentation de la mortalité.

2. ANALYSE QUALITATIVE DE LA FORMATION DES MYOTUBES PAR IMMUNOFLUORESCENCE

Les lignées contrôle AB678C53Q et 7304, ainsi que les lignées porteuses de mutations sur le gène *CAPN3* KM900* et 918* sans et avec transfection par le vecteur d'expression pCMV p94:C58k-EGFP ont été mises en culture en milieu de différenciation jusqu'à obtenir des myotubes. Nous avons réalisé un protocole pour analyse par immunofluorescence afin de révéler la partie N-terminale et la partie C-terminale de la calpaïne-3 et la protéine EGFP fusionnée au fragment autolytique C58k issue de l'expression du vecteur pCMV p94:C58k-EGFP.

Après observations et prises d'image des myotubes de chaque lignée fixée sur lames d'immunofluorescence sous microscopie, nous avons mesuré dans un premier temps la largeur maximale des myotubes formés pour les différentes lignées AB678C53Q, 7304, KM900* et 918*. Les résultats sont présentés ci-dessous (FIG iMOC 3).

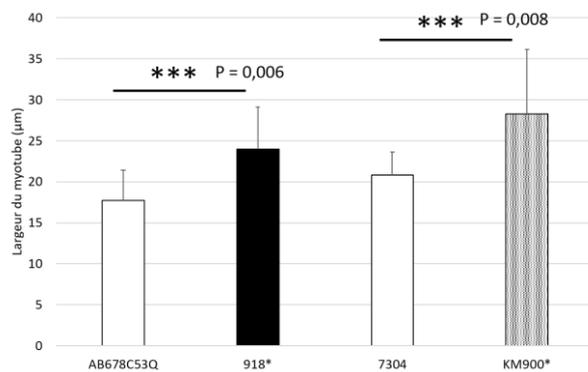


FIG iMOC 3 : Représentation graphique de la largeur maximale moyenne des myotubes issus de la différenciation des lignées de myoblastes humains non mutées AB678C53Q et 7304 et des myoblastes humains mutés 918* et KM900*.

Nous avons constaté que la largeur maximale moyenne des myotubes des deux lignées 918* (avec 24 μ m) et KM900* (28 μ m) étaient significativement plus importantes que celles de leur lignée contrôle respective AB678C53Q (avec 18 μ m, $p=0,006$) et 7304 (avec 21 μ m, $p=0,008$).

Ensuite, nous avons effectué des observations qualitatives à partir des mêmes lames de myotubes de chaque lignée de myoblastes humains pour déterminer l'expression et la localisation de la calpaïne-3 selon si elle était détectée via sa région N-terminale ou sa région C-terminale. Les résultats sont présentés ci-après (FIG iMOC 4).

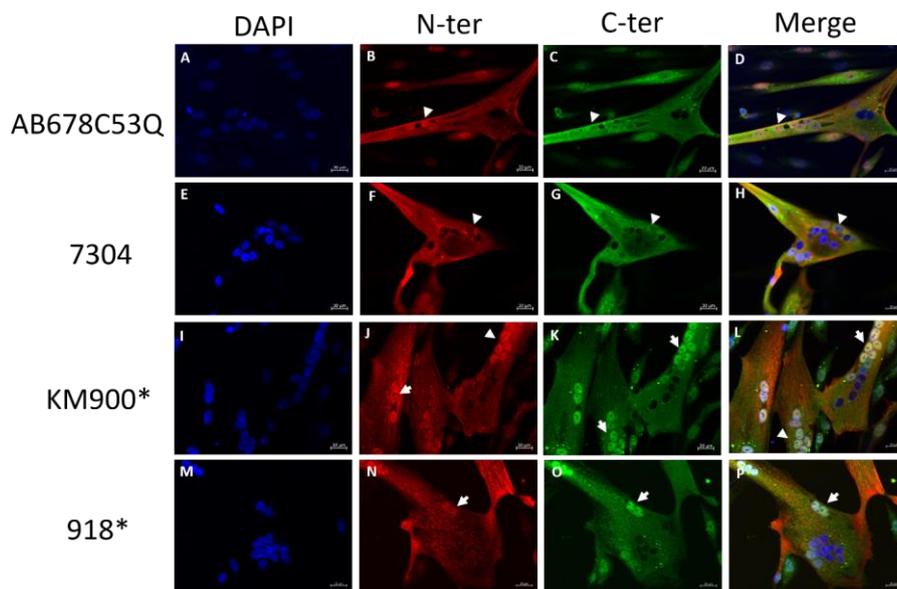


FIG iMOC 4 : Images représentatives de la formation de myotubes à la suite de la différenciation des lignées de myoblastes humains non mutés (**A, B, C et D**) AB678C53Q et (**E, F, G et H**) 7304 et des lignées de myoblastes humains mutés (**I, J, K et L**) KM900* et (**M, N, O et P**) 918*. Les flèches indiquent une localisation nucléaire. Barre d'échelle 20 μ m.

Tout d'abord, nous avons pu constater visuellement la différence de largeur maximale de myotubes entre les lignées contrôle et les lignées mutées, les myotubes 918* (**P**) et KM900* (**L**) étant d'aspect plus larges que leurs lignées contrôle respectives AB678C53Q (**D**) et 7304 (**H**).

Pour chaque lignée, nous avons observé l'expression de la partie N-terminale (**B, F, J et N**) ainsi que de la partie C-terminale (**C, G, K et O**) de la calpaïne-3. Concernant la localisation de la partie N-terminale, nous avons observé une localisation probable au niveau des lignes M du myotube qui donnait cet aspect strié, ainsi qu'au niveau de certains noyaux (indiqué par des flèches), pour toutes les lignées AB678C53Q (**B**), 7304 (**G**), KM900* (**K**) et 918* (**O**). En revanche, nous avons observé que la localisation de la partie C-terminale de la calpaïne-3 était plus diffuse dans les myotubes de chaque lignée. Les différences visuelles que nous avons notées étaient le fait que la partie C-terminale était plus présente dans les lignées contrôle AB678C53Q et 7304, en particulier au niveau des extensions des

myotubes (C) et (G) ; tandis que l'intensité de marquage de la partie C-terminale dans les myoblastes des lignées mutées KM900* (K) et 918* (O) était plus homogène et plus faible. Nous avons aussi constaté un marquage de quelques noyaux, représenté par des flèches blanches. Ces deux éléments laissent penser que ce marquage pourrait être considéré comme un bruit de fond non spécifique.

Nous avons renouvelé cette expérience après avoir transfecté les lignées immortalisées de myoblastes humains KM900* et 918* avec le vecteur d'expression pCMV p94:C58k-EGFP afin de déterminer si nous pouvions obtenir une amélioration phénotypique des myotubes. Les résultats sont présentés ci-après (FIG iMOC 5).

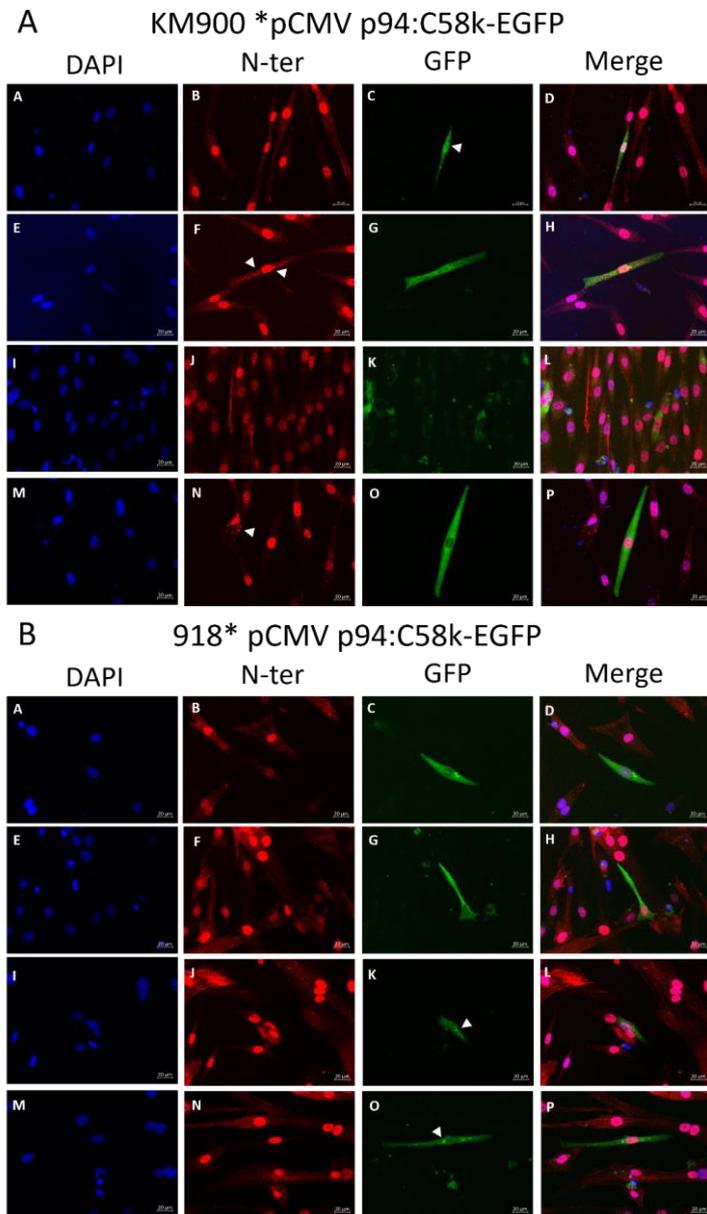


FIG iMOC 5 : Images représentatives de la formation de myotubes à la suite de la différenciation des lignées de myoblastes humains mutés (A) KM900* et (B) 918*. Pour les deux lignées, quatre champs représentatifs différents sont montrés ici. Les flèches blanches indiquent les vacuoles.

Tout d'abord, nous avons observé que certains myoblastes avaient intégré le vecteur d'expression d'intérêt et exprimaient la protéine C58k-EGFP, que ce soit pour **(A)** la lignée KM900* ou **(B)** la lignée 918* (en **C, G, K et O**). Toutefois, nous avons constaté que le nombre de cellules transfectées était faible. Au bout de 5 jours d'incubation dans le milieu de différenciation, nous avons constaté que les myoblastes de la lignée 918* avaient commencé à se différencier en myotubes (en **B**), tandis que ce n'était pas encore le cas pour la lignée KM900* (en **A**). En revanche, l'expression de la partie N-terminale semblait rester identique à celle observée dans la figure iMOC 4, à savoir au niveau des lignes M des quelques myotubes formés dans le cas de **(B)** la lignée 918*, ainsi qu'une forte localisation nucléaire (**B, F, I et N**). Dans le cas de la **(A)** lignée KM900*, nous avons remarqué une localisation nucléaire ainsi que la formation de quelques vacuoles d'expression contenant la partie N-terminale de la calpaïne-3 (**F et N**). Concernant la localisation de l'expression du fragment autolytique C58k-EGFP, dans le cas des deux lignées, la partie C-terminale issue de l'expression du vecteur d'expression était diffuse dans le cytoplasme (**C, G, K et O**) avec parfois la présence de vacuoles visibles en **(C)** pour la lignée **(A)** KM900* et visibles en **(K et O)** pour la lignée **(B)** 918*. Nous n'avons pas observé de localisation nucléaire dans cette situation. En superposant les trois canaux de révélation, nous avons pu confirmer les observations décrites au-dessus (**D, H, L et P**).

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer l'activité protéolytique de la calpaïne-3 au sein des lignées de myoblastes humains mutés 918* et KM900*. Pour se faire, nous avons mis en culture 150 000 cellules de chaque lignée à l'état de myoblastes qui auront subi des transfections avec différents vecteurs d'expression de la calpaïne-3 (pCMV p94:ΔIS1, pCMV p94:C129S-EGFP, pCMV C58k-EGFP) selon des conditions déterminées au préalable. Quarante-huit heures après, les protéines totales ont été extraites puis analysées par immunomarquage afin d'identifier les protéines d'intérêt p94:C129S-EGFP (119 kDa) et C58k-EGFP (83 kDa) dont les résultats sont présentés ci-dessous (FIG iMOC 6).

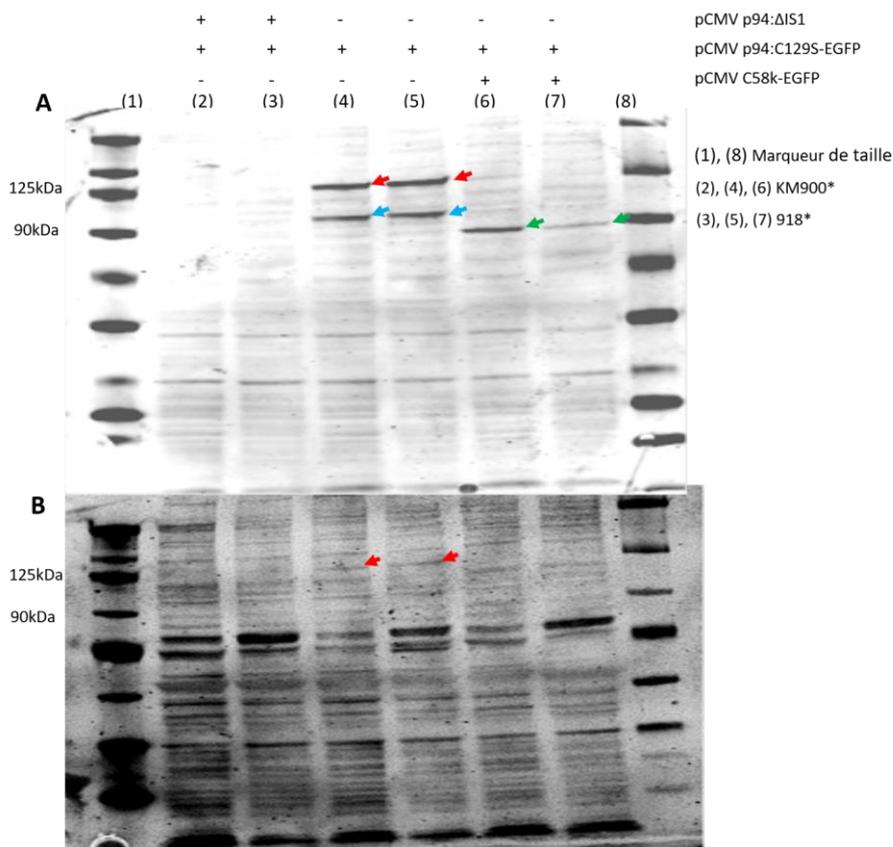


FIG iMOC 6 : Activité protéolytique de la calpaïne-3 révélée par immunotransfert en **A** et **B** à partir d'extraits protéiques issus des lignées de myoblastes humains mutés **(2), (4) et (6)** KM900* et **(3), (5), (7)** 918* sans ou avec transfection des vecteurs d'expression **(2), (3)** pCMV p94:ΔIS1, **(2) à (7)** pCMV p94:C129S-EGFP et **(6) et (7)** pCMV C58k-EGFP. En **A**, les flèches rouges indiquent p94:C129S-EGFP non clivée, les flèches bleues indiquent une protéine probablement clivée de la P94:C129S-EGFP non identifiée et les flèches vertes indiquent l'expression du fragment autolytique C58k-EGFP à 88 kDa. En **B**, les flèches rouges indiquent p94:C129S-EGFP non clivée.

Pour ces immunotransferts, la calpaïne-3 a été révélée en utilisant soit un anticorps primaire dirigé contre la protéine de fusion EGFP en **A** et un anticorps dirigé contre sa partie C-terminale en **B**.

Toutes les lignées ont été transfectées avec le vecteur d'expression pCMV p94:C129S-EGFP ce qui a permis aux myoblastes d'exprimer une forme inactive de la calpaïne-3 qui était incapable d'activité protéolytique mais qui était un très bon substrat pour la calpaïne-3 endogène des myoblastes humains (lignes 2 à 7). La transfection des lignées KM900* et 918* avec le vecteur d'expression pCMV p94:ΔIS1 a eu le rôle de contrôle positif de l'activité protéolytique de la calpaïne-3 car l'absence du domaine IS1 aboutit à une calpaïne-3 constitutivement active et donc capable d'activité protéolytique (lignes 2 et 3). La taille attendue de la calpaïne-3 C129S-EGFP était de 119 kDa. La transfection des

lignées avec le vecteur d'expression pCMV C58k-EGFP (lignes 6 et 7) avait pour but de déterminer si l'activité protéolytique de la calpaïne-3 endogène dans nos lignées pouvait être compensée en utilisant sa capacité de complémentarité intermoléculaire en permettant l'assemblage de deux fragments autolytiques avec un domaine C58k exogène fonctionnel.

Tout d'abord en **A**, concernant les lignes 2 et 3, nous n'avons pas observé de bande à la hauteur de 119 kDa, taille attendue de la calpaïne-3 C129S-EGFP non clivée. Notre contrôle positif d'activité protéolytique était ainsi validé, p94:ΔIS1 ayant agi sur le substrat que représentait p94:C129S-EGFP. Pour les lignes 4 et 5, seul le substrat p94:C129S-EGFP a été ajouté au moment de la transfection des cellules. Nous avons pu constater la présence d'une bande à la taille attendue de 119 kDa lorsque celle-ci n'est pas clivée. En revanche, après transfection des lignées avec le vecteur d'expression pCMV C58k-EGFP en 6 et 7, nous n'avons pas observé la présence d'une bande à 119 kDa.

Ensuite, en **B**, nous avons obtenu des résultats cohérents avec ce qui a été observé en A. Pour les lignes 2 et 3, aucune bande n'a été observée à la taille attendue de 119 kDa, ce qui validait à nouveau notre contrôle positif. Pour les lignes 4 et 5, nous avons observé à nouveau une bande à la hauteur de 119 kDa, ainsi qu'une bande autour de 100kDa. Dans les puits 6 et 7, nous avons observé une bande légèrement inférieure à 90 kDa, qui correspondait à la taille attendue du fragment C58k-EGFP de 88 kDa et une absence de bande à 119 kDa correspondant à p94:C129S-EGFP.

Ces premiers résultats nous ont montré que les lignées de myoblastes mutés KM900* et 918* exprimaient la calpaïne-3 mais cette dernière n'était pas capable de réaliser une activité protéolytique car le substrat p94:C129S-EGFP ajouté n'avait pas été clivé, résultats observés en **A** lignes 2 et 3. En revanche, lorsque les lignées exprimaient le fragment autolytique C58k exogène et non affecté par des mutations, visible en **A** et **B** aux lignes 6 et 7, nous avons constaté que l'activité protéolytique était restaurée car la protéine p94:C129S-EGFP n'était plus détectée. Ce qui signifiait que les lignées étaient capables de former une calpaïne-3 chimère issue d'un fragment autolytique N-terminal endogène et du fragment autolytique C58k-EGFP exogène pour former une protéine active et capable de réaliser ses fonctions protéolytiques.

B. OUTIL DEVELOPPE SUR LE *TRANS*-EPISSAGE : TECHNOLOGIE SMART

I. GENERALITES SUR L'EPISSAGE ET LA TECHNOLOGIE SMART²⁵

1. QUELQUES RAPPELS SUR LE CIS-EPISSAGE

Dans le noyau des cellules eucaryotes, la transcription d'un gène génère un ou plusieurs ARN pré-messagers (pré-ARNm) formés d'exons et d'introns. N'étant pas sujet à la traduction, ces introns doivent être éliminés, les exons adjacents doivent être conservés et joints entre eux pour former l'ARN messager (ARNm) mature qui sera traduit en protéine. Ce phénomène naturel est appelé le *cis*-épissage (FIG Principe SMaRT 1).

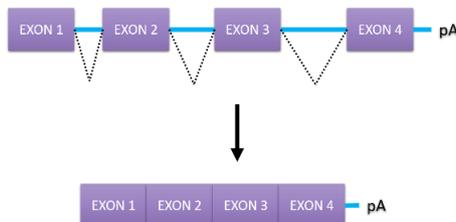


FIG Principe SMaRT 1 : Schéma du *cis*-épissage d'un pré-ARNm en ARNm mature

Ce processus très complexe est catalysé par un complexe enzymatique constitué de nombreuses protéines et de quatre petites particules ribonucléoprotéiques (snRNPs pour small ribonucleoprotein particles) nommé le spliceosome. Le spliceosome va devoir reconnaître des régions précises afin de pouvoir procéder correctement et précisément à l'épissage du pré-ARNm. Chez les mammifères, la voie de catalyse la plus utilisée est nommée U2-dépendante. Ainsi, les frontières exon-intron se distinguent dans ce cas grâce à 4 *cis*-éléments conservés :

- Un site d'épissage donneur 5' (en anglais, 5' splicing site 5'SS) dont la séquence consensus est AG/GURAGU (où « / » est la jonction intron-exon) ;
- Un site d'épissage accepteur 3' (en anglais, 3' splicing site 3'SS) avec la séquence consensus YAG/G ;
- Un point de branchement (en anglais, branch point BP) peu conservé chez les mammifères, avec une séquence consensus CURACYNY, où l'adénosine est le point de branchement, située 18 à 40 nucléotides en amont du site 3'SS ;
- Une voie polypyrimidine (en anglais, polypyrimidine tract PPT), très conservé chez les mammifères, situé juste avant le site 3'SS et souvent composé d'une répétition d'uracile.

²⁵ Sources : (Berger et al., 2016; Mansfield et al., 2004)

Ici, nous utiliserons les acronymes anglophones de ces différents éléments qui sont utilisés dans la nomenclature (FIG Principe SMaRT 2).



FIG Principe SMaRT 2: Schéma d'un intron U2-dépendant

Cependant, un second mécanisme naturel d'épissage de l'ARN moins connu permet de former un ARNm composite à partir de deux transcrits d'ARNm précurseurs : ce mécanisme est le *trans*-épissage. Bien que ce type d'épissage soit rare chez les mammifères, comparé au *cis*-épissage, plusieurs formes de *trans*-épissage chez différentes espèces du règne animal ont été décrites dans la littérature scientifique : en particulier chez le trypanosome, mais aussi dans les hépatocytes de rat et même les récepteurs humains à l'œstrogène, et plus récemment dans des cellules souches embryonnaires humaines. C'est sur ce mécanisme naturel, dont les mammifères possèdent aussi la machinerie, que s'appuie la technologie SMaRT (Spliceosome-Mediated RNA *Trans*-splicing).

2. PRINCIPE DE LA TECHNOLOGIE SMART

Dans le cas des maladies génétiques, certaines techniques de thérapie génique se retrouvent confronter à diverses limites : une taille de l'ADNc trop importante pour être compatible avec le transfert de gène via des vecteurs dans le cas de maladies génétiques récessives ou encore, l'incompatibilité d'inhiber l'expression d'un ARNm dans le cas de maladie génétique dominante qui pourrait causer la suppression de l'expression de l'allèle muté ou des deux allèles empêchant ainsi une régulation correcte du gène sain qui est essentiel. De ce fait, il serait intéressant de pouvoir réparer les transcrits mutés pour en obtenir des copies sans erreurs mutationnelles et n'altérant plus le niveau d'expression du gène. Développer un outil génétique permettant de modifier un transcrit dans une population cellulaire donnée serait un bénéfice majeur. C'est la solution que propose la technologie SMaRT en déviant la machinerie du spliceosome pour modifier une partie des exons d'un transcrit endogène en amenant un ARN artificiel par transfert de gène dans les cellules qui doivent être corrigées.

En 1999, sur des cellules en culture, Puttaraju et collaborateurs ont démontré la faisabilité de corriger un ARNm endogène par un ARN artificiel capable d'induire le *trans*-épissage (Puttaraju et al., 1999). A partir de ce moment, plusieurs études ont été menées pour évaluer l'efficacité du SMaRT comme stratégie de thérapie génique. Pour se faire, un ARN artificiel nommé Pre-mRNA *Trans*-splicing Molecule (PTM) en anglais, est conçue pour cibler spécifiquement un pre-ARNm endogène exprimé dans les cellules cibles. Et de s'y lier spécifiquement pour induire le *trans*-épissage plus efficacement que le *cis*-épissage. C'est pourquoi, un PTM doit respecter plusieurs règles de conception pour avoir une efficacité maximale et doit contenir :

- Un domaine de liaison (binding domain) capable de reconnaître l'intron cible sur le pré-ARNm endogène par appariement de bases nucléotidiques ;
- Un intron artificiel pour catalyser la réaction d'épissage ;
- La séquence d'ADNc constituée de la séquence codante de substitution (FIG Principe SMaRT 3).

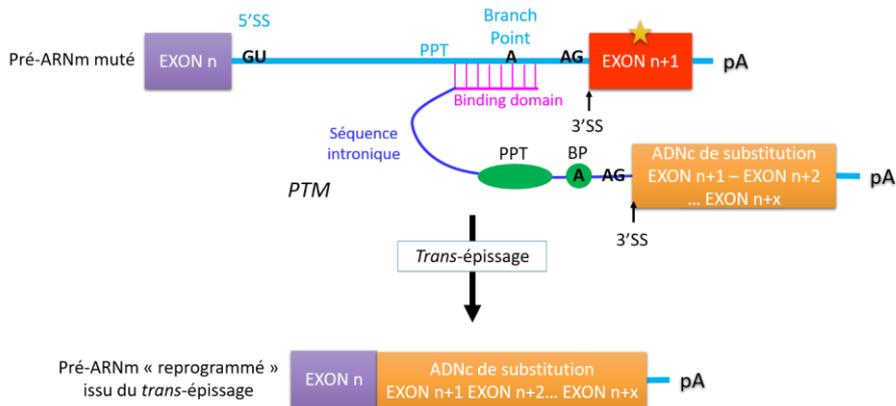


FIG Principe SMaRT 3 : Représentation du principe du *trans*-épissage et de la composition d'un PTM type pouvant induire un phénomène de *trans*-épissage.

La position de ces trois éléments au sein du PTM va dépendre de la localisation de l'exon ou des exons à remplacer sur l'ARNm cible, en position 3' ou en position 5', et donc du mode d'action choisie. Ici, nous avons présenté uniquement l'approche en position 3' car c'est celle que nous avons choisi d'utiliser pour nos travaux.

Par ces différents modes d'action, la technologie SMaRT va posséder plusieurs avantages pour une application en thérapie génique :

- Quand le premier intron est ciblé, un seul PTM est nécessaire pour réparer de nombreuses mutations. Pour un knock-out spécifique d'un allèle ou rendre des mutations dominantes silencieuses, ce PTM unique possède un large bénéfice par rapport à la technologie CRISPR, à l'utilisation de molécules ASO (Allele Specific Oligonucleotide) ou de shRNA qui ne ciblent qu'une seule mutation.
- La conservation dans le temps et l'espace de la régulation d'expression de l'ARNm ciblé. Le PTM étant inerte sauf pour induire la réaction de *trans*-épissage, la régulation de l'ARN chimère est totalement dépendant de la régulation naturelle du pré-ARNm ciblé.
- La double capacité d'un PTM de réduire la synthèse d'une protéine mutée et d'en promouvoir une synthèse normale.
 - Comme le PTM inclut une partie seulement de la séquence codante nécessaire à la réparation, la technologie SMaRT s'appuie sur une petite portion de molécule réparatrice au lieu d'un ADNc complet. Cela facilitera le choix du vecteur viral pour délivrer le PTM dans les cellules cibles.

II. HYPOTHESE DE TRAVAIL

Face à tous ces arguments, nous avons décidé de tester une approche de thérapie génique avec la technologie SMaRT dans le cas de la calpaïnopathie. D'une part, l'utilisation d'un PTM unique va permettre de contourner plusieurs mutations pouvant être présentes dans la séquence du gène *C.APN3*, ce qui est fréquemment le cas chez les patients souffrant de LGMD2A ; et d'autre part, nous voulons déterminer si restaurer la traduction d'une protéine calpaïne-3 fonctionnelle grâce à l'expression d'un ARNm chimère issu du *trans*-épissage est possible grâce à cet outil. Dans les paragraphes suivants, nous faisons état de l'avancé de nos travaux.

III. CONCEPTION DES PTM POUR NOS TRAVAUX

Comme nous l'avons écrit dans le paragraphe précédent, la conception du PTM est essentielle pour la réussite de cette technologie, en particulier le choix des domaines de liaison à déterminer. Dans le cas de la calpaïnopathie, la majorité des mutations se situant après l'exon 5 du gène *C.APN3* (représentant 68,4% des mutations de notre cohorte), nous avons décidé de concevoir un PTM possédant un domaine de liaison complémentaire de la séquence intronique 4-5 qui vous est présentée ci-après (FIG SMaRT 1).

```
TTCTGGCGCTATGGAGAGTGGGTGGACGTGGTTATAGATGACTGCCGCCACGTAACAAATCAACTGGTTT
TCAACAACTCCACCAACCGCAATGAGTTCTGGACTCCTCTGCTGGAGACGGCTTATGCTAA
GTaaacaacactttagaatgtgaggtggggctagaggtgagaagtgggtgcaaaatccagccgagacctcactcacaggaagagcatg
tgcctctatactgtcatatgtgtggcatgcaagtccaactgtgacccaagtagagatcagttccaggcaacaacagctctaactaaaaacat
taaaatlaagatgaaatgaagattgcatagaagaccttagcttagcttaccatagcagagttcttctcattgcaacctccatgggcatgcaag
tcttggatcagagcattgtatctctggagctcagatccagagctcacttggactcaacctcatgctctatagcagattataaagccatgttctc
ttaaagctccaccapagcttaataatggatttttaaaattttgaacaaggttcactctgtaatgaggctggagtgcatgtgtgc
agtcagggctcactgacagctacctcctgggtcaaggtgctcctcccactcagcctccaagtagctgggactacatgaggcatcaccatg
cccagtaattttgtattttgtagagacgggttttccatgttcccagactgttctcgaactctgggctatgcaatccaccagccttggcct
cccgaagcgtgggattgccgtgtgagccaccacaaccggcagctgctaatggctttaatgcagccttccctcaagttcaggatgtagtggaaag
agctctcaggaaggggatagctgggttccaatccagtgcttctgctctctgtgcttgggtgggtcactgaccttggactcagttcttca
ttatgaagaagggaatcattgttccatccatgagctcataggttaatgtggaattgatgaaagaacatcacagcatccaagaggtaaagtct
ggggcagtggtacctgggtttgttccctggaactctgtgaccccaattgggttctcctctctcctaAG
GCTCCATGGTTCCTCGAGCTCTGAAAAGTGGGAAACCCACAGAGGCCATGGAGGACTTCAAGGAGGGGTG
GCAGACTTTTTTGAGATCAGGGATGCTCTAGTGACATGTACAAGATCATCAAGAAGCCATCGAGAGAGGGCTCC
TCATGGGCTGCTCCATGAT
```

FIG SMaRT 1: Séquence de l'exon 4, de l'intron 4-5 et de l'exon 5 du gène *C.APN3*

1. CHOIX DES SEQUENCES DES DOMAINES DE LIAISON

Nous avons réalisé l'analyse des potentiels sites accepteurs présents dans la séquence de l'intron 4-5 sur le site Human Splicing Finder (<http://umd.be/HSF3/>). En entrant la séquence complète, l'analyse en ligne nous a permis d'identifier ces sites accepteurs que nous avons surlignés en bleu sur la figure FIG SMaRT 1. En nous basant sur ces données, nous avons décidé de concevoir trois PTM possédant chacun un domaine de liaison (ou binding domain BD) différent. Ainsi, nous avons choisi des séquences de BD venant recouvrir ces sites accepteurs dans le but d'augmenter le phénomène de *trans*-épissage au dépend de celui du *cis*-épissage. Les séquences des trois domaines sont colorées en

Binding Domain 1, **Binding Domain 2** et **Binding Domain 3**. Un quatrième binding domain, en gris, ne sera pas synthétisé car selon Berger et collaborateurs (Berger et al., 2015), cette position de BD s’est avérée très faiblement efficace et de plus, elle ne recouvre aucun site accepteur potentiel dans notre cas. Les autres séquences de ces trois BD ont aussi été choisies en nous basant sur les travaux présentés dans cette même étude car de nombreux PTM ont été testés.

2. SEQUENCE D’ADNC DE SUBSTITUTION

Concernant la séquence commune d’ADNC de substitution de chaque PTM, soit la séquence exon 5 à exon 24, nous avons effectué deux modifications dans le but d’optimiser et d’augmenter les chances d’expression des PTM :

- *L’optimisation des codons : Pour un même acide aminé, lorsqu’un codon présent dans la séquence codante du gène CAPN3 était un codon peu retrouvé dans le génome humain, nous l’avons remplacé par le codon le plus fréquent. Ex : TCG devient AGC (S), CTA devient CTG (L), etc. (voir Annexe 9).*
- *Afin de pouvoir insérer chaque fragment de PTM dans le vecteur d’expression pcDNA4 mais aussi pouvoir identifier l’ARN chimère issu du trans-épissage, nous avons créé un site de restriction XhoI qui n’existe pas dans la séquence de l’ARNm endogène CAPN3. Ce site est créé par l’identification d’une mutation isosémantique (ou synonyme) en utilisant l’outil en ligne WatCut « Silent mutation analysis » http://watcut.uwaterloo.ca/template.php?act=silent_new&cid=070170a803ac39ada061720774f3587d dont le résultat fut le suivant (FIG SMaRT 2).*

```
Results of silent mutation analysis: my_working_oligo (90 bp)
Mutation frequency: 0 to 1; Enzyme set: my_working_set

Sequence: GTG CGG GGT TGC TCT GCC GGA GGC TGC CGC AAC TTC CCA GAT ACT TTC
           Val Arg Gly Cys Ser Ala Gly Gly Cys Arg Asn Phe Pro Asp Thr Phe

           TGG ACC AAC CCT CAG TAC CGT CTG AAG CTC CTG GAG GAG GAC
           Trp Thr Asn Pro Gln Tyr Arg Leu Lys Leu Leu Glu Glu Asp

                                           Changes TmS TmT
-----
XhoI      GTGCGGGGTTGCTCTGCCGGAGGCTGCCGCAACTCCAGATACTTTCTGGA 1 81 82
           CCAACCTCAGTACCGTCTGAAGCTCTCGAGGAGGAC
```

FIG SMaRT 2 : Résultats de création d’un site de restriction par mutation silencieuse sur une portion de la séquence CAPN3

3. SEQUENCES DES AUTRES COMPOSANTS DU PTM

Après avoir déterminé les domaines de liaison et la séquence d’ADNC exogène qui sera portée par le PTM, il restait à concevoir la partie intronique du PTM comprenant une séquence d’espaceur, le point de branchement BP, la séquence PPT et le site accepteur. Pour les trois premières séquences, nous avons repris celles utilisées par Rodriguez-Martin et collaborateurs (Rodriguez-Martin et al., 2005), optimisées depuis les premières études en 1999 ; quant au site

accepteur, il s'agit de celui inscrit par Puttaraju et collaborateurs (Puttaraju et al., 1999). Ci-dessous, nous vous présentons la séquence complète du PTM1 contenant le binding domain1 (FIG SMaRT 3).

```

acctgtttcaaaaaatttaaaaaatccattatagcatctggggtggagcttttaagtggagagacaacatgctttataaatctgtataa
gcacatgaggttgagccaagcagaccctgggatctgagctccagagatacaatgctCCGGGAACATTATTATAACGTTGCTCG
AACTACTAAGTGGTACGCTCTCTTTTTTTTTGATATCTGGCAAGCTCCATGGTTCACGAAAGCTCTGAAAGGTG
GGAACACACAGAGGCCATGGAGGACTTCACAGGAGGGTGGCAGAGTTTTTGGAGTACGGGATGCTCTAGT
ACATGTACAAGATCATGAAGAAAGCCATCGAGAGGGCTCCCTCATGGGCTGCTCCATGATGATGGCACCAACAT
GACCTATGGAACCTCTCTTCTGGTGAACATGGGGAGTTGATTGCAGGGATGGTGGAGGAATATGGATAACTA
CTGCTCCAGGACTCAGACTCGACCCAGAGGCTCAGATGAAAGACCCAGCCGGACATCATTCCGGTTCAGTATG
AGACAAGATGGCTCGGGCTGGTCAAGGTCACGCTACTCTGTCACTGGGCTGGATGAGCTCCGTTCAAAG
GTGAGAAAGTGAAGCTGGTGGCTGCGGAATCCCTGGGGCCAGGTGGAGTGGAAAGGTTCTGGAGTATAG
TGGAAGGACTGGAGCTTTGGGACAAAGATGAGAAGGCCCTCTGCAGCACAGGTCCTGAGGATGGAGAGTTC
TGGATCTCTATGAGGATTCATCACCATTTCAAAAAGTTGGAGATCTGCAACTCTGCGGATGCTCTGCAGT
CTGACAAAGCTTCAGACTGGACAGTGTCTGTGAACGAGGGCCGCTGGTGGGGGTTGCTCTGCGGAGGCTGC
CGCAACTTCCAGATCTTTTGGACCAACCTCAGTACCCTGTAAGCTCTGGAGGAGGACGATGCCCTGATG
ACAGCGAGGTGATTTGAGCTTCTGGTGGCCCTGATGAGAAGAACCCGGGAAGGACCGGAAGCTGGGGCC
AGTCTCTTCCACCTTGGCTTCCGCTACTCAGAGTTCCAAAGAGATCCAGCGGAACAAGCAGCCTCGAAGG
ACTTCTCTGTGACAGCCCTCAAGGCCAGGACAAAACCTACATCAACATGCGGGAGTTCACAGGCTTCCG
CTGCTCCAGCGGATAGTCTATGCTCCCTCACCTACGAGCCCAAGCAGGAGGGGAAATCCTCTCCGGGTC
TTCTGAAAAGGGAACCTCTCTGAGGAGTTGAAAATACCATCTCGTGATCGGCCAGTAAAAGAAAAA
CCAAAGCCATCTCTTGGACGACAGCAACAGCAACAGGAGCTGGTGTGGACAGGATGACAGAGGAGG
GCAAAGCAAAACAGCCCTGATAAGCAAAAGCAGTCCCAAGCCAGCAGCTGGCAGCTCTGATCAGGAAATGA
GGAACAGCAAAATTCGGAAATTTTCAAGCAGATCCGAGGAGATGATGGAGATCTGTGAGATGAGCTCAAG
AAGTCTTAAACAGCTGTGAACAAACACAAGGACCTGAAGACACACGGGTTCAACATGGAGTCTGCAAGCA
TGATTTGCTCATGATACAGATGGCTCTGGAAGCTCAACCTGCAGGAGTCCACCTCTGGAACAAGATTA
GGCTGGCACAAAATTTCAAACTATGACACAGACAGTCCGGCACCATCAACAGCTACGAGATGGAAATGCA
GTCAACGAGCGAGATCCCACTCAACACAGCTCTATGACATCAATCCATCCGCTGAGCAGACAAACATGAA
CATGCACTTACAGATTTCACTGCTGCTGTTAGCTGGAGGCAATGTTCAAGCTTTTCACTGATTTGACAAG
GATGGAGATGGTATCATCAAGCTCAAGCTTCTGGAGTGGCTGCAGCTCACCATGATGCTCTGA

```

Légende : **Binding Domain 1**. **Spacer** (selon Rodriguez Martin et al., 2005). **Branch Point** (selon Rodriguez Martin et al., 2005). **PPT** et **site accepteur CAG** (selon Puttaraju et al.) **Premier codon de l'exon 5**. **Site de restriction XhoI**. **Premier codon d'un exon**. **Codon remplacé par le codon le plus fréquent pour un même AA**.

FIG SMaRT 3 : Séquence complète du PTM1 contenant le binding domain 1

Enfin, toutes les séquences des PTM sont identiques, à l'exception des binding domain qui diffère selon leur séquence complémentaire. Les séquences des PTM2 et PTM3 sont présentées ci-après (FIG SMaRT 4 et 5).

```

gacctgtttcaaaaaatttaaaaaatccattatagcatctggggtggagcttttaagtggagagacaacatgctttataaatctgtataa
agcacatgaggttgagccaagcagaccctgggatctgagctccagagatacaatgctCCGGGAACATTATTATAACGTTGCTCG
GAACTACTAAGTGGTACGCTCTCTTTTTTTTTGATATCTGGCAAGCTCCATGGTTCACGAAAGCTCTGAAAGGTG
GGAACACACAGAGGCCATGGAGGACTTCACAGGAGGGTGGCAGAGTTTTTGGAGTACGGGATGCTCTAGT
GACATGTACAAGATCATGAAGAAAGCCATCGAGAGGGCTCCCTCATGGGCTGCTCCATGATGATGGCACCAACAT
TGACCTATGGAACCTCTCTTCTGGTGAACATGGGGAGTTGATTGCAGGGATGGTGGAGGAATATGGATAACTA
ACTGCTCCAGGACTCAGACTCGACCCAGAGGCTCAGATGAAAGACCCAGCCGGACATCATTCCGGTTCAGTATG
GAGACAAGATGGCTCGGGCTGGTCAAGGTCACGCTACTCTGTCACTGGGCTGGATGAGCTCCGTTCAAAG
GTGAGAAAGTGAAGCTGGTGGCTGCGGAATCCCTGGGGCCAGGTGGAGTGGAAAGGTTCTGGAGTATAG
ATGGAAGGACTGGAGCTTTGGGACAAAGATGAGAAGGCCCTCTGCAGCACAGGTCCTGAGGATGGAGAGTTC
CTGGATGCTCTATGAGGATTCATCACCATTTCAAAAAGTTGGAGATCTGCAACTCTGCGGATGCTCTGCAG
TCTGACAAAGCTGGAGCTTGTGACAGTGTCTGTGAACGAGGGCCGCTGGTGGGGGTTGCTCTGCGGAGGCTGC
CGCAACTTCCAGATCTTTTGGACCAACCTCAGTACCCTGTAAGCTCTGGAGGAGGACGATGCCCTGATG
ACAGCGAGGTGATTTGAGCTTCTGGTGGCCCTGATGAGAAGAACCCGGGAAGGACCGGAAGCTGGGGCC
AGTCTCTTCCACCTTGGCTTCCGCTACTCAGAGTTCCAAAGAGATCCAGCGGAACAAGCAGCCTCGAAGG
ACTTCTCTGTAAACGCTCAAGGCCAGGACAAAACCTACATCAACATGCGGGAGGTTCACAGGCTTCCG
CTGCTCCAGCGAGTACGTCATGCTCCCTCACCTACGAGCCCAAGCAGGAGGGGAAATCCTCTCCGGGTC
TTCTGAAAAGGGAACCTCTCTGAGGAGTTGAAAATACCATCTCCGTTGGATGGCCAGTAAAAGAAAAA
CCAAAGCCATCTCTTGGTGGACGACAGCAACAGCAACAGGAGCTGGTGTGGACAGGAGTCAAGAGGAGG
GCAAAGCAAAACAGCCCTGATAAGCAAAAGCAGTCCCAAGCCAGCAGCTGGCAGCTCTGATCAGGAAATGA
GGAACAGCAAAATTCGGAAATTTTCAAGCAGATCCGAGGAGATGATGGAGATCTGTGAGATGAGCTCAAG
AAGTCTTAAACAGCTGTGAACAAACACAAGGACCTGAAGACACACGGGTTCAACATGGAGTCTGCAAGCA
TGATTTGCTCATGATACAGATGGCTCTGGAAGCTCAACCTGCAGGAGTTCACCACTCTGGAACAAGATTA
GGCTGGCACAAAATTTCAAACTATGACACAGACAGTCCGGACCATCAACAGCTACGAGATGGAAATGCA
GTCAACGAGCGAGATCCCACTCAACACAGCTCTATGACATCAATCACCATCCGCTGAGCAGACAAACATGAA
CATGCACTTACAGATTTCACTGCTGCTGTTAGCTGGAGGCAATGTTCAAGCTTTTCACTGATTTGACAAG
GATGGAGATGGTATCATCAAGCTCAAGCTTCTGGAGTGGCTGCAGCTCACCATGATGCTCTGA

```

Légende : **Binding Domain 2**. **Spacer** (selon Rodriguez Martin et al., 2005). **Branch Point** (selon Rodriguez Martin et al., 2005). **PPT** et **site accepteur CAG** (selon Puttaraju et al.) **Premier codon de l'exon 5**. **Site de restriction XhoI**. **Premier codon d'un exon**. **Codon remplacé par le codon le plus fréquent pour un même AA**.

FIG SMaRT 4 : Séquence complète du PTM2 contenant le binding domain 2

tgtgggtctcacaccggcaatcccagcgttcgggaggccaaggctgggtgattgcatgagcccaagagttcgagaccagctgggcaaca
 tggcaaaaccccgtctctacaataaaatacaaaaataactgggcatggtgatgcccgcgggaaacattattataacgcttgctc
 GAATACTAACTGGTACGCTCTCTTTTTTTTTGATATCCTGCAAGGTCATGGTTCACGAAGCTCTGAAAGGT
 GGGAAACACCACAGAGGCATGGAGGACTTCACAGGAGGGTGGCAGAGTTTTTGGATCAGGGATGCTCCTAGT
 GACATGTACAAGATCATGAAGAAAGCCATCGAGAGAGGCTCCCTCATGGGCTGCTCCATTGATGATGGCAGCAACA
 TGACCTATGGAACCTCTCTTCTGGTCTGAACATGGGGGAGTTGATTGCACGGATGTCAGGAATGGATAACT
 ACTGCTCCAGGACTCAGACCTCGACCCAGAGGCTCAGATGAAAGACCCAGCCGGACAAATCATTCCGGTTCAGAT
 GAGACAAGAAATGGCTGCGGGCTGGTCAGAGGTCACGCTACTCTGTCACTGGGCTGGATGAGTCCCGTTCAA
 GGTGAGAAAATGAAGCTGGTGGCTGCGGAATCCCTGGGGCCAGGTGGATGGAAACGGTCTTGGAGTGATAG
 ATGGAAGGACTGGAGCTTTGTGGACAAAAGATGAGAAGGCCCGTCTGCAGCACAGGTCCTGAGGATGGAGAGTT
 CTGATGTCCTATGAGGATTTCTATCCATTTACAAAAGTTGGAGATCTGCAACCTACTGCGGATGCTCTGCAG
 TCTGACAAGCTTCAGACCTGGACAGTGTCTGTGAACGAGGGCCGCTGGTGGGGTTGCTCTGCCGGAGGCTGC
 CGCAACTTCCAGATACTTTCTGGACCAACCTCAGTACCGTCTGAAGCTCTCGAGGAGGACGATGACCTGATG
 ACAGCGAGGTGATTTGAGCTTCTGGTGGCCCTGATGCAGAAAGCCGGGGAAGGACCCGAAAGCTGGGGCC
 AGTCTCTTCAACATTGGCTTCCCATCTACGAGGTTCCAAAAGAGATGCACGGGAACAAGCAGCACCTGCAGAAGG
 ACTTCTTCTGTACAACGCTCCAAGGCCAGGAGCAAAAACCTACATCAACTGCGGGAGGTGTCCAGCGCTTCCG
 CCTGCTCCAGCGAGTACGTATCTGTGCTCCACTACGAGCCCAAGGAGGGGAATTCATCTCCGGGTC
 TTCTGTAAAAGAGGAACCTCTGAAGAGTTGAAAATACCATCTCCGTGGATCGGCCAGTGAAGAAAAA
 CCAAGCCATCATCTTCTGTTAGCGACAGAGCAACAGCAACAAGGAGCTGGGTGTGGACAGGAGTCAAGGAGG
 GCAAAGCAAAAACAAGCCTGTAAAGCAAAAGCAGTCCCCACAGCCAGCAGCTGGCAGCTCTGATCAGGAAAGTGA
 GGAACAGCAACAATTCCGGAACTTTTCAAGCAGATCGCAGGAGATGATGAGAGATCTGTGCAGATGAGCTCAAG
 AAGTCTTTAACAACAGTCTGTGAACAACACAAGGACCTGAAGACACACGGGTTACACTGGAGTCTCTGCAAGCA
 TGATTGCTCATGGATACAATGATGCTCTGGAAAGCTCAACCTGCAGGAGTCCACCACCTCTGGAAACAAGATTAA
 GGCCTGGCAGAAAATTTCAAACTATGACACAGACAGTCCGGCACCATCAACAGTACGAGATGCGAAATGCA
 GTCACGAGCAGGATTCACCTCAACAACAGCTTATGACATCATTACCATGCGGTACGAGCAACAACATGAA
 CATGCACTTGACAGTTTCATCTGCTGCTTCTGTTAGGCTGGAGGGCATGTTCAAGCTTTTTCATGCAATTTGACAAG
 GATGGAGATGATCATCAAGCTCAACGTTCTGGAGTGCCTGCAGCTCACCATGATGCCTGA

Légende : Binding Domain 3. Spacer (selon Rodriguez Martin et al., 2005). Branch Point (selon Rodriguez Martin et al., 2005). PPT et site accepteur CAG (selon Puttaraju et al.) Premier codon de l'exon 5. Site de restriction XhoI. Premier codon d'un exon. Codon remplacé par le codon le plus fréquent pour un même AA.

FIG SMaRT 5 : Séquence complète du PTM3 contenant le binding domain 3

4. VERIFICATION DES SEQUENCES DES PTM

La dernière étape a consisté à vérifier que les séquences codantes portées par les ARNm chimères issus du *trans*-épissage aboutissaient bien à la traduction en calpaïne-3.

Dans un premier temps, grâce au site Addgene Analyze Sequence (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome), nous avons effectué la traduction de la séquence de l'ARNm chimère pour chaque PTM. Après cela, sur le site BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) nous avons procédé à un alignement de la séquence protéique donnée par cette analyse avec la séquence protéique de la calpaïne-3 dans le but de vérifier un alignement parfait des deux séquences.

Toutes ces vérifications ont abouti à des résultats concluants, les séquences de chaque ARNm chimère issues des PTM1, PTM2 et PTM3 aboutissant à une calpaïne-3 exogène identique à la protéine endogène. Les séquences complètes des ARN chimère et de leur traduction en protéine, ainsi que les résultats des alignements, sont présentées en Annexe 10.

5. FABRICATION DES VECTEURS D'EXPRESSION CONTENANT LES PTM

La fabrication et le séquençage des PTM ont été confiés à Neobiotech (Clinisciences). Le vecteur d'expression choisi est le vecteur pcDNA4 myc-HisA dont la carte graphique vous est présentée ci-dessous (FIG SMaRT 6). Ce vecteur possède un promoteur fort CMV pour contrôler l'expression de l'insert dans les cellules eucaryotes, un gène de résistance à l'ampicilline pour le clonage en bactéries *E. coli* ainsi que des séquences permettant d'utiliser des amorces pour effectuer son séquençage.

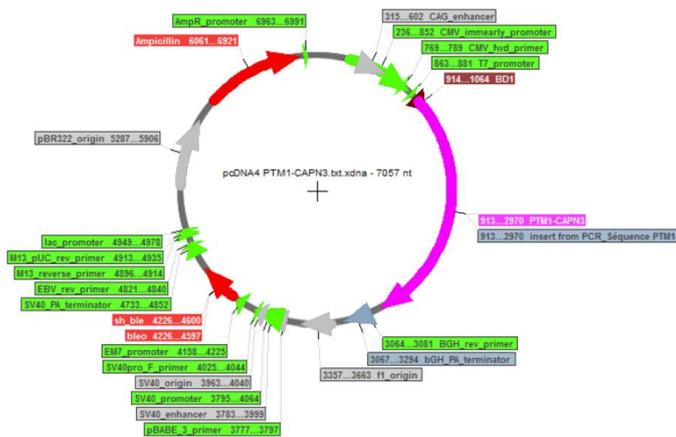


FIG SMaRT 6 : Représentation graphique du vecteur d'expression pcDNA4 myc-HisA contenant l'insert PTM1

IV. MATERIELS ET METHODES

1. CULTURE DES MYOBLASTES HUMAINS

Les quatre lignées immortalisées de myoblastes humains utilisées pour ces travaux sont les mêmes que celles décrites dans la partie « [Chap. 3 §4.1.1](#) ».

Les lignées 7304, AB678C53Q, KM900* et 918* ont été mise en culture dans le milieu Skeletal Muscle Cell Basal Medium (C-23260, PromoCell) et supplement pack (C-39360, PromoCell) additionné de 20% SVF (Gibco) et de 1% d'un mélange antibiotique/antimycotique (GE Healthcare).

La différenciation des myoblastes en myotubes a été obtenue à partir des myoblastes en culture arrivés à confluence puis mis en culture dans du milieu DMEM additionné de gentamicine à 50mg/ml (Gibco) et d'insuline humaine à 5µg/ml (Sigma Aldrich).

2. CONSTRUCTIONS DES ADNc PLASMIDIQUES

Pour permettre l'expression des PTM1, PTM2 et PTM3 dans les lignées immortalisées des myoblastes, les ADNc correspondant ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression pcDNA4 Myc-HisA comme décrit au paragraphe 2. iii. Les vecteurs d'expressions ont été amplifiés par transformation par choc thermique de bactéries compétentes *E. coli* selon le protocole et les recommandations du fournisseur en utilisant le kit High Efficiency Transformation Protocol using NEB® 10-beta Competent *E. coli* (réf. C30911, NEB). Une quantité de 100ng d'ADNc plasmidique a été utilisée. Après sélection par ampicilline des colonies transformées en milieu LB solide, chaque colonie isolée a été repiquée dans 5mL de milieu LB liquide additionné d'ampicilline (20 µg/ml) pour permettre la multiplication des bactéries et amplification du plasmide. Pour purifier et isoler l'ADN plasmidique d'intérêt, nous avons suivi le protocole et les recommandations du fournisseur en utilisant le kit QIAGEN® Plasmid Midi Kit (réf. 12143, QIAGEN). La quantité d'ADN plasmidique purifiée a été dosée avec un lecteur NanoDrop avant utilisation.

3. TRANSFECTION ET DIFFERENCIATION DES MYOBLASTES HUMAINS

Les plasmides préparés à une quantité finale de 1µg ont été transfectés dans les cellules en utilisant l'agent de transfection FuGeneHD (Promega) selon les recommandations du fournisseur. Pour chaque condition de transfection, 300 000 cellules de chaque lignée ont été mises en culture dans un puits de 3,5cm de diamètre, 24h avant la transfection. Au bout de 48h d'incubation, le milieu de culture a été changé. L'incubation se poursuivait jusqu'à ce que les cellules soient suffisamment à confluence pour lancer leur différenciation en myotubes.

4. EXPRESSION DES TRANSCRITS ISSUS DU TRANS-EPISSAGE

Les ARN totaux ont été extraits et purifiés à partir des myotubes formés par les lignées immortalisées de myoblastes humains en respectant les étapes décrites dans le guide utilisateur du TriZol™ Reagent (réf. 15596026, Invitrogen). 500ng d'ARN total ont subi une transcription inverse avec le kit High Capacity cDNA Reverse Kit (réf. 4368814, Ambion) en utilisant des hexamères aléatoires selon le protocole du fournisseur.

Une amplification des transcrits d'intérêt a été effectuée par PCR en utilisant le kit PCR MasterMix (Promega) et en suivant les recommandations du fournisseur. Les conditions de la PCR ont été les suivantes : 95°C 2min, 35 cycles de (95°C 30sec, 56°C 30sec, 72°C 1min15sec). Les amorces ont été conçues pour chaque région d'intérêt (TABLEAU SMaRT 1) et ont été ajoutées au tube réactionnel à une concentration finale de 100µM pour une concentration finale d'ADNc à 500ng. 10µl des produits réactionnels de la PCR ont été déposés sur gel à 2% d'agarose et la révélation de la migration a été rendue possible par addition de BET.

Amorce sens	Amorce antisens	Cible <i>CAPN3</i>	Amplicon
GTTCTGGAGTGCTCTGCT	GCCAAATGGTGAAGAGACTGG	ARNm endogène	921pb
TGCACGGATGGTGAGGAAT	TGCTGTTTGCTCTGTCGCTA	ARNm exogène issu du PTM	974pb
GTTCTGGAGTGCTCTGCT	GCAGTGAGTTATCCATATTCCTC	ARNm chimère issu du <i>trans</i> - épissage	307pb

TABLEAU SMaRT 1 : Séquence des amorces sens et antisens utilisés avec leur région d'intérêt ciblée

V. RESULTATS

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences de mise au point pour déterminer les conditions de transfection afin d'avoir une expression optimale des vecteurs pcDNA4-PTM et de déterminer les conditions de PCR les plus appropriées pour l'analyse des transcrits exprimés (durée des cycles, choix des amorces, etc.). Une fois toutes les conditions déterminées et optimisées, nous avons pu procéder aux expériences préliminaires sur les lignées de myoblastes humains AB678C53Q, 7304, KM900* et 918* dont nous vous présentons les résultats ci-après.

Tout d'abord, nous avons procédé à différentes conditions de transfection présentées dans les tableaux ci-dessous (TABLEAU SMaRT 2). Comme témoin, nous avons fait le choix pour ces premiers essais d'utiliser chaque lignée non transfectée mais exposée à l'agent de transfection. Les cellules ont été mises en culture à 300 000 cellules/puits de diamètre 3,5cm et la transfection a été effectuée 24h après incubation.

Volume (µL)	AB678C53Q	7304	KM900*	918*	Volume (µL)	918*	918*	918*	KM900*	KM900*	KM900*
DMEM	150	150	150	150	DMEM	150	150	150	150	150	150
PTM1.2 (1µg)					PTM1.2 (1µg)	1.25			1.25		
PTM2.4 (1µg)					PTM2.4 (1µg)		1.40			1.40	
PTM3.1 (1µg)					PTM3.1 (1µg)			1.22			1.22
FuGene HD	3	3	3	3	FuGene HD	3	3	3	3	3	3

TABLEAU SMaRT 2 : Conditions de transfection des myoblastes humains mutés et non mutés

Les concentrations des ADNc plasmidiques pcDNA4-PTM1 (PTM1.2), pcDNA4-PTM2 (PTM2.4) et pcDNA4-PTM3(PTM3.1) utilisés ici et obtenues après purification étaient respectivement à 799µg/ml, 1219µg/ml et 822µg/ml.

Au bout de 72h d'incubation, les cellules étaient arrivées suffisamment à confluence pour lancer la différenciation des myoblastes en myotubes. Quotidiennement, le développement de la formation des myotubes a été suivi pour chaque condition. Ensuite, nous avons effectué l'analyse par PCR de l'expression des transcrits *CAPN3* issus soit de l'expression endogène de chaque lignée, soit de l'expression des pcDNA4-PTM, soit de l'expression issue du *trans*-épissage.

Pour analyser l'expression des transcrits *CAPN3* issus de leur expression endogène par chaque lignée de myoblastes humains, nous avons utilisé un couple d'amorces encadrant une séquence présente sur l'ARNm endogène mais non présente sur celles des PTM, située en amont de l'exon 5. La taille attendue de l'amplicon était de 921pb. Les résultats de la PCR sont présentés ci-dessous (FIG SMaRT 7).

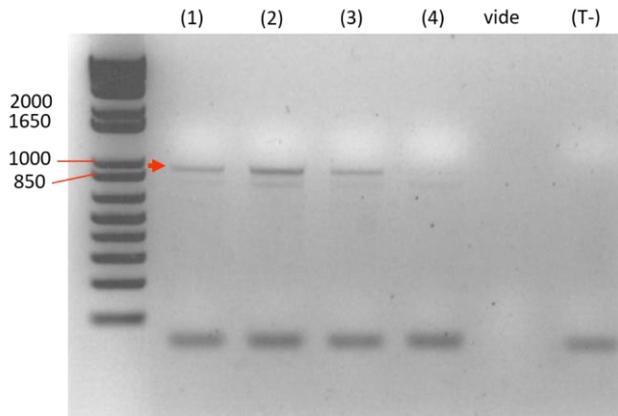


FIG SMaRT 7 : Résultats de la PCR de l'expression de l'ARNm endogène *CAPN3* dans les lignées immortalisées de myoblastes humains différenciées en myotubes non mutées (1) AB678C53Q, (2) 7304 et mutées (3) KM900* et (4) 918* non transfectées

Pour commencer, nous avons validé notre protocole de PCR car le contrôle négatif (T-) sans ajout d'ADNc ne présentait aucune bande, ce qui signifiait qu'il n'y avait donc pas eu d'amplification d'ADN non spécifique. De ce fait, nous avons pu poursuivre l'analyse : nous avons observé la présence d'une bande pour les 4 puits correspondant à l'ADNc issu de chaque lignée et toutes à la taille attendue de 921pb. Nous avons aussi observé la présence d'une seconde bande aux alentours de 850pb pour chaque lignée. Cette bande pourrait s'expliquer par un possible épissage alternatif de l'ARNm du gène *CAPN3* endogène. Fragment d'ADN à analyser par clonage et séquençage. Néanmoins, ces résultats ont prouvé que les quatre lignées immortalisées de myoblastes humains différenciées en myotubes exprimaient un transcrite du gène *CAPN3*. Condition requise pour utiliser la technologie SMaRT

Par la suite, nous avons analysé l'expression du transcrite du gène *CAPN3* produit uniquement par les vecteurs d'expression pcDNA4-PTM afin de déterminer si les lignées étaient capables de le transcrire. Pour se faire, nous avons conçu un couple d'amorces complémentaires de séquences spécifiques de l'ADNc de substitution situées sur le PTM en profitant du fait que des codons ont été remplacés lors de leur conception (cf. §2.1.iii.c). Ainsi, nous espérions avoir une spécificité maximale pour l'ADNc issus des PTM. La taille attendue de l'amplicon était de 974pb. Les résultats de la PCR sont présentés ci-dessous (FIG SMaRT 8).

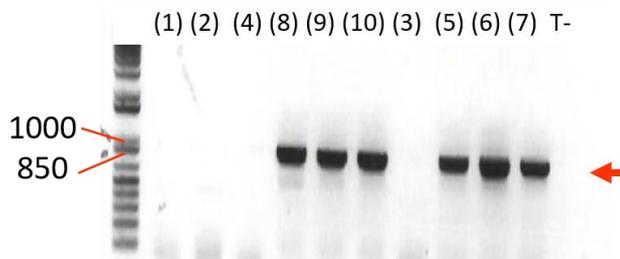


FIG SMaRT 8 : Résultats de la PCR de l'expression de l'ARNm de substitution *CAPN3* issu des PTM dans les lignées immortalisées de myoblastes humains différenciées en myotubes non mutées/non transfectées **(1)** AB678C53Q, **(2)** 7304 et mutées/non transfectées **(3)** KM900* et **(4)** 918* ; mutées/transfectées KM900* avec le pcDNA4-PTM1 **(5)**, -PTM2 **(6)** et -PTM3 **(7)** et 918* avec le pcDNA4-PTM1 **(8)**, -PTM2 **(9)** et -PTM3 **(10)**

Comme auparavant, nous avons validé notre protocole de PCR car le contrôle négatif (T-) sans ajout d'ADNc était négatif (absence de bande). Il n'y avait donc pas eu d'amplification d'ADN non spécifique. Nous avons poursuivi l'analyse et avons observé l'absence de bande pour les puits **(1)** à **(4)** et la présence d'une bande à la taille attendue de 974pb pour les puits **(5)** à **(10)**. Ces résultats ont montré que les lignées immortalisées de myoblastes humains différenciés en myotubes non mutées/non transfectées AB678C53Q et 7304 et mutées/non transfectées KM900* et 918* n'exprimaient pas de transcrite identique à celui issu de l'expression des pcDNA4-PTM. Contrairement aux lignées immortalisées mutées/transfectées KM900* et 918* qui exprimaient le transcrite issu de l'expression des pcDNA4-PTM1, -PTM2 et -PTM3. Nous pouvons donc en déduire que les vecteurs d'expression ont été correctement intégrés par les myoblastes et que les PTM conçus permettent d'exprimer le PTM au sein de ces cellules.

Pour finir, nous avons voulu déterminer si le phénomène de *trans*-épissage aboutissait à un ARNm *CAPN3* chimère. Pour se faire, nous avons conçu un couple d'amorces complémentaires spécifiques à la fois d'une séquence présente sur l'ARNm endogène, juste en amont de l'exon 5 (amorce sens) et d'une séquence spécifique de l'ADNc située sur le PTM (amorce antisens). Ensuite, nous avons purifié les différents produits de PCR et réalisé une digestion avec l'enzyme de restriction XhoI dont le site de restriction était présent sur la séquence ADNc des PTM mais absent sur la séquence de l'ADNc endogène (cf. §B.3.II). Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (FIG. SMaRT 9).

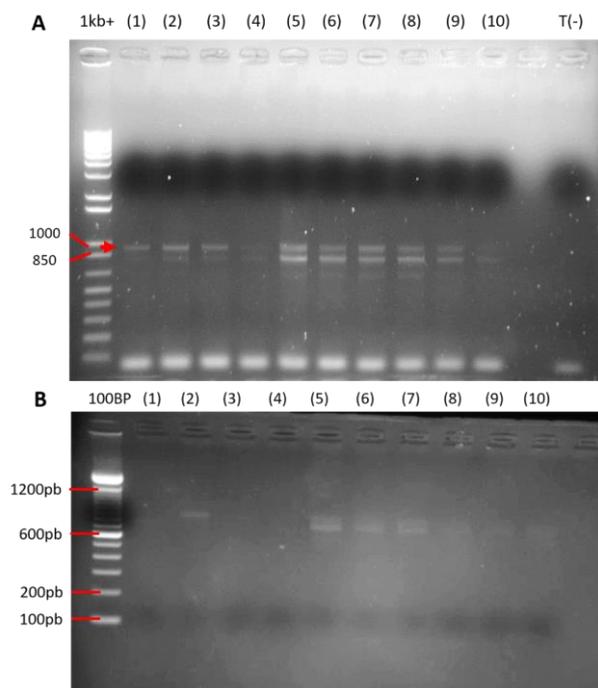


FIG SMaRT 9 : Résultats de l'expression des ARNm chimères *CAPN3* dans les lignées immortalisées de myoblastes humains différenciées en myotubes non mutées/non transfectées **(1)** AB678C53Q, **(2)** 7304 et mutées/non transfectées **(3)** KM900* et **(4)** 918* ; mutées/transfectées KM900* avec le pcDNA4-PTM1 **(5)**, -PTM2 **(6)** et -PTM3 **(7)** et 918* transfectées avec le pcDNA4-PTM1 **(8)**, -PTM2 **(9)** et -PTM3 **(10)** avant digestion avec XhoI des différents produits de la PCR **(A)** et après digestion avec XhoI de ces mêmes produits de PCR **(B)**

Cette fois-ci encore, nous avons validé notre protocole de PCR car le contrôle négatif (T-) sans ajout d'ADNc ne présentait aucune bande. Il n'y avait donc pas eu d'amplification d'ADNc non spécifique. Nous avons pu poursuivre l'analyse : en **(A)**, nous avons observé la présence d'une bande à la taille attendue de 922pb pour tous les puits **(1)** à **(10)**. Ces résultats ont montré que les lignées immortalisées de myoblastes humains différenciées en myotubes non mutées/non transfectées AB678C53Q et 7304 et mutées/non transfectées ou transfectées KM900* et 918* exprimaient toutes un transcrite identique *CAPN3*. Le profil du gel observé était le même que celui présenté dans la FIG SMaRT 7, à savoir la présence de 2 bandes pour chaque puits. A ce stade, nous ne pouvions pas en déduire si les vecteurs d'expression avaient été correctement intégrés par les myoblastes et si les PTM conçus induisaient un phénomène de *trans*-épissage au sein de ces mêmes cellules donc à l'expression d'un ARNm chimère, du fait d'une amplification d'ARNm observée dans les lignées contrôle AB678C53Q et 7304. D'où l'intérêt de procéder à la digestion avec l'enzyme de restriction XhoI afin de pouvoir déceler la présence de l'ARNm *CAPN3* chimère dont le profil du gel obtenu après cette digestion est présenté en **(B)**. Nous avons observé la présence d'une bande de bonne intensité et d'une bande de plus faible intensité pour les puits **(2)**, **(5)** à **(10)** mais pas pour les puits **(1)**, **(3)** et **(4)** à une taille attendue si absence de coupure à 922pb. L'absence de produits de PCR pour ces derniers puits devaient être liés à la perte trop importante des produits après l'étape de purification qui a entraîné un signal non détectable. En revanche,

aucune bande n'était visible aux tailles attendues si coupure par XhoI à 807pb et 114pb. Nous n'avons donc pas pu en déduire si les lignées de myoblastes humains mutées/transfectées KM900* et 918* exprimaient un ARNm *CAPN3* chimère issu du *trans*-épissage de l'expression des pcDNA4-PTM. En prenant en compte ces derniers résultats, il serait intéressant de réaliser une méthode plus sensible pour tenter de déceler l'expression de ces ARNm chimères dans les lignées utilisées.

C. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les résultat que nous avons obtenus avec l'outil de complémentation intermoléculaire de la calpaïne-3 sont très encourageants pour l'avenir de cette approche en thérapie. L'étude de prolifération que nous avons réalisée a montré une amélioration de la division des myoblastes de la lignée KM900*, et plus tardivement de la lignée 918*, après que celles-ci aient été transfectées avec le vecteur d'expression pCMV p94:C58k-EGFP. De plus, nous avons constaté que la largeur moyenne des myotubes issus des lignées mutées 918* était significativement plus importante que celle de la lignée contrôle 7304, même observation pour la lignée KM900*. Ces résultats étaient aussi visibles lors de nos observations en immunofluorescence, pour lesquelles les myotubes issus des lignées de myoblastes mutés semblaient en effet plus larges que ceux issus des lignées non mutées. Concernant la localisation d'expression des parties N-terminale et C-terminale de la calpaïne-3, nous avons constaté que la première était localisée principalement au niveau des lignes M des myotubes ainsi qu'une localisation nucléaire très marquée, jamais décrite dans la littérature jusqu'à présent. De plus, nous avons constaté la formation de vacuoles exprimant cette partie N-terminale dans certains myotubes pour les deux lignées mutées. A l'inverse, la partie C-terminale associée à la GFP issue de l'expression du vecteur d'expression était diffuse dans le cytoplasme, tout comme la partie C-terminale endogène montrée dans la figure iMOC 4 avec parfois la formation de quelques vacuoles coexprimant la partie N-terminale de la calpaïne-3. Nous avons donc montré que les myoblastes humains mutés étaient capables d'une part, de synthétiser la calpaïne-3 et ses deux fragments autolytiques mais qu'ils étaient aussi capables d'exprimer le fragment autolytique C58k exogène et probablement que ce fragment pouvait s'associer à la partie N-terminale, uniquement au niveau du cytoplasme et non du noyau.

De plus, nous avons montré grâce à nos expériences d'immunomarquages, que les lignées immortalisées de myoblastes humains mutés KM900* et 918* étaient capables de synthétiser la calpaïne-3 mais que cette dernière ne pouvait exercer son activité protéolytique sur ses substrats. Nous pouvons donc dire que les mutations affectant les lignées 918* et KM900* empêchent l'activité protéolytique de la calpaïne-3 endogène, mutation affectant le domaine IS1, nécessaire à l'activation extramoléculaire, et CBSW, nécessaire à la reconnaissance du substrat, dans le cas de la lignée 918* et uniquement le domaine CBSW dans le cas de la lignée KM900*. En revanche, nous avons montré qu'en parant ce défaut grâce à l'expression du fragment autolytique C58k actif issue du vecteur pCMV p94:C58k-EGFP, les lignées mutées étaient capables de restaurer une activité protéolytique de la calpaïne-3 (cf. figure iMOC 6). En revanche, la transfection des myoblastes a retardé le développement des myotubes, il serait donc nécessaire de reproduire les protocoles d'IF en veillant à obtenir des myotubes issus des lignées KM900* et 918* après transfection afin de les comparer aux lignées contrôle AB678C53Q et 7304.

Concernant la technologie SMaRT, les premiers résultats que nous avons obtenus sont aussi encourageants car les myoblastes humains sont capables d'exprimer la molécule de trans-épissage issue de l'expression du vecteur pcDNA4 correspondant. Toutefois, nous n'avons pas pu déterminer à ce stade si les PTM étaient correctement intégrées au *trans*-épissage du gène *CAPN3* et donc évaluer correctement l'efficacité des vecteurs d'expression pcDNA4-PTM que nous avons conçus. C'est pourquoi il nous faudrait aller plus loin dans nos travaux, en réalisant une étude de prolifération des lignées immortalisées de myoblastes humains sans et avec transfection avec chaque vecteur, en réalisant une étude de l'activité protéolytique de la calpaïne-3 chimère issue du *trans*-épissage par immunotransfert et en réalisant une analyse par immunofluorescence pour observer le phénotype des myotubes formés après transfection ; comme nous avons commencé à le faire pour l'outil de complémentation intermoléculaire. Mais nous devons garder à l'esprit qu'obtenir une molécule de *trans*-épissage efficace demande d'en tester des dizaines auparavant, et que l'efficacité du *trans*-épissage *in vitro* a été estimé à 14% au maximum, et que le *trans*-épissage d'un pre-ARNm endogène *in vivo* exprimé dans une lignée cellulaire stable est plus faible encore. De plus, il faut s'assurer que les PTMs soient exprimés uniquement dans les cellules d'intérêt, des travaux ayant rapportés des *trans*-épissage non spécifiques (Mansfield et al., 2004).

Pour les deux outils de thérapie que nous avons décidé de développer, augmenter le pourcentage de myoblastes qui auront correctement intégré les différents vecteurs d'expression est un impératif pour améliorer les études d'évaluation de ces technologies et utiliser un vecteur de transfert couramment utilisé en essai clinique chez l'Homme. Ainsi, nous envisageons d'utiliser des virus adénoassociés, dits AAV pour adeno-associated virus en anglais, pour de futures études préliminaires. En effet, en augmentant le nombre de cellules transfectées, nous augmenterons la pertinence des résultats et les effets sur le phénotype des myotubes et l'activité enzymatique de la calpaïne-3, ainsi qu'une meilleure étude de la localisation des parties N-terminale et C-terminale de la calpaïne-3 sans et avec transfection du vecteur d'expression pCMV p94:C58k-EGFP. Nos prochains travaux devraient plutôt se concentrer sur le développement de l'outil de thérapie génique utilisant la capacité de complémentation intermoléculaire de la calpaïne-3 car cet outil présente des avantages non retrouvés avec la technologie SMaRT :

- *Premièrement, en utilisant des AAV pour infecter les myoblastes, nous augmenterions le nombre de myoblastes intégrant le vecteur d'expression d'intérêt de l'ordre de 90%.*
- *Deuxièmement, l'efficacité de cet outil serait meilleure que celle issue du trans-épissage car la complémentation intermoléculaire fait partie intégrant du mode d'activation et d'action de la calpaïne-3.*
- *Troisièmement, nous éviterons une expression non spécifique de la calpaïne-3 et les effets délétères qui y sont associés, comme une toxicité cardiaque par exemple (Bartoli et al., 2006), car le fragment autolytique C58k potentiellement exprimé dans d'autres cellules que des myoblastes du muscle squelettique serait dégradé très rapidement, ne pouvant s'associer à une calpaïne-3 entière ou le fragment autolytique N31k dans des cellules ne les synthétisant pas.*
- *Quatrièmement, il sera possible de transfecter soit la partie N-terminale, soit la partie C-terminale de la calpaïne-3 pour restaurer une activité de cette dernière et ainsi proposer cette solution de thérapie génique à une très grande majorité des patients atteints de dystrophie musculaire des ceintures de type 2A car toutes les mutations présentes sur le gène CAPN3 seraient compensées par une séquence intacte de chacun des deux fragments autolytiques.*

Pour finir, ces travaux montrent que malgré la complexité de la LGMD2A du fait de la présence de nombreux variants pathogènes répartis sur le gène *CAPN3* des patients souffrant de cette pathologie et des différents impacts de ces mutations sur la calpaïne-3, des outils de thérapie peuvent être développés et démontrer

des efficacités non négligeables et potentiellement sans effets secondaires sur l'expression d'autres gènes avec l'avantage de pouvoir concerner la quasi-totalité des patients souffrant de cette pathologie. Ce sont donc des outils qui ont toute leur place à l'avenir et pour lesquels des travaux plus poussés doivent être menés pour enfin pouvoir proposer une solution curative aux patients atteints de calpainopathie.

BIBLIOGRAPHIE

Alam, R. (1992). Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells. *J. Exp. Med.* *176*, 781–786.

Anderson, L.V.B., Davison, K., Moss, J.A., Richard, I., Fardeau, M., Tomé, F.M.S., Hübner, C., Lasa, A., Colomer, J., and Beckmann, J.S. (1998). Characterization of Monoclonal Antibodies to Calpain 3 and Protein Expression in Muscle from Patients with Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. *Am. J. Pathol.* *153*, 1169–1179.

Angelini, C., and Fanin, M. (2017a). Limb girdle muscular dystrophies: clinical-genetical diagnostic update and prospects for therapy. *Expert Opin. Orphan Drugs* *5*.

Angelini, C., and Fanin, M. (2017b). Calpainopathy (University of Washington, Seattle).

Bartoli, M., Roudaut, C., Martin, S., Fougerousse, F., Suel, L., Poupiot, J., Gicquel, E., Noulet, F., Danos, O., and Richard, I. (2006). Safety and efficacy of AAV-mediated calpain 3 gene transfer in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *13*, 250–259.

Baumeister, S.K., Todorovic, S., Milić-Rasić, V., Dekomien, G., Lochmüller, H., and Walter, M.C. (2009). Eosinophilic myositis as presenting symptom in gamma-sarcoglycanopathy. *Neuromuscul. Disord.* *NMD 19*, 167–171.

Berger, A., Lorain, S., Joséphine, C., Desrosiers, M., Peccate, C., Voit, T., Garcia, L., Sahel, J.-A., and Bemelmans, A.-P. (2015). Repair of Rhodopsin mRNA by Spliceosome-Mediated RNA Trans-Splicing: A New Approach for Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Mol. Ther.* *23*, 918–930.

Berger, A., Maire, S., Gaillard, M., Sahel, J., Hantraye, P., and Bemelmans, A. (2016). mRNA trans-splicing in gene therapy for genetic diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *7*, 487–498.

Besançon-Watelet, C., Béné, M.C., Montagne, P., Faure, G.C., and Jankowski, R. (2002). Eosinophilia and Cell Activation Mediators in Nasal Secretions. *The Laryngoscope* *112*, 43–46.

Brown, R.H., and Amato, A. (2006). Calpainopathy and eosinophilic myositis. *Ann. Neurol.* *59*, 875–877.

Bryant, N.D., Li, K., Does, M.D., Barnes, S., Gochberg, D.F., Yankeelov, T.E., Park, J.H., and Damon, B.M. (2014). Multi-parametric MRI characterization of inflammation in murine skeletal muscle. *NMR Biomed.* *27*, 716–725.

Carlier, P.G., Marty, B., Scheidegger, O., Loureiro de Sousa, P., Baudin, P.-Y., Snezhko, E., and Vlodayets, D. (2016). Skeletal Muscle Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy as an Outcome Measure for Clinical Trials. *J. Neuromuscul. Dis.* *3*, 1–28.

Charton, K., Sarparanta, J., Vihola, A., Milic, A., Jonson, P.H., Suel, L., Luque, H., Boumela, I., Richard, I., and Udd, B. (2015). CAPN3-mediated processing of C-terminal titin replaced by pathological cleavage in titinopathy. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 3718–3731.

Cummings, B.B., Marshall, J.L., Tukiainen, T., Lek, M., Donkervoort, S., Foley, A.R., Bolduc, V., Waddell, L.B., Sandaradura, S.A., O'Grady, G.L., et al. (2017). Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Sci. Transl. Med.* 9.

ten Dam, L., van der Kooi, A.J., van Waddingen, M., de Haan, R.J., and de Visser, M. (2012). Reliability and accuracy of skeletal muscle imaging in limb-girdle muscular dystrophies. *Neurology* 79, 1716–1723.

Davoine, F., and Lacy, P. (2014). Eosinophil Cytokines, Chemokines, and Growth Factors: Emerging Roles in Immunity. *Front. Immunol.* 5.

Degardin, A., Morillon, D., Lacour, A., Cotten, A., Vermersch, P., and Stojkovic, T. (2010). Morphologic imaging in muscular dystrophies and inflammatory myopathies. *Skeletal Radiol.* 39, 1219–1227.

Díaz-Manera, J., Llauger, J., Gallardo, E., and Illa, I. (2015). Muscle MRI in muscular dystrophies. *Acta Myol.* 34, 95–108.

Duguez, S., Bartoli, M., and Richard, I. (2006). Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS J.* 273, 3427–3436.

Eggers, S., and Zatz, M. (1998). Social adjustment in adult males affected with progressive muscular dystrophy. *Am. J. Med. Genet.* 81, 4–12.

Ermolova, N., Kudryashova, E., DiFranco, M., Vergara, J., Kramerova, I., and Spencer, M.J. (2011). Pathogenicity of some limb girdle muscular dystrophy mutations can result from reduced anchorage to myofibrils and altered stability of calpain 3. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3331–3345.

Fanin, M., Fulizio, L., Nascimbeni, A. c., Spinazzi, M., Piluso, G., Ventriglia, V. m., Ruzza, G., Siciliano, G., Trevisan, C. p., Politano, L., et al. (2004). Molecular diagnosis in LGMD2A: Mutation analysis or protein testing? *Hum. Mutat.* 24, 52–62.

Fanin, M., Nascimbeni, A.C., and Angelini, C. (2014). Gender difference in limb-girdle muscular dystrophy: a muscle fiber morphometric study in 101 patients. *Clin. Neuropathol.* 33, 179–185.

Fardeau, M., Eymard, B., Mignard, C., Tomé, F.M.S., Richard, I., and Beckmann, J.S. (1996). Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: Clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromuscul. Disord.* 6, 447–453.

Fatehi, F., Salort-Campana, E., Troter, A.L., Lareau-Trudel, E., Bydder, M., Fouré, A., Guye, M., Bendahan, D., and Attarian, S. (2017). Long-term follow-up of MRI changes in thigh muscles of patients with Facioscapulohumeral dystrophy: A quantitative study. *PLOS ONE* 12, e0183825.

Fougerousse, F., Gonin, P., Durand, M., Richard, I., and Raymackers, J.-M. (2003a). Force impairment in calpain 3-deficient mice is not correlated with mechanical disruption. *Muscle Nerve* 27, 616–623.

Fougerousse, F., Gonin, P., Durand, M., Richard, I., and Raymackers, J.-M. (2003b). Force impairment in calpain 3-deficient mice is not correlated with mechanical disruption. *Muscle Nerve* 27, 616–623.

Groen, E.J., Charlton, R., Barresi, R., Anderson, L.V., Eagle, M., Hudson, J., Koref, M.S., Straub, V., and Bushby, K.M.D. (2007). Analysis of the UK diagnostic strategy for limb girdle muscular dystrophy 2A. *Brain* 130, 3237–3249.

Hauerslev, S., Sveen, M.-L., Duno, M., Angelini, C., Vissing, J., and Krag, T.O. (2012). Calpain 3 is important for muscle regeneration: Evidence from patients with limb girdle muscular dystrophies. *BMC Musculoskelet. Disord.* 13, 43.

Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S., et al. (2008). Multiple Molecular Interactions Implicate the Connectin/Titin N2A Region as a Modulating Scaffold for p94/Calpain 3 Activity in Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.* 283, 14801–14814.

Hermanová, M., Zapletalová, E., Sedláčková, J., Chrobáková, T., Letocha, O., Kroupová, I., Zámečník, J., Vondráček, P., Mazanec, R., Maříková, T., et al. (2006). Analysis of histopathologic and molecular pathologic findings in Czech LGMD2A patients. *Muscle Nerve* 33, 424–432.

Huang, Y., de Morrée, A., van Remoortere, A., Bushby, K., Frants, R.R., Dunnen, J.T., Maarel, V.D., and M, S. (2008). Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1855–1866.

Jankowski, R., Persoons, M., Foliguet, B., Coffinet, L., Thomas, C., and Verient-Montaut, B. (2000). Eosinophil count in nasal secretions of subjects with and without nasal symptoms. *Rhinology* 38, 23–32.

Keira, Y., Noguchi, S., Kurokawa, R., Fujita, M., Minami, N., Hayashi, Y.K., Kato, T., and Nishino, I. (2007). Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling. *Neurosci. Res.* 57, 513–521.

Kergourlay, V., Raï, G., Blandin, G., Salgado, D., Bérout, C., Lévy, N., Krahn, M., and Bartoli, M. Identification of Splicing Defects Caused by Mutations in the Dysferlin Gene. *Hum. Mutat.* 35, 1532–1541.

Krahn, M., Lopez De Munain, A., Streichenberger, N., Bernard, R., Pécheux, C., Testard, H., Pena-Segura, J.L., Yoldi, E., Cabello, A., Romero, N.B., et al. (2006). CAPN3 mutations in patients with idiopathic eosinophilic myositis. *Ann. Neurol.* 59, 905–911.

Krahn, M., Goicoechea, M., Hanisch, F., Groen, E., Bartoli, M., Pécheux, C., Garcia-Bragado, F., Leturcq, F., Jeannet, P.-Y., Lohrbus, J., et al. (2011). Eosinophilic infiltration related to CAPN3 mutations: a pathophysiological component of primary calpainopathy? *Clin. Genet.* 80, 398–402.

Kramerova, I., Kudryashova, E., Tidball, J.G., and Spencer, M.J. (2004). Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1373–1388.

Kramerova, I., Kudryashova, E., Wu, B., Ottenheijm, C., Granzier, H., and Spencer, M.J. (2008). Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3271–3280.

Lebel, R.M., and Wilman, A.H. (2010). Transverse relaxometry with stimulated echo compensation. *Magn. Reson. Med.* *64*, 1005–1014.

Lee, J.J., Jacobsen, E.A., Ochkur, S.I., McGarry, M.P., Condjella, R.M., Doyle, A.D., Luo, H., Zellner, K.R., Protheroe, C.A., Willetts, L., et al. (2012). Human versus mouse eosinophils: “That which we call an eosinophil, by any other name would stain as red.” *J. Allergy Clin. Immunol.* *130*, 572–584.

Luo, S.-S., Xi, J.-Y., Lu, J.-H., Zhao, C.-B., Zhu, W.-H., Lin, J., Wang, Y., Ren, H.-M., Yin, B., and Andoni, U.J. (2011). Clinical and pathological features in 15 Chinese patients with calpainopathy. *Muscle Nerve* *43*, 402–409.

Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J.L., et al. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet. Muscle* *1*, 34.

Mansfield, S.G., Chao, H., and Walsh, C.E. (2004). RNA repair using spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Trends Mol. Med.* *10*, 263–268.

MARTINEZ-THOMPSON, J.M., NIU, Z., TRACY, J.A., MOORE, S.A., SWENSON, A., WIEBEN, E.D., and MILONE, M. (2018). AUTOSOMAL DOMINANT CALPAINOPATHY DUE TO HETEROZYGOUS CAPN3 C.643_663DEL21. *Muscle Nerve* *57*, 679–683.

Meyer, A., Lannes, B., Carapito, R., Bahram, S., Echaniz-Laguna, A., Geny, B., Sibia, J., and Gottenberg, J.E. (2015). Eosinophilic myositis as first manifestation in a patient with type 2 myotonic dystrophy CCTG expansion mutation and rheumatoid arthritis. *Neuromuscul. Disord.* *NMD 25*, 149–152.

Milic, A., Daniele, N., Lochmüller, H., Mora, M., Comi, G.P., Moggio, M., Noulet, F., Walter, M.C., Morandi, L., Poupiot, J., et al. (2007). A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an in vitro assay. *Neuromuscul. Disord.* *17*, 148–156.

Narayanaswami, P., Weiss, M., Selcen, D., David, W., Raynor, E., Carter, G., Wicklund, M., Barohn, R.J., Ensrud, E., Griggs, R.C., et al. (2014). Evidence-based guideline summary: Diagnosis and treatment of limb-girdle and distal dystrophies. *Neurology* *83*, 1453–1463.

Norwood, F., De Visser, M., Eymard, B., Lochmüller, H., and Bushby, K. (2007). EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. *Eur. J. Neurol.* *14*, 1305–1312.

Ojima, K., Ono, Y., Ottenheijm, C., Hata, S., Suzuki, H., Granzier, H., and Sorimachi, H. (2011). Non-Proteolytic Functions of Calpain-3 in Sarcoplasmic Reticulum in Skeletal Muscles. *J. Mol. Biol.* *407*, 439–449.

Okere, A., Reddy, S.S., Gupta, S., and Shinnar, M. (2013). A Cardiomyopathy in a Patient With Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. *Circ. Heart Fail.* *6*, e12–e13.

Ono, Y., Iemura, S., Novak, S.M., Doi, N., Kitamura, F., Natsume, T., Gregorio, C.C., and Sorimachi, H. (2013). PLEIAD/SIMC1/C5orf25, a Novel Autolysis Regulator for a Skeletal-Muscle-Specific Calpain, CAPN3, Scaffolds a CAPN3 Substrate, CTBP1. *J. Mol. Biol.* *425*, 2955–2972.

Ono, Y., Shindo, M., Doi, N., Kitamura, F., Gregorio, C.C., and Sorimachi, H. (2014). The N- and C-terminal autolytic fragments of CAPN3/p94/calpain-3 restore proteolytic activity by intermolecular complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E5527–E5536.

Ono, Y., Ojima, K., Shinkai-Ouchi, F., Hata, S., and Sorimachi, H. (2016). An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie* *122*, 169–187.

Oygaard, K., Haestad, H., and Jørgensen, L. (2011). Physiotherapy, based on the Bobath concept, may influence the gait pattern in persons with limb-girdle muscle dystrophy: a multiple case series study. *Physiother. Res. Int. J. Res. Clin. Phys. Ther.* *16*, 20–31.

Perez, F., Vital, A., Martin-Negrier, M.-L., Ferrer, X., and Sole, G. (2010). Diagnostic des dystrophies musculaires progressives des ceintures de type 2A ou calpainopathies : étude des patients du centre de référence des maladies neuromusculaires de Bordeaux (France). *Rev. Neurol. (Paris)* *166*, 502–508.

Puttaraju, M., Jamison, S.F., Mansfield, S.G., Garcia-Blanco, M.A., and Mitchell, L.G. (1999). Spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing as a tool for gene therapy. *Nat. Biotechnol.* *17*, 246.

Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdigui, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., et al. (2000). Loss of Calpain 3 Proteolytic Activity Leads to Muscular Dystrophy and to Apoptosis-Associated I κ b α /Nuclear Factor κ B Pathway Perturbation in Mice. *J. Cell Biol.* *151*, 1583–1590.

Richard, I., Hogrel, J., Stockholm, D., Payan, C.A.M., Fougerousse, F., Eymard, B., Mignard, C., Lopez de Munain, A., Fardeau, M., and Urtizberea, J.A. (2016). Natural history of LGMD2A for delineating outcome measures in clinical trials. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *3*, 248–265.

Rodriguez-Martin, T., Garcia-Blanco, M.A., Mansfield, S.G., Grover, A.C., Hutton, M., Yu, Q., Zhou, J., Anderton, B.H., and Gallo, J.-M. (2005). Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA *trans*-splicing: Implications for tauopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15659–15664.

Sáenz, A., and López de Munain, A. (2017). Dominant LGMD2A: alternative diagnosis or hidden digenism? *Brain* *140*, e7–e7.

Sáenz, A., Ono, Y., Sorimachi, H., Goicoechea, M., Leturcq, F., Blázquez, L., García-Bragado, F., Marina, A., Poza, J.J., Azpitarte, M., et al. (2011). Does the severity of the LGMD2A phenotype in compound heterozygotes depend on the combination of mutations? *Muscle Nerve* *44*, 710–714.

Salem, I.H., Hsairi, I., Mezghani, N., Kenoun, H., Triki, C., and Fakhfakh, F. (2012). CAPN3 mRNA processing alteration caused by splicing mutation associated with novel genomic rearrangement of *Alu* elements. *J. Hum. Genet.* *57*, 92–100.

Sarparanta, J., Blandin, G., Charton, K., Vihola, A., Marchand, S., Milic, A., Hackman, P., Ehler, E., Richard, I., and Udd, B. (2010). Interactions with M-band Titin and Calpain 3 Link Myospryn (CMYA5) to Tibial and Limb-girdle Muscular Dystrophies. *J. Biol. Chem.* *285*, 30304–30315.

- Schröder, T., Fuchss, J., Schneider, I., Stoltenburg-Didinger, G., and Hanisch, F. (2013). Eosinophils in hereditary and inflammatory myopathies. *Acta Myol.* 32, 148–153.
- Schutz, P.W., Scalco, R.S., Barresi, R., Houlden, H., Parton, M., and Holton, J.L. (2017). Calpainopathy with macrophage-rich, regional inflammatory infiltrates. *Neuromuscul. Disord.* NMD 27, 738–741.
- Selva-O'Callaghan, A., Trallero-Araguás, E., and Grau, J.M. (2014). Eosinophilic myositis: An updated review. *Autoimmun. Rev.* 13, 375–378.
- Sun, L., He, C., Nair, L., Yeung, J., and Egwuagu, C.E. (2015). Interleukin 12 (IL-12) Family Cytokines: Role in Immune Pathogenesis and Treatment of CNS Autoimmune Disease. *Cytokine* 75, 249–255.
- Sveen, M.-L., Andersen, S.P., Ingelsrud, L.H., Blichter, S., Olsen, N.E., Jønck, S., Krag, T.O., and Vissing, J. (2013). Resistance training in patients with limb-girdle and becker muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 47, 163–169.
- Takatsu, K. (2011). Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 87, 463–485.
- Talim, B., Ognibene, A., Mattioli, E., Richard, I., Anderson, L.V., and Merlini, L. (2001). Normal calpain expression in genetically confirmed limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Neurology* 56, 692–693.
- Tao, T., Shi, H., Guan, Y., Huang, D., Chen, Y., Lane, D.P., Chen, J., and Peng, J. (2013). Def defines a conserved nucleolar pathway that leads p53 to proteasome-independent degradation. *Cell Res.* 23, 620–634.
- Taveau, M., Bourg, N., Sillon, G., Roudaut, C., Bartoli, M., and Richard, I. (2003). Calpain 3 Is Activated through Autolysis within the Active Site and Lyses Sarcomeric and Sarcolemmal Components. *Mol. Cell. Biol.* 23, 9127–9135.
- Thompson, R., and Straub, V. (2016). Limb-girdle muscular dystrophies — international collaborations for translational research. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 294–309.
- Urtasun, M., Sáenz, A., Roudaut, C., Poza, J.J., Urtizberea, J.A., Cobo, A.M., Richard, I., García Bragado, F., Leturcq, F., Kaplan, J.C., et al. (1998). Limb-girdle muscular dystrophy in Guipúzcoa (Basque Country, Spain). *Brain J. Neurol.* 121 (Pt 9), 1735–1747.
- Vainzof, M., de Paula, F., Tsanaclis, A.M., and Zatz, M. (2003). The effect of calpain 3 deficiency on the pattern of muscle degeneration in the earliest stages of LGMD2A. *J. Clin. Pathol.* 56, 624–626.
- Vissing, J., Barresi, R., Witting, N., Van Ghelue, M., Gammelgaard, L., Bindoff, L.A., Straub, V., Lochmüller, H., Hudson, J., Wahl, C.M., et al. (2016). A heterozygous 21-bp deletion in CAPN3 causes dominantly inherited limb girdle muscular dystrophy. *Brain* 139, 2154–2163.
- Vohra, R.S., Mathur, S., Bryant, N.D., Forbes, S.C., Vandenborne, K., and Walter, G.A. (2016). Age-related T2 changes in hindlimb muscles of mdx mice. *Muscle Nerve* 53, 84–90.

Wokke, B.H., Van Den Bergen, J.C., Hooijmans, M.T., Verschuuren, J.J., Niks, E.H., and Kan, H.E. (2016). T2 relaxation times are increased in Skeletal muscle of DMD but not BMD patients. *Muscle Nerve* 53, 38–43.

Wolpe, S. (1988). Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J. Exp. Med.* 167, 570–581.

Wosczyzna, M.N., and Rando, T.A. (2018). A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Dev. Cell* 46, 135–143.

Wynn, T.A., and Vannella, K.M. (2016). Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* 44, 450–462.

ANNEXES

ANNEXE 2 : CONTRACTION ET RELACHEMENT DU SARCOMERE

La contraction du muscle est un mécanisme rendu possible grâce à l'interaction entre l'actine et la myosine dans la bande A, les myofilaments glissant les uns sur les autres. L'actine joue le rôle de la molécule « tractée » tandis que la myosine est le « moteur » moléculaire tirant les myofilaments d'actine vers la bande M. Ce mécanisme est réalisé par des milliers de têtes de myosine et permet de raccourcir un sarcomère de sa forme étirée de 3,4 μm à sa forme contractée de 2,4 μm . Il s'effectue en 5 étapes majeures :

1. A l'état de relâchement, le domaine d'interaction de la myosine avec l'actine est recouvert par la tropomyosine. La myosine est sous une forme redressée, de haute énergie et liée à l'ATP.
2. Lors d'une stimulation d'un myocyte par un motoneurone, via les neurotransmetteurs à l'acétylcholine, les canaux calciques voltage-dépendants sont activés et provoquent l'entrée de calcium dans la cellule et sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique. Ce calcium va se fixer sur la troponine, ce qui engendre un changement de sa conformation, libérant le domaine d'interaction de la myosine. Au terme de cette étape, la myosine est toujours liée à l'actine.
3. Une molécule d'ADP fixée sur la tête de la myosine va être libérée lors de l'interaction myosine-actine, ce qui aboutit à un changement de conformation et bascule la tête de la myosine. Ce basculement est responsable de la traction de l'actine vers la bande M qui provoque un raccourcissement du sarcomère. Au terme de ce mouvement, la tête de la myosine va lier une molécule ATP provoquant le détachement de la molécule d'actine et le retour à une position repliée, de basse énergie.
4. La myosine va hydrolyser son ATP en ADP et un ion phosphate. L'énergie ainsi libérée par cette réaction va faire passer la myosine dans son état de haute énergie et la rendre de nouveau capable d'interagir avec l'actine. La troponine va pouvoir empêcher cette interaction si elle n'est plus fixée au calcium. Ainsi, le cycle est terminé et peut recommencer.

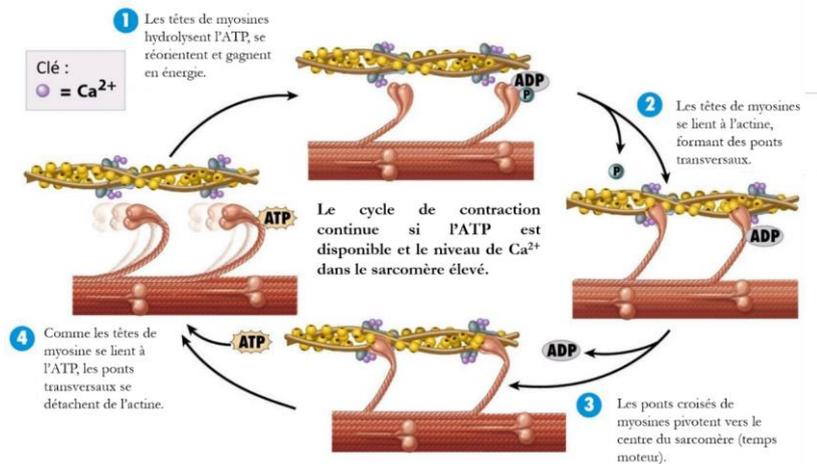
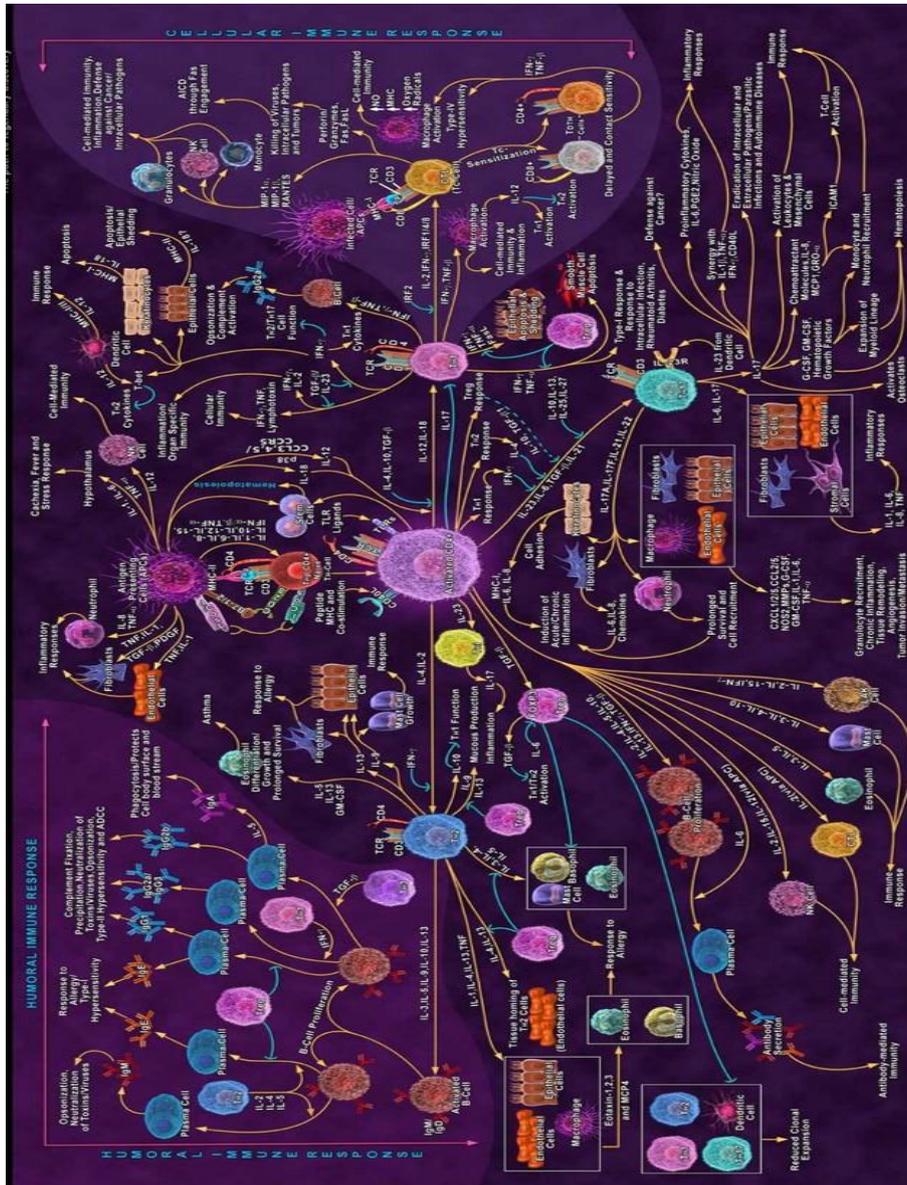


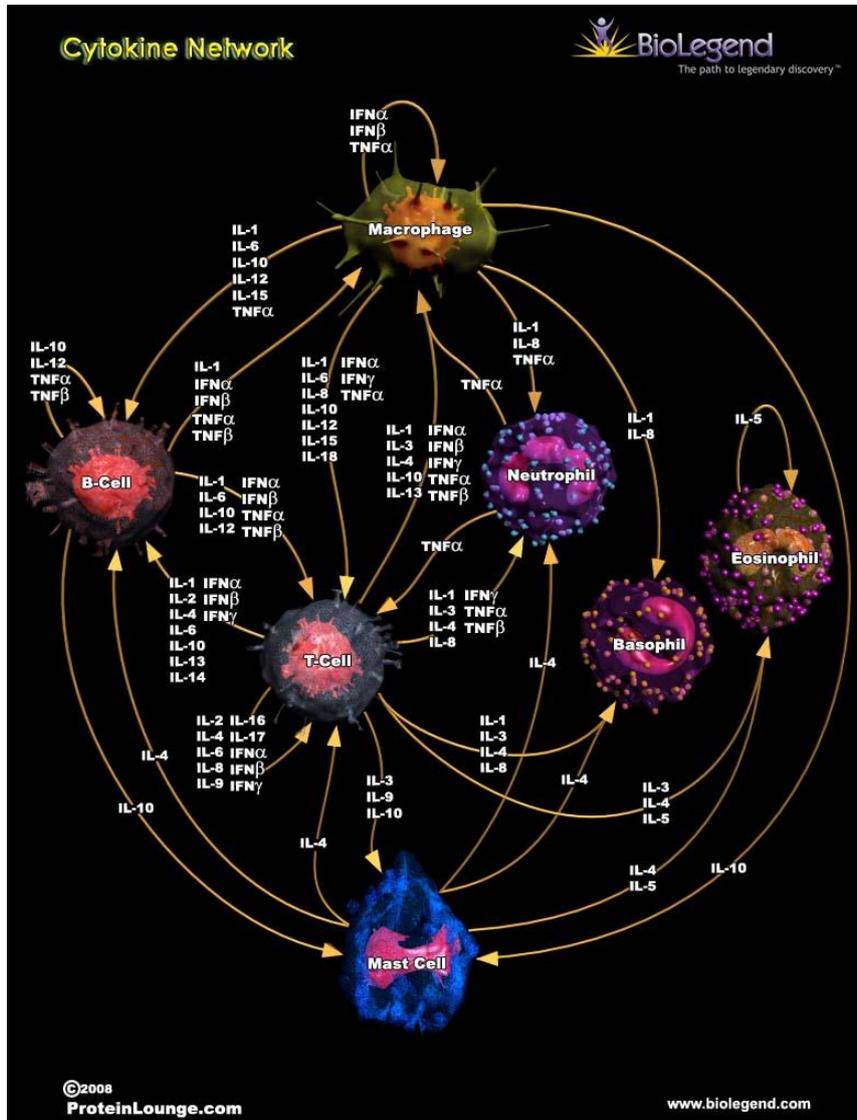
Figure 10-7 Principles of Anatomy and Physiology, 11/e
© 2006 John Wiley & Sons

ANNEXE 3 : LE RESEAU IMMUNOLOGIQUE



Source : Biogen https://www.biogen.com/pop_pathway.php?id=88

ANNEXE 4 : RESEAU DES CYTOKINES ET LEURS CELLULES CIBLES



Source : BioLegend https://www.biolegend.com/pop_pathway.php?id=31

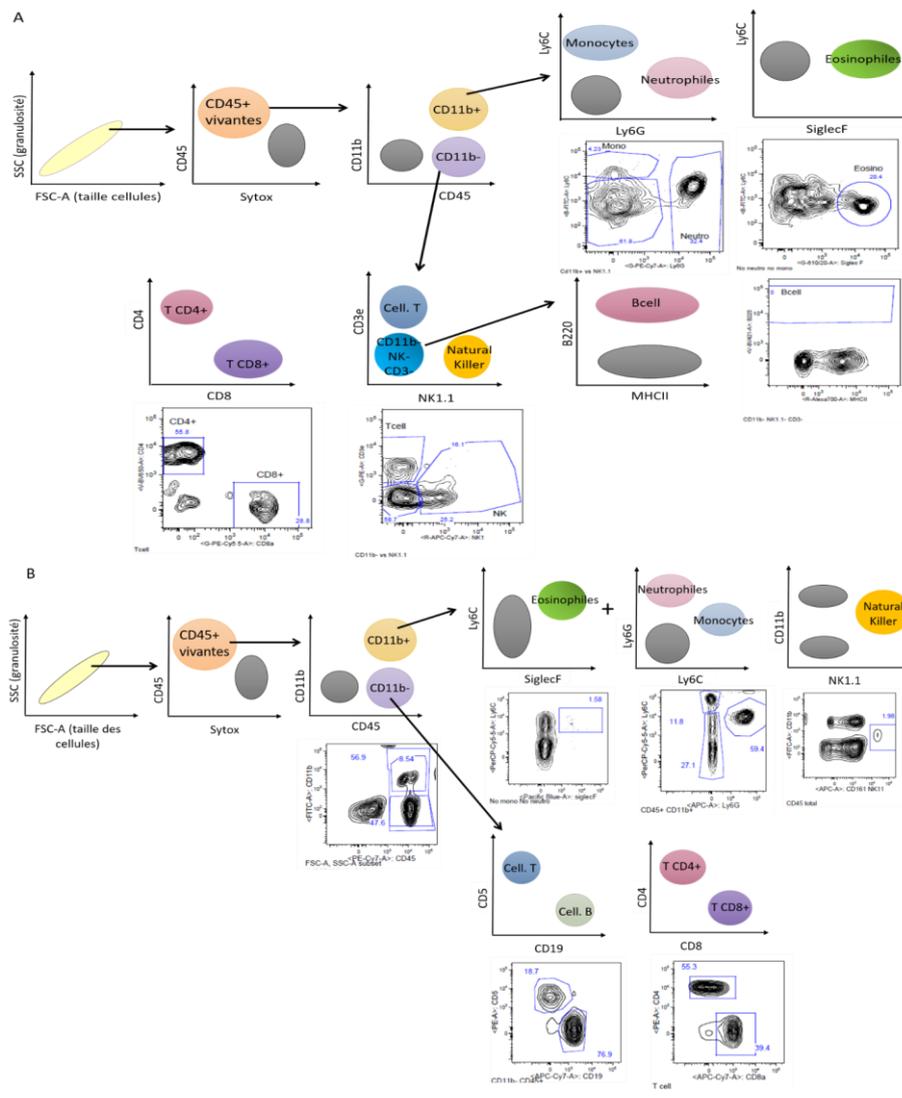
ANNEXE 5 : EXPRESSION DE CERTAINS ANTIGENES DE SURFACE DES SOUS-POPULATIONS LEUCOCYTAIRES D'INTERET

Pour identifier et quantifier les différentes sous-populations leucocytaires, nous nous sommes basés sur leur capacité à exprimer différents antigènes de surface selon leur stade de maturation et de différenciation qui sont récapitulés dans le tableau ci-après :

	LIGNÉES MYÉLOÏDES			LIGNÉES LYMPHOÏDES		
	Monocyte	Neutrophile	Eosinophile	Cellule B	Cellule T	Natural killer
CD45	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ly-6C	✓	✗	✗	✗	✓	✗
Ly-6G	✗	✓	✓	✗	✗	✗
Siglec F	✗	✗	✓	✗	✗	✗
CD64	✓	✓(activés)	✗	✗	✗	✗
MHCII	✗	✗	✗	✓	✓ (sous pop)	✗
CD19	✗	✗	✗	✓ (pro-B à B mature)	✗	✗
NK1.1	✗	✗	✗	✗	✓ (Th17 cells)	✓
CD3ε	✗	✗	✗	✗	✓	✗
CD11c	✗	✓	✗	✗	✓	✓
CD24	✗	✗	✗	✓ (expression varie lors différenciation B et T cells)		✗
CD11b	✓	✓	✓	✗	✗	✗
CD8a	✗	✗	✗	✗	✓ (sous pop)	✗
CD4	✓	✗	✗	✗	✓ (sous pop)	✗
B220 (CD45R)	✗	✗	✗	✓	✓ (sous pop)	✓ (sous pop)
CD5	✗	✗	✗	✗	✓	✗

ANNEXE 6 : STRATEGIES DE SELECTION DES LEUCOCYTES EN CYTOMETRIE EN FLUX SOUS LE LOGICIEL FLOWJO

Ci-dessous, nous vous présentons les stratégies de sélection des leucocytes dans le muscle **(A)** et dans le sang **(B)** d'après les marquages antigéniques déterminés au préalable et sous le logiciel FlowJo avant de procéder à l'analyse des données issues de cette méthode.



ANNEXE 7 : TABLEAU DES CYTOKINES/CHIMIOKINES RECHERCHEES ET LEUR IMPLICATION DANS L'IMMUNITE

Dans le chapitre concernant notre projet de recherche sur les phénomènes immunologiques au stade présymptomatique de la calpaïnopathie, nous avons effectué des investigations immunologiques à l'échelle cellulaire et moléculaire. Ces dernières concernaient la recherche de certaines cytokines et chimiokines. Nous vous présentons ici leur implication dans la réponse immunitaire (source : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)

CYTOKINE OU CHIMIOKINE	IMPLICATION DANS L'IMMUNITE
Interleukine 1a (IL1a)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine impliquée dans : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Diverses réponses immunitaires, ▪ Processus inflammatoires, ▪ Hématopoïèse. • Produite par monocytes et macrophages en tant que proprotéine en réponse à une blessure cellulaire → induit l'apoptose.
Interleukine 2 (IL2)	<p style="text-align: center;">Cytokine impliquée dans la prolifération des lymphocytes T et B.</p>
Interleukine 4 (IL4)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine pléiotrope produite par les cellules T activées → ligand du récepteur IL4 (IL4R). • IL4R se lie aussi à l'interleukine 13 : chevauchement des fonctions de IL4 et IL13. • STAT6, transducteur et activateur de signal de transcription, joue un rôle central dans la médiation de la régulation du signal induit par cette cytokine.
Interleukine 5 (IL5)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine agissant comme un facteur de croissance et de différenciation des cellules B et des éosinophiles. • Rôle majeur dans la régulation de la formation, maturation, recrutement et survie des éosinophiles. • Surexpression de IL5 peut être liée à la pathogenèse de maladies inflammatoires dépendantes des éosinophiles. • IL5 agit en se liant à son récepteur.

Interleukine 6 (IL6)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine impliquée dans l'inflammation et la maturation des cellules B. • Pyrogène endogène → induit la fièvre chez les personnes atteintes de maladies auto-immunes ou d'infections. • Produite sur les sites d'inflammations aiguë et chronique, sécrétée sous forme de sérum → induit une réponse inflammatoire via le récepteur IL6.
Interleukine 10 (IL10)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine produite d'abord par les monocytes et plus tardivement par les lymphocytes. • Effets pléiotropes dans l'immunorégulation et l'inflammation. • Inhibe l'expression des cytokines Th1, des antigènes du CMH de classe II et des molécules costimulatrices des macrophages. • Améliore la survie, la prolifération et la production d'anticorps des cellules B. • Inhibe l'activité de NF-kappa B. • Impliquée dans la régulation de la voie de signalisation JAK/STAT.
Interleukine 12a (IL12a)	<ul style="list-style-type: none"> • Sous-unité de la cytokine IL12. • Agit sur les cellules T et les NK. • Possède un large éventail d'activités biologiques. • Nécessaire pour l'induction de l'interféron gamma (IFNg) dépendante des cellules T. • Importante pour la différenciation des cellules Th1 et Th2.
Interleukine 13 (IL13)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine immunorégulatrice produite, dans un premier temps, par les cellules Th2 activées. • Impliquée dans plusieurs stades de maturation et différenciation des cellules B. • Régule à la hausse l'expression de CD23 et du CMH de classe II. • Promeut le passage des cellules B en isotype IgE. • Régule à la baisse l'activité des macrophages et par là, inhibe la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. • Rôle critique dans la pathogenèse de l'asthme induit par des allergènes mais agit par des mécanismes indépendants des IgE et des éosinophiles.
CCL5 (RANTES)	<ul style="list-style-type: none"> • Chimiokine appartenant à une superfamille de chimiokines impliquées dans l'immunorégulation et les processus inflammatoires.

	<ul style="list-style-type: none"> • Membre de la sous-famille CC, • Chimioattractante pour les monocytes circulants, les cellules mémoires T helper et les éosinophiles. • Cause le largage de l'histamine par les basophiles. • Active les éosinophiles.
CCL11 (EOTAXINE 1)	<ul style="list-style-type: none"> • Chimiokine appartenant à une superfamille de chimiokines impliquées dans l'immunorégulation et les processus inflammatoires. • Membre de la sous-famille CC, • Activité chimiotactique sur les éosinophiles mais pas sur les cellules mononuclées ou les neutrophiles. • Spécifique des éosinophiles. • Impliquée dans les maladies inflammatoires à éosinophiles.
CSF2 (GM-CSF)	Cytokine contrôlant la production , la différenciation et la fonction des macrophages et des granulocytes .
Tumor Necrosis Factor (TNF)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine membre de la superfamille TNF, des cytokines proinflammatoires multifonctionnelles. • Principalement secrétée par les macrophages. • Se lie aux récepteurs TNFRSF1A/TNFR1 et TNFRSF1B/TNFR2 pour assurer ses fonctions. • Impliquée dans la régulation d'un large spectre de processus biologique incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, le métabolisme lipidique et la coagulation. • Impliquée dans de nombreuses maladies, comprenant les maladies auto-immunes, la résistance à l'insuline et le cancer.
Interféron Gamma (IFNγ)	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine soluble membre des interférons de classe II. • Sécrétée par les cellules à la fois des réponses immunitaires innée et adaptative. • Se lie à son récepteur qui déclenche une réponse cellulaire aux infections virale et microbienne.
CCL3 (MIP1a)	Chimiokine jouant un rôle dans les réponses inflammatoires via sa liaison avec les récepteurs CCR1, CCR4 et CCR5.

ANNEXE 8 : LISTE DES VARIANTS EXONIQUES ET INTRONIQUES
DU GENE *CAPN3* IDENTIFIES ET ANALYSES DANS LA COHORTE DES 344
PATIENTS LGMD2A

LISTE DES VARIANTS EXONIQUES *CAPN3* IDENTIFIES ET ANALYSES

Fréquence	Variants exoniques	UMD Predictor	Protéine	Exons concernés	Domaines protéiques	Nature de la mutation	Evènement mutationnelle
1	c.1001A>T	Pathogenic	p.His334Leu	7	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.103delG	NA	p.Gly36Valfsx21	1	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
1	c.1058T>C	Pathogenic	p.Leu33Pro	8	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1061T>G	Pathogenic	p.Val354Gly	8	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1063C>G	Pathogenic	p.Arg355Gly	8	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1069C>T	Pathogenic	p.Arg357Trp	8	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.1070G>A	Pathogenic	p.Arg357Gln	8	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
8	c.1079G>A	Pathogenic	p.Trp360X	8	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
1	c.107delG	NA	p.Gly36Valfsx21	1	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
2	c.1187A>T	Pathogenic	p.Glu396Val	9	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
13	c.1230C>T	Pathogenic	p.Thr417Met	10	X	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1239C>A	Pathogenic	p.Ala420Asp	10	X	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1292T>C	Pathogenic	p.Val431Ala	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1301A>T	Pathogenic	p.Asn434Ile	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.1303G>A	Pathogenic	p.Glu435Lys	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1309C>G	Pathogenic	p.Arg437Gly	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
6	c.1309C>T	Pathogenic	p.Arg437Cys	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1318C>T	Pathogenic	p.Arg440Trp	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
4	c.1322delG	NA	p.Gly441ValX22	10	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
3	c.1322G>A	Pathogenic	p.Gly441Asp	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.1333G>A	Pathogenic	p.Gly445Arg	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.1336G>A	Pathogenic	p.Ala457Thr	1	NS	Mutation ponctuelle	Faux-sens
6	c.1342C>G	Pathogenic	p.Arg448Gly	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.1342C>T	Pathogenic	p.Arg448Cys	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
5	c.1343G>A	Pathogenic	p.Arg448His	10	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.135_137delCAT	NA	p.Ile46del ?????	1	PC1	Déletion	Décalage du cadre de lecture
2	c.1373delC	NA	p.Pro436LeufsX3	10	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
1	c.1401_1403delGGA	NA	p.Glu467del	11	CB5W	Déletion	Décalage du cadre de lecture
1	c.1435A>G	Pathogenic	p.Ser479Gly	11	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1447delG	NA	p.Ala483Pro fs X2	11	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
2	c.1465C>T	Pathogenic	p.Arg489Trp	11	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.1466G>A	Pathogenic	p.Arg489Gln	11	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
5	c.1468C>T	Pathogenic	p.Arg490Trp	11	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
15	c.1469G>A	Pathogenic	p.Arg490Gln	11	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.1469G>A	Pathogenic	p.Arg49His	1	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1477C>T	Pathogenic	p.Arg493Trp	11	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
4	c.149A>G	Probably pathogenic	p.Asn505er	1	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1505T>C	Pathogenic	p.Ile502Thr	11	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.157A>G	Probable polymorphism	p.Ile53Val	11	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1585G>A	Pathogenic	p.Ala525Thr	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1611C>A	Pathogenic	p.Tyr537X	13	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
1	c.1623_1637del	NA	p.S42_346del EVSQR	13	CB5W	Déletion	Décalage du cadre de lecture
1	c.1636C>T	Pathogenic	p.Arg546Cys	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.1641C>A	Pathogenic	p.Phe547Leu	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.1642delC	NA	p.Arg548AlafsX47	13	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
1	c.1643G>A	Pathogenic	p.Arg548His	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1657G>A	Pathogenic	p.Glu553Lys	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.1668C>T	Polymorphism	p.Ile556Ile	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Synonyme
1	c.1681T>C	Pathogenic	p.Tyr561His	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.1699G>T	Pathogenic	p.Gly567Trp	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.1706T>C	Pathogenic	p.Phe569Ser	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1714C>G	Pathogenic	p.Arg572Gly	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
6	c.1714C>T	Pathogenic	p.Arg572Trp	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
5	c.1715G>A	Pathogenic	p.Arg572Gln	13	CB5W	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1722delC	NA	p.Ser575LeufsX20	13	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
1	c.1789dupA	NA	p.Thr594AsnfsX33	15	Troncature	Duplication	Décalage du cadre de lecture
1	c.1802C>G	Pathogenic	p.Pro601Arg	16	IS2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.1813G>C	Probably pathogenic	p.Val605Leu	16	IS2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.1817C>T	Pathogenic	p.Ser606Leu	16	IS2	Mutation ponctuelle	Faux-sens

4	c.1838delA	NA	p.Lys613ArgfsX49	16	Troncature	Déletion	Non-sens
1	c.1853C>T	Pathogenic	p.Gln615X	16	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
4	c.1865_1866delIAG	NA	p.Glu622GlyfsX9	16	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
6	c.1873C>T	Probably pathogenic	p.Gly624Gly	16	IS2	Mutation ponctuelle	Synonyme
1	c.1828G>T	Probable polymorphism	p.Ser643Ile	17	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.1979A>G	Pathogenic	p.Gln660Arg	17	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
6	c.1981delA	NA	p.Ile661X	17	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
3	c.2022_2023delinsCT	NA	p.Lys674_Lys673delinsAsnX	18	Troncature	Indel	Décalage du cadre de lecture
3	c.2069_2070delIAC	NA	p.His690ArgfsX9	19	Troncature	Déletion	Non-sens
1	c.2093C>A	Pathogenic	p.Arg695Ser	19	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.2093C>T	Pathogenic	p.Arg698Cys	19	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.2109C>T	Pathogenic	p.Ala702Val	19	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
6	c.2182C>T	Pathogenic	p.Gln728X	20	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
1	c.2190_2196delITTCAAA	NA	p.Phe731_Lys732>ThrfsX44	21	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
3	c.2207_2208delICA	NA	p.Thr736ArgfsX28	21	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
3	c.2230A>G	Pathogenic	p.Ser744Gly	21	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
4	c.223dupT	NA	p.Tyr75LeufsX5	21	Troncature	Duplication	Décalage du cadre de lecture
1	c.2242C>T	Pathogenic	p.Arg748X	21	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
2	c.2243G>A	Pathogenic	p.Arg748Gln	21	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.224dupT	NA	p.Tyr75Leu dupT fs X3 ????	1	Troncature	Duplication	Décalage du cadre de lecture
1	c.2237_2258delinsAA	NA	p.Asp753LysX11	21	Troncature	Indel	Décalage du cadre de lecture
5	c.2257G>A	Pathogenic	p.Asp753Asn	21	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.225dupT	NA	p.Val76CysfsX4	1	Troncature	Duplication	Décalage du cadre de lecture
2	c.229G>A	Pathogenic	p.Asp77Asn	1	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.2303C>T	Pathogenic	p.Arg769Trp	22	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.2306G>A	Pathogenic	p.Arg769Gln	22	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.2306G>C	Pathogenic	p.Arg769Pro	22	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
9	c.2314_2317delIGACA	NA	p.Asp772delLys773AsnfsX3	22	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
1	c.232C>A	Pathogenic	p.Pro78Thr	1	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
6	c.2338G>C	Pathogenic	p.Asp780His	22	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
16	c.2362_2363delIAGinsTCAT	NA	p.Arg788delinsSerfsX14	22	Troncature	Indel	Décalage du cadre de lecture
3	c.2364G>C	Pathogenic	p.Arg788Ser	22	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.2393C>A	Pathogenic	p.Ala799Glu	23	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.2420T>C	Pathogenic	p.Ile807Thr	23	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.2443C>G	Pathogenic	p.Leu815Val	24	PEF	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.246G>A	Polymorphism	p.Pro82Pro	1	PC1	Mutation ponctuelle	Synonyme
1	c.258_259insT	NA	p.Leu875erfsX4	1	Troncature	Insertion	Décalage du cadre de lecture
3	c.258dupT	NA	p.Leu875erfsX4	1	Troncature	Duplication	Décalage du cadre de lecture
1	c.277_300del	NA	p.Phe93_Lys100del	1	PC1	Déletion	Décalage du cadre de lecture
2	c.281C>A	Probably pathogenic	p.Phe97Leu	1	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.287G>T	Pathogenic	p.Trp99Cys	1	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.309G>A	Probably pathogenic	p.Pro103Pro	2	PC1	Mutation ponctuelle	Synonyme
3	c.318C>T	Polymorphism	p.Cys106Cys	2	PC1	Mutation ponctuelle	Synonyme
6	c.328C>T	Pathogenic	p.Arg110X	2	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
1	c.331T>A	Pathogenic	p.Phe111Ile	2	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.338G>A	Pathogenic	p.Asp120Asn	2	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.363C>G	Pathogenic	p.Ile121Met	2	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.409T>C	Pathogenic	p.Cys137Arg	3	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.416C>T	Pathogenic	p.Thr139Ile	3	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.424C>T	Pathogenic	p.Gln142X	3	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
3	c.439C>T	Pathogenic	p.Arg147X	3	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
1	c.444delC	NA	p.Ile149Tyr fs X30	3	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
2	c.476A>G	Pathogenic	p.Tyr159Cys	3	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.479C>G	Polymorphism	p.Ala160Gly	3	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.481delG	NA	p.Ile162Ser fsX17	3	Troncature	Déletion	Décalage du cadre de lecture
2	c.484A>C	Probably pathogenic	p.Ile162Leu	3	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.485C>T	Polymorphism	p.Phe165Phe	3	PC1	Mutation ponctuelle	Synonyme
1	c.533T>C	Pathogenic	p.Ile178Thr	4	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.534A>G	Pathogenic	p.Ile178Met	4	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.543T>A	Pathogenic	p.Leu183Gln	4	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens

1	c.550A>G	Pathogenic	p.Thr184Ala	4	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
26	c.550delA	NA	p.Thr184Arg fs 36X	4	Troncature	Délétion	Décalage du cadre de lecture
2	c.551C>G	Probable polymorphism	p.Thr184Arg	4	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
7	c.551C>T	Probably pathogenic	p.Thr184Met	4	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.56deC	NA	p.Pro20Gln56X	1	Troncature	Délétion	Décalage du cadre de lecture
1	c.584A>C	Probably pathogenic	p.Asn195Thr	4	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.593A>G	Pathogenic	p.Asn198Ser	4	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.59deC	NA	p.Pro20GlnfsX37	1	Troncature	Délétion	Décalage du cadre de lecture
10	c.606T>C	Polymorphism	p.Ser202Ser	4	PC1	Mutation ponctuelle	Synonyme
2	c.62G>A	Polymorphism	p.Gly21Glu	1	NS	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.643T>C	Pathogenic	p.Ser215Pro	5	PC1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.668deA	NA	p.Asn223Thr252X	5	Troncature	Délétion	Décalage du cadre de lecture
1	c.700G>A	Pathogenic	p.Gly234Arg	5	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.701G>A	Pathogenic	p.Gly234Glu	5	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
23	c.706G>A	Polymorphism	p.Ala236Thr	5	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.717deT	NA	p.Phe239LeuK14	5	Troncature	Délétion	Décalage du cadre de lecture
4	c.73C>T	Polymorphism	p.His25Tyr	1	NS	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.743T>G	Pathogenic	p.Met248Arg	5	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.759_761delGAA	NA	p.Lys254del	5	PC2	Délétion	Décalage du cadre de lecture
1	c.763G>A	Pathogenic	p.Ala255Thr	5	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.763G>C	Pathogenic	p.Ala255Pro	5	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.78G>A	Polymorphism	p.Pro26Pro	1	NS	Mutation ponctuelle	Synonyme
2	c.791G>A	Pathogenic	p.Cys264Tyr	5	PC2	Mutation ponctuelle	Faux-sens
1	c.829T>C	Pathogenic	p.Ser277Pro	6	IS1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
2	c.848T>C	Pathogenic	p.Met283Thr	6	IS1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
3	c.883_886delGATGinsCTT	NA	p.Asp295delinsLeufsX37	6	Troncature	Indel	Décalage du cadre de lecture
1	c.892C>T	Polymorphism	p.Leu298Leu	6	IS1	Mutation ponctuelle	Synonyme
2	c.898C>T	Pathogenic	p.Gln300X	6	Troncature	Mutation ponctuelle	Non-sens
1	c.930T>C	Polymorphism	p.Asp310Asp	6	IS1	Mutation ponctuelle	Synonyme
1	c.939G>A	Polymorphism	p.Pro313Pro	6	IS1	Mutation ponctuelle	Synonyme
2	c.958G>T	Probably pathogenic	p.Val320Phe	7	IS1	Mutation ponctuelle	Faux-sens
30	c.96T>C	Polymorphism	p.Thr32Thr	1	NS	Mutation ponctuelle	Synonyme
3	c.984C>T	Polymorphism	p.Cys328Cys	7	PC2	Mutation ponctuelle	Synonyme

Les cas surlignés en jaune correspondent aux mutations décrites dans le chapitre 1 §C.6.

LISTE DES VARIANTS INTRONNIQUES SUR LE GENE *CAPN3* IDENTIFIES ET ANALYSES

Fréquence	DNA Level	Evt Mut.	Nature de la mutation	Introns concernés	Statut	HSF 1
7	c.1029+3A>G	ND	Mutation ponctuelle	7-8	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
1	c.1115+22delG	ND	Délétion	8-9	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESS site.
1	c.1115+2T>C	Splicing	Mutation ponctuelle	8-9	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site
2	c.1116-116C>G	Polym	Mutation ponctuelle	7-8	Hétérozygote	Creation of an intronic ESS site.
9	c.1194-17_1194-18delCT	Polym	Délétion	9-10	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
1	c.1194-25_1194-26delCT	Splicing	Délétion	9-10	Hétérozygote	Alteration of WT Branch Point (3 sites)
4	c.1194-26C>G	Polym	Mutation ponctuelle	9-10	Hétérozygote	Creation of an intronic ESE site.
2	c.1194-8C>G	Splicing	Mutation ponctuelle	9-10	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
4	c.1194-9A>G	Splicing	Délétion	9-10	Homozygote	Alteration of the WT acceptor site
1	c.1354+61C>T	Polym	Mutation ponctuelle	10-11	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
1	c.1354+96G>A	Polym	Mutation ponctuelle	10-11	Hétérozygote	Creation of an intronic ESS site.
1	c.1355-1G>C	Splicing	Mutation ponctuelle	10-11	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
3	c.1355-6G>A	Polym	Mutation ponctuelle	10-11	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
3	c.1356-1G>C	Splicing	Mutation ponctuelle	10-11	Homozygote	Exon sequence too short vs mutation position
1	c.1525-1G>A	Splicing	Mutation ponctuelle	11-12	Homozygote	Alteration of the WT acceptor site
1	c.1536+1G>T	Splicing	Mutation ponctuelle	12-13	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
1	c.1536+58C>A	ND	Mutation ponctuelle	12-13	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESS site.
1	c.1536+62C>T	Polym	Mutation ponctuelle	12-13	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
2	c.1537-40C>G	Splicing	Mutation ponctuelle	12-13	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
9	c.1537-48T>C	Polym	Mutation ponctuelle	12-13	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESS site.
1	c.1567-40G>A	Polym	Mutation ponctuelle	12-13	Hétérozygote	
1	c.1745+4+7delAGTG	Splicing	Délétion	13-14	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site
1	c.1746-1G>A	Splicing	Mutation ponctuelle	13-14	Homozygote	Alteration of the WT acceptor site
8	c.1746-20C>G	Splicing	Mutation ponctuelle	13-14	Hétérozygote	Activation of an intronic cryptic acceptor site.
1	c.1782+5G>A	Splicing	Mutation ponctuelle	14-15	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site
2	c.1783-63C>G	ND	Mutation ponctuelle	14-15	Homozygote	Alteration of an intronic ESS site.
1	c.1801-1G>A	Splicing	Mutation ponctuelle	15-16	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
1	c.1915-106C>A	Polym	Mutation ponctuelle	16-17	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
1	c.1992+1G>T	Splicing	Mutation ponctuelle	17-18	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site
1	c.1992+2del	Splicing	Délétion	17-18	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site
1	c.1992+42C>G	Polym	Mutation ponctuelle	17-18	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
1	c.1993-19C>G	ND	Mutation ponctuelle	17-18	Homozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
1	c.1993-1G>A	Splicing	Mutation ponctuelle	17-18	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
2	c.2050+2T>A	Splicing	Mutation ponctuelle	18-19	Homozygote	Alteration of the WT donor site
5	c.2051-1G>T	Splicing	Mutation ponctuelle	18-19	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
3	c.2051-29C>T	ND	Mutation ponctuelle	18-19	Hétérozygote	Creation of an intronic ESE site.
1	c.2115+1_2115+2dupGT	Splicing	Duplication	19-20	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESS site.
1	c.2115+3insGT	Splicing	Insertion	19-20	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site

Fréquence	DNA Level	Evt Mut.	Nature de la mutation	Introns concernés	Statut	HSF 1
2	c.2184+3G>A	ND	Mutation ponctuelle	20-21	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
1	c.2185-16A>G	Splicing	Mutation ponctuelle	20-21	Hétérozygote	Activation of an intronic cryptic acceptor site.
2	c.2185-2A>G	Splicing	Mutation ponctuelle	20-21	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
2	c.2264-1G>C	Splicing	Mutation ponctuelle	21-22	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
1	c.2264-3C>A	Splicing	Mutation ponctuelle	21-22	Homozygote	Alteration of the WT acceptor site
23	c.2380+12delA	Polym	Délétion	22-23	Homozygote	Alteration of an intronic ESS site.
1	c.2380+2T>G	Splicing	Mutation ponctuelle	22-23	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site
1	c.2380+6T>C	Splicing	Mutation ponctuelle	22-23	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site
1	c.2439+69C>T	Polym	Mutation ponctuelle	23-24	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
2	c.2440-3C>G	Splicing	Mutation ponctuelle	23-24	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
5	c.309+31+32delTTinsGTC	ND	Indel	1-2	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESS site.
4	c.310-44A>G	ND	Mutation ponctuelle	1-2	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESE site
2	c.379+5G>C	Splicing	Mutation ponctuelle	2-3	Hétérozygote	Alteration of the WT donor site
1	c.380-27C>T	Polym	Mutation ponctuelle	2-3	Hétérozygote	Creation of an intronic ESS site.
1	c.380-79G>A	Polym	Mutation ponctuelle	2-3	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESE site
1	c.498+35G>T	Polym	Mutation ponctuelle	3-4	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESE site
1	c.499-1G>A	Splicing	Mutation ponctuelle	3-4	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
2	c.633-69G>A	Polym	Mutation ponctuelle	4-5	Hétérozygote	Alteration of an intronic ESS site.
10	c.802-9G>A	Splicing	Mutation ponctuelle	5-6	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site
1	c.945+56C>T	Polym	Mutation ponctuelle	6-7	Hétérozygote	No significant splicing motif alteration detected. probably no impact on splicing.
23	c.946-1G>A	Splicing	Mutation ponctuelle	6-7	Hétérozygote	Alteration of the WT acceptor site

**ANNEXE 9 : TABLEAU DE LA FREQUENCE DES CODONS DANS LE
GENOME HUMAIN CODANT POUR UN MEME ACIDE AMINE**

AA apolaire	CODON	F (pour 1000)
F (Phe)	UUC	20,3
Phénylalanine	UUU	17,6
L (Leu)	CUG	39,6
Leucine	CUC	19,6
	CUU	13,2
	UUG	12,9
	UUA	7,7
	CUA	7,2
I (Ile)	AUC	20,8
Isoleucine	AUU	16
	AUA	7,5
V (Val)	GUG	28,1
Valine	GUC	14,5
	GUU	11
	GUA	7,1
P (Pro)	CCC	19,8
Proline	CCU	17,5
	CCA	16,9
	CCG	6,9
A (Ala)	GCC	27,7
Alanine	GCU	18,4
	GCA	15,8
	GCG	7,4
W (Trp) Tryptophane	UGG	13,2
G (Gly) Glycine	GGC	22,2
	GGA	16,5
	GGG	16,5
	GGU	10,8
M (Met) Méthionine	AUG	20,8

AA polaire	CODON	F (pour 1000)
S (Ser)	AGC	19,5
Sérine	UCC	17,7
	UCU	15,2
	UCA	12,2
	AGU	12,1
	UCG	4,4
T (Thr)	ACU	13,1
Thréonine	ACC	18,9
	ACA	15,1
	ACG	6,1
Y (Tyr)	UAC	15,3
Tyrosine	UAU	12,2
C (Cys)	UGC	12,6
Cystéine	UGU	10,6

Terminaison	CODON	F (pour 1000)
STOP	UGA	1,6
	UAA	1
	UAG	0,8

AA acide	CODON	F (pour 1000)
Q (Gln)	CAG	34,2
Glutamine	CAA	12,3
N (Asn)	AAC	19,1
Asparagine	AAU	17
D (Asp)	GAC	25,1
Ac. Aspartique	GAU	21,8
E (Glu)	GAG	39,6
Ac. Glutamique	GAA	29

AA basique	CODON	F (pour 1000)
H (His)	CAC	15,1
Histidine	CAU	10,9
K (Lys)	AAG	31,9
Lysine	AAA	24,4
R (Arg)	AGA	12,2
Arginine	AGG	12
	CGG	11,4
	CGC	10,4
	CGA	6,2
	CGU	4,5

ANNEXE 10 : SEQUENCES DES PTM ET DE LEUR ARNM CHIMERE,
DE LEUR TRADUCTION EN PROTEINE

PTM1-CAPN3

SEQUENCE CODANTE ATTENDUE DU PTM1-CAPN3 ISSUE DU *TRANS*-SPLICING

ATGCCGACCGTCATTAGCGCATCTG TGGCTCCAAGGACAGCGGCTGAGCCCCGGTCCCAGG
GCCAGTTCCTCACCCGGCCAGCAAGGCCACTGAGGCTGGGGGTGGAACCCAAGTGGCATCTA
TTCAGCCATCATCAGCCGCAATTTTCTAATTATCGGAGTGAAAAGAGAAGACATTTCGAGCAACTTCAC
AAGAAATGTCTAGAAAAGAAAGTTCTTTATGTGGACCCTGAGTTCCACC GGATGAGACCTCTCTCT
TTTATAGCCAGAAGTTCCCATCCAGTTCTGCTGGAAGAGACCTCCG GAAATTTGGCAGAAATCCCCG
ATTTATCATTGATGGAGCCAAACAGAACCTGACATCTGTCAAGGAGAGCTAG GGGACTGCTGGTTTCT
CGCAGCCATTGCTGCTGACCTGAACCAGCACCTTCTTTTCCGAGTCATACCCCATGATCAAAGTT
TCATCGAAAACACGAGGGATCTCCACTTCCAGTTC TGGCGCTATGGAGAGTGGGTGGACGTGG
TTATAGATGACTGCCTGCCAACGTACAACAATCAACTGGTTTTACCAAGTCCAACCA CCGCAATGAG
TTCTGGAGTGCTCTGCTGGAGAAGGCTTATGCTAA CCTCCATGGTTCTACGAAGCTCTGAAAAGGTG
GGAACACCACAGAGGCCATGGAGGACTTCACAGGAGGGGTGGCAGAGTTTTTTGAGATCAGGGATG
CTCTAGTGACATGTACAAGATCATGAAGAAAGCCATCGAGAGAGGCTCCCTCATGGGCTGCTCCAT
TGATCTGGCACGAACATGACCTATGGAACCTCTCCTTCTGCTGTAACATGGGGGAGTTGATTGCA
CGGATGGTGAGGAATATGGATAACTACTGCTCCAGGACTCAGACCTCGACCCAGAGGCTCAGAT
GAAAGACCCGACCCGGTCAATCATTCCGGTTCAGTATGAGACAAGAATGGCTGCGGGCTGGTCAGA
GGTCACGCCCTACTCTGTCACTGGGCTGGATGAGCTG CCGTTCAAAGGTGAGAAAAGTGAAGCTGGTGC
GGCTGCGGAATCCCTGGGGCCAGGTGGAGTGGAAACGGTTCTTGGAGTGATAGATGGAAGACTGGA
GCTTTGTGACAAAAGATGAGAAGGCCCGTCTGCAGCACCAGGTCATGAGGATGGAGAGTTCTGCA
TGTCTATGAGGATTTCTACCTACATTTACAAAAGTTGGAGATCTGCAACCTCACTGCCGATGCTCTG
CAGTCTGACAAGCTTCAGACCTGACAGTGTCTGTGAACGAGGGCCGCTGGGTGCGGGGTGTGCTCTG
CCGAGGGCTGCGGCAACTTCCAGTATCTTTCTGGACCAACCTCAGTACCGTCTGAAGCTCCCTGAG
GAGGACGATGACCCTGATGACAGCGGAGGTGATTTGCAGCTTCTGTTGGCCCTGATGCGAGAAGAAC
CGCGGAAGGACCCGGAAGCTGGGGCCAGTCTCTTACCATTGGCTTCGCCATCTACGAGGTTCCC
AAAGAGATGCACGGGAACAAGCAGCACCTGCAGAAGGACTTCTTCTGTACAACGCTCCAAGGCC
AGGAGCAAAAACCTACATCAACATGCGGGAGGTGTCCAGCGCTTCCGCTGCTCCACGCGAGTAC
GTCATGCTGCCCTCCACCTACGAGCCCAACAGGAGGGGAATTCATCTCCGGGTCTTCTGTGAAA
AGAGGAACCTCTCTGAAGGAGTTGAAAATACCATCTCCGTGGATCGGCCAGTGAAAAGAAAAAAA
CCAAAGCCATCATCTTCGTTAGCGACAGAGCAAAACAGCAACAAGGAGCTGGGTGTGGACCAGGAGT
CAGAGGAGGGCAAAGGCAAAAACAAGCCCTGATAAGCAAAAAGCAGTCCCCACAGCCACAGCCTGGCA
GCTCTGATCAGGAAAAGTGGGAACAGCAACAATTCGGGAACATTTCAAGCAGATCGCAGGAGATG
ACATGGAGATCTGTGAGATGAGCTCAAGAAGTCTTAACACAGTCTGTAACAACACAAGGACC
TGAAGACACACGGGTTACACTGGAGTCTCTGAGAGCATGATTGCCCTCATGGATACAATGGCT
CTGGAAGCTCAACCTGCAGGAGTTCACCACCTCTGGAACAAGATTAAGGCTGGCAGAAAATTT
CAAACTATGACACAGACCAGTCCGGCACCATCAACAGCTACGAGATGCGAAAATGCAGTCAACGAC
GCAGGATCCACCTCAACAACAGCTCTATGACATCATTACCATGCGGTACGCAGACAAAACATGA
ACATCGACTTTGACAGTTTCTGCTGCTTCTGTTAGGCTGGAGGGCATGTTCAAGCTTTTTCATGC
ATTTGACAAGGATGGAGATGGTATCATCAAGCTCAACGTTCTGGAGTGGCTGCAGCTACCATGTA
TGCCTGA

TRADUCTION DU PTM1-CAPN3

MPTVISASVA PRTAAEPRSP GPVPHPAQSK ATEAGGNPS GIYSALISRN
FPIIGVKEKT FEQLHKKCLE KKVLYVDPEF PPDETSLFYS QKFP IQFVWK
RPPEICENPR FIIDGANRTD ICQELGDCW FLAAIACLTL NQHLLFRVIP
HDQSFNIENYA GIFHFQFWRY GEWVDVVIDD CLPTYNNQLV FTKSNHRNEF
WSALLEKAYA KLHGSYEALK GGNTTEAMED FTGGVAEFFE IRDAPSDMYK
IMKKAIERGS LMGCSIDDGT NMTYGTSPSG LNMGELIARM VRNMDNSLLQ

DSDLDPGRSD ERPTRTIIPV QYETRMACGL VRGHAYSVTG LDEVFPKGEK
 VKLVRRLNRPW GQVEWNGSWS DRWKDWSFVD KDEKARLQHQ VTEDGEFWMS
 YEDFIYHFTK LEICNLTA DA LQSDKLQWT VSVNEGRWVR GCSAGGCRNF
 PDTFWTNPQY RLKLEEDDD PDDSEVICSF LVALMQKNRR KDRKLGASLF
 TIGFAIYEVK KEMHGKQHL QKDFFLYNAS KARSKTYINM REVSQRFRLP
 PSEYVIVPST YEPHQEGEFI LRVFSEKRNL SEEVENTISV DRPVKTKTK
 PIIFVSDRAN SNKELGVDQE SEEGKGTSP DKQKQSPQPQ PGSSDQSEEE
 QQQFRNIFKQ IAGDDMEICA DELKVLNTV VNKHKDLKTH GFTLESCRSM
 IALMDDTDSG KLNLEQEFHHL WNKIKAWQKI FKHYDQSG TINSYEMRNA
 VNDAGFHLNN QLYDIITMRY ADKHMNIDFD SFICCFVRLE GMFRAFHAFD
 KDGDGIKLN VLEWLQLTMY A*

RESULTATS ALIGNEMENTS CALPAÏNE-3 vs PTM1-CALPAÏNE 3

Range 1: 1 to 822 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1727 bits(4472)	0.0	Compositional matrix adjust.	822/822(100%)	822/822(100%)	0/822(0%)
Query 1	MPTVISASVAPRTAAEPRSPGPVPHPAQSKATEAGGGNPSGIYSAIISRNFPPIIGVKEK			60	
Sbjct 1	MPTVISASVAPRTAAEPRSPGPVPHPAQSKATEAGGGNPSGIYSAIISRNFPPIIGVKEK			60	
Query 61	FEQLHKKCLEKKVLYVDPEFPDDETSLFYSQKFPFIOFVWKRPEICENPRFIIDGANRTD			120	
Sbjct 61	FEQLHKKCLEKKVLYVDPEFPDDETSLFYSQKFPFIOFVWKRPEICENPRFIIDGANRTD			120	
Query 121	ICQELGDCWFLAAIACLTLNQHLLFRVIPHDQSFENYAGIFHFQFWRVGEWVWVIDD			180	
Sbjct 121	ICQELGDCWFLAAIACLTLNQHLLFRVIPHDQSFENYAGIFHFQFWRVGEWVWVIDD			180	
Query 181	CLPTYNNQLVFTKSNHRNEFWSALLEKAYAKLHGSYEALKGGNTTEAMEDFTGGVAEFFF			240	
Sbjct 181	CLPTYNNQLVFTKSNHRNEFWSALLEKAYAKLHGSYEALKGGNTTEAMEDFTGGVAEFFF			240	
Query 241	IRDAPSDMYKIMKKAIERGSLMGCSIDDGTNMTYGTSPSGLNMGELIARMVRNNDNSLLQ			300	
Sbjct 241	IRDAPSDMYKIMKKAIERGSLMGCSIDDGTNMTYGTSPSGLNMGELIARMVRNNDNSLLQ			300	
Query 301	DSDLDPGRSDERPTRTIIPVQYETRMACGLVRGHAYSVTGLDEVFPKGEKVKLVRRLNRPW			360	
Sbjct 301	DSDLDPGRSDERPTRTIIPVQYETRMACGLVRGHAYSVTGLDEVFPKGEKVKLVRRLNRPW			360	
Query 361	GQVENNGSWSDRWKDWSFVDKDEKARLQHQVTEDGEFWMSYEDFIYHFTKLEICNLTA DA			420	
Sbjct 361	GQVENNGSWSDRWKDWSFVDKDEKARLQHQVTEDGEFWMSYEDFIYHFTKLEICNLTA DA			420	
Query 421	LQSDKLQWTVSVNEGRWVRGCSAGGCRNFPDTFWTNPQYRLKLEEDDDPDDSEVICSF			480	
Sbjct 421	LQSDKLQWTVSVNEGRWVRGCSAGGCRNFPDTFWTNPQYRLKLEEDDDPDDSEVICSF			480	
Query 481	LVALMQKNRRKDRKLGASLFTIGFAIYEVKEMHGKQHLQKDFFLYNASKARSKTYINM			540	
Sbjct 481	LVALMQKNRRKDRKLGASLFTIGFAIYEVKEMHGKQHLQKDFFLYNASKARSKTYINM			540	
Query 541	REVSQRFRLPSEYVIVPSTYEPHQEGEFILRVFSEKRNLSEEVENTISVDRPVKTKTK			600	
Sbjct 541	REVSQRFRLPSEYVIVPSTYEPHQEGEFILRVFSEKRNLSEEVENTISVDRPVKTKTK			600	
Query 601	PIIFVSDRANSNKLGVQDQSEEGKGTSPDKQKQSPQPQPGSSDQSEEEQQQFRNIFKQ			660	
Sbjct 601	PIIFVSDRANSNKLGVQDQSEEGKGTSPDKQKQSPQPQPGSSDQSEEEQQQFRNIFKQ			660	
Query 661	IAGDDMEICADELKVLNTVNNKHKDLKTHGFTLESCRSMIALMDDTDSGKLNLEQEFHHL			720	
Sbjct 661	IAGDDMEICADELKVLNTVNNKHKDLKTHGFTLESCRSMIALMDDTDSGKLNLEQEFHHL			720	
Query 721	WNKIKAWQKIFKHYDQSGTINSYEMRNAVNDAGFHLNQLYDIITMRYADKHMNIDFD			780	
Sbjct 721	WNKIKAWQKIFKHYDQSGTINSYEMRNAVNDAGFHLNQLYDIITMRYADKHMNIDFD			780	
Query 781	SFICCFVRLEGMFRAFHAFDKDGDGIKLNLEWLQLTMYA* 822				
Sbjct 781	SFICCFVRLEGMFRAFHAFDKDGDGIKLNLEWLQLTMYA* 822				

PTM2-CAPN3

SEQUENCE CODANTE ATTENDUE ISSUE DU *TRANS-SPLICING* PTM2-CAPN3

ATGCCGACCGTCATTAGCGCATCTGTGGCTCCAAGGACAGCGGGCTGAGCCCGGTCCCAGG
GCCAGTTCCTCACCCGGCCCAGAGCAAGGCCACTGAGGCTGGGGGTGAAAACCAAGTGGCATCTA
TTCAGCCATCATCAGCCGCAATTTTCTATTATCGGAGTGAAAGAGAAGACATTGAGCAACTTCAC
AAGAAATGTCTAGAAAAGAAAGTTCTTTATGTGGACCCTGAGTTCCACCCGGATGAGACCTCTCTCT
TTTATAGCCAGAAGTTCCCATCCAGTTCGTCTGGAAGAGACCTCCGGAATTTGCGAGAATCCCCG
ATTTATCATTTGATGGAGCCAAACAGAATGACATCTGTCAAGGAGAGCTAGGGACTGCTGGTTTCT
CGCAGCCATTGCTGCTGACCTGAACCAGCACCTTCTTTCCGAGTCATACCCCATGATCAAAGTT
TCATCGAAAACACGCAGGGATCTTCCACTTCCAGTTCGGCGCTATGGAGAGTGGGTGGACGTGG
TTATAGATGACTGCCAGCAAGTACAACAATCAACTGGTTTTCACCAAGTCCAACCAACCGCAATGAG
TCTGGAGTCTCTGCTGGAGAAGGCTTATGCTAAAGCTCCATGGTTCCTACGAAGCTCTGAAAGGT
GGGAACACCACAGAGGCCATGGAGGACTTCACAGGAGGGGTGGCAGAGTTTTTTGAGATCAGGGA
TGCTCTAGTGACATGACAAGATCATGAAAGGCCATCGAGAGAGGCTCCCTCATGGGCTGCTCC
ATTGATGATGGCACAACATGACCTATGGAACCTCTCCTTCTGGTCTGAACATGGGGGAGTTGATT
GCACGGATGTTGAGGAATATGGATAAATCACTGCTCCAGGACTCAGACCTCGACCCAGAGGCTCA
GATGAAAGACCGACCCGACAATCATTCGGTTCAGTATGAGACAAGAATGGCCTGCGGGCTGGTTC
AGAGGTCACGCCTACTCTGTCAGTGGGCTGGATGAGCTCCGTTCAAAGGTGAGAAAGTGAAGCT
GGTGGGCTGCGGAATCCCTGGGGCCAGGTGGAGTGAACCGTTCCTGGAGTGATAGATGGAAG
GACTGGAGCTTTGTGGACAAAGATGAGAAAGGCCCTGTCAGCACCAGGTCACTGAGGATGGAGA
GTTCTGGATGTCCTATGAGGATTTCACTACCATTTACAAAAGTTGGAGATCTGCAACCTCACTGCC
GATGCTCTGCAGTCTGACAAGCTTCAGACCTGGACAGTGTCTGTGAACGAGGGCCGCTGGTCCG
GGTGTCTGCTGCCGGAGGCTGCCGCAACTTCCAGATACTTTCTGGACCAACCTCAGTACCCTCTG
AAGCTCCTGAGGACGATGACCTGATGACAGCGAGGTGATTTGCAGTTCCTGTTGGCCCTG
ATGCAGAAGAACCGCGGAAGGACCCGGAAGCTGGGGCCAGTCTTACCATTTGGCTTCGCCATC
TACGAGGTTCCCAAAGAGATGACACGGGAACAAGCAGCACCTGCAGAAGGACTTCTCCTGTACAAC
GCCTCAAGGCCAGGAGCAAAAACCTACATCAACATGCGGGAGGTGTCCAGCGCTTCCGCTGCCTC
CCAGCGAGTACGTCATCGTCCCTCCACCTACGAGCCCAACAGGAGGGGGAATTCATCTCCGGGT
CTTCTGAAAAAGAGGAACCTCTCTGAAGAGTTGAAAATACCATCTCCGTGGATCGGCCAGTAAA
AAGAAAAAACCAAGCCATCATCTCTGTTAGCGACAGAGCAAACAGCAACAAGGAGCTGGGTGTG
TACAGATGGCTCTGGAAAAGCTCAACCTGCAGGAGTCCACCACCTCTGGAACAAGATTAAGGCCCTG
GCAGAAAATTTTCAAACACTATGACACAGACCAGTCCGGCACCATCAACAGCTACGAGATGCGAAAT
GCAGTCAACGACGCAGGATCCACCTCAACAACCAGCTCTATGACATCATTACCATGCGGTACGCAG
ACAAAACATGAACATCGACATTTGACAGTTTCATCTGCTGCTTCTGTTAGGCTGGAGGGCATGTTCA
AGCTTTTATGCAATTTGACAAGGATGGAGATGGATCATCAAGCTCAACGTTCTGGAGTGGCTGCA
GCTCACCATGTATGCCTGA

TRADUCTION DU PTM2-CAPN3

MPTVISASVA PR TAAEPRSP GVPVHPAQSK ATEAGGNPS GIYSAIISRN
FPIIGVKEKT FEQLHKKCLE KKVLYVDPEF PPDETSLFYS QKFPIQFVWK
RPPEICENPR FIIDGANRTD ICQELGDCW FLAAIACLTL NQHLLFRVIP
HDQSFIENYA GIFHFQFWRY GEWVDVVIDD CLPTYNNQLV FTKSNHRNEF
WSALLEKAYA KLHGSYEALK GGNTTEAMED FTGGVAEFFE IRDAPSDMYK
IMKKAIERGS LMGCSIDDTG NMTYGTSPSG LNMGELIARM VRNMDNSLLQ
DSDLDPGRSD ERPTRTIIPV QYETRMACGL VRGHAYSVTG LDEVVFKGKEK
VKLVRLRNPW QOVEWNGSWS DRWKDWSFVD KDEKARLQHQ VTEDGEFWMS
YEDFIYHFTK LEICNLTDADA LQSDKLQTTW VSVNEGRWVR GCSAGGCRNF
PDTFWTNPQY RLKLEEDDD PDDSEVICSF LVALMQKNRR KDRKLGASLF
TIGFAIYEVP KEMHGNKQHL QKDFFLYNAS KARSKTYINM REVSQRFRFP
PSEYVIVPST YEPHQEGEFI LRVFSEKRNL SEEVENTISV DRPVKKKKTK
PIIFVSDRAN SNKELGVDQE SEEGKGKTSK DKQKQSPQPQ PGSSDQSESE
QQQFRNIFKQ IAGDDMEICA DELKKVLTNTV VNKHKDLKTH GFTLESKRSM

IALMDTDGSG KLNLEQEFHHL WNKIKAWQKI FKHYDQSG TINSYEMRNA
 VNDAGFHLNN QLYDIITMRY ADKHMNIDFD SFICCFVRL EGMFRAFHFAD
 KDGDGIIKLN VLEWLQLTMY A*

RESULTATS ALIGNEMENT CALPAÏNE-3 vs. PTM2-CALPAÏNE 3

Range 1: 1 to 822 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1727 bits(4472)	0.0	Compositional matrix adjust.	822/822(100%)	822/822(100%)	0/822(0%)
Query 1		MPTVISASVAPRTAAEPRSPGPVPHPAQSKATEAGGGNPSGIYSAIISRNFPPIIGVKEKT		60	
Sbjct 1		MPTVISASVAPRTAAEPRSPGPVPHPAQSKATEAGGGNPSGIYSAIISRNFPPIIGVKEKT		60	
Query 61		FEQLHKKCLEKKVLYVDFEFPDETSLFYSQKFPFQVWKRPPPEICENPRFIIDGANRTD		120	
Sbjct 61		FEQLHKKCLEKKVLYVDFEFPDETSLFYSQKFPFQVWKRPPPEICENPRFIIDGANRTD		120	
Query 121		ICQGLGDCWFLAAIACTLNQHLLFRVIPHDQSF IENYAGIFHFQFWRVYGEWVDDVDD		180	
Sbjct 121		ICQGLGDCWFLAAIACTLNQHLLFRVIPHDQSF IENYAGIFHFQFWRVYGEWVDDVDD		180	
Query 181		CLPTYNNQLVFTKSNHRNEFWSALLEKAYAKLHGSYEALKGGNTTEAMEDFTGGVAEFFE		240	
Sbjct 181		CLPTYNNQLVFTKSNHRNEFWSALLEKAYAKLHGSYEALKGGNTTEAMEDFTGGVAEFFE		240	
Query 241		IRDAPSDMYKIMKKAIERGSLMGCSIDGDNMTYGTSPSGLNMGELIARVNRNMDNSLLQ		300	
Sbjct 241		IRDAPSDMYKIMKKAIERGSLMGCSIDGDNMTYGTSPSGLNMGELIARVNRNMDNSLLQ		300	
Query 301		DSLDPRGSDERPTRTIIPVQYETRMACGLVRGHAYSVTGLDEVFPFKGEKVKLVRLRNPW		360	
Sbjct 301		DSLDPRGSDERPTRTIIPVQYETRMACGLVRGHAYSVTGLDEVFPFKGEKVKLVRLRNPW		360	
Query 361		GQVEWNGSWSDRNKDWSFVDKDEKARLQHQVTEDEGFNMSYEDFIYHFTKLEICNLTADA		420	
Sbjct 361		GQVEWNGSWSDRNKDWSFVDKDEKARLQHQVTEDEGFNMSYEDFIYHFTKLEICNLTADA		420	
Query 421		LQSDKLQWTWTVSNVGRWVRGCSAGGCRNFPDTFWTNPQYRLKLEEDDDPDDSEVICSF		480	
Sbjct 421		LQSDKLQWTWTVSNVGRWVRGCSAGGCRNFPDTFWTNPQYRLKLEEDDDPDDSEVICSF		480	
Query 481		LVALMQKNRRKDRKLGASLFTIGFAIYEVPKEMHGNKQHLQKDFFLYNASKARSKTYINM		540	
Sbjct 481		LVALMQKNRRKDRKLGASLFTIGFAIYEVPKEMHGNKQHLQKDFFLYNASKARSKTYINM		540	
Query 541		REVSQRFLPPSEYVIVPSTYEPHQEGEFILRVFSEKRNLSSEVENTISVDRPVKKKKTK		600	
Sbjct 541		REVSQRFLPPSEYVIVPSTYEPHQEGEFILRVFSEKRNLSSEVENTISVDRPVKKKKTK		600	
Query 601		PIIFVSDRANSNKLGVQDESEEGKGTSPDKQKQSPQPGSSDQSEEEQQFRNIFKQ		660	
Sbjct 601		PIIFVSDRANSNKLGVQDESEEGKGTSPDKQKQSPQPGSSDQSEEEQQFRNIFKQ		660	
Query 661		IAGDDMEICADELKKVLTNVVNHKDKLTHGFTLESCRSIALMDTGSGKLNLEQEFHHL		720	
Sbjct 661		IAGDDMEICADELKKVLTNVVNHKDKLTHGFTLESCRSIALMDTGSGKLNLEQEFHHL		720	
Query 721		WNKIKAWQKIFKHYDQSGTINSYEMRNAVNDAGFHLNNQLYDIITMRYADKHMNIDFD		780	
Sbjct 721		WNKIKAWQKIFKHYDQSGTINSYEMRNAVNDAGFHLNNQLYDIITMRYADKHMNIDFD		780	
Query 781		SFICCFVRL EGMFRAFHFADKDGDGIIKLNLEWLQLTMYA* 822			
Sbjct 781		SFICCFVRL EGMFRAFHFADKDGDGIIKLNLEWLQLTMYA* 822			

PTM3-CAPN3

SEQUENCE CODANTE COMPLETE ATTENDUE ISSUE DU *TRANS-SPLICING* PTM3-CAPN3

ATG CCG ACCGTCATTAGCGCATCTGTGGCTCCAAGGACAGCGGCTGAGCCCCGGTCCCAGG
GCCAGTTCCTCACCCGGCCAGAGCAAGGCCACTGAGGCTGGGGGTGAAAACCAAGTGGCATCTA
TTCAGCCATCATCAGCCGCAATTTTCTATTATCGGAGTGAAAGAGAAGACATTGAGCAACTTCAC
AAGAAATGTCTAGAAAAGAAAGTTCTTTATGTGGACCCTGAGTTCACCCGGATGAGACCTCTCTCT
TTTATAGCCAGAAGTTCCCATCCAGTTCGTCTGGAAGAGACCTCCG GAA ATTTGCGAGAATCCCCG
ATTTATCATTTGATGGAGCCAACAGAATGACATCTGTCAAGGAGAGCTAG GGG ACTGCTGGTTTCT
CGCAGCCATTGCTGCTGACCCTGAACCAGCACCTTCTTTCCGAGTCATACCCCATGATCAAAGTT
TCATCGAAAACCTACGCAGGGATCTTCCACTTCCAG TTC TGGCGCTATGGAGAGTGGGTGGACGTGG
TTATAGATGACTGCCTGCCAACGTACAACAATCAACTGGTTTTCACCAAGTCCAACCA CCGCAATGAG
TCTGGAGTGCCTGTGGAGAAGGCTTATGCTAA GCT CCATGGTTCCTACGAAGCTCTGAAAAGT
GGGAACACCACAGAGGCCATGGAGGACTTCACAGGAGGGGTGGCAGAGTTTTTTGAGATCAGGGA
TGCTCTAGTGACATGTACAAGATCATGAAGAAGCCATCGAGAGAGGCTCCCTCATGGGCTGCTCC
ATTGAT GAT GGCACGAACATGACCTATGGAACCTCTCCTTCTGGTCTGAACATGGGGGAGTTGATT
GCACGGATG GTG AGGAATATGGATAAATCACTGCTCCAGGACTCAGACCTCGACCCAGAGGCTCA
GATGAAAGACCGACCCGG ACA ATCATTTCCGGTTCAGTATGAGACAAGAATGGCCTGCGGGCTGGT
AGAGGTCACGCCCTACTCTGTC ACTGGGCTGGATGAG CTC CCGTTCAAAGGTGAGAAAAGTGAAGCT
GGTGGGCTGCGGAAT CCC TGGGGCCAGGTGGAGTGGAAACGGTTCCTGGAGTGATAG ATG GAAG
GACTGGAGCTTTGTGGACAAAAGATGAGAAAGGCCCTGTCAGCACCAGGTCACTGAGGATGGAGA
GTTCTG GAT GTCTATGAGGATTTTCATCTACCATTTACAAAAGTTGGAGATCTGCAACCTC ACTGCC
GATGCTCTGCAGTCTGACAAGCTTCAGACCTGGACAGTGTCTGTGAACGAGGGCCGCTGG GTG CG
GGGTTGCTCTGCCGAGGCTGCCGCAACTTCCAG ATA CTTTCTGGACCAACCCTCAGTACCCTCTG
AAGCTC CAG GAGGACGATGACCCTGATGACAGCGGAGGTGATTTGCAGCTTCCTGGTGGCCCTG
ATGCAGAAGAACCGCGGAAGGACCCGGAAG CTC GGGGCCAGTCTTTCACCATTTGGCTTCGCCATC
TACGAG GTT CCAAAGAG ATG CACGGGAACAAGCAGCACCTGCAGAAGGACTTCTCCTGTACAAC
GCCTCCAAGGCCAGGAGCAAAAACCTACATCAACATGCGGGAGGTGTCCAGCGCTTCCGCTGCCTC
CCAGCG AGTAGCTCATCGTGCCCTCC ACCCTACGAGCCCCACCAGGAGGGGGAATTCATCTCCGGGT
CTTCTCTGAAAAGAGGAACCTCTCTGA GGA AGTTGAAAATACCATCTCCGTGGATCGGCCAGTG AAA
AAGAAAAAACCAAG CCC ATCATCTTCTGTT AGC GACAGAGCAAAACAGCAACAAGGAGCTGGGTGTG
GACCAGGAGTGCAGAGGAGGGCAAAAGCAAAACAAGCCCTGATAAGCAAAAGCAGTCCCCACAG CC
ACAGCCTGGCAGCTCTGATCAGGAAAAGTGAGGAACAGCAACAATTCCGGAACATTTTCAAGCAG AI
CGCAGGAGAT GAC ATGGAGATCTGTGCAGATGAGCTCAAGAAGTTCCTTAACACAGTCGTGAACAA
ACACA AGGACCTGAAGACACACGGGTTCACTGGAGTCTTGC AGA AGCATGATT GCCCTCATGGA
T ACA GATGGCTCTGGAAAAGCTCAACCTGCAGGAGTTCACCACCTCTGGAACAAGATTAAGCCCTG
GCAG AAA ATTTTCAAACACTATGACACAGACCAGTCCGGCACCATCAACAGCTACGAGATGCGAAAT
GCAGTCAACGACGCAG GAT TCCACCTCAACAACCAGCTCTATGACATCATTACCATGCGGTACGCAG
ACAAAACATGAACATCGACATTTGACAGTTTCATCTGCTGCTTCTGTTAGGCTGGAGGGCATGTTCA
AG CTTTTATGCATTTGACAAGGATGGAGATGGATATCATCAAGCTCAACGTTCTGGAG TGG CTGCA
GCTCACCATGTATGCCTGA

TRADUCTION DU PTM3-CAPN3

MPTVISASVA PRTAAEPRSP GPVPHPAQSK ATEAGGNPS GIYSAIISRN
PFIIGVKEKT FEQLHKKCLE KKVLYVDPEF PPDETSLFYS QKFP IQFVWK
RPPEICENPR FIIDGANRTD ICQGELGDCW FLAAIACLT L NQHLLFRVIP
HDQSFIENYA GIFHFQFWRY GEWVDVVIDD CLPTYNNQLV FTKSNHRNEF
WSALLEKAYA KLHGSYEALK GGNTEAMED FTGGVAEFFE IRDAPSDMYK
IMKKAIERGS LMGCSIDDGT NMTYGTSPSG LNMGELIARM VRNMDNSLLQ
DSDLPRGSD ERPRTIIPV QYETRMACGL VRGHAYSVTG LDEVPPKGEK
VKLVRLRNPW GQVEWNGSWS DRWKDWSFVD KDEKARLQHQ VTEDGEFWMS
YEDFIYHFTK LEICNLTADA LQSDKLQWT VSVNEGRWVR GCSAGGCRNF

PDTFWTNPQY RLKLEEDDD PDDSEVICSF LVALMQKNRR KDRKLGASLF
TIGFAIYEVP KEMHGNKQHL QKDFFLYNAS KARSKTYINM REVSQRFRLP
PSEYVIVPST YEPHQEGEFI LRVFSEKRNL SEEVENTISV DRPVKTKTK
PIIFVSDRAN SNKELGVDQE SEEGKGTSP DKQKQSPQPQ PGSSDQSEEE
QQQFRNIFKQ IAGDDMEICA DELKVLNTV VNKHKDLKTH GFTLESCSRM
IALMDTDGSG KLNLEQEFHHL WNKIKAWQKI FKHYDQSG TINSYEMRNA
VNDAGFHLNN QLYDIITMRY ADKHMNIDFD SFICCFVRLE GMFRAFHAFD
KDGDIKLN VLEWLQLTMY A*

RESULTATS ALIGNEMENT CALPAÏNE-3 vs. CALPAÏNE-3-PTM3

Range 1: 1 to 822 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1727 bits(4472)	0.0	Compositional matrix adjust.	822/822(100%)	822/822(100%)	0/822(0%)
Query 1	MPTVISASVAPRTAAEPRSPGPVPHPAQSKATEAGGGNPSGIYSAIISRNFPIIGVKEKT			60	
Sbjct 1	MPTVISASVAPRTAAEPRSPGPVPHPAQSKATEAGGGNPSGIYSAIISRNFPIIGVKEKT			60	
Query 61	FEQLHKKCLEKKVLYVDFEPPDETSLFYSQKFPFIQFVWKRPEICENPRFIIDGANRTD			120	
Sbjct 61	FEQLHKKCLEKKVLYVDFEPPDETSLFYSQKFPFIQFVWKRPEICENPRFIIDGANRTD			120	
Query 121	ICQELGDCWFLAAIACTLNQHLFRVIPHDQSFNIENYAGIFHFQFWRVGEWVVDVDD			180	
Sbjct 121	ICQELGDCWFLAAIACTLNQHLFRVIPHDQSFNIENYAGIFHFQFWRVGEWVVDVDD			180	
Query 181	CLPTYNNQLVFTKSNHRNEFWSALLEKAYAKLHGSYEALKGGNTTEAMEDFTGGVAEFFF			240	
Sbjct 181	CLPTYNNQLVFTKSNHRNEFWSALLEKAYAKLHGSYEALKGGNTTEAMEDFTGGVAEFFF			240	
Query 241	IRDAPSDMYKIMKKAIERGSLMGCSIDDGTNMTYGTSPSGLNNGELIARMVRNMDNSLLQ			300	
Sbjct 241	IRDAPSDMYKIMKKAIERGSLMGCSIDDGTNMTYGTSPSGLNNGELIARMVRNMDNSLLQ			300	
Query 301	DSLDPRGSDERPTRTIIPVQYETRMACGLVRGHAYSVTGLDEVPFKGKVKLVRLRNPW			360	
Sbjct 301	DSLDPRGSDERPTRTIIPVQYETRMACGLVRGHAYSVTGLDEVPFKGKVKLVRLRNPW			360	
Query 361	GQVEWNGSWSDRMKDWSFVDKDEKARLQHQVTEDEGFWMSYEDFIYHFTKLEICNLTADA			420	
Sbjct 361	GQVEWNGSWSDRMKDWSFVDKDEKARLQHQVTEDEGFWMSYEDFIYHFTKLEICNLTADA			420	
Query 421	LQSDKLQTTWTSVNEGRWVRGCSAGGCRNFPDTFWTNPQYRLKLEEDDDPDDSEVICSF			480	
Sbjct 421	LQSDKLQTTWTSVNEGRWVRGCSAGGCRNFPDTFWTNPQYRLKLEEDDDPDDSEVICSF			480	
Query 481	LVALMQKNRRDRKLGASLFTIGFAIYEVKEMHGNKQHLQKDFFLYNASKARSKTYINM			540	
Sbjct 481	LVALMQKNRRDRKLGASLFTIGFAIYEVKEMHGNKQHLQKDFFLYNASKARSKTYINM			540	
Query 541	REVSQRFRALPPSEYVIVPSTYEPHQEGEFILRVFSEKRNLSEEVENTISVDRPVKTKTK			600	
Sbjct 541	REVSQRFRALPPSEYVIVPSTYEPHQEGEFILRVFSEKRNLSEEVENTISVDRPVKTKTK			600	
Query 601	PIIFVSDRANSNKELGVDQSEEGKGTSPDKQKQSPQPGSSDQSEEEQQQFRNIFKQ			660	
Sbjct 601	PIIFVSDRANSNKELGVDQSEEGKGTSPDKQKQSPQPGSSDQSEEEQQQFRNIFKQ			660	
Query 661	IAGDDMEICADELKKVLNTVVKHKDLKTHGFTLESCRSMIALMDTDGSGKLNLEQEFHHL			720	
Sbjct 661	IAGDDMEICADELKKVLNTVVKHKDLKTHGFTLESCRSMIALMDTDGSGKLNLEQEFHHL			720	
Query 721	WNKIKAWQKIFKHYDQDQSGTINSYEMRNAVNDAGFHLNNQLYDIITMRYADKHMNIDFD			780	
Sbjct 721	WNKIKAWQKIFKHYDQDQSGTINSYEMRNAVNDAGFHLNNQLYDIITMRYADKHMNIDFD			780	
Query 781	SFICCFVRLEGMFRAFHAFDKDGDIKLNLEWLQLTMYA* 822				
Sbjct 781	SFICCFVRLEGMFRAFHAFDKDGDIKLNLEWLQLTMYA* 822				

ANNEXE 11

Mon CV présentant mon parcours professionnel et mon cursus universitaire.

CURSUS UNIVERSITAIRE

Depuis octobre 2015 (soutenance prévue le 01/10/2018)

- ❖ DOCTORANTE EN THESE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE, PATHOLOGIE HUMAINE SPE. GENETIQUE HUMAINE

AIX MARSEILLE UNIVERSITE, MARSEILLE (FRANCE), FINANCEMENT MESR 2015 - 2018

- « DYSTROPHIE MUSCULAIRE DES CEINTURES DE TYPE 2A : ETUDE DE PHENOMENES INFLAMMATOIRES ET DEVELOPPEMENT D'OUTILS EN THERAPIE GENIQUE » sous la direction du Dr BARTOLI Marc, DR2, CNRS

2014

- ❖ MASTER 2 PROFESSIONNEL COORDONNATEUR D'ETUDES DANS LE DOMAINE DE LA SANTE – REÇUE AVEC MENTION « TRES BIEN - MAJOR DE PROMO »

UNIVERSITE VERSAILLES SAINT-QUENTIN-EN-YVELINES, VERSAILLES (FRANCE)

- ENSEIGNEMENTS REÇUS (15 SEMAINES) :
 - Notions en médecine générale ;
 - Réglementation en recherche clinique (BPC, ICH, législation française et européenne, assurance qualité) ;
 - Méthodologie et gestion des essais cliniques interventionnels/non interventionnels ;
 - Management entrepreneurial et gestion d'entreprise, Innovation et gestion de la propriété intellectuelle ;
 - Economie de la santé, Bioéthique, Epidémiologie
 - Anglais professionnel
- TITRE DU PROJET TUTEUR (rédaction d'un protocole complet d'essai clinique avec recherche bibliographique, justification scientifique, déroulement de l'essai, etc.) : « EVALUATION DU BENEFICE CLINIQUE DE LA STIMULATION PHRENIQUE INTRADIAPHRAGMATIQUE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE DE STEINERT ».
- TITRE DU RAPPORT D'APPRENTISSAGE (CENTRE ANTOINE LACASSAGNE - ALTERNANCE DE 13 MOIS) : « RAPPORT D'APPRENTISSAGE DU METIER D'ATTACHEE DE RECHERCHE CLINIQUE AU SEIN DU CENTRE ANTOINE LACASSAGNE »

2013

Equipe Neuromyologie Translationnelle (U1251)

159

- ❖ MASTER 1 DE RECHERCHE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE SPECIALITES GENETIQUE, IMMUNOLOGIE ET DEVELOPPEMENT ANIMAL – REÇUE AVEC MENTION « BIEN »

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS, NICE (FRANCE)

- *ENSEIGNEMENTS REÇUS :*
 - *Biologie cellulaire*
 - *Immunologie fondamentale*
 - *Génétique moléculaire*
 - *Génétiques des grandes pathologies*
 - *Technologies omiques*
 - *Biologie cellulaire et génétique du développement animal*
 - *Anglais scientifique*

- *TITRE DU RAPPORT DE STAGE DE RECHERCHE (UMR E4320 'UNIVERSITE DE NICE, CEA' - 5 MOIS) : « SELECTION PAR IMAGERIE ET CARACTERISATION DE VECTEURS DE TRANSFERT DE GENE NON-VIRAUX » (COSIGNATAIRE DE RICHARD-FIARDO ET AL., BIOMATERIALS, VOLUME 45, MARS 2015).*

2007

- ❖ LICENCE PROFESSIONNELLE BIOTECHNOLOGIES SPECIALITES GENIE GENETIQUE, MICROSCOPIE ET QUALITE – REÇUE AVEC MENTION « TRES BIEN »

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS, NICE (FRANCE)

- *ENSEIGNEMENTS REÇUS :*
 - *Génétique cellulaire et moléculaire*
 - *Biotechnologies*
 - *Histologie et microscopie*
 - *Assurance qualité*
 - *Statistiques*
 - *Anglais scientifique*

- *TITRE DU RAPPORT DE STAGE (CABINET D'ANATOMIE ET DE CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES HUMAINE ; 7 MOIS) : « EVALUATION DE L'UTILISATION DE SUBSTITUTS DU FORMOL EN ANATOMIE PATHOLOGIQUE (HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE) »*

2006

❖ BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR BIOANALYSES ET CONTROLE – « MENTION BIEN »

LYCEE A. DE TOCQUEVILLE, GRASSE (FRANCE)

- ENSEIGNEMENTS REÇUS :
 - Génétique cellulaire et moléculaire
 - Biochimie
 - Chimie
 - Biotechnologies
 - Microbiologie
 - Assurance qualité
 - Anglais scientifique
 - Statistiques et mathématiques générales

- TITRE DU RAPPORT DE STAGE (LABORATOIRE DE RECHERCHE DE L'UNIVERSITE DE NICE) : « CARACTERISATION DE CELLULES EPITHELIALES DE REIN CODANT POUR LA PROTEINE DE FUSION ODD-GFP »

2003

❖ BACCALAUREAT SERIE SCIENTIFIQUE OPTION PHYSIQUE - CHIMIE

LYCEE AMIRAL DE GRASSE, GRASSE (FRANCE)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Depuis octobre 2015 (fin 30/09/2018)

❖ CHERCHEUR JUNIOR (CONTRAT DOCTORAL)

U1251 MARSEILLE MEDICAL GENETICS, INSERM AMU, MARSEILLE

- Assurer la gestion et le suivi de projets de recherche ;
- Analyser, exploiter et présenter des résultats de travaux de recherche ;
- Elaborer et/ou améliorer des protocoles pour les travaux de recherche ;
- Mettre en place et gérer une base documentaire (protocoles) ;

- Réaliser des techniques en laboratoire nécessaires aux travaux.

- *Stage de recherche de 3 semaines en avril 2017 au Tokyo Metropolitan Institute of Medical Sciences (Tokyo, Japon)*

Equipe Neuromyologie Translationnelle (U1251)

161

01/09/2013 - 30/09/2014

❖ ATTACHEE DE RECHERCHE CLINIQUE (CONTRAT DE PROFESSIONNALISATION)

CENTRE DE LUTTE CONTRE LE CANCER ANTOINE LACASSAGNE, NICE (FRANCE)

- Assurer la gestion et le suivi des essais cliniques mis en place dans le centre ;
- Assurer le suivi des dossiers des patients participant aux essais cliniques ;
- Elaborer les documents spécifiques pour l'inclusion et le suivi des patients participants aux essais cliniques ;
- Effectuer la visite de mise en place ;
- Effectuer les visites de monitoring ;
- Effectuer la visite de clôture ;
- Travailler sur les procédures réglementaires : dossiers ANSM et CPP ;
- Remplissage des cahiers d'observation ;
- Résolution des queries.

01/05/2008 - 30/05/2012

❖ TECHNICIENNE RESPONSABLE D'ETUDES TOXICOLOGIQUES ANIMALES

BAYER CROPSCIENCE, SOPHIA ANTIPOLIS (FRANCE)

- Mettre en place et gérer différentes études en toxicologie expérimentale : études immunotoxicologiques (15 études/an), 90-jours rats/souris (3 à 4 études/an), cancérogenèse (18 à 24 mois) rat/souris (2 études/an), Local Lymph Node Assay (2 études/an), 28-jours rat/souris (5 études/an).
 - Contrôler les données et le déroulement des études selon les BPL.
 - Préparer et réaliser l'archivage des études terminées.
 - Réaliser les différentes techniques en expérimentation animale (examen clinique, gavage, autopsie, prise de sang, etc. chez le rat, la souris, le lapin).
-

07/01/2007 - 04/30/2008

❖ TECHNICIENNE EN HISTOPATHOLOGIE HUMAINE

CABINET D'ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES HUMAINE DU DR SIMBSLER, NICE (FRANCE)

- Préparer les échantillons biologiques et pièces opératoires pour le diagnostic : macroscopie, fixation et inclusion, coupe au microtome, montage sur lames et coloration ;
- Réaliser les techniques d'immunohistochimie ;
- Gérer les stocks, les commandes et les déchets ;
- Participer à la mise en place de la norme ISO 9001 au sein du cabinet.

AUTRES COMPETENCES

- ❖ Qualification niveau Concepteur de Projets modèle rongeur (Niveau 1).
- ❖ Techniques en expérimentation animale : contention, prélèvements et administrations, autopsie (rongeur et lapin) ;
- ❖ Techniques en microbiologie : ensemencement, identification de germes ;
- ❖ Culture cellulaire ;
- ❖ Biologie moléculaire : ELISA, Western Blot, électrophorèse sur gel d'agarose, SDS-Page, Immunofluorescence ;
- ❖ Histologie, immunohistochimie et immunocytochimie ;
- ❖ Notions en imagerie du petit animal : IRM et pet-scan ;
- ❖ Notions en tant qu'utilisatrice de FACS ;
- ❖ Anglais professionnel : niveau intermédiaire ;
- ❖ Bureautique : niveau intermédiaire sur Word, Excel, Power Point ; notions sur MS Project ; notions sur FlowJo (cytométrie en flux).
- ❖ Utilisatrice de MacOs et Windows.

ACTIVITES EXTRA PROFESSIONNELLES

- ❖ Participante à l'opération « 1000 Chercheurs dans les écoles », novembre 2015, AFM-Téléthon et au « Recherch'Thon » les 3 et 4 décembre 2015.
- ❖ Déléguée de classe de la promotion 2013/2014 du M2P CEDS : intermédiaire entre l'équipe pédagogique et les étudiants, vérification et aide à la coordination de l'emploi du temps, aide à la gestion des problèmes.
- ❖ Loisirs : lecture (thriller psychologique, romans policiers), randonnée, voyages (Japon, Rome, Prague, Berlin, Londres, Genève, Paris, Montréal), dessin.

PUBLICATION

- ❖ “Evaluation of tetrafunctional block copolymers as synthetic vectors for lung gene transfer”, Peggy Richard - Fiardo, Catherine Hervouet, Robert Marsault, Philippe R. Franken, Béatrice Cambien, Julien Guglielmi, **Julie Warnez-Soulie**, Jacques Darcourt, Thierry Pourcher, Thibault Colombani, Thomas Haudebourg, Pauline Peuziat, Bruno Pitard, Georges Vassaux ; *Biomaterials volume 45, March 2015, Pages 10 - 17.*

PUBLICATIONS

Dans le cadre de mes projets de thèse principaux et en particulier pour la partie exploration IRM des souris déficientes en calpaïne-3 j'ai été très souvent en contact avec l'équipe de Benoit GIANNESINI au CRMBM. Benoit conduisait en parallèle un projet concernant l'impact d'un déficit de la protéine TP53INP1 sur le stress oxydatif musculaire lors d'un exercice physique chez des souris modèle. Il m'a proposée de participer à ces travaux étant donné mes connaissances sur le muscle ainsi que mon expérience à gérer et mener des études précliniques et une certaine expertise technique en biologie moléculaire. Au tout départ, il s'agissait de réaliser des expériences complémentaires mais cette collaboration a pris un jour nouveau en fonction de nos discussions et des modifications que mes résultats ont apportées. Finalement, ce projet a pris une place plus importante que prévue et je me suis consacrée aux nombreuses études biomoléculaires et aux manipulations *in vivo* nécessaires pour mener à bien ce projet commun. Je présente ici l'article soumis au journal *AJP-Endocrinology and Metabolism* (E-00248-2018).

Le déficit en (TP53INP1) Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 est connu depuis quelques années pour être à l'origine de l'obésité et la résistance à l'insuline associées à un stress oxydatif. Le rôle primordial des muscles squelettiques dans le développement du syndrome métabolique est également connu depuis des années. Cependant, il n'avait jamais été recherché les informations de bioénergétique de même que les conséquences fonctionnelles de la déficience en TP53INP1 sur ce tissu. Répondre à ces questions est à l'origine du travail présenté ici.

Brièvement, les résultats que nous avons obtenus dans cette étude montrent :

Chez la souris déficiente en TP53INP1 nous avons observé une augmentation visible de l'accumulation de graisse corporelle et du tissu adipeux (nombre d'adipocytes). Cette augmentation n'est cependant pas corrélée avec une exacerbation du stress oxydatif cytosolique, ni de la teneur en lipides, ni du pool mitochondrial et enfin ne modifie pas la capacité (force) des cellules musculaires.

Pour essayer de pousser ce modèle, nous avons fait réaliser aux souris des exercices assez intenses. Le muscle étudié est le muscle gastrocnémien : dans ces muscles durant l'exercice, le déficit en TP53INP1 réduit la capacité de synthèse oxydative de l'ATP et l'efflux protonique sans altérer la résistance à la fatigue, et paradoxalement augmente la force contractile. L'ensemble de ces résultats nous indiquent que le muscle squelettique n'est pas impliqué dans le développement du syndrome métabolique induit par le déficit en TP53INP1, ce qui est particulièrement important. De plus, ces données révèlent que TP53INP1 joue un rôle clé dans l'équilibre entre la fonction musculaire et le métabolisme oxydatif.

Finalement ces travaux complémentaires ont permis de répondre à la question sur le rôle de TP53INP1 et de mieux appréhender le fonctionnement du muscle et des outils développés pour son étude.

Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 deficiency reduces oxidative capacity in exercising mouse gastrocnemius muscle in vivo

Julie WARNEZ-SOULIE², Michael MACIA¹, Sophie LAC³, Emilie PECCHI¹, Monique BERNARD¹, David BENDAHAN¹, Marc BARTOLI², Alice CARRIER³, Benoît GIANNESINI¹

¹ Aix Marseille Univ, CNRS, CRMBM, Marseille, France

² Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, Marseille, France

³ Aix Marseille Univ, CNRS, INSERM, Institut Paoli-Calmettes, CRCM, Marseille, France

Running title: TP53INP1 deficiency impacts skeletal muscle bioenergetics

Keywords: Oxidative stress; mitochondrial function; magnetic resonance phosphorus spectroscopy

Table of contents category: Muscle

Corresponding author: Dr. Benoît GIANNESINI

Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale
(CRMBM), UMR 7339 CNRS – Aix-Marseille Université

27 Bd Jean Moulin, 13005 Marseille, France

E-mail: benoit.giannesini@univ-amu.fr

Key points summary

- Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) deficiency favors oxidative stress-associated obesity and insulin resistance.
- Despite skeletal muscle has a predominant role in metabolic syndrome development, the bioenergetics and functional consequences of TP53INP1 deficiency upon this tissue remain undocumented.
- We report in mice that TP53INP1 deficiency increases whole-body fat accumulation and adiposity, but does not affect cytosolic oxidative stress, lipid content and mitochondrial pool and capacity in myocyte.
- In exercising gastrocnemius muscle in vivo, TP53INP1 deficiency reduces the oxidative ATP synthesis capacity and the proton efflux without altering the fatigue resistance, and paradoxically increases the contractile force.
- Beyond the demonstration that skeletal muscle is not involved in the development of metabolic syndrome induced by TP53INP1 deficiency, these data reveal that TP53INP1 plays a key role in the balance among muscle function and oxidative metabolism.

Abstract

Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) deficiency leads to oxidative stress-associated obesity and insulin resistance. Although the skeletal muscle plays a predominant role in metabolic syndrome development, the bioenergetics and functional consequences of TP53INP1 deficiency upon this tissue remain undocumented. To clarify this issue, gastrocnemius muscle mechanical performance, bioenergetics and anatomy were investigated under physiological condition in TP53INP1-deficient and wild-type mice using a multidisciplinary approach implementing noninvasive magnetic resonance (MR) imaging and dynamic ³¹-phosphorus MR spectroscopy. TP53INP1 deficiency increased whole-body fat accumulation (+56%) and adiposity (+49%) but did not affect cytosolic oxidative stress, lipid content, and mitochondrial pool and capacity in myocyte. TP53INP1 deficiency also did not disturb basal bioenergetics status but increased (+59%) VDAC1 content, a crucial ADP/ATP shuttle between mitochondrial matrix and cytosol. In exercising muscle in vivo, the oxidative ATP synthesis capacity was dramatically reduced (-58%) in TP53INP1-deficient mice despite the level of ADP (the main in vivo stimulator of mitochondrial respiration) did not differ between genotypes. Moreover, TP53INP1 deficiency did not alter fatigue resistance but paradoxically increased the contractile force, without any difference for fiber-type distribution and STIM1 calcium regulation protein content between both groups. In addition, proton efflux from the muscle was decreased (-67%) in TP53INP1-deficient mice, thereby indicating a reduced blood supply. In conclusion, TP53INP1 plays a role in muscle function and bioenergetics through oxidative capacity impairment in exercising muscle possibly as the consequence of abnormal mitochondrial respiration regulation and/or defective blood supply.

Introduction

Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) was identified in the late 1990s independently by three different laboratories (Saadi *et al.*, 2015). The gene encoding TP53INP1 belongs to a gene family composed of two members, namely Tp53inp1 and Tp53inp2 (also known as DOR, for "diabetes- and obesity-regulated"), which are highly conserved in mammals (Carrier *et al.*, 1999; Baumgartner *et al.*, 2007). TP53INP1 is considered as a key stress protein with antioxidant-associated tumor suppressive function (Gommeaux *et al.*, 2007; Cano *et al.*, 2009; N'Guessan *et al.*, 2011). Two major mechanisms by which TP53INP1 contributes to stress response have been unveiled. First, in the nucleus, TP53INP1 regulates the transcriptional activity of p53 and p73 by direct interaction, and mediates the antioxidant activity of p53 (Tomasini *et al.*, 2002; Tomasini *et al.*, 2005; Cano *et al.*, 2009). Second, independently of p53, TP53INP1 is involved in autophagy and more particularly mitophagy (Seillier *et al.*, 2012; Seillier *et al.*, 2015).

It has been evidenced in cultured cells and in vivo that TP53INP1 deficiency causes a chronic cellular oxidative stress characterized by an increase of reactive oxidative species (ROS) level and a decrease of antioxidant defenses (Gommeaux *et al.*, 2007; N'Guessan *et al.*, 2011). Restoration of TP53INP1 expression in TP53-deficient cells is able to reduce ROS content toward normal level, demonstrating the primary role of TP53INP1 in the antioxidant activity of p53 (Cano *et al.*, 2009). Besides, recent experiments have reported that the chronic oxidative stress observed in the absence of TP53INP1 results from the accumulation of defective mitochondria in association with impaired PINK1/PARKIN mitophagy and massive intracellular accretion of lipid droplets (Seillier *et al.*, 2015), which is in accordance with other studies showing that mitochondrial function is impaired in various mouse models deficient for enzymes and transcription factors involved in antioxidant defenses (Ho *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009). In addition, given that mice lacking TP53INP1 are prone to develop ROS-driven obesity and insulin resistance, it has been proposed that TP53INP1 protects from metabolic syndrome through a mechanism involving prevention of oxidative stress through mitochondrial homeostasis regulation ((Cano *et al.*, 2009; N'Guessan *et al.*, 2011; Seillier *et al.*, 2015). Noteworthy, it must be kept in mind that skeletal muscle has a predominant role in the development of metabolic syndrome because it is one of the major organs participating in the assimilation, storage and utilization of glucose provided by food. Yet, the physiological consequence of TP53INP1 deficiency on this tissue

has never been addressed. This issue warrants consideration because excessive cytosolic oxidative stress as well as reduced oxidative capacity are usually associated with impairment of muscle function (Reid *et al.*, 1994; Supinski *et al.*, 1997; Moopanar & Allen, 2005; Zolfaghari *et al.*, 2015).

The aim of the present study was to investigate the impact of TP53INP1 deficiency upon skeletal muscle function and bioenergetics under physiological condition. In particular, we have tested whether lack of TP53INP1 impairs the oxidative capacity and mechanical performance. For this purpose, we used mutant mice generated in the laboratory in which TP53INP1 has been genetically inactivated (Gommeaux *et al.*, 2007), that we compared with their wild-type counterpart. Force-generating capacity, energy metabolism and oxidative ATP flux were investigated in contracting gastrocnemius muscle during a standardized fatiguing bout of exercise, using noninvasive magnetic resonance (MR) imaging and 31-phosphorus (³¹P) MR spectroscopy. ³¹P-MR spectroscopy is a unique and valuable technique for the dynamic and simultaneous monitoring of the acidosis and the levels of high-energy phosphorylated compounds involved in muscle bioenergetics, thereby assessing a number of key variables depicting muscle oxidative capacity, ATP turnover and regulation in intact muscle (Kemp *et al.*, 1995; Lanza *et al.*, 2011; Prompers *et al.*, 2014; Kemp *et al.*, 2015).

Methods

Ethical Approval

All animal procedures were performed with the approval of the animal experiment committee of Aix Marseille University and under the supervision of BG (license to perform experiments #13.164 2008/11/25) in strict accordance with the guidelines of the European Communities Council Directive 86/609/EEC for Care and Use of Laboratory Animals. The present work complies with the animal ethical principles of *The Journal of Physiology* and Grundy's (2015) checklist. Every attempt was made to minimize the number and suffering of animals at all times. Mice were housed as 4-6 per cage in an environmentally controlled facility

(12-12 h light-dark cycle, 22°C) with free access to commercial standard food and water until the time of the experiments.

Animal model

The generation of TP53INP1-deficient mice (in which the gene *Trp53inp1* encoding murine TP53INP1 was inactivated by homologous recombination; named *Tp53inp1*^{-/-} in this work) backcrossed on the C57BL/6 parental genetic background and their genotyping by PCR were described previously (Gommeaux *et al.*, 2007; N'Guessan *et al.*, 2011). Twenty-one 5-months-old male *Tp53inp1*^{+/+} (*n* = 10) and *Tp53inp1*^{-/-} (*n* = 11) mice generated from heterozygous (*Tp53inp1*^{+/-}) pairs (Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle de Luminy, Marseille, France) were used for these experiments.

Study design

Each animal was studied in a noninvasive manner twice over a one-week period. The first study session was devoted to the dynamic in vivo investigation of gastrocnemius muscle function and bioenergetics throughout a standardized rest-exercise-recovery protocol including a fatiguing workout. During the second session, whole-body MR images were acquired to quantify body and abdominal fat contents. Afterwards, animals were euthanized by cervical dislocation following isoflurane anesthesia. Gastrocnemius muscles were quickly removed, freeze-clamped with nitrogen-chilled metal tongs, and stored at -80°C for in vitro analytical procedures.

Non-invasive investigation of gastrocnemius muscle function and bioenergetics

Investigations were conducted using an innovative homebuilt experimental setup that has been designed to be operational inside the 4.7-Tesla horizontal magnet of a preclinical 47/30 Biospec Avance MR scanner (Bruker, Karlsruhe, Germany) equipped with a 120-mm BGA12SL (200 mT/m) gradient insert (Giannesini *et al.*, 2010). The setup allows (i) to get

anatomical information about the hindlimb using MR imaging, (ii) to assess gastrocnemius muscle mechanical performance with a dedicated ergometer consisting of a foot pedal coupled to a force transducer, and (iii) to monitor dynamically the levels of high-energy phosphorylated compounds and acidosis in this muscle using ^{31}P -MR spectroscopy. We have chosen to study the gastrocnemius muscle, which forms the belly of the calf, because it is clearly distinct from the other muscles of the leg, easily accessible for MR coils and large enough to give ^{31}P -MR spectra in a short time and with a good signal to noise ratio, and preferentially activated using our experimental methodology.

Animal preparation

Each mouse was initially anesthetized in an induction chamber using an air flow (3 L/min) containing 4% isoflurane. The left hindlimb was shaved before electrode cream was applied at the knee and heel regions to optimize electrically evoked muscle contractions. Anesthetized animal was then placed supine in the experimental setup. Corneas were protected from drying by applying ophthalmic cream, and the animal's head was placed in a facemask continuously supplied with 1.75% isoflurane in 33% O_2 (0.2 L/min) and 66% N_2O (0.4 L/min). The foot was positioned on the pedal of the ergometer and the hindlimb was centered inside a 20-mm-diameter ^1H Helmholtz imaging coil while the belly of the gastrocnemius muscle was located above an elliptic ($8 \times 12 \text{ mm}^2$) ^{31}P -MR spectroscopy surface coil. The leg was immobilized using piece works fitting animal morphology. Body temperature was controlled and maintained at a physiological level throughout the experiment using a feedback loop including an electrical heating blanket, a temperature control unit (ref. 507137, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) and a rectal thermometer.

Induction of muscle contraction and contractile force measurement

Muscle contractions were induced by electrostimulation using two transcutaneous surface electrodes connected to a constant-current stimulator (DS7A, Digitimer, Hertfordshire, United Kingdom). One electrode was placed at the heel level and the other one

was located just above the knee joint. Electrical signal coming out from the force transducer of the ergometer was amplified (operational amplifier AD620, Analog Devices, Norwood, MA, USA; 70-dB gain; 0-5 kHz bandwidth) and converted to a digital signal (PCI-6220, National Instrument, Austin, TX, USA) that was continuously monitored and recorded on a personal computer using the WinATS software version 6.5 (Sysma, Aix-en-Provence, France). The digital signal was converted to force according to a linear calibration curve and expressed in mN.

Fatiguing exercise protocol

Gastrocnemius muscle function and bioenergetics were evaluated throughout a fatiguing bout of exercise consisting of 6 minutes of maximal isometric contractions repeated at a frequency of 1.7 Hz in order to produce marked mechanical and metabolic changes.

Preliminary adjustments

Before the launch of MR acquisition, muscle was passively stretched at rest by adjusting the angle between the foot and the hindlimb in order to produce maximal twitch tension in response to supramaximal square wave pulses (1-ms duration). The individual maximal electrostimulation intensity was determined by progressively increasing stimulus intensity until there was no further increase in the peak twitch force.

Multimodal MR data acquisition

Ten consecutive noncontiguous axial slices (1-mm thickness; 0.5-mm spaced) covering the region from the knee to the ankle were selected across the hindlimb. Anatomic images of these slices were acquired at rest using a spin echo sequence (18.2-ms echo time; 1000-ms repetition time; two accumulations; 30 x 30 mm² field of view; 256 x 256 matrix size; 8.5-min total acquisition time). ³¹P-MR spectra (8 kHz sweep width; 2048 data points) from the gastrocnemius muscle were continuously acquired before (rest period; 6-min duration), during and after (recovery period; 15-min duration) the 6-min fatiguing exercise. Spectra acquisition

was gated to muscle electrostimulation to reduce potential motion artifacts due to contraction. A fully relaxed spectrum (12 scans, 20-s repetition time) was acquired at rest, followed by a total of 768 saturated free induction decays (FID; 1.875-s repetition time). The first 64 FIDs were acquired in resting muscle and summed together. The next 192 FIDs were acquired during the exercise and were summed by packets of 32, allowing a 60-s temporal resolution. The remaining 512 FIDs were obtained during the recovery period and were summed as 7 packets of 32 FIDs followed by 3 packets of 64 FIDs and one packet of 96 FIDs.

MR data processing and calculation

MR data were processed using custom-written analysis programs developed under the IDL (Interactive Data Language, Exelis Visual Information Solutions, Boulder, CO, USA) environment (Mattei *et al.*, 2006; Le Fur *et al.*, 2010). For each hindlimb MR image, region of interest was manually outlined so that the corresponding cross-sectional area of the gastrocnemius muscle was measured. Muscle volume was calculated by summing up the volume between consecutive slices. Relative concentrations of phosphocreatine (PCr), inorganic phosphate (P_i) and ATP were obtained from ^{31}P -MR spectra using a time domain fitting routine based on the AMARES-MRUI Fortran code and appropriate prior knowledge for the ATP multiplets (Vanhamme *et al.*, 1997). Absolute amounts of phosphorylated compounds were expressed relative to basal ATP concentration determined *in vitro* using a bioluminescence-based method (see analytical procedures below). Intracellular pH was calculated from the chemical shift of the P_i signal relative to PCr according to the formula (Arnold *et al.*, 1984): $\text{pH} = 6.75 + \log[(3.27 - \delta_{P_i}) / (\delta_{P_i} - 5.69)]$. ADP concentration was calculated from [PCr], [ATP] and pH considering the equilibrium constant ($K = 1.67 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$) of the creatine kinase reaction (Roth & Weiner, 1991). The rate of PCr degradation ($V_{\text{PCr}_{\text{stim}}}$, in mM/min) at the start of the exercise was calculated as $V_{\text{PCr}_{\text{stim}}} = \Delta\text{PCr} / \tau_{\text{PCr}_{\text{stim}}}$, where ΔPCr is the extent of PCr depletion measured at the exercise-end (relative to basal value) and $\tau_{\text{PCr}_{\text{stim}}}$ is the time constant of PCr degradation. $\tau_{\text{PCr}_{\text{stim}}}$ was determined by fitting the time course of PCr level to a mono-exponential function with a least-mean-squared algorithm. Similarly, the PCr recovery

kinetic parameters were determined during the postexercise period by fitting the time course of PCr resynthesis to a mono-exponential function. The maximal oxidative capacity (Q_{\max} , in mM/min) was calculated from the time-constant of PCr resynthesis ($\tau_{\text{PCr}_{\text{rec}}}$) and the PCr concentration in resting muscle (PCr_{rest}): $Q_{\max} = \text{PCr}_{\text{rest}}/\tau_{\text{PCr}_{\text{rec}}}$ (Lanza *et al.*, 2011; Prompers *et al.*, 2014). Force-normalized oxidative ATP synthesis was calculated as the ratio between $V_{\text{PCr}_{\text{rec}}}$ and the amount of force produced at the exercise end considering that at this time, ATP production from oxidative phosphorylation is equal to $V_{\text{PCr}_{\text{rec}}}$ (Boska, 1991; Prompers *et al.*, 2014). The rate of proton efflux from the muscle (in mM/min) was calculated in the early stage of the postexercise recovery period from the changes in pH and levels of high-energy phosphorylated contents as described previously (Trenell *et al.*, 2006; Layec *et al.*, 2011).

Non-invasive MR measurement of fat content

Explorations were performed with our preclinical 47/30 Biospec Avance MR scanner. Each mouse was initially anesthetized by isoflurane inhalation as described above and placed in prone position in a whole-body imaging coil (PRK200-RES200, Bruker, Karlsruhe, Germany) integrating a facemask continuously supplied with 1.75% isoflurane in 33% O₂ (0.2 L/min) and 66% N₂O (0.4 L/min). Axial MR images were acquired across the entire body length excluding the tail using a turbo spin echo sequence (5.530-ms echo time; 77.85 ms-effective echo time; 300-ms repetition time; 2 averages; 40 x 40 x 80 mm³ field of view, 128 x 128 x 64 matrix size). Fat volume was quantified using an automatic segmentation method based on a pixel intensity analysis of MR images with the FMRIB Software Library v5.0.2.2, (FSL, Oxford University, UK; <http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl>). Fat mass was calculated considering that density of adipose tissue is 0.92 g/cm³ (Farvid *et al.*, 2005).

Citrate synthase activity

Freeze-clamped gastrocnemius muscle (20 to 30 mg) was homogenized with a lysis reagent (ref. C3228; Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin Fallavier, France) and a protease inhibitor cocktail (ref. P834; Sigma-Aldrich France). Citrate synthase activity was measured on

a microplate reader (Victor X3; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) using the colorimetric Citrate Synthase Assay Kit (ref. CS0720; Sigma-Aldrich France) according to the manufacturer's instructions. Citrate synthase activity was normalized by the protein content measured using the colorimetric Pierce BCA Protein Assay Kit (ref. 23225; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

In vitro determination of metabolic content

Intramuscular contents for ATP, glycogen and glucose were determined in 40-60 mg of freeze-clamped muscles homogenized in 1.2 mL of ice-cold 0.6 M perchloric acid using a Polytron PT2100 (Kinematica AG, Luzern, Switzerland). After incubation for 15 min at 4°C, the homogenates were centrifuged (15 min, 2000 x g, 4°C). The supernatants were neutralized with K₂CO₃, placed for 30 min at 4°C and centrifuged (15 min, 2000 x g, 4°C) to remove precipitates. ATP concentration was determined using the bioluminescence ATP Determination Kit (ref. A22066; Invitrogen, Eugene, OR, USA). Glycogen and glucose contents were assessed by colorimetric procedure using the Glycogen Assay Kit (ref. E2GN-100; EnzyChrome, Hayward, CA, USA).

Intramyocellular lipid (IMCL) content was determined in another part (50-70 mg) of the freeze-clamped muscle homogenized in 1 mL of a 1% (w/v) Triton X-100 in chloroform solution. Briefly, homogenates were centrifuged (10 min, 13000 x g, 20°C), the organic phases were collected and chloroform was removed using a nitrogen evaporator (N-EVAP-111, Organomation, Berlin, MA, USA). IMCL content was then measured using the colorimetric Free Fatty Acid Quantitation Kit (ref. MAK044, Sigma-Aldrich France).

Protein quantification

Total proteins extraction and quantification

Freeze-clamped muscles were homogenized using a MagNA Lyser Instrument (Roche Life Science France, Meylan, France) in MagNA Lyser Green Beads filled with a lysis buffer

containing 50 mM Tris/HCl, 15% glycerol, 1mM DTT, 10 mM EDTA, 0.2% Triton, 46 mM KCl and 10 μ L of protease inhibitor cocktail (ref. P2714; Sigma-Aldrich France) per 500 μ L. The homogenates were subjected to sonication and centrifugation at 10,000 x g for 10 minutes at 4°C. The supernatants were aliquoted and used for BCA protein assay (Promega Glomax Multi detection System spectrophotometer at 560 nm) to determine total protein content.

Myosin heavy chain isoform analysis

The primary antibodies were purchased from Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, University of Iowa, Iowa City, IA, USA) and were specific to the myosin heavy chains (MHC) type I (mouse anti-bovine IgG2b, ref. BA-F8; at 1:250), type IIa (mouse anti-bovine IgG1, ref. SC-71; at 1:250) and type IIb (mouse anti-bovine IgGM, ref. BF-F3; at 1:250). The primary antibody specific to glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (ref. SC-48167; at 1:1000). The fluorescent secondary antibodies used were as follow: IRDye® 800CW donkey anti-mouse IgG (H + L) (ref. P/N926-32212, Li-Cor; at 1:10,000) and IRDye® 800CW donkey anti-goat IgG (H + L) (ref. P/N926-32214, Li-Cor; at 1:10,000). Twenty μ g of proteins extract were separated by SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were probed with the appropriate primary antibodies for overnight at 4°C followed by washes and one-hour incubation at room temperature with the appropriate fluorescent secondary antibodies. Proteins were detected using an Odyssey infrared imaging system (Odyssey, Li-Cor Biosciences). Amplitudes of protein expression were arbitrary quantified with the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Peak area for each band corresponding to MYHx or STIM1 was normalized to GAPDH peak area.

STIM1 analysis

The primary antibody specific to stromal interaction molecule 1 (STIM1) was purchased from Sigma-Aldrich France (ref. S-6072; at 1:750). The fluorescent secondary antibodies used were as followed: IRDye® 800CW donkey anti-rabbit IgG (H + L) (ref. 926-32213, Li-Cor; at

1:10,000). Twenty μ g of proteins extract were separated by SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were probed with primary antibodies for overnight at 4°C followed by washes and one-hour incubation at room temperature with fluorescent secondary antibodies.

Oxidative proteins analysis

Oxidative proteins were quantified using the Oxidized Protein Western Blot Detection Kit (ref. ab178020, Abcam) according the manufacturer's guidelines. Ten μ g of proteins were separated by SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were probed overnight at 4°C with primary antibody rabbit anti-DNP from Oxidized Protein Western Blot Detection Kit, followed by washes and one-hour incubation at room temperature with fluorescent secondary antibody IRDye® 800CW donkey anti-rabbit IgG (H + L) (ref. 926-32213, Li-Cor; at 1:10,000). Proteins were detected using an Odyssey infrared imaging system. Amplitudes of oxidative protein expression were arbitrary quantified with the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Peak area for each band corresponding to DNP-proteins was normalized to derivatization control peak area.

PARKIN, PINK1, PGC-1 α , VDAC1, 4HNE analysis

Twenty μ m sections from freeze-clamped muscle were homogenized using polytron PT2100 in a lysis buffer containing 50 mM Tris/HCl, 15% glycerol, 1 mM DTT, 10 mM EDTA, 0.2% Triton, 46 mM KCl and 10 μ L of protease inhibitor cocktail (ref. P2714, Sigma-Aldrich France) per 500 μ L. The homogenates were subjected to sonication and centrifugation at 10,000 x g for 10 minutes at 4°C. The supernatants were aliquoted and used for BCA protein assay (Promega Glomax Multi detection System spectrophotometer at 560 nm) to determine total protein content. Twenty μ g of proteins extract were separated by SDS/PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were blocked in 5% non-fat milk in phosphate-buffered saline Tween-20, and developed with antibodies specific for PARKIN (ab15954 - 1:1000, Abcam), PGC-1 α (ref. sc13067 - 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), PINK1 (ref. BC100-494 - 1:200, Novus Biologicals, Montluçon, France), VDAC1 (ref. ab14734 - 1:2500; Abcam, Cambridge, UK), 4HNE (ref. NHE11-S - 1:500; Alpha

Diagnostic, San Antonio, TX, USA), and β -tubulin (ref. T4026 - 1:3000, Sigma-Aldrich France). Secondary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology: anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugate (ref. sc-2004 - 1:5000) and anti-mouse HRP-conjugate (ref. sc-2005 - 1:5000). Immunoblots were developed using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). Chemiluminescence was detected using Fusion FX7 device (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Amplitudes of protein expression were arbitrary quantified with the ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Peak area for each band corresponding to PARKIN, PINK1, PGC-1 α , VDAC1 or 4HNE was normalized to Beta-tubulin peak area.

Statistics

All values are expressed as mean \pm SEM. Sample distribution was tested with the Shapiro-Wilk test. Force production and fatigue resistance throughout the 6-min exercise were tested using two-factor (group \times time) ANOVAs with repeated measures on time followed by Tukey-Kramer post-hoc multiple comparison tests to determine pairwise differences between groups. For other variables, significant differences were determined with non-parametric Mann-Whitney tests or parametric two-tailed Student's *t*-tests. The significance level was set at $P < 0.05$.

Results

Morphological characteristics

Body weight (Fig. 1A) and gastrocnemius muscle volume (Fig. 1B) did not differ significantly between wild-type and TP53INP1-deficient mice, but the ratio between body weight and gastrocnemius muscle volume was higher (+6%) in animals lacking TP53INP1 (Fig. 1C), hence suggesting that TP53INP1 deficiency affects body composition. Actually, we found using *in vivo* whole-body MR imaging that both body (Fig. 1D) and abdominal (Fig. 1E) fat contents were larger (+56% and +50%, respectively) in TP53INP1-deficient mice, whereas

lean mass was not affected in those animals (Fig. 1F). Overall, adiposity index was 49% higher in mice lacking TP53INP1 (Fig. 1G). Besides, TP53INP1 deficiency did not alter the relative distribution of MHC isoform proteins in the gastrocnemius muscle (Fig. 2).

Metabolic content

No differences were observed between both genotypes for IMCL (Fig. 3A) and total glucidic (Fig. 3B) contents. However, glycogen store was 49% larger (Fig. 3C) in TP53INP1-deficient mice whereas glucose content was 19% lower (Fig. 3D). Further, the citrate synthase activity did not differ between both groups (Fig. 3E).

Protein content and oxidation

There were no differences between both groups for oxidative protein (Fig. 4A), STIM1 (Fig. 4B), PARKIN, PINK1, PGC-1 α and 4HNE contents (Fig. 4C). By contrast, the VDAC1 protein level was 59% higher in TP53INP1-deficient mice (Fig. 4C).

Mechanical performance

Contractile force production was normalized to gastrocnemius muscle volume measured from anatomic hindlimb MR images. The time courses of force production and force-generating capacity throughout the 6-min in vivo fatiguing bout of exercise are shown in Fig. 5A and 5B. For each group, force transiently increased in the early stage of the exercise (Fig. 5A) to reach a maximal value that was 13% larger in TP53INP1-deficient mice (Fig. 5C). Force then decreased progressively until the exercise end as a sign of fatigue development; at this stage, the extent of force reduction did not differ between both groups, averaging around 45% (Fig. 5D). Importantly, force production was 10-15% larger in TP53INP1-deficient mice during the first half of the exercise (Fig. 5A), whereas the shape of force-generating capacity curve was very similar for both mouse genotypes during the whole exercise (Fig. 5B). Moreover, the total amount of force produced during the whole exercise was larger (+17%) in TP53INP1-deficient mice (Fig. 5E).

Gastrocnemius muscle bioenergetics

Muscle bioenergetics was assessed throughout a standardized rest-exercise-recovery protocol. At rest, TP53INP1-deficient mice did not display any significant alterations of pH and PCr, ATP and ADP contents (Table 1), which indicates that the basal bioenergetics status was preserved in these animals. During the fatiguing exercise, the time courses of phosphorylated compound levels and pH were comparable in the two mouse genotypes (Fig. 6A-D). At the start of the exercise, PCr was rapidly consumed at a similar rate between wild type and TP53INP1-deficient mice (Table 1). After 2 min, PCr level reached a plateau that was maintained until the end of exercise (Fig. 6A), which indicates the establishment of a metabolic steady state since the PCr pool is at this stage considered as a shuttle for the transport of high-energy phosphates between the sites of production and consumption of ATP (Meyer *et al.*, 1984; Wallimann *et al.*, 1992). For both groups, ATP level decreased slightly throughout the exercise (Fig. 6B), hence demonstrating that ATP homeostasis was ensured, whereas ADP – the main stimulator of oxidative ATP synthesis *in vivo* (Gyulai *et al.*, 1985; Kemp & Radda, 1994) – continuously accumulated (Fig. 6C) to reach an end-exercise value that did not differ between mouse genotypes (Table 1). The time course of pH was characterized by a strong and rapid acidosis during the first half of the exercise period followed by a phase of fairly steady state (Fig. 6D). At the exercise end, there were no differences between both genotypes for the extents of PCr degradation (an index of the intramuscular energetics load), ATP depletion and acidosis (Table 1), hence showing that the stress induced by exercise produced similar bioenergetics changes in both groups. Nevertheless, the oxidative ATP production measured at the exercise end was strongly lower (-58%) in mice lacking TP53INP1 (Fig. 7A). During the postexercise recovery period, TP53INP1 deficiency dramatically reduced the initial rate of PCr resynthesis (-54%; Fig. 7B) and prolonged the time constant for PCr resynthesis (+141%; Fig. 7C), which indicates mitochondrial bioenergetics defect. Consistently, the maximal oxidative capacity was reduced in TP53INP1-deficient mice (-52%; Fig. 7D). In addition, the initial rate

of proton efflux from the muscle in the early stage of the recovery was reduced in mice lacking TP53INP1 (-67%; Fig. 7E).

Discussion

This *in vivo* study represents the first attempt for investigating the impact of TP53INP1 deficiency upon skeletal muscle function and bioenergetics. The main findings are that TP53INP1 deficiency increases whole-body fat accumulation and adiposity but does not affect oxidative stress, lipid content, and mitochondrial pool in myocyte. However, oxidative ATP synthesis capacity and proton efflux are dramatically reduced in exercising TP53INP1-deficient muscle *in vivo*, whereas the fatigue resistance remains unchanged and the contractile force is paradoxically increased.

Our data show that TP53INP1 deficiency changes animal morphology. We found that the ratio between body weight and gastrocnemius muscle volume was larger in TP53INP1-deficient mice, which leads to assume that body composition is altered in these animals. We have performed *in vivo* whole-body MR imaging to test this assumption and found that body and abdominal fat contents were larger (+56% and +50%, respectively) in mouse lacking TP53INP1, which is in line with previous experiments showing that dissected gonadal fat is more abundant in this mouse model (Seillier *et al.*, 2015). Noteworthy, this increased fat content occurred without any concomitant change in lean mass, thereby causing an increased adiposity in mice lacking TP53INP1. Considering that increased adiposity favors the development of metabolic syndrome (Tchernof & Despres, 2013; Bhatti *et al.*, 2016), our results therefore support the view that TP53INP1 prevents metabolic syndrome development through the dampening of body fat accumulation (Seillier *et al.*, 2015). More specifically, it has been proposed on the basis of experiments in cultured immortalized mouse embryonic fibroblasts (MEFs) that this propensity to develop metabolic syndrome results from the accumulation of defective mitochondria leading to mitochondria-derived ROS increase and

massive intracellular lipid accretion in the absence of TP53INP1 (Cano *et al.*, 2009; N'Guessan *et al.*, 2011; Seillier *et al.*, 2015). On the contrary, we found that TP53INP1 deficiency did not affect PINK1/PARKIN mitophagy, expression of PGC-1 α mitochondria biogenesis factor and creatine kinase activity, which demonstrates that muscle mitochondrial pool and capacity were not changed. Also, we did not detect any difference between both phenotypes for intramyofiber lipid content and biomarkers of reactive oxygen species. Taken together, these data lead us to state that despite skeletal muscle is considered to play an important role in the development of metabolic syndrome, this tissue would not be involved in the ROS-drive obesity and insulin development induced by TP53INP1 deficiency.

Importantly, our *in vivo* ^{31}P -MRS measurements however evidenced that muscle mitochondrial capacity was dramatically impaired in TP53INP1-deficient mice under physiological condition. This impairment did not affect the basal bioenergetics status but strongly reduced the normalized oxidative ATP synthesis in exercising muscle, i.e., when energy demand is high. The origin of this oxidative defect has to be explain. We found that the time constant of PCr resynthesis after the 6-min fatiguing bout of exercise was increased in muscle lacking TP53INP1, which indicates (Lanza *et al.*, 2011; Prompers *et al.*, 2014) that the intrinsic mitochondrial capacity was reduced *in vivo*. It must be pointed that mitochondrial respiration is mainly stimulated *in vivo* by ADP throughout a feedback loop (Gyulai *et al.*, 1985; Kemp & Radda, 1994). However, we found that oxidative ATP production was reduced in TP53INP1-deficient mice whereas ADP accumulation did not differ between both groups. Then, it can be assumed that lack of TP53INP1 weakens the feedback control of ADP on mitochondrial respiration. In that, we found that VDAC1 content was increased in muscle lacking TP53INP1, in accordance with what was observed in cultured TP53INP1-deficient MEFs (Seillier *et al.*, 2015). VDAC1 has a key role in the regulation of mitochondrial bioenergetics, being involved in the transport of ADP across the mitochondrial outer membrane (Rostovtseva & Colombini, 1997; Anflous *et al.*, 2001). Therefore, increased VDAC1 content in TP53INP1-deficient mice can be interpreted as a compensatory mechanism for alleviating

the potent weakened feedback control of ADP. Besides, the ability of mitochondria to produce ATP critically depends on oxygen supply. Yet, we found that proton efflux from the muscle was 67% lower in TP53INP1-deficient mice, which indicates (Kemp *et al.*, 1995; Cea *et al.*, 2002) reduction in muscle blood flow. Such a reduction is consistent with previous studies showing that oxidative stress impairs the endothelial function via accelerated degradation of nitric oxide (Goodwill & Frisbee, 2012; Sena *et al.*, 2013). Blood flow reduction might limit oxygen and substrate delivery to the muscle, which in turn would reduce oxidative ATP synthesis during exercise.

Given the deleterious effect of TP53INP1 deficiency on oxidative capacity, one can wonder whether TP53INP1 deficiency impairs ATP regeneration in exercising muscle, thereby affecting muscle function. ATP is indeed critical for the contractile process because it is involved in myofilaments sliding and ion transport (including calcium reuptake by the sarcoplasmic reticulum). Additionally, skeletal muscle has a high potential for regenerating ATP during exercise to keep in pace with an energy demand that can increase by several orders of magnitude at the transition between rest and exercise (Wallimann *et al.*, 1992; Hochachka & McClelland, 1997; Sahlin *et al.*, 1998). In the present study, we have implemented an intensive exercise protocol to produce a global energetic stress. Despite this, we found that ATP level and energy load throughout the exercise were very similar in the two groups, which demonstrates that TP53INP1 deficiency did not compromise ATP homeostasis. We found that muscle fatigue resistance was not affected by TP53INP1 deficiency. On the other hand, we surprisingly observed that both the maximal contractile force and the total amount of force produced during the whole fatiguing exercise were larger (+13% and +17%, respectively) in TP53INP1-deficient mice. These data could not be linked to any typological change because we found that lack of TP53INP1 did not affect MHC distribution. Also, it must be kept in mind that muscle performance can be improved in exercising muscle in response to an increase in energy supply and/or calcium release from the sarcoplasmic reticulum (Allen *et al.*, 1997; Westerblad *et al.*, 1998). However, we found that gastrocnemius muscle content of

STIM1, the main regulator of Store Operated Calcium Entry (SOCE) in the skeletal muscle (Woo *et al.*, 2016), did not differ between TP53INP1-deficient and wild-type mice, thereby indicating that lack of TP53INP1 did not affect calcium reentry in sarcoplasmic reticulum. Further investigations are required to determinate the origin of the ergogenic effect associated to TP53INP1 deficiency.

In conclusion, this study provides data evidencing that TP53INP1 plays a role in muscle function and bioenergetics. TP53INP1 deficiency actually reduces the *in vivo* oxidative capacity in exercising muscle possibly as the consequence of abnormal mitochondrial respiration regulation and/or defective blood supply. Nevertheless, TP53INP1 deficiency does not affect oxidative stress level and mitochondrial pool in resting muscle, thereby indicating that this tissue is not involved in the development of metabolic syndrome previously reported in TP53INP1-deficient mice.

Additional information

Competing interests: The authors have no conflicts of interest, financial or otherwise, to declare.

Funding: The authors were supported by Aix-Marseille Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National du Cancer (INCa), Fondation ARC, Association pour le Développement des Recherches Biologiques et Médicales au Centre Hospitalier Régional de Marseille (ADEREM), and Association Française pour l'étude des Rhabdomyolyses et des Rhumatismes (AFPERR). CRMBM is a laboratory member of France Life Imaging (FLI) network (grant ANR-11-INBS-0006).

Author contributions:

Conception or design of the work: AC, BG, JSW and MBa; Acquisition, analysis or interpretation of data for the work: AC, BG, EP, JSW, MBA, MM and SL; Drafting the work or revising it critically for important intellectual content: AC, BG, DB, JWS, MBa and MBe.

All authors have approved the final version of the manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed above.

Acknowledgements:

We are grateful to Fabrice Gianardi and Gilles Warcollier for assistance with the use of the animal housing facility (Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle de Luminy, Marseille). We also thank Valérie Depraetere-Ferrier for editing the manuscript.

References

- Allen DG, Lannergren J & Westerblad H. (1997). The role of ATP in the regulation of intracellular Ca²⁺ release in single fibres of mouse skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* **498**, 587-600.
- Anflous K, Armstrong DD & Craigen WJ. (2001). Altered mitochondrial sensitivity for ADP and maintenance of creatine-stimulated respiration in oxidative striated muscles from VDAC1-deficient mice. *J Biol Chem* **276**, 1954-1960.
- Arnold DL, Bore PJ, Radda GK, Styles P & Taylor DJ. (1984). Excessive intracellular acidosis of skeletal muscle on exercise in a patient with a post-viral exhaustion/fatigue syndrome. A 31P nuclear magnetic resonance study. *Lancet* **1**, 1367-1369.
- Baumgartner BG, Orpinell M, Duran J, Ribas V, Burghardt HE, Bach D, Villar AV, Paz JC, Gonzalez M, Camps M, Oriola J, Rivera F, Palacin M & Zorzano A. (2007). Identification of a novel modulator of thyroid hormone receptor-mediated action. *PLoS One* **2**, e1183.
- Bhatti JS, Bhatti GK & Reddy PH. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta*.
- Boska M. (1991). Estimating the ATP cost of force production in the human gastrocnemius/soleus muscle group using 31P MRS and 1H MRI. *NMR Biomed* **4**, 173-181.
- Cano CE, Gommeaux J, Pietri S, Culcasi M, Garcia S, Seux M, Barelier S, Vasseur S, Spoto RP, Pebusque MJ, Duseti NJ, Iovanna JL & Carrier A. (2009). Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 is a major mediator of p53 antioxidant function. *Cancer Res* **69**, 219-226.
- Carrier A, Nguyen C, Victorero G, Granjeaud S, Rocha D, Bernard K, Miazek A, Ferrier P, Malissen M, Naquet P, Malissen B & Jordan BR. (1999). Differential gene expression in CD3epsilon- and

RAG1-deficient thymuses: definition of a set of genes potentially involved in thymocyte maturation. *Immunogenetics* **50**, 255-270.

Cea G, Bendahan D, Manners D, Hilton-Jones D, Lodi R, Styles P & Taylor DJ. (2002). Reduced oxidative phosphorylation and proton efflux suggest reduced capillary blood supply in skeletal muscle of patients with dermatomyositis and polymyositis: a quantitative ³¹P-magnetic resonance spectroscopy and MRI study. *Brain* **125**, 1635-1645.

Farvid MS, Ng TW, Chan DC, Barrett PH & Watts GF. (2005). Association of adiponectin and resistin with adipose tissue compartments, insulin resistance and dyslipidaemia. *Diabetes Obes Metab* **7**, 406-413.

Giannesini B, Vilmen C, Le Fur Y, Dalmaso C, Cozzone PJ & Bendahan D. (2010). A strictly noninvasive MR setup dedicated to longitudinal studies of mechanical performance, bioenergetics, anatomy, and muscle recruitment in contracting mouse skeletal muscle. *Magn Reson Med* **64**, 262-270.

Gommeaux J, Cano C, Garcia S, Gironella M, Pietri S, Culcasi M, Pebusque MJ, Malissen B, Dusetti N, Iovanna J & Carrier A. (2007). Colitis and colitis-associated cancer are exacerbated in mice deficient for tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *Mol Cell Biol* **27**, 2215-2228.

Goodwill AG & Frisbee JC. (2012). Oxidant stress and skeletal muscle microvasculopathy in the metabolic syndrome. *Vascul Pharmacol* **57**, 150-159.

Gyulai L, Roth Z, Leigh JS, Jr. & Chance B. (1985). Bioenergetic studies of mitochondrial oxidative phosphorylation using ³¹phosphorus NMR. *J Biol Chem* **260**, 3947-3954.

Ho YS, Xiong Y, Ma W, Spector A & Ho DS. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *J Biol Chem* **279**, 32804-32812.

Hochachka PW & McClelland GB. (1997). Cellular metabolic homeostasis during large-scale change in ATP turnover rates in muscles. *J Exp Biol* **200**, 381-386.

Kemp GJ, Ahmad RE, Nicolay K & Prompers JJ. (2015). Quantification of skeletal muscle mitochondrial function by ³¹P magnetic resonance spectroscopy techniques: a quantitative review. *Acta Physiol (Oxf)* **213**, 107-144.

Kemp GJ, Hands LJ, Ramaswami G, Taylor DJ, Nicolaidis A, Amato A & Radda GK. (1995). Calf muscle mitochondrial and glycogenolytic ATP synthesis in patients with claudication due to peripheral vascular disease analysed using ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Clin Sci (Lond)* **89**, 581-590.

Kemp GJ & Radda GK. (1994). Quantitative interpretation of bioenergetic data from ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopic studies of skeletal muscle: an analytical review. *Magn Reson Q* **10**, 43-63.

Lanza IR, Bhagra S, Nair KS & Port JD. (2011). Measurement of human skeletal muscle oxidative capacity by ³¹P-MR spectroscopy: a cross-validation with in vitro measurements. *J Magn Reson Imaging* **34**, 1143-1150.

Layec G, Bringard A, Le Fur Y, Vilmen C, Micallef JP, Perrey S, Cozzone PJ & Bendahan D. (2011). Comparative determination of energy production rates and mitochondrial function using different ³¹P MRS quantitative methods in sedentary and trained subjects. *NMR Biomed* **24**, 425-438.

Le Fur Y, Nicoli F, Guye M, Confort-Gouny S, Cozzone PJ & Kober F. (2010). Grid-free interactive and automated data processing for MR chemical shift imaging data. *Magma* **23**, 23-30.

Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira, II, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX & Finkel T. (2009). Bmi1

regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* **459**, 387-392.

Mattei JP, Fur YL, Cuge N, Guis S, Cozzone PJ & Bendahan D. (2006). Segmentation of fascias, fat and muscle from magnetic resonance images in humans: the DISPIMAG software. *Magma* **19**, 275-279.

Meyer RA, Sweeney HL & Kushmerick MJ. (1984). A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *Am J Physiol* **246**, C365-377.

Moopanar TR & Allen DG. (2005). Reactive oxygen species reduce myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in fatiguing mouse skeletal muscle at 37 degrees C. *J Physiol* **564**, 189-199.

N'Guessan P, Pouyet L, Gosset G, Hamlaoui S, Seillier M, Cano CE, Seux M, Stocker P, Culcasi M, Iovanna JL, Dusetti NJ, Pietri S & Carrier A. (2011). Absence of tumor suppressor tumor protein 53-induced nuclear protein 1 (TP53INP1) sensitizes mouse thymocytes and embryonic fibroblasts to redox-driven apoptosis. *Antioxid Redox Signal* **15**, 1639-1653.

Prompers JJ, Wessels B, Kemp GJ & Nicolay K. (2014). MITOCHONDRIA: investigation of in vivo muscle mitochondrial function by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Int J Biochem Cell Biol* **50**, 67-72.

Reid MB, Stokic DS, Koch SM, Khawli FA & Leis AA. (1994). N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J Clin Invest* **94**, 2468-2474.

Rostovtseva T & Colombini M. (1997). VDAC channels mediate and gate the flow of ATP: implications for the regulation of mitochondrial function. *Biophys J* **72**, 1954-1962.

- Roth K & Weiner MW. (1991). Determination of cytosolic ADP and AMP concentrations and the free energy of ATP hydrolysis in human muscle and brain tissues with ^{31}P NMR spectroscopy. *Magn Reson Med* **22**, 505-511.
- Saadi H, Seillier M & Carrier A. (2015). The stress protein TP53INP1 plays a tumor suppressive role by regulating metabolic homeostasis. *Biochimie* **118**, 44-50.
- Sahlin K, Tonkonogi M & Soderlund K. (1998). Energy supply and muscle fatigue in humans. *Acta Physiol Scand* **162**, 261-266.
- Seillier M, Peugot S, Gayet O, Gauthier C, N'Guessan P, Monte M, Carrier A, Iovanna JL & Dusetti NJ. (2012). TP53INP1, a tumor suppressor, interacts with LC3 and ATG8-family proteins through the LC3-interacting region (LIR) and promotes autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ* **19**, 1525-1535.
- Seillier M, Pouyet L, N'Guessan P, Nollet M, Capo F, Guillaumond F, Peyta L, Dumas JF, Varrault A, Bertrand G, Bonnafous S, Tran A, Meur G, Marchetti P, Ravier MA, Dalle S, Gual P, Muller D, Rutter GA, Servais S, Iovanna JL & Carrier A. (2015). Defects in mitophagy promote redox-driven metabolic syndrome in the absence of TP53INP1. *EMBO Mol Med* **7**, 802-818.
- Sena CM, Pereira AM & Seica R. (2013). Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 2216-2231.
- Supinski G, Nethery D, Stofan D & DiMarco A. (1997). Effect of free radical scavengers on diaphragmatic fatigue. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 622-629.
- Tchernof A & Despres JP. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev* **93**, 359-404.

Tomasini R, Samir AA, Pebusque MJ, Calvo EL, Totaro S, Dagorn JC, Dusetti NJ & Iovanna JL. (2002). P53-dependent expression of the stress-induced protein (SIP). *Eur J Cell Biol* **81**, 294-301.

Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn JC, Pebusque MJ, Iovanna JL & Dusetti NJ. (2005). TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. *Oncogene* **24**, 8093-8104.

Trenell MI, Sue CM, Kemp GJ, Sachinwalla T & Thompson CH. (2006). Aerobic exercise and muscle metabolism in patients with mitochondrial myopathy. *Muscle Nerve* **33**, 524-531.

Vanhamme L, van den Boogaart A & Van Huffel S. (1997). Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J Magn Reson* **129**, 35-43.

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K & Eppenberger HM. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* **281**, 21-40.

Westerblad H, Allen DG, Bruton JD, Andrade FH & Lannergren J. (1998). Mechanisms underlying the reduction of isometric force in skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol Scand* **162**, 253-260.

Woo JS, Srikanth S, Nishi M, Ping PP, Takeshima H & Gwack Y. (2016). Junctophilin-4, a component of the endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions, regulates Ca²⁺ dynamics in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 2762-2767.

Zolfaghari PS, Carre JE, Parker N, Curtin NA, Duchon MR & Singer M. (2015). Skeletal muscle dysfunction is associated with derangements in mitochondrial bioenergetics (but not UCP3) in a rodent model of sepsis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **308**, E713-725.

Table 1Gastrocnemius muscle bioenergetics assessed in vivo using ³¹P-MR spectroscopy.

	Tp53inp1 ^{+/+}	Tp53inp1 ^{-/-}
Basal		
[PCr], mM	10.8 ± 0.6	11.1 ± 0.3
[ATP], mM	4.3 ± 0.4	4.8 ± 0.3
[ADP], μM	4.8 ± 0.3	5.4 ± 0.4
pH	7.02 ± 0.03	7.02 ± 0.02
Onset of the exercise		
Initial rate of PCr consumption, mM/min	7.1 ± 0.9	6.7 ± 1.1
End of the exercise		
Δ[PCr] (relative to basal), mM	7.0 ± 0.5	6.7 ± 0.3
Δ[ATP] (relative to basal), mM	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.3
[ADP], μM	26 ± 3	22 ± 3
ΔpH (relative to basal), pH unit	0.33 ± 0.03	0.36 ± 0.04

Data are means ± SEM (Tp53inp1^{+/+}, n = 10; Tp53inp1^{-/-}, n = 11).

Figures and figure legends

Commenté [BM2]: Sur ma version on voit pas les barres des graphiques !

Figure 1

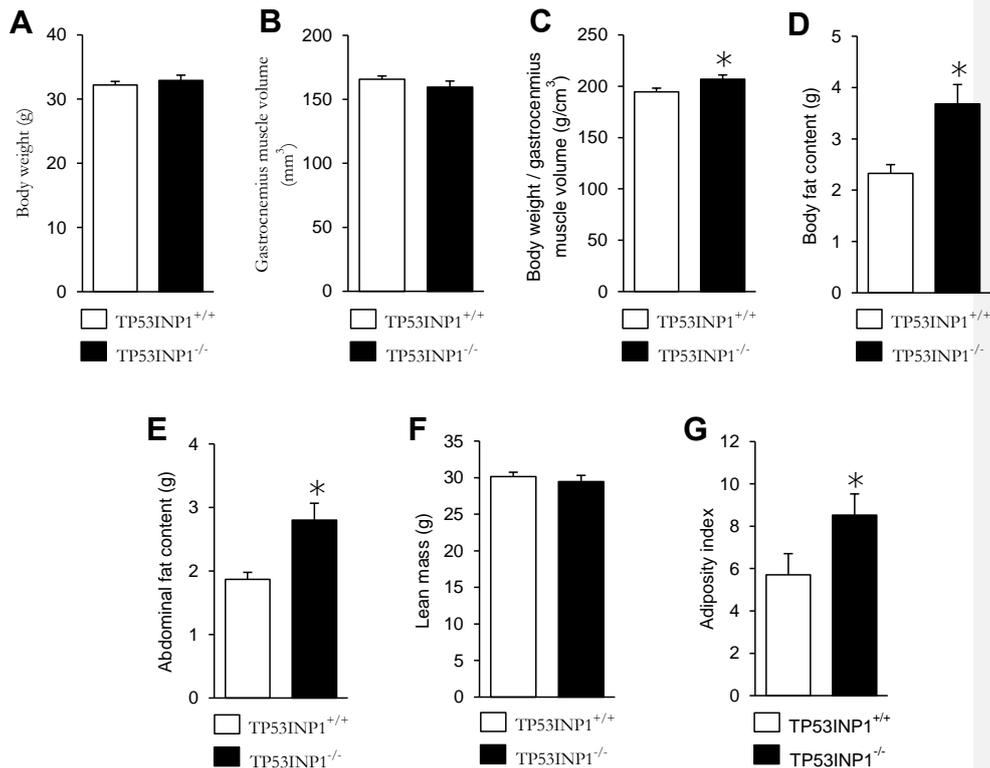


Figure 1. Morphological characteristics. Body weight (A), gastrocnemius muscle volume (B), ratio between body weight and gastrocnemius muscle volume (C), body (D) and abdominal (E) fat contents, lean mass (F), and adiposity index (G). Data are means ± SEM (Tp53inp1^{+/+}, *n* = 10; Tp53inp1^{-/-}, *n* = 11). * Significantly different from Tp53inp1^{+/+}.

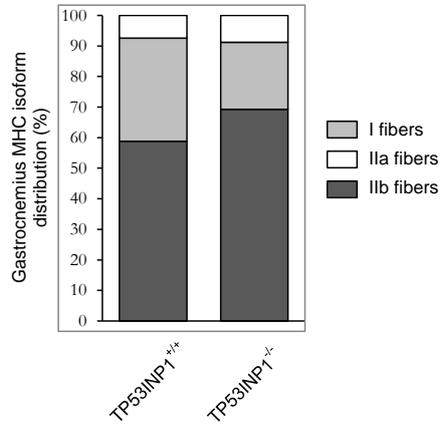


Figure 2. Gastrocnemius muscle typology. Relative distribution of MHC isoform proteins (Tp53inp1^{+/+}, *n* = 8; Tp53inp1^{-/-}, *n* = 10).

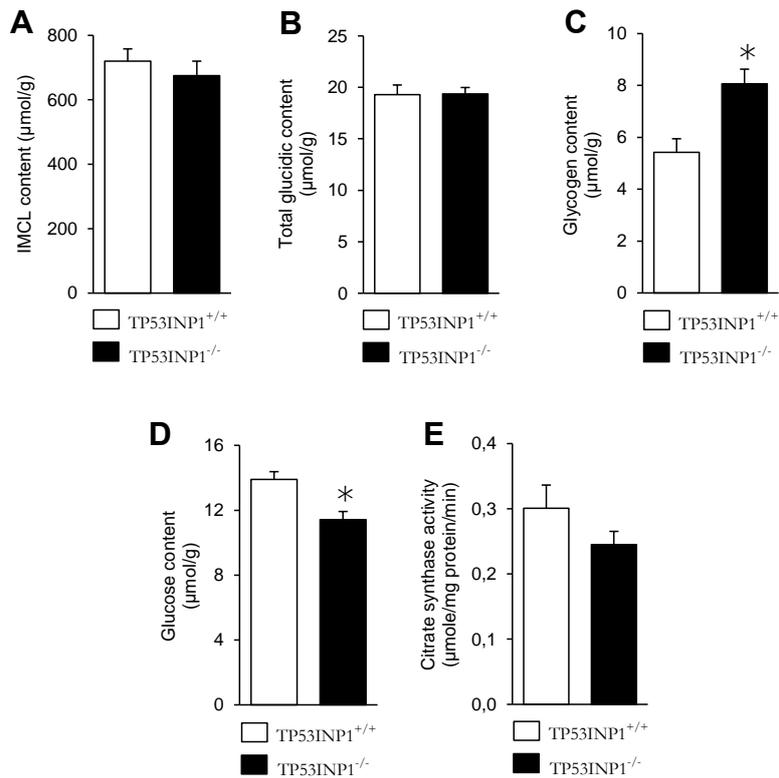


Figure 3. In vitro determination of metabolic contents and citrate synthase activity. IMCL (A), total glucidic (B), glycogen (C) and glucose (D) contents, and citrate synthase activity (E). Data are means \pm SEM (Tp53inp1^{+/+}, *n* = 10; Tp53inp1^{-/-}, *n* = 11).
* Significantly different from Tp53inp1^{+/+}.

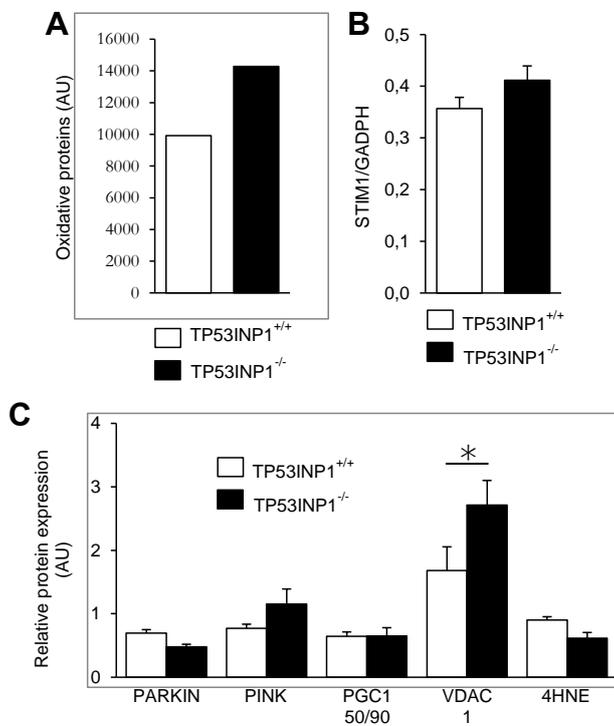


Figure 4. Protein content and oxidation. Oxidative protein (A; *n* = 6 for both groups). STIM1 (B), and PARKIN, PINK1, PGC-1 α , VDAC1 and 4HNE (C) contents (Tp53inp1^{+/+}, *n* = 8; Tp53inp1^{-/-}, *n* = 10). Data are means \pm SEM. * Significantly different from Tp53inp1^{+/+}.

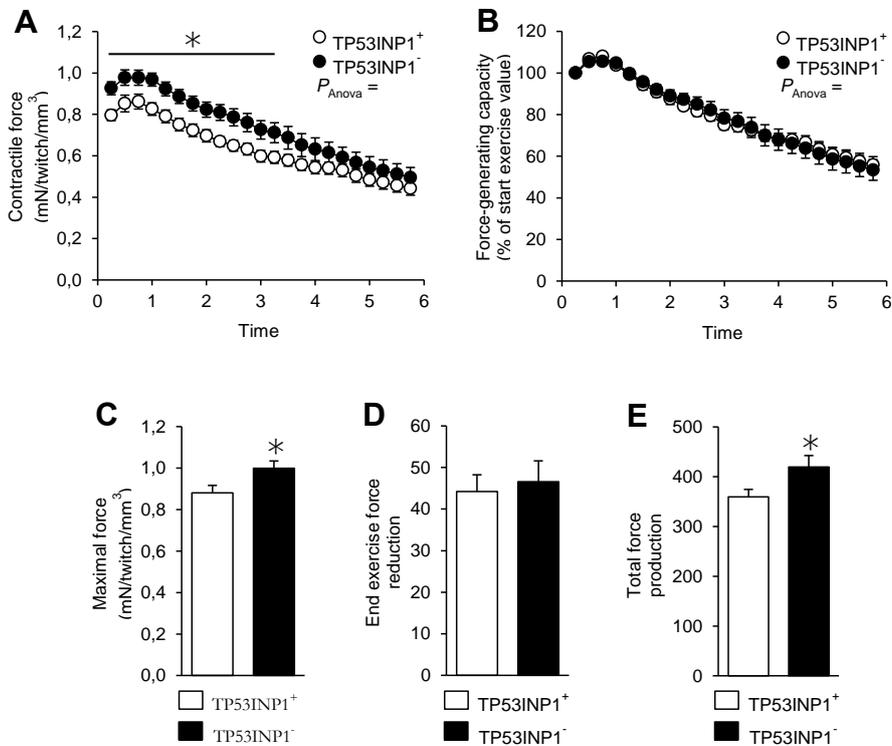


Figure 5. Gastrocnemius muscle mechanical performance. Time courses of force production (A) and force-generating capacity (B) were measured in vivo throughout the 6-min fatiguing bout of exercise performed simultaneously to the dynamic ³¹P-MRS acquisition. Maximal contractile force produced during the whole exercise (C), extent of force reduction measured at the exercise end (D) and total amount of force production during the whole exercise (E). For the panels A and B, P_{ANOVA} indicates the overall result of the two-way repeated measures ANOVA, and Tukey post-hoc multiple comparisons were used to determine pairwise time-points differences. Data are means \pm SEM (Tp53inp1^{+/+}, $n = 10$; Tp53inp1^{-/-}, $n = 11$). * Significantly different from Tp53inp1^{+/+}.

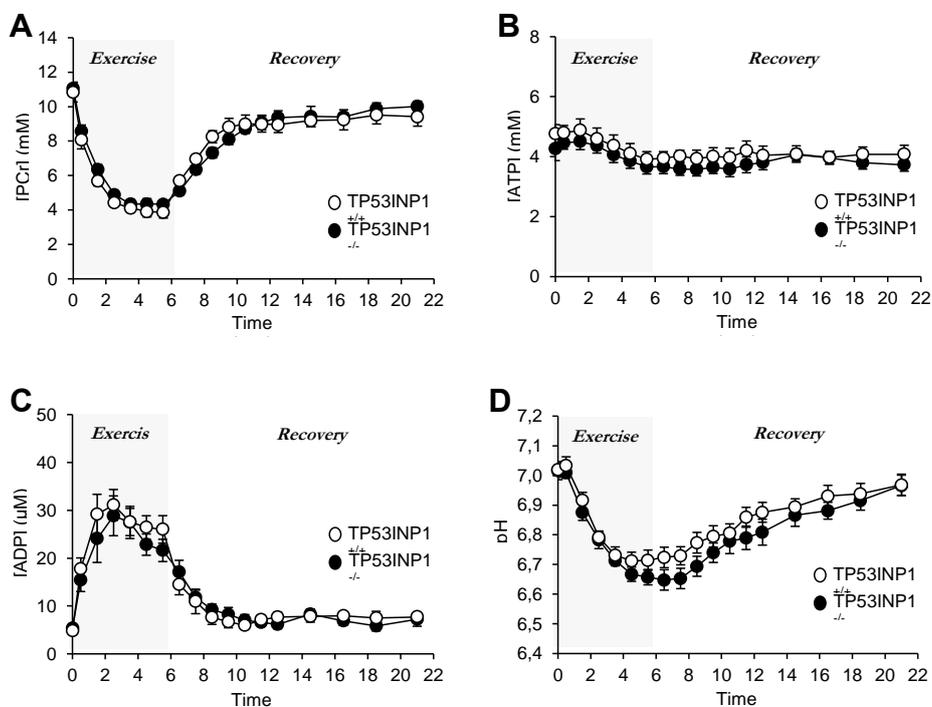


Figure 6. Noninvasive investigation of gastrocnemius muscle bioenergetics using dynamic ³¹P-MRS. Changes in [PCr] (A), [ATP] (B), [ADP] (C) and pH (D) were measured throughout the 6-min fatiguing bout of exercise and the 15-min postexercise recovery period. For each panel, the first time-point (t = 0) indicates the basal value. Data are means ± SEM (Tp53inp1^{+/+}, n = 10; Tp53inp1^{-/-}, n = 11).

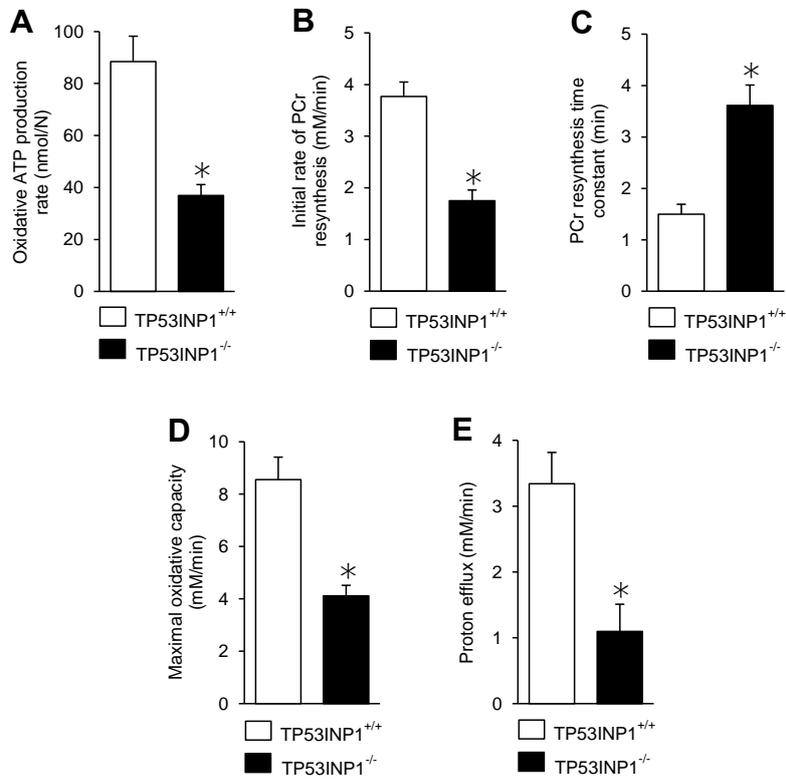


Figure 7. Gastrocnemius muscle oxidative function and proton efflux. Oxidative ATP production at the end of the 6-min fatiguing bout of exercise (A), initial rate (B) and time-constant (C) of PCr resynthesis at the start of the postexercise recovery period, maximal oxidative capacity (D) and proton efflux (E). Data are means ± SEM (Tp53inp1^{+/+}, n = 10; Tp53inp1^{-/-}, n = 11). * Significantly different from Tp53inp1^{+/+}.