

AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 29 novembre 2016

Par Madame Eugénie DIONNET

**EXPLORATION DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ MUTATIONNELLE ET DE SES
CONSÉQUENCES PATHOLOGIQUES DANS LES MYOPATHIES : ANALYSES DES
MÉCANISMES ET DÉVELOPPEMENT D'OUTILS THÉRAPEUTIQUES**

Pour obtenir le grade de DOCTEUR d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

Mention : Pathologie Humaine
Spécialité : Génétique humaine

Membres du Jury de la Thèse :

Monsieur le Professeur Patrice ROLL	Président du jury
Madame le Docteur Isabelle MARTY	Rapporteur
Monsieur le Professeur François Jérôme AUTHIER	Rapporteur
Madame le Docteur Karine CHARTON	Examinatrice
Madame le Docteur Capucine TROLLET	Examinatrice
Monsieur le Docteur Marc BARTOLI	Directeur de Thèse

A mes parents

« On ne va jamais si loin que lorsque l'on ne sait pas où l'on va. »

Antoine de Rivarol (1753-1801)

Remerciements

Me voilà arrivée aujourd'hui au bout de cette longue et enrichissante aventure qu'est la thèse. Que d'émotions et de moments importants traversés... Si j'en suis arrivée là aujourd'hui c'est pour beaucoup grâce à l'aide, aux conseils et au soutien de nombreuses personnes que je souhaite tout particulièrement remercier aujourd'hui.

En premier lieu, je souhaite adresser mes plus vifs remerciements à l'ensemble des patients qui accepte chaque jour de s'investir dans la recherche scientifique. Sans eux, ce travail n'aurait jamais vu le jour. Je suis également reconnaissante envers le Professeur Nicolas Lévy qui m'a permis d'intégrer son laboratoire de recherche il y a maintenant 6 ans.

Je tiens à remercier les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail de recherche. Merci au Professeur Patrice Roll d'avoir accepté de présider le jury, au Docteur Isabelle Marty et au Professeur François-Jérôme Authier pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, leur relecture, leurs conseils et leurs commentaires en tant que rapporteurs. Merci également aux Docteurs Karine Charton et Capucine Trollet d'avoir examiné mon manuscrit et pour leur investissement dans ce travail.

Comment revenir sur toutes ces années passées au labo sans automatiquement penser à l'équipe formidable, quasiment née en même temps que ma thèse, dont j'ai eu la chance de faire partie : « My(c)ologie Translationnelle ». Et avec elle bien sûr, mon cher directeur de thèse, Marc Bartoli. Merci mille fois, Marc, pour tout ce que tu m'as apporté : ton soutien, tes idées, ta disponibilité constante, tes corrections instantanées, ton enthousiasme, ta compréhension, ta patience et tes encouragements. Merci pour ta passion contagieuse de la recherche et de la biologie que tu sais si bien partager avec ton équipe. Elle transparait à travers chaque conversation scientifique que l'on peut avoir avec toi. C'est un formidable stimulant sur lequel je me suis beaucoup appuyé dans les moments de doute. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur de nombreux sujets passionnants et de m'avoir laissé en favoriser certains ☺. Ces six années de formations à tes côtés m'ont notamment appris à étayer mon raisonnement scientifique et à parfaire mon esprit critique. Puisque bientôt je ne t'appellerai plus chef, j'espère très prochainement pouvoir t'appeler « Monsieur le Directeur » !

La seconde personne qui me vient tout aussi vite à l'esprit est Francesca Puppo. Francesca, toi aussi tu as énormément contribué à ce que j'en arrive là aujourd'hui. Merci, merci de m'avoir tant aidée, de m'avoir portée et supportée (!) pendant mon master 2 et mes années de thèse. Je suis extrêmement fière d'avoir co-signé ma première publication scientifique avec toi! J'ai beaucoup appris à tes côtés, aussi bien au niveau scientifique qu'humain. Merci aussi de m'avoir accueillie tant de fois et si gentiment sous ton toit. S'il te plaît, remercie aussi Frida de ma part et dit lui que je ne manquerai pas l'occasion de lui rapporter des croûtes de fromages dès qu'elle se présentera ;-). Tu es devenue une véritable amie et je compte bien te rendre la pareille en te recevant à mon tour chez moi à Grenoble pour te faire découvrir ma belle région, le Vercors et mes chères montagnes.

Je ne peux pas m'empêcher de conclure avec quelques mots dans ma langue favorite : Cara Francesca, grazie mille per tutto, sei veramente una persona brava, in bocca al lupo per i tuoi progetti futuri, sia personali che professionali.

Je n'oublie pas bien entendu l'autre pilier de l'équipe, Martin Krahn. Tu ne te souviens peut-être pas, Martin, de la première répétition d'oral de master 1 que j'ai faite à l'équipe en 2011... Je m'étais laissée submerger par le stress pendant ma présentation et à la fin des dix minutes, j'étais catastrophée par ma prestation... A ce moment-là, tu as su trouver les mots justes pour me rassurer, me donner des conseils pour me remettre à flot et me permettre de me relancer. J'en garde un souvenir ému, merci beaucoup ! Merci aussi pour les cafés et les bons moments partagés à parler musique et concert, Mark Knopfler et ACDC notamment. Nous aurons désormais un autre point commun, une soutenance quasiment au même moment : toi, ton HDR le 28 novembre et moi ma thèse le 29 !

Je pense aussi bien évidemment à mes deux autres voisins de bureau qui m'ont accueillie à leurs côtés les bras ouverts, lors de ma dernière année de thèse : Marie Chapoton et Sébastien Courrier.

Merci Marie pour ton aide précieuse au labo sur les manips, ton soutien sans faille et ta bonne humeur (mais non, tu ne ronchannes pas tout le temps ☺). Merci à toi, la reine de la récup' et de la débrouille, pour la déco florale du bureau et les paris qui vont avec. Ravie d'avoir révolutionné ton moyen de transport de nourriture du midi ! Merci de ton amitié, de m'avoir fait sortir de chez moi pour découvrir de beaux endroits à Marseille, pour les belles soirées et personnes que tu m'as présentées. Je compte sur toi pour venir me voir avec Francesca ! Bon courage pour la suite, j'espère que le vent te mènera où tu le souhaites et que tu pourras réaliser une bonne partie des millions de projets que tu as dans la tête.

Merci Seb pour tes coups de main en manip, tes nombreux conseils et explications sur les Western blot, IP, microscope ou image J, pour les bons gâteaux et ta divine galette des rois... J'ai bien envie de venir faire un tour en réunion au mois de janvier prochain... ! Bien que les occasions n'aient pas été aussi fréquentes que je l'aurai aimé, j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi, notamment sur ces maudites AB320... Merci pour ta gentillesse, ton écoute attentive, tes encouragements et ton amitié. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir dans ton beau métier (tu sais ce que j'en pense ☺) et dans ta vie personnelle au côté de ta très jolie famille.

Je tiens également à remercier les dernières recrues de l'équipe, Nathalie Da Silva, Julie Soulié et Aurélia Defour.

Miss Nat, je suis vraiment très contente pour toi que tu aies pu revenir comme tu le souhaitais, travailler à l'U910. Je suis encore plus contente pour l'équipe que ce soit chez nous que tu aies posé tes pipettes ! Ta bonne humeur, ta joie de vivre et ta motivation constante se marient à merveille avec l'équipe. Le volume sonore de ton rire aussi d'ailleurs ;-) Un grand et chaleureux merci pour ton aide sur les manips et ton acharnement sur le pCAS2 que tu as fini par dompter ! Merci pour tes paroles stimulantes et réconfortantes mais aussi ta fraîcheur et ta spontanéité, j'adore !

Julie, je te laisse la place de « prochaine thésarde de l'équipe à passer sur le grill » ! Tu as un peu de temps mais méfie-toi, ça vient beaucoup plus vite qu'on le pense ! Bon courage pour la fin de ta thèse, j'espère que tu réussiras à mener à bien ton projet de collab' avec le Japon. Merci de m'avoir proposé ton aide à de nombreuses reprises, aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

Merci Aurélia d'avoir tenté de si nombreuses fois de me rassurer et de me faire dédramatiser sur l'échéance tout proche de la thèse... Je garde tes conseils pour la culture cell dans un coin de ma tête pour m'en resservir plus tard.

Bonne continuation les filles !

Je tiens également à remercier les autres membres de la branche médicale de l'équipe, Svetlana Gorokhova, Mathieu Cerino et André Maues de Paula. Merci Svet pour ton aide sur de nombreux logiciels de bio-informatiques, Mathieu pour mes premiers pas sur Vraft et pour les fameuses discussions interminables, qui font ta renommée, que nous avons eues à de nombreuses reprises ;-). Merci André « Mousse de peau » pour toutes tes anecdotes et ta collection de blagues qui ont animé plus d'une soirée d'équipe ! Entre ta soutenance et la mienne, Stim1 va être à l'honneur ces prochaines semaines. Bon courage pour ton grand oral le 9 décembre.

Parce que mon équipe est aussi faite de ceux qui y ont passés quelques mois/années et sont aujourd'hui partis voler de leurs propres ailes, je veux aussi remercier Florian Barthélémy, Amandine Sévy, Virginie Kergourlay, Jean-Philippe Simon et Nicolas Wein.

Merci Flo de m'avoir encadrée pendant mon premier stage dans l'équipe en master 1, quand j'étais toute débutante en manip. Cette première approche avec le monde des pipettes et des ferlines m'avait émerveillée, quel bon souvenir !

Merci chère Amandine, pour ta gentillesse, ton amitié et tous les bons moments passés ensemble. Ces dernières années ont été bien remplies pour toi et j'ai été contente d'y assister. Encore félicitations pour tes deux « minots », bonne fin d'assistantat et rendez-vous à Grenoble ou dans la belle maison de la Montagne une fois la page Marseille tournée ☺

Merci Jean-Philippe pour ta bonne humeur au labo et les bons vins que tu nous as fait goûter lors des soirées d'équipe. Félicitations car j'ai ouïe dire que ta famille allait bientôt s'agrandir. Bon vent chez mes voisins suisses !

Merci Virginie pour tous les chocolats, les encouragements pour la thèse et les bons moments passés. Bravo pour ton adaptation au froid polaire de Cold Spring. Tu vois en fait, je te préparais à tes futures conditions climatiques quand j'ouvrais la fenêtre du bureau en hiver ;-)

Nico, tu ne dois pas t'en souvenir mais tu es le premier à m'avoir fait découvrir le Western blot. Merci pour ces premières manips, tes conseils et pour la bonne soirée partagée à Brighton l'année dernière.

Je souhaite également remercier vivement mes collaborateurs sur le projet STIM1, François Devred, Philip Tsvetkov et Andreï Roman, membres de l'équipe « *Redox Microenvironment, Cytoskeleton and tumor progression* ». Merci François d'avoir toujours répondu présent les nombreuses fois où je t'ai sollicité et pris le temps de m'expliquer les bases de la micro-calorimétrie alors que toi aussi, tu préparais ton HDR.

Je pense bien sûr à ma seconde équipe de cœur du labo, celle de Frédérique Magdinier et toute sa bande de joyeux drilles, encore présents ou partis, en particulier : Marie-Cécile Gaillard, Natacha Broucqsault, Camille Dion et Stéphane Roche.

Merci Docteur Cake pour toutes ces années de belle amitié marseillaise. A mon tour de partager mes souvenirs de notre rencontre, le premier jour de rentrée du master 1. « Ah, tu t'appelles Marie-Cécile, comme dans le père Noël est une ordure ? » Je me souviens m'être dit après une telle réflexion qu'il y avait alors deux possibilités : « Bon, soit on devient les meilleures amies, soit elle me déteste à jamais ». Je suis contente que tu n'aies pas choisi l'option 2 ! Quelle joie et quelle chance de t'avoir toujours eu à mes côtés pendant 5 ans. Merci pour ton soutien sans faille au labo comme dans la vie, ta porte toujours ouverte et ton accueil chaleureux, pour toutes les fois où tu as répondu présente pour partir en vadrouille avec moi. Je pense tout particulièrement aux missions Moana et fond d'Urle ou bien sûr à ce formidable weekend où l'on a vogué sur les eaux claires du lac. On a grandi scientifiquement ensemble et je dois dire que tu m'as impressionnée ! Je t'ai vu t'épanouir, progresser à une vitesse folle et devenir une grande scientifique pleine de potentiel. Chapeau gamine ! Tu vas tout déchirer aux States, j'en suis sûre !

Un très grand merci à toi aussi chère Natacha, éminent membre, avec MT de la bande des PDB. Merci pour tes conseils avisés et tes encouragements pendant tout mon parcours à Marseille. Je me rappelle aussi très bien notre rencontre sur le patio du 4^{ème}, autour d'une histoire de stagiaire qui laisse trainer ses cheveux dans une cuve de BET (petite pensée pour Françoise... ;-)). Un bon moment de rigolade ! Pour moi, tu as été une grande sœur au labo, distillant les bons conseils et toujours prête à aider en cas de problème. Merci aussi pour tous les « en dehors du labo », ta gentillesse, tes étincelles, ton amitié, et toutes les supers soirées passées sur ta terrasse à la grande époque. Tu es pour moi un modèle de courage et de détermination quand je vois comment tu as réussi à supporter tes années à Nice et notamment les aléas quotidiens de la SNCF... Respect vraiment ! Je finirai par te remercier de m'avoir permis de trouver un réconfort canin à Marseille ! Merci à Edora de m'avoir laissée l'approcher.

Merci à toi, Camille, chère cousine éloignée (c'est sûre je te dis, avec un nom pareil !) de m'avoir si souvent accueillie chez toi ces derniers mois. En toi aussi, j'ai trouvé une amie et qui plus est, une amie avec qui je partage une passion commune : l'Italie. La prochaine fois, on part ensemble c'est obligé ! Bon courage pour ta dernière année, vient me rendre visite à Grenoble et rendez-vous en 2017 pour ta soutenance !

Parce que, j'en suis convaincue, les gens bien travaillent avec des gens bien, j'ai une pensée particulière pour votre chef les filles. Frédérique, merci pour tes paroles attentionnées, ton temps et ton aide lors de la préparation de mes oraux. Merci aussi de m'avoir toujours fait une place dans un coin de ton bureau pour que je vienne voir mes copines ou déposer ma valise.

Enfin, merci Stéphane de m'avoir toujours accueillie comme une entité à part entière de votre équipe afin que je puisse taper sans scrupule dans tes stocks inépuisables de bonbons !

Je tiens également à remercier mes autres potes thésards ou ex-thésards des diverses équipes du labo.

Je pense notamment à Clothilde Estève, Ghadi Rai, Arnaud Blanchard, Sitraka Rabarimeriarijaona, Alexandre Del Vecchio et Yann Ehinger.

Merci Clo, Arnaud et Ghadi, les trois membres permanents de la team « soutien-fiesta ». Merci Clo pour tous les délires partagés au labo (qu'on ne citera pas plus en détails !) et en dehors, d'avoir été là lorsque je me suis retrouvée transformée en meringue, ou encore à mes côtés lors de la session chez Yvette... Merci de partager avec moi ma lubie papeterie, je me sens moins seule !

Merci Arnaud pour toutes les soirées partagées, les bons dîners et les bons vins ainsi que les franches rigolades. Je garde un souvenir ému de ta rencontre avec un certain fromage corse un soir de 2013... inoubliable !

Merci Ghadi, cher compatriote, pour ta disponibilité constante et toute l'aide que tu m'as apportée quand j'avais des questions sur HSF. Toi aussi tu fais maintenant parti des nombreuses bonnes âmes qui m'ont accueillie sous leur toit. Merci pour ça et pour ton amitié cher coloc', je suis ravie qu'on partage notre dernier mois en tant que thésard. Je penserai bien à toi pendant les dix jours qui séparent ta thèse de la mienne !

Merci au frangin du labo, cher Sitrak', pour ta bonne humeur constante, ta sympathie et ta musique chaleureuse. Félicitations pour ta nouvelle famille !

Merci Alex pour les apéro/bières partagés ensemble et les regrettées soirées/belotes avec les filles.

Merci Yann pour les bons moments partagés autour de la machine à café et pour la soirée d'athlé avec Christophe et Renaud.

Je souhaite également remercier chaleureusement les nombreuses personnes qui font tourner le labo et sans qui l'unité serait beaucoup moins accueillante. Je pense particulièrement à Christel Castro, Nathalie Trevisiol, Françoise Merono, Christiane Bouquet, Christophe Scajola, Evelyne Bes, Rodolphe Moreau, Frédéric Naudon et Evelyne Valentin.

Merci Crickette pour tous les petits trucs et astuces que tu m'as appris au cours de ces années, les concerts privés dans le labo, mais aussi ta douceur et ta bonne humeur constante. Félicitations pour ton fils sublime et ton prochain bébé qui c'est obligé, sera tout aussi parfait 😊.

Merci Nathalie de m'avoir transmis un peu de ta science de la bactério, et pour toutes les fois où tu m'as permis de retrouver mes montagnes en partageant avec moi les magnifiques photos de Saint-Gervais envoyées par ta copine. Je te souhaite de tout cœur le plus prompt rétablissement. Reviens vite, tu manques à tous !

Qui dit montagne dit Haute-Savoie et qui dit Haute-Savoie dit Françoise ! Merci Françoise pour ton soutien logistique au labo durant toutes ces années mais aussi ta gentillesse, tes bons plans loc' à Argentière et ta recette de gâteau de Savoie. Ravie d'avoir pu partager les grands moments des JO d'hiver avec toi !

Merci Christiane et Christophe pour votre sympathie et votre bonne humeur constante. Christiane, merci pour ta gentillesse, ton soutien et d'avoir ressuscité les orchidées ! Ya pas à dire, tu as la main verte, tu portes bien ton nom !

Merci au « big four » du secrétariat et tout particulièrement à Evelyne B. et Rodolphe pour votre disponibilité toutes les fois où vous m'avez aidée en un rien de temps.

J'ai également une grande pensée pour les deux Danielle du labo, aujourd'hui à la retraite, Danielle Depetris et Danielle Bisogno. Merci pour votre aide, que ce soit pour mes premiers pas en culture cellulaire ou pour la paperasse administrative pendant mon M2.

Finalement, merci à tous les membres de l'unité, présents et passés, pour les bons moments partagés pendant ces 6 années.

Je pense aussi au professeur Joël Lunardi, à qui j'adresse mes sincères remerciements pour m'avoir reçue en entretien à plusieurs reprises et guidée dans mes choix lorsque j'étais en première année de médecine ou en dernière année de licence de biologie.

Merci à toute l'équipe Valoridoc de Grenoble pour la formation passionnante qu'ils m'ont dispensée l'année dernière. Mes remerciements s'adressent plus particulièrement à Philippe Chinkirch, Marc de Zélicourt et Patrick Malaureille.

Merci à la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) d'avoir financé l'intégralité de ma dernière année de doctorat.

Je tiens également à remercier mes alliés du rail, ceux qui m'ont accompagnée et soutenue ces deux dernières années pendant mes trajets quotidiens entre Romans et Marseille : Sabrina Kantane, Julien San José et Christophe Chenu. Pendant ces deux ans, on a parcouru ensemble près de 220000 km en TGV soit l'équivalent de cinq fois et demie le tour de la terre, pas mal non ?

Merci Sabrina, mon amie romanaise, pour ta réactivité flash-éclair quand je devais passer une commande chez life et de m'avoir tant gâtée dans le train et lors de mes derniers jours à Romans. Merci également de ton soutien et pour toutes les fois où nous avons pris la route ensemble, j'en garderai de très bons souvenirs. J'espère que toi aussi, tu pourras bientôt arrêter de faire ces fichus allers-retours.

Merci Julien, plus connu dans mon entourage sous le surnom de « mon pote du train », pour tous les bons moments partagés debout devant la porte de la voiture 8 et les diverses conversations, notamment sur le pont du Gard, autour d'un jus de pomme et croissant dans la voiture bar. Voyager à tes côtés fut un plaisir qui m'a beaucoup manqué les derniers mois.

Enfin, merci Christophe de ton soutien lors de ma rébellion SNCF.

Je n'oublie pas ceux que j'élirai, en tête et de loin, comme la meilleure équipe de restaurateurs de France et de Navarre, qui s'est chargée de me remonter le moral à coup de tartares et autres délices culinaires : Julie et Olivier Vastel. Merci les amis pour tous les jeudis et vendredi soir passés au « 5 chevalier » et les bons moments partagés en Toscane avec les filles.

Merci aussi à Jean-Christophe Bertin pour ton amitié, la programmation musicale du resto et la soirée téléthon 2015.

Merci à l'équipe Semtech de Grenoble, pour leur accueil chaleureux dans leur locaux climatisés cet été.

Et parce que la thèse ça se répercute à tous les niveaux, je tiens à remercier mes amis les plus chers pour leur soutien indéfectible pendant toutes ces années. Merci à Zez et Audrey, Ben et Lara, Ju et Yannou, Nico et Marie, Fred et Danielle, David et Cindy.

Je finirai par remercier ma famille, celle de toujours et la nouvelle, ceux qui ont toujours répondu présents dans les bons comme les mauvais moments.

Merci Annie, Dan et Betty pour votre accueil chaleureux à Nice et toutes les petites attentions.

Merci à ma grande famille adorée, mes oncles/tantes et cousins/cousines pour vos encouragements.

Merci Mamath, ma sœur chérie pour tous tes coups de mains et ton soutien sans faille.

Je n'en serai pas arrivée là aujourd'hui sans mes fabuleux parents qui ont toujours cru en moi malgré mon long et sinueux parcours. Il n'y a pas de mots assez forts pour vous dire à quel point votre soutien a été précieux. Si j'en suis arrivée là aujourd'hui, c'est grâce à vous alors merci, merci et mille fois merci.

Enfin, merci à toi Matthieu de m'avoir accompagnée soutenue et portée sans relâche à chaque étape de cette thèse. Merci pour ton amour, ta patience et ta compréhension. Je crois que nous garderons tous les deux un merveilleux souvenir de cette période de doctorat, un certain 17 mai 2014...

Sommaire

Remerciements	9
Introduction.....	23
I. Le muscle.....	23
1. Généralités	23
1.1. Le tissu musculaire lisse	23
1.2. Le tissu musculaire strié.....	24
2. Le muscle squelettique	25
2.1. Myogenèse et développement.....	25
3. Structure et organisation cellulaire du muscle.....	31
3.1. Les motoneurones.....	31
3.2. L'appareil contractile	33
3.3. Les faisceaux et enveloppes externes du muscle.....	59
4. Fonctionnement du muscle.....	61
4.1. Jonction neuromusculaire et membrane postsynaptique	61
4.2. Propagation du potentiel d'action et couplage excitation-contraction	62
4.3. Rôle du Calcium.....	62
4.4. Les canaux mis en jeu au cours de la contraction musculaire	63
4.5. Les récepteurs mis en jeu au cours du relâchement musculaire.....	68
II. Les maladies génétiques.....	70
1. Des pathologies héritables et transmissibles	70
1.1. Héritéité.....	70
1.2. Apparition « de novo ».....	71
2. Une palette de mutations très riche	72
2.1. Les micromutations ou mutations ponctuelles.....	72
2.2. Les macromutations	74
3. La synthèse protéique chez le sujet sain : rappel	77
3.1. La transcription : maturation du pré-messager en ARNm	77
3.2. La traduction	84

4. Des conséquences physiopathologiques complexes	87
4.1. Mutations affectant la maturation du pré-ARNm.....	87
4.2. Mutations affectant la traduction.....	92
III. Les pathologies du muscle d'origines génétiques : classification.....	94
1. Pathologies touchant le motoneurone	94
1.1. La sclérose latérale amyotrophique (SLA).....	94
1.2. L'amyotrophie spinale proximale (SMA).....	94
2. Pathologies touchant le nerf périphérique : les neuropathies	97
2.1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT).....	97
2.2. Les Ataxies.....	98
3. Myopathies touchant la jonction neuromusculaire	100
3.1. Les myasthénies.....	100
4. Myopathies touchant la fibre musculaire.....	102
4.1. Les myopathies congénitales	102
4.2. Les myopathies myofibrillaires	105
4.3. Les dystrophies musculaires congénitales.....	106
4.4. Les dystrophies musculaires progressives.....	114
IV. Les stratégies thérapeutiques.....	128
1. Les vecteurs de type « virus associés aux adénovirus » (AAV).....	129
2. Thérapies utilisant des mini-protéines.....	130
3. Thérapies ciblant l'ARN messager	131
3.1. Principe de l'épissage.....	131
3.2. L'épissage en trans, la technique de « Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing » (SMaRT)	131
3.3. Le saut d'exon thérapeutique	134
Résultats et discussions.....	136
I. Etude de l'implication du gène FAT1 dans la dystrophie Facio-Scapulo-Humérale	136
1. Contexte de la recherche.....	136
2. Résultats	137
3. Discussion	138
II. Amélioration du diagnostic dans la LGMD2A : Etude de l'impact de mutations faux-sens sur l'épissage de CAPN3.....	150

1. Contexte de la recherche, choix des mutations à tester	150
2. Résultats	151
3. Discussion	157
III. Mutations dans le gène STIM1, quelles conséquences sur la protéine ?.....	159
1. Contexte de la recherche.....	159
2. Résultats	160
2.1. Production des plasmides.....	160
2.2. Production bactérienne et purification des constructions protéiques	161
2.3. Analyses par ITC de la fixation du calcium et de la capacité des protéines STIM1 à se dimériser	164
3. Discussion	165
IV. Mise au point d'un outil thérapeutique par technique de « Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing » (SMaRT) dans le cadre des dysferlinopathies	168
1. Contexte de la recherche.....	168
2. Stratégie envisagée et résultats	170
3. Discussion	172
V. Confirmation du statut pathogène de mutations CAPN3 découvertes par séquençage haut débit	174
1. Contexte de la recherche.....	174
2. Résultats	174
3. Discussion	176
VI. Récupération de la capacité de réparation membranaire portée par la dysferline après saut de l'exon 32	181
1. Contexte de la recherche.....	181
2. Résultats	182
3. Discussion	182
Conclusion.....	193
Matériels et Méthodes.....	197
I. Etude de l'implication du gène FAT1 dans la dystrophie Facio-Scapulo-Humérale	197
1. Principe du test minigène.....	197
II. Amélioration du diagnostic dans la LGMD2A : Etude de l'impact de mutations faux-sens sur l'épissage de CAPN3.....	197
1. Choix des mutations.....	197

2. Etudes in silico	198
3. Clonage des exons de CAPN3 dans les plasmides pCAS2	198
4. Etudes in cellulo.....	198
4.1. Cultures cellulaires	198
4.2. Transfections cellulaires.....	198
5. Etudes Transcriptionnelles.....	198
5.1. Extraction d'ARN et Traitement DNase	198
5.2. RT-PCR, PCR et Séquençage	199
III. Mutations dans le gène STIM1, quelles conséquences sur la protéine ?.....	199
1. Production des constructions STIM1.....	199
IV. Mise au point d'un outil thérapeutique par technique de « Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing » (SMaRT) dans le cadre des dysferlinopathies	200
V. Confirmation du statut pathogène de mutations CAPN3 découvertes par séquençage haut débit	200
VI. Récupération de la capacité de réparation membranaire portée par la dysferline après saut de l'exon 32	200
ANNEXE 1 : Protocole Impact Kit : production et purification de protéines.....	201
I. Production des protéines dans les bactéries.....	201
1. Transformation des bactéries T7 Express lysY/Iq Competent E.coli (High efficiency) [NEB C3013I] avec les plasmides d'intérêt.....	201
1.1. Induction à l'IPTG : production des protéines.....	201
1.2. Extraction et purification des protéines	202
1.3. Induction de la coupure sur colonne	203
1.4. Elution des protéines purifiées.....	204
1.5. Striping de la colonne	204
1.6. Régénération de la colonne	204
2. Préparation des solutions :	205
ANNEXE 2 : Protocole Impact Kit : préparation des colonnes de chitine	206
I. Intégration de la résine dans la colonne.....	206
II. Conservation des colonnes.....	206
Bibliographie :	207

Introduction

I. Le muscle

1. Généralités

Le muscle est un tissu majeur de l'organisme humain. Il représente à lui seul entre 40 et 50% du poids sec d'un Homme. Les cellules qui le constituent sont, comme beaucoup d'autres, capables de mouvement mais leur caractéristique propre est leur capacité à se contracter. Elles fonctionnent sous forme « d'unités contractiles » unies ou pluricellulaires. Le muscle transforme l'énergie chimique en énergie mécanique.

Chez les mammifères, on distingue trois types de tissus musculaires : lisse, cardiaque et squelettique (figure 1). Plusieurs paramètres permettent de les différencier et notamment leur aspect en microscopie optique, leur composition histologique ou encore leur mode de contrôle et leur capacité à se contracter de manière volontaire ou non.

1.1. Le tissu musculaire lisse

Ce premier type de muscle est un composant important des structures viscérales. Il ne possède pas de striation transversale (figure 1) d'où son qualificatif de muscle « lisse ». Sa contraction est involontaire, sous la dépendance du système nerveux végétatif et de certaines hormones. Il est composé de cellules plates, étoilées, pourvues de prolongements. On distingue plusieurs types de cellules musculaires lisses ayant chacune une activité spécifique.

Les cellules myoépithéliales sont retrouvées au niveau des glandes mammaires, salivaires ou sudoripares. Elles jouent un rôle dans la sécrétion glandulaire en facilitant l'excrétion.

Les péricytes sont localisés au niveau de la lame basale de certains vaisseaux sanguins. Leurs prolongements entourent l'endothélium des capillaires, ce qui leur confère la capacité de contrôler le débit vasculaire : en se contractant, ils diminuent le diamètre de la lumière de ces vaisseaux. Ces cellules peuvent également être impliquées dans la régénération tissulaire. Elles possèdent un potentiel de différenciation qui sera activé en cas de lésion.

Les myofibroblastes enfin, sont des cellules fusiformes qui participent à la plasticité cellulaire ainsi qu'à sa motilité au sein des tissus conjonctifs. Ils ont un rôle majeur dans la cicatrisation puisque, lors d'une lésion tissulaire, ils vont s'activer et proliférer de manière importante. Ils vont également synthétiser une matrice extracellulaire temporaire afin de rapprocher les berges de la plaie.

1.2. Le tissu musculaire strié

1.2.1. Le tissu musculaire cardiaque

Comme son nom l'indique, le tissu myocardique est spécifique du cœur. Son rôle est d'assurer un rythme continu. A la différence du muscle lisse, il apparaît strié en microscopie optique (figure 1).

Les cardiomyocytes qui le composent possèdent une caractéristique intrinsèque particulière : ils ont la capacité de s'exciter spontanément, ce qui leurs confère une activité rythmique indépendante. Néanmoins, le système nerveux autonome exerce une influence sur les battements cardiaques. Il peut accélérer ou diminuer le rythme des contractions, respectivement via ses composantes sympathiques ou parasympathiques.

1.2.2. Le tissu musculaire squelettique

Comme le muscle cardiaque, ce tissu apparaît strié en microscopie (Figure 1). Il recouvre l'ensemble du squelette (d'où son nom) et permet, lorsqu'il se contracte, de faire pivoter les os autour des articulations. Il est sous la dépendance du système nerveux cérébro-spinal, et peut donc se contracter de manière consciente. L'ensemble de ces muscles est responsable de la motricité cinétique, des mouvements du squelette et de certains organes ainsi que du maintien de la posture, de la motricité statique.

Les travaux de recherche que j'ai réalisés au cours de mon doctorat ont porté sur ce dernier type de tissu. Il est décrit plus en détail dans le chapitre suivant.

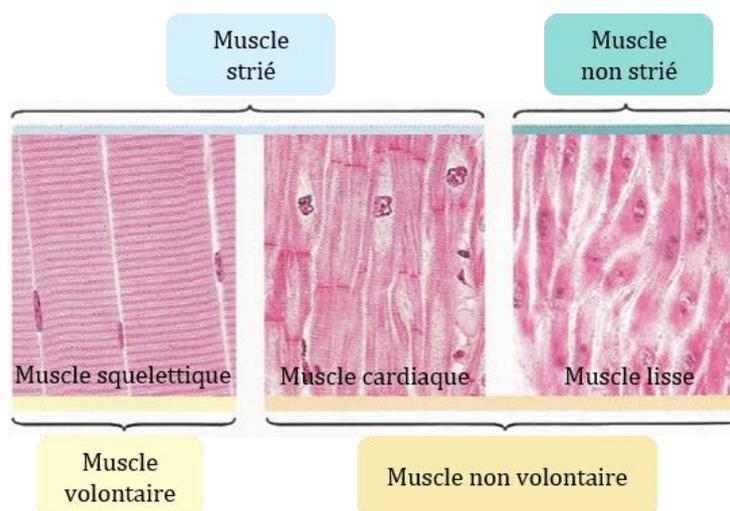


Figure 1 : Coupes histologiques des 3 types de muscles
Extrait de « Biologie moléculaire de la cellule – 5^e édition » Bruce Alberts

2. Le muscle squelettique

2.1. Myogenèse et développement

Avant d'atteindre son caractère mature, la fibre musculaire passe par plusieurs stades de développement.

La première étape se caractérise par la prolifération, dans les somites de l'embryon, de cellules uni-nucléées, les myoblastes, sous l'influence de facteurs de transcription spécifiques du muscle tels que Myf5 ou MyoD. Après cette première vague de prolifération, ces cellules migrent vers un bourgeon de membre en développement. Lorsqu'elles atteignent leur destination, un deuxième stade débute : les myoblastes cessent de se diviser, s'alignent et fusionnent en un syncytium plurinucléé, le myotube.

A ce stade, les noyaux des cellules fusionnées sont retrouvés en position centrale. Cette caractéristique de la maturation myogénique sera, comme nous le verrons plus loin, très utile pour diagnostiquer certaines myopathies.

La différenciation se poursuit, les noyaux sont repoussés en périphérie des myocytes et une connexion neuronale est mise en place vers la dixième semaine de la vie embryonnaire. Les axones des motoneurons issus de la corne antérieure de la moelle épinière viennent ensuite innover la fibre musculaire créant ainsi une jonction neuromusculaire (JNM) (Figure 2).

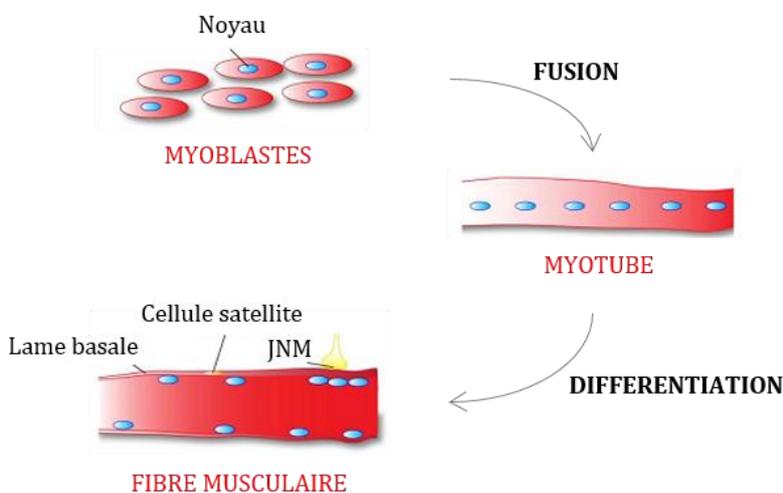


Figure 2 : Myogenèse d'une fibre musculaire.

Représentation schématique des différentes étapes de la différenciation myogénique.

Les myoblastes, cellules fusiformes avec un seul noyau, fusionnent pour former un myotube présentant initialement des noyaux centraux. Les noyaux migrent ensuite en périphérie et la différenciation en fibre musculaire se termine. Les cellules satellites sont retrouvées au niveau de la lame basale qui entoure la fibre.

Une accumulation de noyaux est visible sous la jonction neuromusculaire (jNM).

Adapté d'après « Repère Savoir & Comprendre » AFM

Dès la fin du deuxième trimestre de vie embryonnaire chez l'homme, on retrouve, sous la lame basale, juxtaposées aux fibres musculaires, une population de progéniteurs musculaires appelées cellules satellites. Dans le muscle adulte, ces dernières vont rester dans un état quiescent jusqu'à ce qu'une lésion se produise. A ce moment-là, elles seront activées, proliféreront et entreront dans la voie de différenciation musculaire responsable de la régénération des fibres lésées (voir plus loin).

2.1.1. Rôle des jonctions communicantes dans le développement musculaire

La plupart des tissus de l'organisme disposent de systèmes de communication entre cellules appelés jonction communicantes (*gap junction*). Ce sont des canaux qui laissent diffusés librement les ions et les petites molécules. Ils sont constitués de protéines appartenant à la famille des connexines qui vont se regrouper en hexamère pour former un connexon. A son tour, ce dernier se connectera avec un autre connexon situé sur la membrane de la cellule voisine pour former un véritable canal.

Dans les cellules musculaires, les jonctions communicantes jouent un rôle important durant la myogenèse mais ne sont plus retrouvées dans le muscle adulte. En effet, elles disparaissent lors de la formation des myotubes par fusion des myoblastes entre eux. Au cours du développement, ce mécanisme est sous la dépendance de plusieurs connexines différentes dont le membre le plus important, et le premier identifié dans les cellules musculaires, est la connexine 43 (Cx43). Lorsque l'on bloque l'expression de cette molécule, les myoblastes ne peuvent plus fusionner entre eux et les facteurs de différenciation tels que la myogénine ou MRF4 sont inhibés. A l'inverse, lorsque l'on surexprime Cx43, la différenciation cellulaire est favorisée et la formation des myotubes accélérée. Cx43 est donc un régulateur clé du développement musculaire (figure 3) (Merrifield and Laird, 2016).

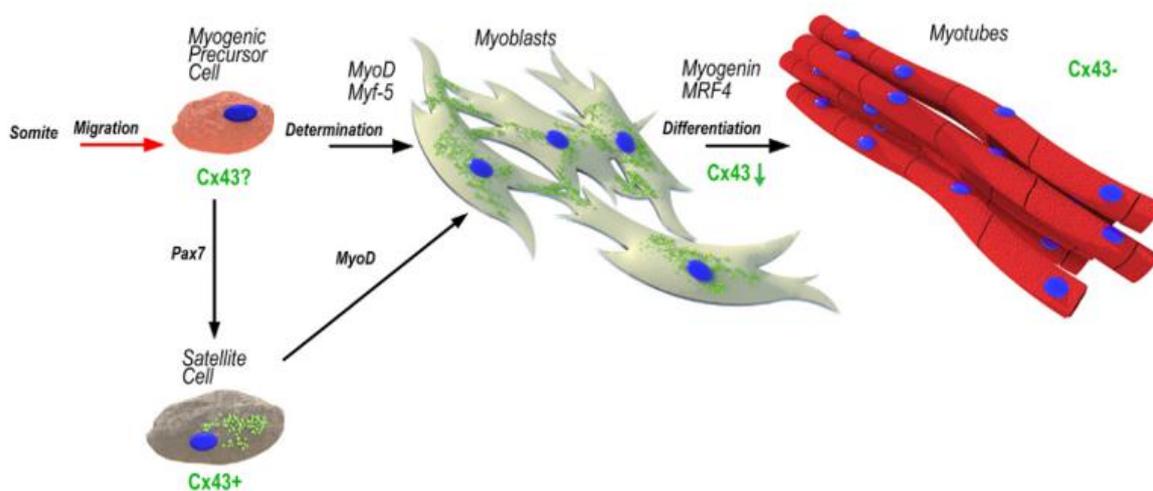


Figure 3 : Variation d'expression de la connexine 43 (Cx43) au cours de la myogenèse

Les précurseurs cellulaires entrent dans le lignage myogénique suite à l'expression de Myf5 et MyoD ou se différencient en cellules satellites sous la dépendance de Pax7. Au stade myoblaste, Cx43 est retrouvée exprimée à la membrane des cellules et dans leur cytoplasme. La fusion des myoblastes en myotubes est contrôlée simultanément par l'augmentation de l'expression des facteurs Myogénine et MRF4 et la diminution de celle de Cx43.

Merrifield and Laird, 2016

Plus récemment, l'expression de trois autres connexines a également été mise en évidence dans des myoblastes de souris au cours de l'embryogenèse : Cx39, Cx40 et Cx45. Les deux premières ne sont plus exprimées à la naissance mais on constate une augmentation du taux de Cx45 et de Cx43 dans les muscles de souris adulte en cours de régénération (Araya et al., 2005; Maltzahn et al., 2004; Merrifield and Laird, 2016).

Au cours de la croissance, le volume musculaire va augmenter jusqu'à devenir vingt fois plus important à l'âge adulte. Ce n'est pas le nombre de fibres qui va croître (environ 250 millions à la naissance) mais leur diamètre et leur longueur. Différents facteurs nerveux, mécaniques et hormonaux sont à l'origine de cette évolution.

Avec l'âge, les muscles s'aminciront et leur force diminuera progressivement : il y aura perte de fibres, diminution de leur taille voire dénervation de certaines. D'autres facteurs pourront être à l'origine de l'atrophie musculaire telle que la sous-utilisation ou la non-utilisation de certaines fibres.

2.1.2. La polarité cellulaire planaire (PCP)

Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, les myoblastes sont issus des somites embryonnaires. Ce sont des structures métamériques transitoires des vertébrés dont sont dérivés tous les muscles squelettiques du corps et des membres. Le muscle squelettique primitif est un tissu particulièrement bien organisé où les premières fibres musculaires formées sont toutes parallèles et alignées dans l'axe antéro-postérieur de l'embryon. Leur arrangement précis est essentiel à la fonction contractile de ce tissu.

De nombreuses molécules telles que les protéines des familles wnt, fat, daschous ou encore frizzled régulent étroitement le processus de myogenèse et participe au maintien de l'homéostasie musculaire (Caruso et al., 2013; Mao et al., 2016). Les signaux de polarisation qu'elles émettent sont interprétés par les myocytes en cours d'élongation, leur permettant ainsi de s'allonger dans une seule direction, l'axe de l'embryon.

Cette voie de signalisation est appelée « voie de polarité cellulaire planaire » ou PCP. Elle est parfaitement conservée au cours de l'évolution et n'est pas spécifique du muscle. La PCP est utilisée chaque fois que des cellules ont besoin de s'orienter dans l'espace de manière coordonnée, par exemple pour organiser les soies sur les ailes de drosophile (figure 4), les cheveux, les poils ou les cils de la cochlée chez l'humain (Carvajal-Gonzalez and Mlodzik, 2014; Goodrich and Strutt, 2011; Sienknecht, 2015). Il n'est dès lors pas étonnant de constater que le mauvais fonctionnement de la PCP peut avoir des conséquences dramatiques sur la mise en place et le fonctionnement de certains organes et tissus.

Dans le cas des muscles, l'inhibition spécifique de membres de la voie PCP aboutit à la désorganisation des myocytes qui s'allongent alors dans des directions aberrantes, entraînant une désorganisation du tissu musculaire et une perte de sa fonction motrice (Mao et al., 2016; Sugiyama et al., 2015).

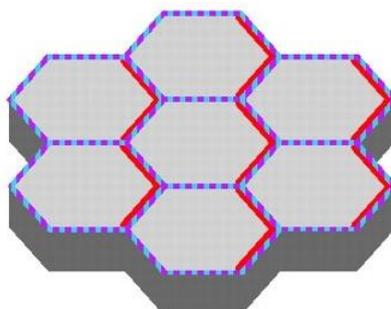


Figure 4 : Représentation schématique de la surface apicale d'une cellule épithéliale d'aile de drosophile.
La répartition asymétrique de différentes protéines, induit la mise en place de la voie de polarité cellulaire planaire.
D'après Goodrich and Strutt, 2011

2.1.3. Fat1

Le gène *fat1* est connu pour être l'orthologue humain d'un des membres de la famille des cadhérines « fat » retrouvées chez la drosophile. Chez ces insectes, seules deux protéines sont incluses dans cette famille : les protéines fat (ft) et fat-like (ftl). Fat joue un rôle majeur dans la polarité cellulaire planaire pendant l'embryogénèse de la drosophile. Elle code pour une protéine « suppresseur de tumeur » qui contrôle la prolifération et l'adhésion cellulaire. Lorsqu'elle est mutée, la croissance cellulaire n'est plus maîtrisée, ce qui conduit à l'apparition de larves de taille plus importante que la normale, d'où le nom du gène (Sharma and McNeill, 2013). Fat-like intervient quant à elle dans la morphogénèse et le maintien de structures tubulaires d'origine ectodermique tel que le glomérule ou la cochlée. Ces deux protéines ont, comme toutes les cadhérines, la capacité de lier le calcium.

Chez les mammifères, cette famille comporte quatre membres numérotés de fat1 à fat4. Malgré une origine phylogénétique commune avec leurs orthologues drosophiliens, ces protéines ont évolué de manière différente. Ainsi, d'après différentes expériences réalisées sur la mouche et la souris, il semble que fat1 partage le plus grand degré d'homologie avec fat-like et fat4 avec fat. Cependant, plusieurs études effectuées sur des modèles murins ont montré que fat1 et fat4 agissent de façon synergique au cours du développement. Elles contrôleraient la fermeture du tube neural, le développement du cerveau, la croissance cochléaire ou encore le développement correct des reins (Badouel et al., 2015; Saburi et al., 2012). En 2013, l'implication du gène *fat1* a été mise en évidence dans l'orientation et la mise en place du tissu musculaire via le processus de PCP.

Les travaux réalisés sur un modèle murin hypomorphe pour le gène *fat1*, ont montré qu'une diminution de la quantité de cette protéine induit l'apparition d'un phénotype dystrophique avec notamment une atrophie asymétrique de certains muscles de la face et des épaules (figure 5) (Caruso et al., 2013).

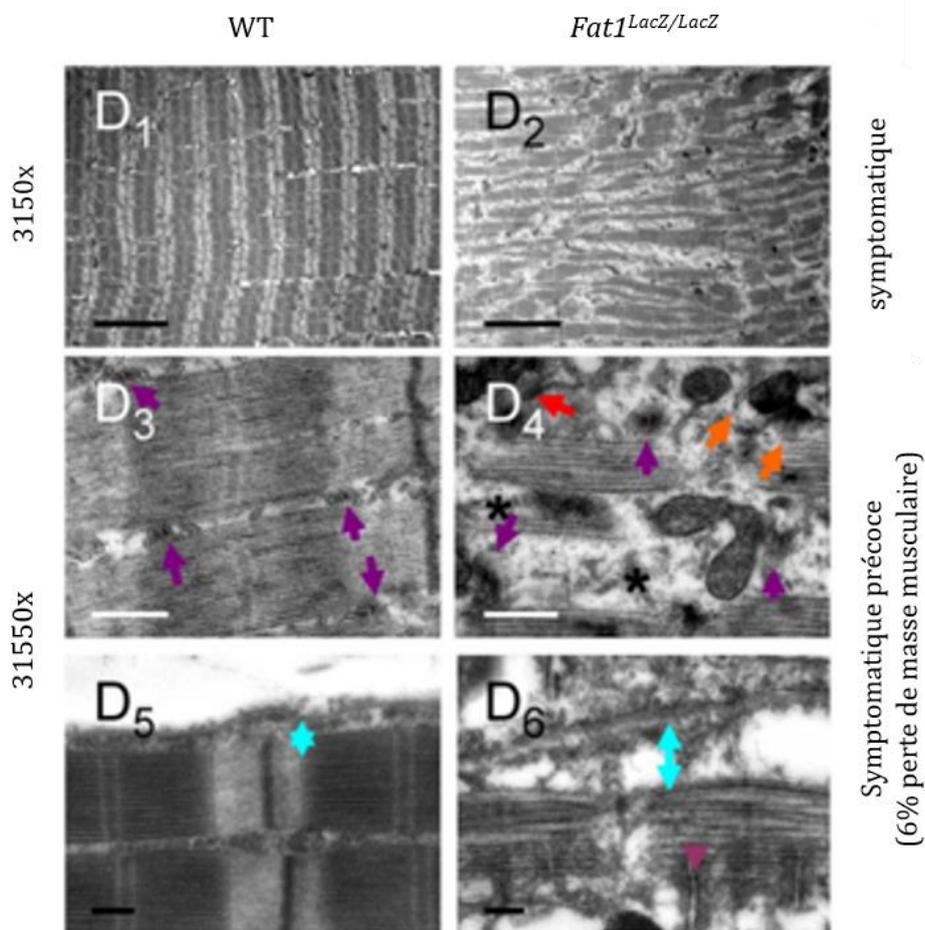


Figure 5 : Fibres musculaires rhomboïdes de souris adultes *Fat1^{LacZ/LacZ}* observées en microscopie électronique à différents stades d'apparition des symptômes (6-15% de perte de poids), à trois grossissements différents.

En comparant les prélèvements musculaires de souris WT (D1, D3, D5) avec ceux de souris hypomorphes pour *fat1* (D2, D4, D6), on observe une architecture des fibres fragmentée et des tubules T déstructurés.

Dans les myofibrilles de souris sauvages (D3), les tubules T (flèches violettes) sont visibles entre les myofibrilles, alignés avec précision à l'extrémité des filaments de myosine, de part et d'autre de chaque bande Z. En revanche, dans les fibres dystrophiques de souris *fat1^{LacZ/LacZ}* (D4), la désorganisation générale est corrélée à des modifications de la structure des triades. Les triades peuvent être absentes (étoiles), mal alignées, mal orientées (flèches orange), ou encore fragmentées (flèches rouges).

Dans les muscles de souris *fat1^{LacZ/LacZ}*, un écart plus important entre le sarcolemme et l'appareil contractile est observé (indiquée en double barre fléchée bleue) par rapport aux myofibrilles sauvages (D5). Il y a perte de l'association étroite entre l'appareil contractile et le sarcolemme.

Echelle : (D1, D2) 5 mm ; (D3, D4) 0,5 mm ; (D5, D6) 0,2 mm.

Caruso et al., 2013

Ainsi, de nouvelles fonctions ont été attribuées à la protéine fat1 : elle intervient dans la polarité planaire des myoblastes au cours du développement et contrôle de cette manière, la forme et la position de groupes de muscles distincts. On pense qu'elle jouerait également un rôle dans la contraction musculaire chez l'individu adulte via son implication dans le couplage excitation-contraction au niveau des tubules T (Caruso et al., 2013).

Une partie de mes travaux de doctorat a consisté à étudier l'impact de mutations faux-sens retrouvées dans le gène *fat1* sur la fonction de la protocadhérine qu'il code. En effet, ces recherches ont permis de montrer qu'elle pourrait être impliquée dans une pathologie musculaire phénotypiquement semblable à la dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (Puppo, Dionnet et al., 2015).

3. Structure et organisation cellulaire du muscle

3.1. Les motoneurones

Les motoneurones établissent la connexion entre le système nerveux central et le système musculaire. Leurs corps cellulaires sont dans le tronc cérébral ou dans la corne antérieure grise de la moelle épinière tandis que leurs axones myélinisés sont directement connectés aux muscles. Ces contacts synaptiques entre fibres musculaires et neurones moteurs se font au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM) ou plaque motrice (figure 6).

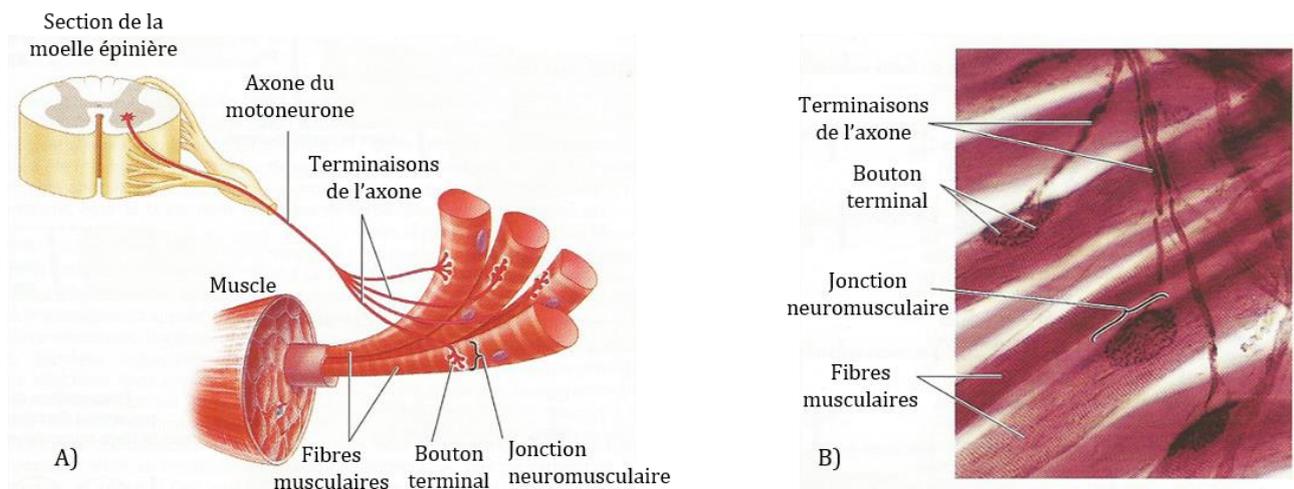


Figure 6 : Motoneurone innervant un muscle squelettique :

En atteignant le muscle squelettique, le neurone moteur (motoneurone) se ramifie ; chaque ramification forme une jonction avec une seule cellule musculaire (fibre musculaire).

A) Représentation schématique B) Jonctions neuromusculaires observées en microscopie électronique

D'après « physiologie humaine - 3^{ème} édition » Scherwood

Les motoneurones transmettent aux muscles une excitation cohérente après intégration des entrées synaptiques. Ces dernières, majoritairement retrouvées sur l'arborisation dendritique, convergent vers le soma pour déclencher un train de potentiels d'action après sommation spatiale. C'est l'arrivée de ce potentiel d'action aux jonctions neuromusculaires qui génèrera la contraction des fibres. Chez les mammifères, un motoneurone unique peut innervier plusieurs fibres musculaires de propriétés mécaniques proches, on parle alors d'unité motrice. Au cours du développement embryonnaire, les fibres quant à elles, vont recevoir des connexions en provenance de plusieurs motoneurones. Elles les perdront progressivement pour ne conserver l'innervation que d'un unique motoneurone une fois mature. Ce phénomène est appelé élimination synaptique (figure 7)(Tintignac et al., 2015).

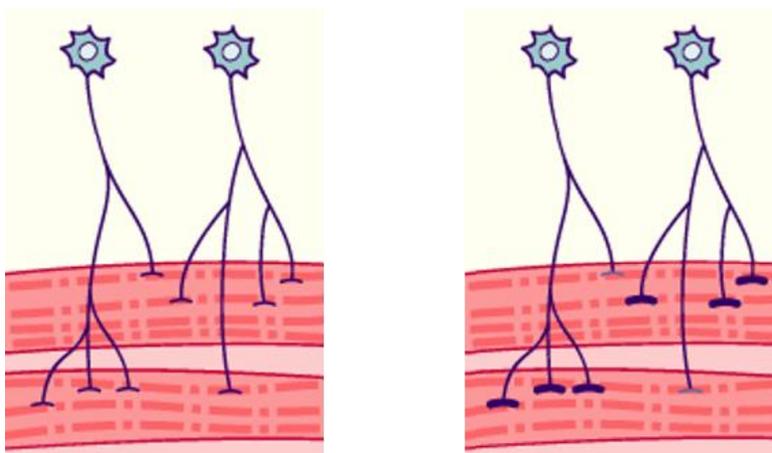


Figure 7 : Elimination synaptique au cours de la maturation de la jonction neuro-musculaire

Extrait de : <http://www.embryology.ch/francais/vcns/encephale08.html>

Plus le motoneurone est loin de sa cible, plus le diamètre de son axone est grand et plus le nombre de fibres musculaires qu'il innerve est important. En effet, la taille des unités motrices est proportionnelle à la précision du mouvement que le muscle doit réaliser. On trouve par exemple de très petites unités motrices avec seulement 3 à 4 fibres par neurone moteur, au niveau des muscles contrôlant les mouvements du globe oculaire. En revanche, lorsque l'on observe des muscles contrôlant des mouvements puissants et relativement moins précis, comme le biceps brachial, on retrouve plus d'une centaine de fibres musculaires par motoneurone. On peut atteindre 2000 fibres par unité motrice au niveau du quadriceps.

L'ensemble des neurones moteurs qui innervent un même muscle forme une population, un pool de motoneurone. Ils sont retrouvés en amas cylindrique dans la moelle épinière au niveau de plusieurs segments. D'après le type de fibres auxquelles ils sont connectés, on distingue trois grandes catégories de motoneurones :

- les motoneurones α , qui innervent exclusivement les fibres musculaires extrafusales,
- les motoneurones γ , qui innervent les fibres intrafusales qui constituent les fuseaux neuromusculaires,
- les motoneurones β , qui innervent les deux types de fibres.

Les fuseaux neuromusculaires sont des récepteurs sensoriels qui répondent aux changements de pression, de force et de longueur du muscle. Ils sont localisés près de la jonction musculo-tendineuse ou dans le corps des muscles. Les fuseaux mesurent entre 7 et 10 mm et sont constitués de fibres musculaires de taille variable dont la région centrale ne contient pas de matériel contractile.

Ces fibres, hautement spécialisées, sont contenues dans une capsule de collagène et sont appelées fibres intrafusales par opposition à la majorité des fibres musculaires avec lesquelles nous sommes familiers, qui sont extrafusales. Ce sont des récepteurs d'étirement soumis aux changements de longueur du muscle qui courent parallèlement aux fibres extrafusales (figure 8).

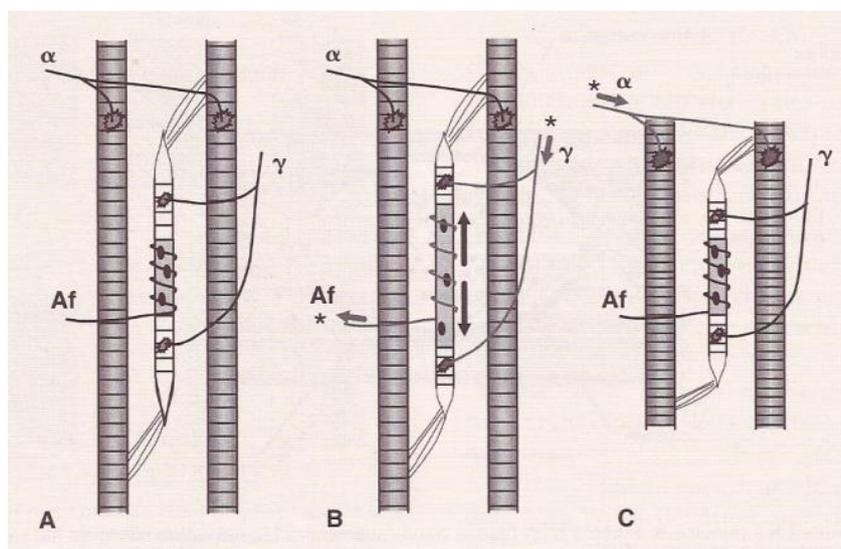


Figure 8 : Action des fuseaux neuromusculaires

A : Position de départ. B : L'activité γ () étire la portion centrale du fuseau, entraînant une décharge afférente (*).*

C : L'activité du motoneurone α () provoque la contraction des fibres extrafusales, raccourcissant le fuseau et réduisant la décharge afférente. Af : fibres afférentes.*

Extrait de « physiologie du muscle squelettique » David Jones, Joan Round, Arnold de Haan

3.2. L'appareil contractile

Le muscle strié est formé de cellules multinucléées, les fibres musculaires, qui sont entourées par le sarcolemme, une membrane plasmique électriquement excitable. Chaque fibre musculaire, qui peut s'étendre sur toute la longueur du muscle, contient un faisceau de nombreuses myofibrilles, disposées parallèlement et enfouies dans un liquide intracellulaire, le sarcoplasme (figure 9A). Ce liquide contient des vésicules de réticulum endoplasmique lisse également appelées réticulum sarcoplasmique, des mitochondries, du glycogène, et aussi des composés hautement énergétiques comme l'ATP et la phosphocréatine (figure 9B).

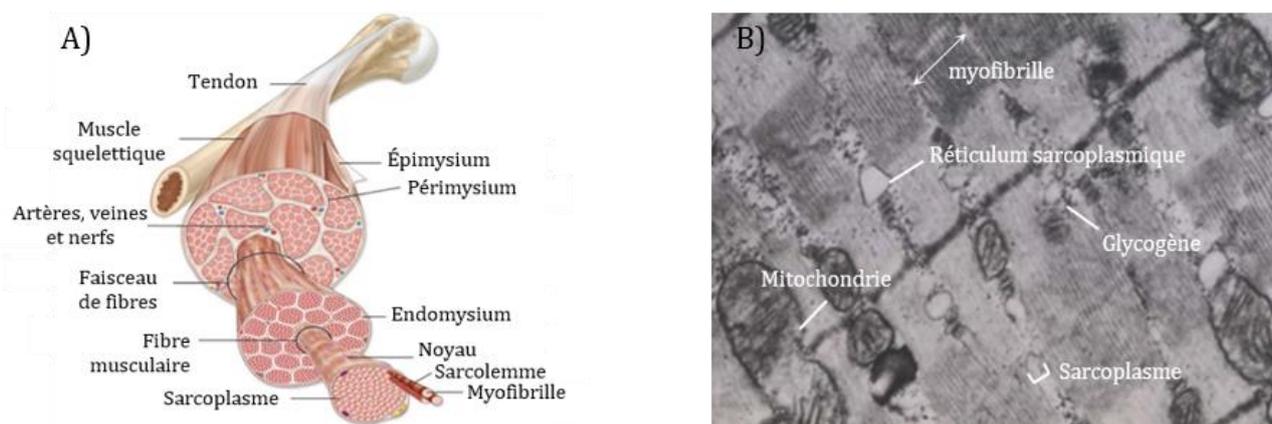


Figure 9 : Anatomie du muscle squelettique.

A) Représentation schématique d'un muscle squelettique

B) Détail d'une myofibrille en microscopie électronique

A) Extrait de <http://svt.ghediri.com/bac-sciences/10/neurophysiologie/20/fonctionnement-du-muscle-squelettique.html>,

B) adapté de <http://slideplayer.fr/slide/6006893/>

3.2.1. La myofibrille

L'efficacité de contraction d'un muscle est dépendante de l'organisation interne de ses fibres. Les myofibrilles, dont le diamètre varie de 1 à 2 μm , sont le support de la contraction musculaire. Très nombreuses dans une fibre musculaire, elles se disposent parallèlement à son grand axe et s'étendent sur toute sa longueur. Cette répartition ainsi que leur composition hétérogène leur donnent un aspect strié sur plusieurs niveaux, caractéristique du muscle squelettique.

A. Striation du muscle : bandes et sarcomère

La myofibrille est l'élément contractile des cellules musculaires, c'est le composant majeur du cytoplasme de la cellule. Le premier niveau de striation du muscle s'observe sur le plan longitudinal, par le regroupement en faisceaux des myofibrilles (figure 9B). Le second niveau d'organisation est apporté par la présence de stries transverses dans les myofibrilles, qui donnent son aspect caractéristique au muscle squelettique lorsqu'on l'observe en microscopie (figure 10).

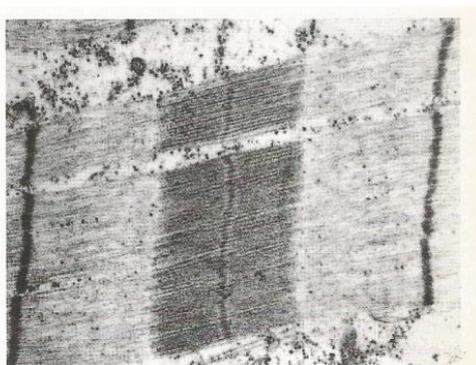


Figure 10 : Sarcomère normal

Coupe longitudinale d'un muscle squelettique humain observée en microscopie électronique (x22500)

Extrait de « pathologie du muscle strié » Jean de Recondo

Ces stries transverses sont dues à l'alternance régulière de disques sombres et de disques clairs. Les noms qui leur ont été attribués ont été choisis en raison de leurs propriétés biréfringentes différentes en microscopie optique (figure 11) :

- Les premiers disques, sombres et anisotropes forment la bande A. Cette dernière est divisée en deux par une bande plus claire, la bande H, elle-même centrée sur la ligne M.

- Les seconds, clairs et isotropes, constituent la bande I qui est elle aussi divisée en deux par une bande sombre, la strie Z.

Dans une myofibrille, la structure entre deux disques Z est définie anatomiquement et constitue le sarcomère. Cette structure est l'unité de contraction élémentaire, structurale et fonctionnelle, du muscle squelettique.

La strie Z est une structure particulièrement complexe car elle unit et sépare à la fois deux sarcomères voisins.

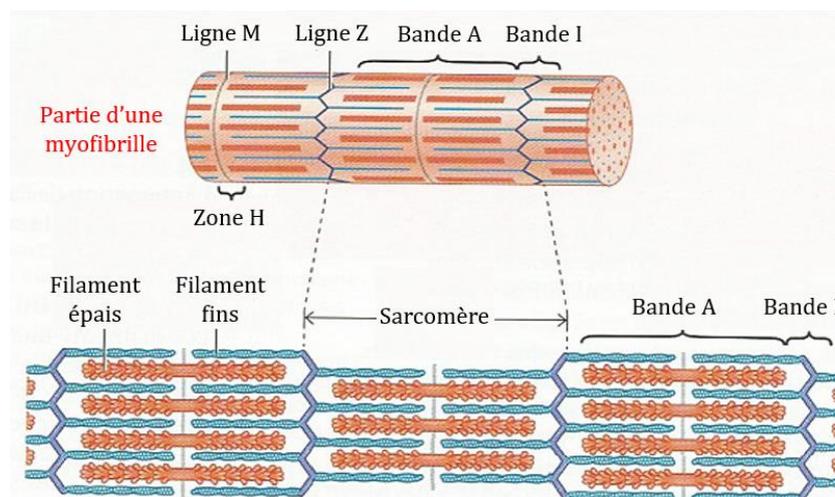


Figure 11 : Aspect strié, en bandes, du muscle squelettique.

En haut, représentation schématique d'un sarcomère et des différentes bandes qui le constituent.

En bas, détails montrant la disposition des filaments d'actine et de myosine.

Extrait de « Biologie moléculaire de la cellule - 5^e édition »

Chez les mammifères, à la longueur naturelle de repos du muscle, une myofibrille comprend une chaîne de sarcomères mesurant entre 2 et 2,5 μ m chacun. Lors de la contraction musculaire, la distance entre deux bandes Z diminue de manière simultanée dans toute la cellule et entraîne un raccourcissement global des sarcomères d'environ 30%. Les observations faites au microscope classique ont montré que la bande A conserve une largeur constante lors de l'allongement ou de la contraction du muscle alors que celle de la bande I varie.

C'est grâce à l'identification des protéines contractiles présentes dans les myofibrilles et à la compréhension de leur disposition à l'intérieur, que le mécanisme de génération de la force et l'apparence striée du muscle squelettique ont pu être expliqués.

3.2.2. Les myofilaments

L'aspect hétérogène des myofibrilles s'explique par leur structure filamentaire. Elles sont constituées de deux types de filaments : les uns épais et les autres fins. Ce sont eux qui donnent leur aspect strié au muscle puisque leur répartition dans la cellule est parfaitement régulière.

Les filaments épais sont composés d'un assemblage de molécules de myosine. Ils forment la bande A où ils se disposent de façon hexagonale les uns par rapport aux autres, et s'associent avec des protéines au milieu du sarcomère pour constituer la ligne M. La bande I quant à elle, est formée par les filaments fins ou microfilaments, qui sont composés d'actine. On les trouve également dans une partie de la bande A où ils vont se distribuer entre les filaments épais. Dans cette zone, chaque filament épais est entouré de six filaments fins. A l'inverse, chaque filament d'actine peut interagir avec trois filaments différents de myosine (figure 12).

La zone H, située au centre de la bande A, apparaît plus claire en microscopie car elle est uniquement constituée de filaments épais. En effet, les filaments fins n'atteignent pas la ligne M. Cette dernière, située au centre de la zone H donc de la bande A, a une épaisseur de 80 à 90nm et assure la stabilité sur le plan longitudinal et transversal du treillis formé par les filaments épais.

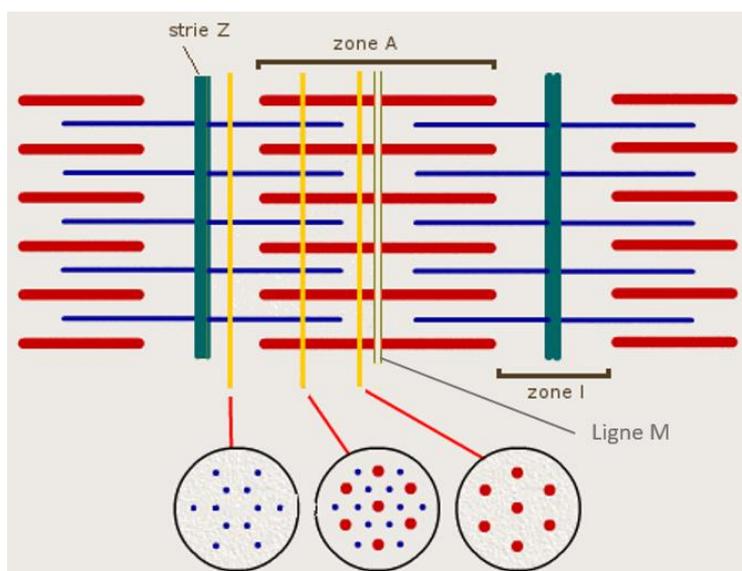


Figure 12 : Représentation schématique de différentes coupes de sarcomère

Extrait de « physiologie du muscle squelettique » David Jones, Joan Round, Arnold de Haan

A. Les protéines contractiles

A l'échelle de la myofibrille, de nombreuses protéines jouent un rôle stratégique dans l'efficacité de contraction et le maintien de l'homéostasie cellulaire.

a. La myosine et l'actine

Bien que le mouvement volontaire soit une des caractéristiques qui séparent l'animal de la plante, les protéines contractiles, tant la myosine que l'actine, sont présentes dans tous les types de cellules. Elles sont responsables du flux protoplasmique mais aussi des mouvements des organites intracellulaires.

Le muscle squelettique (comme le muscle cardiaque) a la particularité de renfermer un pourcentage particulièrement élevé d'actine et de myosine dans ses cellules (environ 80% des protéines totales). Comme décrit plus haut ces deux protéines sont disposées selon un schéma très ordonné à l'intérieur de la cellule, permettant la génération de mouvements et de force contrôlée. C'est l'interaction de l'actine avec la myosine qui va entraîner le glissement des filaments fins sur les filaments épais et permettre la contraction du muscle.

La myosine : composant des filaments épais

La myosine comme l'actine, est présente dans les règnes animaux et végétaux. L'isoforme retrouvée dans les muscles squelettiques des mammifères est la myosine II. La molécule est faite de 2 chaînes identiques « lourdes » (environ 200kDa chacune) codées par le gène *MYH* (17pter-p11) et de quatre chaînes légères (environ 20kDa chacune) codées quant à elles par *MYL1* (2q33qter).

La myosine est constituée de deux fragments majeurs (figure 13) :

- la tête globulaire, encore appelée domaine moteur ou fragment S1, qui peut se combiner à l'actine puisque c'est elle qui porte l'activité ATPasique et,
- la portion S2, qui comprend la région flexible de la molécule et une queue.

La longue queue à superenroulement forme des faisceaux avec les queues d'autres molécules de myosine. Ces interactions queue-queue forment de gros « filaments épais » bipolaires qui ont plusieurs centaines de têtes de myosine, orientées dans des directions opposées aux deux extrémités du filament épais. Au centre de chacun se trouve une région dans laquelle aucune tête ne se projette et où l'on ne retrouve que des queues de myosine. Cette région correspond à la zone H, celle dénuée de filaments fins et représente environ 10% de la longueur totale du filament épais.

Contrairement aux microfilaments dont la longueur peut légèrement varier, les filaments épais ont la même longueur dans tout le règne animal.

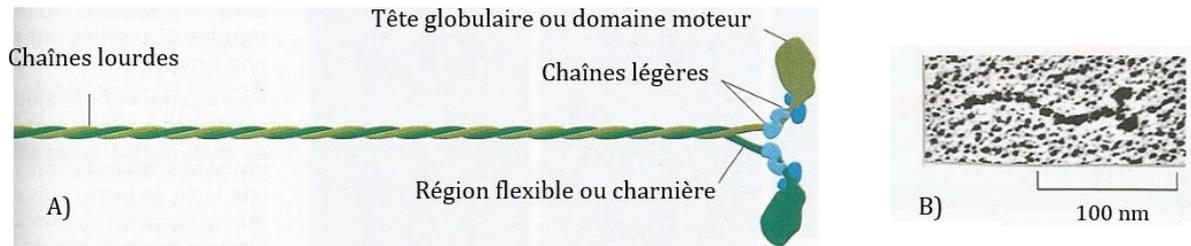


Figure 13 : Myosine II

(A) Schéma d'une molécule de Myosine II composée de 2 chaînes lourdes (vert) et de quatre chaînes légères (bleu). Les chaînes légères sont de deux types distincts et une copie de chaque type se trouve dans chaque tête de myosine. La dimérisation se produit lorsque deux hélices α de la chaîne lourde s'enroule l'une autour de l'autre pour former un superenroulement, conduit par l'association d'acides aminés hydrophobes régulièrement espacés. La disposition en superenroulement forme un bâtonnet allongé en solution et cette partie de la molécule est appelée la queue.
 (B) Les deux têtes globulaires et la queue sont faciles à observer sur les photographies en microscopie électronique de molécules de myosine ombrées au platine.

Extrait de « Biologie moléculaire de la cellule – 5^e édition »

L'actine : le composant principal des microfilaments ou filaments fins

L'actine, codée par le gène *ACTA1* (1q42), est une protéine très ancienne qui a peu évoluée dans le temps : les actines des cellules animales et végétales sont immunologiquement et fonctionnellement similaires. C'est une protéine globulaire (actine G) qui se polymérise en un double filet hélicoïdal polarisé (actine F) (figure 14).



Figure 14 : L'actine

A) Schéma d'un microfilament (ou actine F), un polymère hélicoïdal à deux brins, composé de nombreuses molécules d'actine G.
 B) Microfilament observé en microscopie électronique

Extrait de « Biologie moléculaire de la cellule – 5^e édition »

Cette polarité est toujours orientée du disque Z (extrémité +) vers le centre du sarcomère (extrémité -). La polymérisation de l'actine nécessite l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Après perte de l'ion phosphate, la molécule reste liée au filament et représente environ 90% de l'ADP total du muscle.

A leurs extrémités, les filaments d'actine sont coiffés par deux protéines, la tropomoduline et la CapZ, qui les stabilisent et empêchent leur dépolymérisation. La première protège l'extrémité - des filaments tandis que la seconde, l'extrémité +. CapZ est située dans la strie Z où elle facilite l'accrochage des filaments fins aux autres protéines présentes à cet endroit. La longueur des filaments d'actine, peut varier selon les muscles ou dans un même sarcomère.

b. La tropomyosine et la troponine

La tropomyosine et la troponine sont les autres constituants des filaments fins.

La tropomyosine, est une protéine fibreuse codée par le gène *TPM3* (1q22-23). Elle est constituée de deux chaînes polypeptidiques identiques qui se logent dans les sillons formés par les deux brins d'actine torsadés en hélice (figure 15). Chaque molécule de tropomyosine entre ainsi en contact avec sept sous-unités d'actine G. Lorsque le muscle est au repos, la tropomyosine est disposée sur les filaments fins de telle sorte qu'elle bloque les sites de liaison de la myosine à l'actine.

Le dernier constituant du filament fin est la troponine, codée par le gène *TNNI1* (1q32). C'est une protéine globulaire, hétérotrimérique, composée des sous unités C, T et I. Comme la tropomyosine, la troponine est située dans les sillons des filaments d'actine (figure 15). Elle interagit par ailleurs avec ces deux protéines, respectivement via ses sous-unités T et I. La troponine joue un rôle important dans le déclenchement de la contraction musculaire puisque sa sous-unité C lui confère une capacité à fixer fortement le calcium. En effet, lorsqu'une molécule de calcium se fixe sur la sous-unité C, cela va modifier la conformation de l'échafaudage protéique dans le sillon du filament d'actine et libérer les sites de fixation de la myosine sur l'actine.

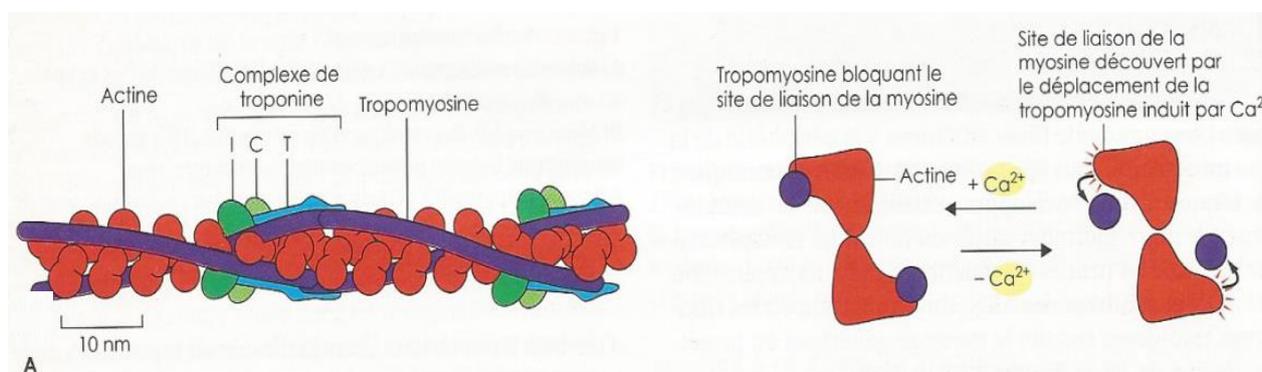


Figure 15 : Représentation schématique des interactions de la tropomyosine et de la troponine avec la molécule d'actine.

Le calcium est l'élément clé dans la libération du site de fixation de la myosine sur l'actine.

Extrait de « pathologie du muscle strié » Jean de Recondo

B. Les protéines de structure du sarcomère

En dehors des protéines impliquées dans le phénomène de contraction, il en existe d'autres dont la fonction est de maintenir l'architecture du sarcomère (figure 16).

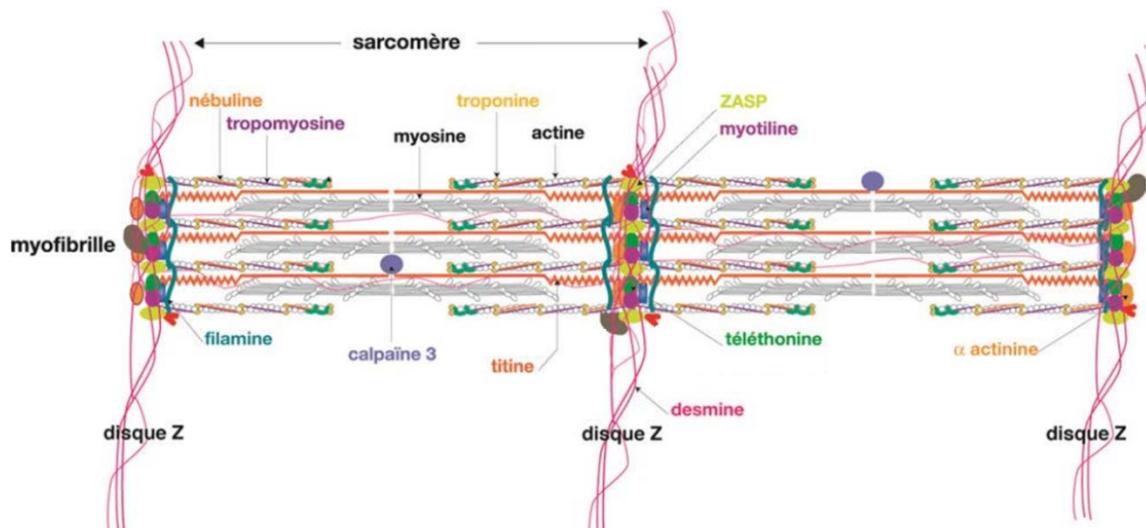


Figure 16 : Principales protéines impliquées dans la structure du sarcomère

D'après « avancées dans les myopathies des ceintures » Savoir et comprendre - juin 2016 – AFM

a. Le troisième groupe de myofilaments

Un troisième type de filaments organise la disposition tridimensionnelle des filaments fins et épais et permet le maintien de leur architecture lors des épisodes de contraction et de relaxation. Formés de protéines géantes qui s'associent à l'actine et la myosine, ils confèrent au tissu musculaire son élasticité inhérente. Ce sont eux également qui contrôlent sa réorganisation lorsque des forces supérieures au fonctionnement physiologique ont été appliquées au muscle.

La titine

Après la myosine et l'actine, la titine est la protéine la plus abondante dans le muscle strié, représentant quelque 10 % de la masse myofibrillaire. Codée par le gène *TTN* (2q31), c'est une protéine géante de 4200kDa (la plus grande protéine du vivant), extrêmement longue (plus d'1µm), qui s'étend sur la longueur d'un demi-sarcomère (figure 17).

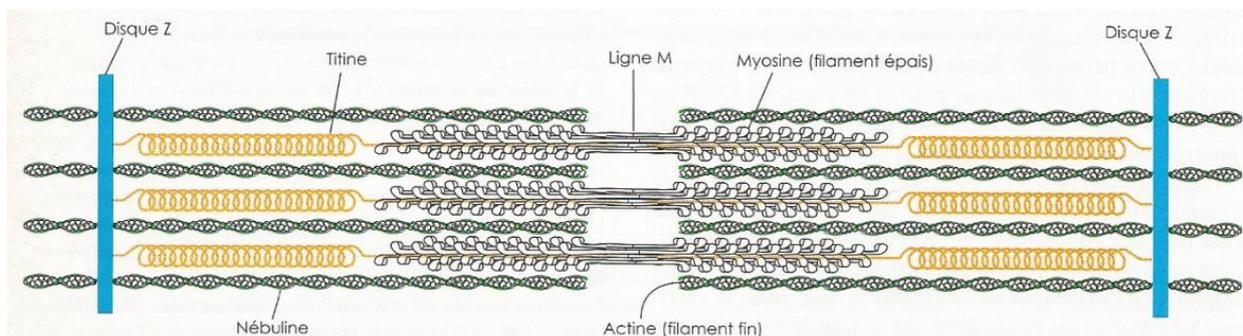


Figure 17 : Localisation des filaments de titine et de nébuline dans un sarcomère

Extrait de « pathologie du muscle strié » Jean de Recondo

La titine est ancrée au niveau du disque Z par son extrémité N-terminal et s'étire jusqu'à la ligne M côté C-terminal (Meyer and Wright, 2013). Sa structure est hautement répétitive et modulaire : 90% de sa masse est constituée de répétitions immunoglobuline et de domaines de fibronectine-III qui permettent la liaison à diverses protéines myofibrillaires. Dans la bande I par exemple, elle interagit entre autres avec l'actine, l' α -actinine, la téléthonine, la myoméline ou la nébuline et dans la bande A avec la myosine, la Myosin Binding Protein-C (MyBP-C) et l'obscurine (figure 18) (Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009).

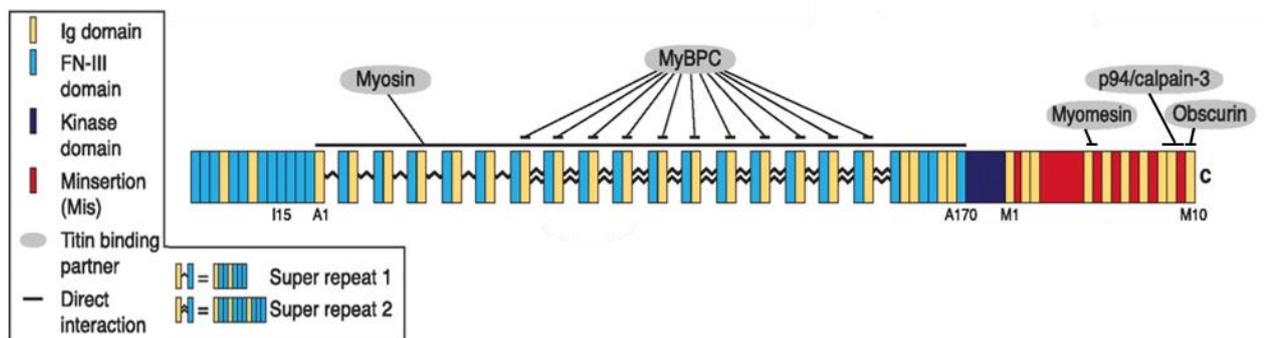


Figure 18 : Représentation schématique de la titine et de ses interactions avec des protéines partenaires dans la bande A

Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009

Les 10% restant de sa structure, située dans la bande A, sont formés d'un domaine kinase et de 17 régions uniques qui ne présentent aucune homologie avec des séquences connues. C'est notamment dans ces régions que l'on retrouve des sites de liaison à la calpaïne 3 (figure 18) (Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009) (Charton et al., 2015).

Les rôles de la titine sont divers : elle intervient dans le maintien de la structure et l'élasticité des sarcomères mais également dans la transduction du signal que ce soit entre les myofibrilles ou entre le noyau et les différents compartiments de la cellule musculaire (Krüger and Kötter, 2016).

Douée de propriétés intrinsèques « élastique », un des rôles majeurs de la titine lors du travail musculaire est de résister à l'étirement excessif du sarcomère en générant une force opposée à sa tension et de maintenir l'alignement des filaments fins et épais. En effet, pendant la contraction d'un muscle strié, la tension active provient de l'action des filaments fins sur les filaments épais et la tension passive résulte de l'extension de la titine (Tskhovrebova and Trinick, 2003).

La titine interagit de deux manières avec la myosine : directement via de multiples sites d'interaction répartis tout le long des filaments épais dans la bande A mais également indirectement par l'intermédiaire de la myoméline et de la protéine M au niveau de la ligne M (Houmeida et al., 1995).

Au niveau de la strie Z, la titine est reliée à l'actine par l' α -actinine. Cette association de protéines garantit le maintien de l'assemblage myofibrillaire au cours du travail musculaire. Toujours sur cette même ligne Z, la titine interagit avec la téléthonine (Faulkner et al., 2001)(voir paragraphe « la téléthonine » [I.3.2.2.c.b]).

Différentes pathologies musculaires sont dues à des mutations retrouvées dans la titine et sont regroupées sous le terme de titinopathies. On retrouve notamment dans ce groupe une dystrophie musculaire des ceintures, la LGMD2J et une forme de dystrophie semblable à la dystrophie d'Emery Dreifuss mais sans atteinte cardiaque.

La nébuline

Autre protéine géante, la nébuline, codée par le gène *NEB* (2q23.3), est étroitement associée aux filaments fins d'actine, l'actine F (figure 17). De longueur similaire à la titine ($\approx 1\mu\text{m}$), la plupart de sa masse (97%) est composée de domaines modulaires répétés. Elle est connue pour ancrer son extrémité C-terminale au niveau de la ligne Z du sarcomère. Sa structure allongée entraîne de nombreuses associations avec des protéines partenaires (figure 19).

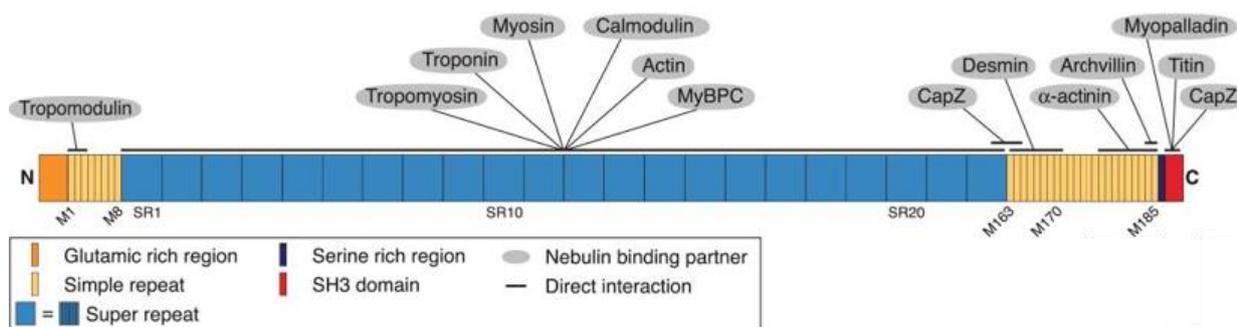


Figure 19 : Représentation schématique de la nébuline et de ses interactions avec des protéines partenaires
Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009

De la ligne Z à l'extrémité du filament d'actine on va trouver les protéines suivantes : la tropomoduline, la tropomyosine, les troponines et l'actine, c'est-à-dire les composants majeurs du filament fin. Il a été suggéré que la nébuline sert de matrice pour la mise en place de la bande I et que sa longueur détermine celle des filaments fins. En effet, contrairement à la titine, la nébuline n'a pas de propriété élastique, sa structure est inextensible.

La Nébuline régulerait donc la longueur du filament fin mais aurait également un rôle dans le contrôle des performances contractiles du muscle, via ses interactions avec la Myosine et l' α -actinine au niveau de la bande I. Elle serait également impliquée dans la transduction de signaux, la transmission de forces et le maintien de l'intégrité du sarcomère durant la contraction.

C'est en fait l'élément qui va préciser la largeur des disques Z et déterminer l'arrangement latéral de ces derniers en rapport avec les myofibrilles adjacentes. Au niveau de la bande I, des interactions avec la Myosine et l' α -actinine ont été mises en évidence, lui conférant ainsi un rôle dans la contraction.

Des zones de contact avec la calmoduline, la MyBP-C, la capZ, la desmine, l'archvilline, la titine et la myopalladine ont également été mises en évidence.

Son absence va se traduire par une réduction de la taille des filaments fins et un déficit des performances contractiles du muscle. Des expériences réalisées sur des souris complètement déficientes en Nébuline, confirment que cette protéine renforce la probabilité d'attachement des têtes de Myosine sur le filament d'Actine.

L'obscurine

Identifiée en 2001, l'obscurine, codée par le gène *OBSCN* (1q42), est la troisième et dernière protéine géante identifiée à ce jour dans le sarcomère. Elle est composée de plus de huit mille acides aminés et comme les deux autres, la majeure partie de sa masse est constituée de motifs immunoglobuline. C'est également un élément indispensable au maintien de l'intégrité du sarcolemme et de la bonne symétrie des sarcomères au sein des muscles des ailes de drosophiles (Katzemich et al., 2012). Enfin, elle aiderait la dystrophine dans sa localisation au sein des costamères et aurait un rôle important dans l'organisation des microtubules sub-sarcolemmaux (Randazzo et al., 2013).

Les partenaires de l'obscurine sont multiples et leurs interactions se situent principalement au niveau de la bande M. On retrouve notamment des associations avec la titine, la myoméline, les ankyrines, la MyBP-C, la calmoduline ou encore la myosine (figure 20).

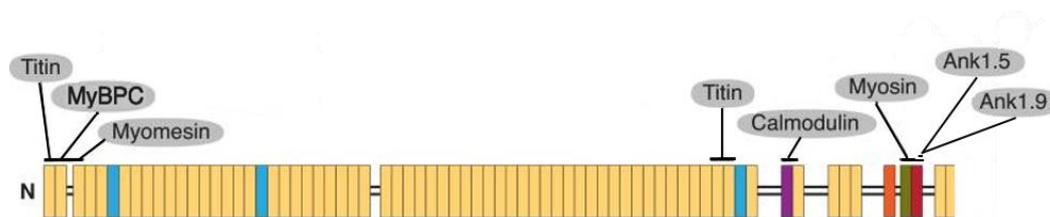


Figure 20 : Représentation schématique de l'obscurine et de ses interactions avec des protéines partenaires

Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009

b. La myotiline

Tout comme les précédentes protéines décrites, la myotiline, codée par le gène *MYOT1*(5q31), est une protéine myofibrillaire qui joue un rôle central dans l'assemblage du sarcomère. Côté N-terminal, elle est impliquée dans la stabilité et le contrôle du disque Z où elle y ancre les filaments fins d'actine grâce à des interactions avec l' α -actinine.

Côté C-terminal, elle s'homodymérise par ses domaines immunoglobulines avec une autre molécule de myotiline ce qui lui permet de couvrir l'intégralité d'un sarcomère (figure 21). De cette manière, elle régule la taille des fibres musculaires et participe au maintien de la masse musculaire (Salmikangas et al., 2003).

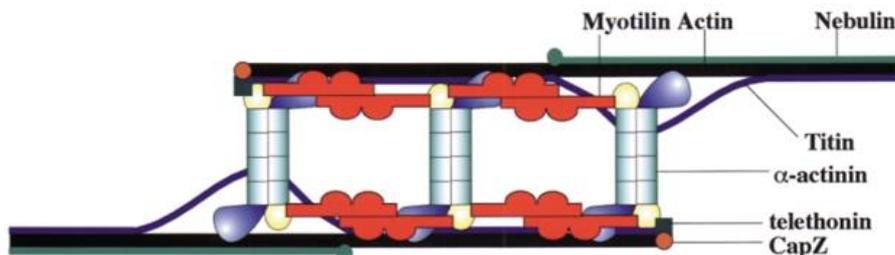


Figure 21 : Représentation schématique de l'assemblage de molécules de myotiline dans un sarcomère

Salmikangas et al., 2003

Lorsqu'elle est mutée, la myotiline est responsable de myopathie des ceintures de type 1A (LGMD1A) (Nigro and Savarese, 2014; Reilich et al., 2011).

c. L' α -actinine

L' α -actinine, présente sous forme dimérique dans les fibres contractiles, est le principal constituant de la strie Z dont elle détermine l'épaisseur. Il en existe quatre isoformes dont trois sont retrouvées au sein du muscle squelettique [*ACTN1*(14q22-24) ; *ACTN2*(1q42-43) ; *ACTN3*(11q13-14)]. L' α -actinine assure le lien entre les filaments fins en les interconnectant entre eux par des ponts moléculaires lâches, laissant ainsi la possibilité à la myosine II d'entrer dans le faisceau. Le nombre de ponts qu'elle effectue dans la strie Z est très variable puisqu'elle adapte sa structure aux contraintes mécaniques de chaque type de muscle. L' α -actinine n'est retrouvée que dans les faisceaux lâches, et est remplacée par la fimbrine dans les faisceaux serrés (Figure 22).

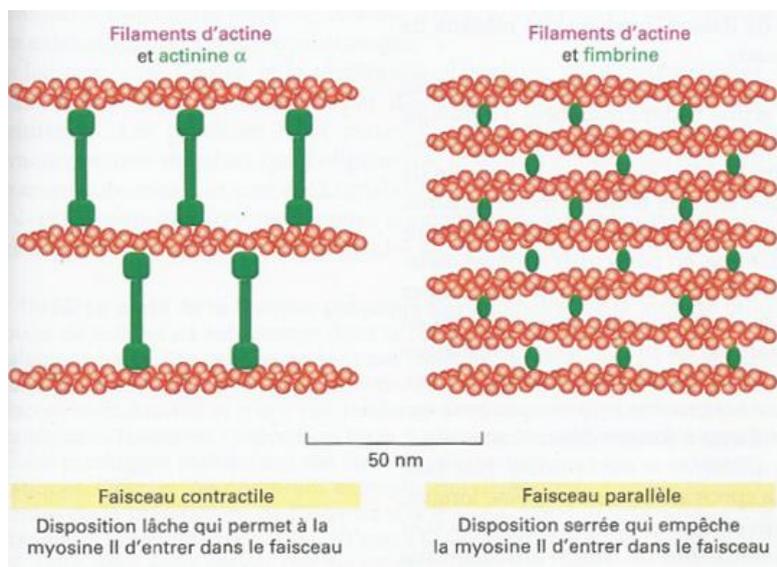


Figure 22 : Interconnexion, dans la strie Z, des filaments d'actine par l' α -actinine ou la fimbrine

Extrait de « Biologie moléculaire de la cellule - 5^e édition »

C. Les protéines de régulation du sarcomère

En plus de son rôle structural, la titine a également une fonction de « plateforme » pour différentes protéines régulatrices du sarcomère. Parmi elles, on retrouve la calpaïne 3, la téléthonine mais aussi les *Muscle Ankyrin Repeat Proteins* (MARPs) ou encore la *muscles-specific RING finger protein-1* (MURF-1).

a. La calpaïne 3

La famille des calpaïnes

Décrites pour la première fois en 1964, les calpaïnes (pour *Calcium-dependant papain-like protease*) « classiques » la calpaïne-1 (ou μ -calpain) et la calpaïne-2 (ou m-calpain), respectivement codée par les gènes *CAPN1* (11q13) et *CAPN2* (1q41), ont été les principales étudiées jusque dans les années 90.

Ce fût certainement dû au fait qu'elles s'expriment de manière ubiquitaire dans tous les tissus des mammifères. Depuis, une douzaine d'autres membres ont été caractérisés, la plupart « non classiques ». Ils sont ainsi qualifiés parce qu'ils ont subit des modifications de la structure primaire de leurs domaines ou bien parce qu'ils s'expriment spécifiquement dans un tissu ou un organe donné pour y remplir une fonction particulière (Ono et al., 2016). Toutes sont des protéases à cystéine, non lysosomiales et dépendantes du calcium. Leur rôle est de réguler les fonctions cellulaires en hydrolysant certains substrats de façon très limitée et spécifique.

A l'exception de la calpaïne 3 qui ne possède qu'une large et unique sous-unité catalytique, tous les membres de la famille sont des hétérodimères comportant une petite sous-unité régulatrice associée à une grande sous-unité catalytique. La première est toujours identique tandis que la seconde, elle, est variable selon le membre de la famille. L'unité catalytique comprend quatre domaines structuraux dont un domaine protéolytique, un domaine de liaison au calcium et deux domaines sans homologie connue (Ono and Sorimachi, 2012).

Zoom sur la calpaïne 3

La calpaïne 3 codée par le gène *CAPN3* (15q1-3) est exprimée de façon prépondérante dans le muscle squelettique où son ARNm est au moins dix fois plus abondant que ceux des grandes sous-unités des calpaïnes μ et m . Ce transcrit de 3,5kb code une protéine de 94kDa comportant les quatre domaines caractéristiques des calpaïnes et trois courtes régions spécifiques : NS (pour *N-terminal addition Sequence*), IS1 et IS2 (pour *Insertion Sequence*) (figure 23).

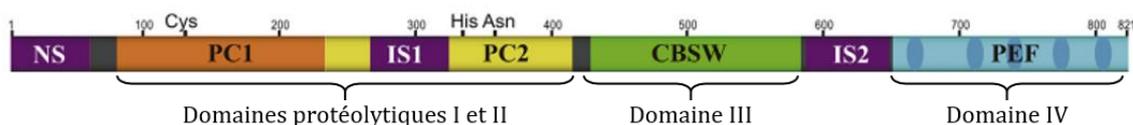


Figure 23 : Représentation schématique de la calpaïne 3 et de ses différents domaines

NS : *N-terminal addition sequence* ; IS1 : *insertion sequence* ; CBSW : *Calpain-type Beta-SandWich domain* aussi appelé *C2-domain-like domain (C2L)* ; PEF : *Penta EF hand domain*

Ono et al., 2016

Les domaines NS et IS1, respectivement situés dans la région amino-terminale de la protéine et dans un de ses domaines protéolytiques, sont spécifiques de la calpaïne 3 et renferment chacun un site d'autoclivage de la protéine. IS2 est quant à lui localisé entre les domaines III et IV et comprend un signal de localisation nucléaire ainsi qu'un site de liaison à la partie N2A de la titine (Ono et al., 2016).

A l'inverse des autres membres de sa famille, l'activité lytique de la calpaïne 3 fonctionne lorsque le taux de calcium cellulaire est bas ; son activation ne dépend pas d'un signal calcique. Sa demi-vie est extrêmement rapide et elle subit une autolyse immédiatement après sa traduction ; elle exerce, en outre, une activité protéolytique *in vitro* vis-à-vis d'autres protéines comme la fodrine ou la spectrine, deux protéines du cytosquelette se fixant sur l'actine et dont la structure est proche de celle de la dystrophine.

Le gène *CAPN3* est composé de 24 exons, couvre 40kb et a été localisé sur le chromosome 15 en 15q1-15q3. L'étude des ADN complémentaires (ADNc) du messenger de la calpaïne 3 humaine a mis en évidence des épissages alternatifs touchant les exons 6, 15 et 16 et aboutissant à une grande variété de messagers selon les tissus et le stade de développement. La traduction de ces isoformes entraîne des modifications de structure et de propriété de la calpaïne.

L'absence de l'exon 6 affecte l'autolyse de la protéine, mais pas la dégradation de la fodrine ni la liaison à la titine. Situé dans le site catalytique, l'exon 6 doit également jouer un rôle déterminant dans la reconnaissance d'un substrat spécifique. L'épissage de l'exon 15, qui porte un site de localisation nucléaire, peut moduler la localisation subcellulaire de la calpaïne. Quant à la délétion de l'exon 16, elle a deux effets : elle affecte les deux types de protéolyse, en accroissant leur dépendance vis-à-vis du calcium, et entraîne une augmentation de la liaison à la titine (Herasse et al., 1999; Ono et al., 2016).

Parmi les données récentes, une description de la structure cristalline de la calpaïne a été faite. Elle permet de comprendre comment le calcium modifie la conformation de l'enzyme et la rend fonctionnelle (Partha et al., 2014).

Chez l'adulte, la calpaïne s'exprime dans le tissu musculaire squelettique et les techniques d'immunofluorescence utilisant des anticorps spécifiques ont mis en évidence sa localisation dans le noyau.

Il a été également montré que, lors des dix premières semaines du développement embryonnaire humain, la calpaïne 3 s'exprime de façon prépondérante dans le cœur puis qu'elle y décroît tandis que son expression dans le muscle squelettique augmente (Ono et al., 2016).

C'est une protéine essentielle pour le bon fonctionnement du muscle squelettique et qui, lorsqu'elle est mutée, est responsable de la dystrophie des ceintures la plus fréquente, la LGMD2A (*Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2A*) encore appelée calpaïnopathie. Elle est le siège de très nombreuses mutations réparties sur toute sa séquence, sans point chaud mutationnel particulier.

Dans le but d'améliorer le diagnostic de la maladie, un pan de mes recherches a été consacré à l'étude du caractère pathogène de mutations faux-sens retrouvées chez des patients souffrant de calpainopathie. J'ai étudié leur impact sur l'épissage de CAPN3 et montré que quasiment la moitié d'entre elles provoquait la synthèse de transcrits aberrants codant une protéine non fonctionnelle. J'ai également établi que ce phénomène de modification d'épissage peut aussi s'observer pour des mutations synonymes, comme je l'ai démontré à partir d'une biopsie musculaire de patiente (Sevy et al., 2015).

b. La téléthonine

La téléthonine, codée par le gène *TCAP*(17q12), est une protéine sarcomérique de 19kDa exprimée dans les muscles cardiaque et squelettique au niveau des disques Z. Elle intervient dans le fonctionnement du tubule T, participe au bon assemblage du sarcomère et joue également un rôle dans l'apoptose (Ibrahim et al., 2013; Knöll et al., 2011). Les analyses structurales de la protéine montrent qu'elle est formée de diverses structures hélicoïdales comportant de nombreux repliements ce qui lui confère des rôles totalement différents aux extrémités N- et C-terminales (Sadikot et al., 2010).

Cependant, sa forme en épingle à cheveux lui confère une forme pseudo-symétrique qui permet la stabilisation antiparallèle de molécules de titine via deux domaines *Ig-like* spécifiques. Ainsi, il peut se former un complexe comprenant deux titines accrochées à une téléthonine. La formation d'un tel oligomère a pour but d'augmenter la cohésion des titines entre elles et de renforcer leur ancrage à la ligne Z. C'est la coordination titine/téléthonine qui permet l'équilibre dynamique des muscles, la stabilité (Pinotsis et al., 2006; Zou et al., 2006).

Lorsqu'elle est mutée, la téléthonine est responsable de myopathie distale et de myopathie des ceintures de type 2G (Nigro and Savarese, 2014). Elle est également connue pour jouer une action sur une des voies de signalisation de la myostatine (Markert et al., 2010).

c. Les Muscle Ankyrin Repeat Proteins (MARPs)

La famille des MARPs renferme plusieurs membres dont la *Cardiac Ankyrin Repeat Protein* (CARP) codée par le gène *Ankrd1* (10q23), la *Diabetes related Ankyrin Repeat Protein* (DARP) codée par *Ankrd23* (2q11) et l'*ANKYrin-Repeat Domain 2* (*Ankrd2* ; 10q23). Ces trois membres possèdent tous un signal de localisation nucléaire qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle de régulateur de la transcription génique. Les MARPs sont connues pour interagir avec la titine à la ligne Z mais surtout dans sa région N2A. Au niveau de ce dernier domaine, elles vont former un complexe avec la calpaïne 3 pour participer à la transduction de signaux entre la myofibrille et les noyaux (figure 24, voir paragraphe suivant) (Ojima et al., 2005).

Des études réalisées sur des modèles murins de LGMD2J et LGMD2A ont montré que la perte d'interaction entre titine et calpaïne 3 provoque une surexpression de CARP conduisant à une dégénérescence musculaire sévère. Ceci s'explique entre autres parce que l'expression de cette MARP est sous la dépendance de la calpaïne 3 qui la régule en la clivant du côté N-terminal. CARP joue elle-même un rôle important dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes tel que NF- κ B (Laure et al., 2009, 2010; Ojima et al., 2005).

d. La muscles-specific RING finger protein-1 (MURF-1)

Lorsque MURF-1 (TRIM63; 1p34) est exprimée de manière exogène dans des cellules musculaires, on constate une désorganisation de l'assemblage protéiques à la ligne M, autour de la titine. Cette protéine a donc un rôle critique dans la construction de l'échafaudage moléculaire mis en place à ce niveau (figure 24). D'autres expériences montrent qu'elle intervient dans la régulation de l'expression génique, notamment via des interactions avec la *glucocorticoid modulatory element binding protein-1* (GMEB-1, 1p35) qui contrôle la transcription en fonction des taux de glucocorticoïdes cellulaires (Ojima et al., 2005). Il a également été établi que MURF-1 a des activités ubiquitine-ligase qui lui permettent d'intervenir dans des processus d'atrophie musculaire et de contrôler le renouvellement protéique (Palma et al., 2008).

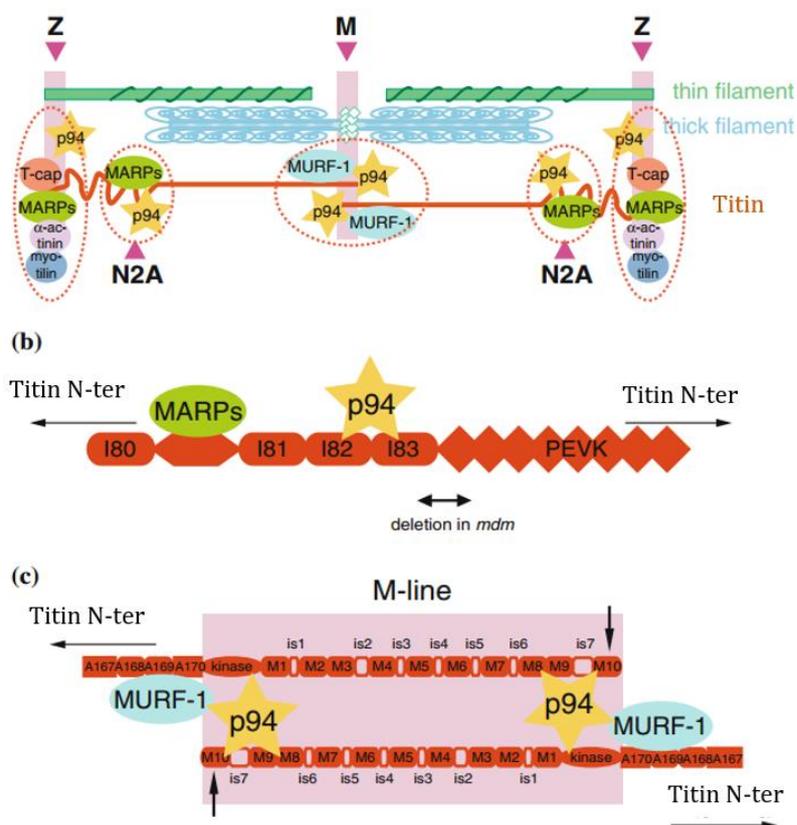


Figure 24 : Organisation des protéines de structure du sarcomère

P94 : Calpaïne 3

Ojima et al., 2005

Enfin, le site de fixation de MURF-1 sur la titine est proche du site de fixation de la calpaïne 3, ce qui laisse supposer qu'elles interagissent à ce niveau. Cette hypothèse est notamment appuyée par le fait que, chez les patients atteints de LGMD2A, on retrouve des taux de MURF-1 plus élevés que la normale et un niveau d'expression génique plus important. MURF-1 est donc une protéine qui joue un rôle important dans l'homéostasie du muscle squelettique (Fanin et al., 2013; Ojima et al., 2005).

D. Les protéines d'ancrage à la membrane basale

a. Les filaments intermédiaires et la desmine

Les filaments intermédiaires possèdent une structure moléculaire unique qui les distingue des autres composants du cytosquelette. A l'inverse de l'actine et de la myosine qui sont des protéines globulaires, l'unité de base des filaments intermédiaires est un dimère très allongé (~45 nm) et très fin (~2-3 nm). Dans le muscle squelettique comme dans d'autres types cellulaires dans lesquels ils sont présents, les filaments intermédiaires s'assemblent spontanément entre eux, sans suivre d'axe de polarité particulier. Ils s'organisent en un réseau supramoléculaire complexe qui s'étend de la surface du noyau à la membrane plasmique.

Ce sont des éléments très stables mais non statique, qui résistent à la dénaturation dans des tampons très dénaturants. Ce réseau implique l'association avec d'autres constituants du cytosquelette et la présence de nombreuses protéines "accessoires" dites IFAPs (*Intermediate Filament Associated Proteins*).

La desmine, codée par le gène *DES* (2q35) est un des principaux composants des filaments intermédiaires, c'est la protéine caractéristique des cellules musculaires. Localisée dans les disques Z et orientée longitudinalement, elle relie les myofibrilles les unes aux autres dans le sarcomère et les fixe d'un côté à la lame basale et de l'autre à la face cytosolique de l'enveloppe nucléaire (figure 25).

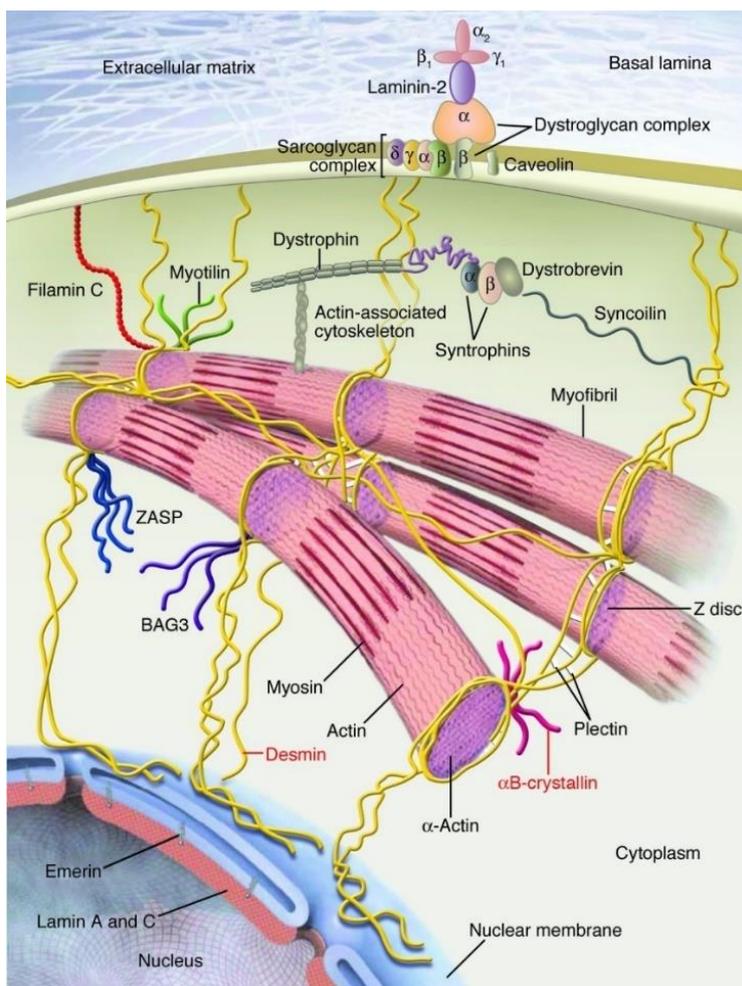


Figure 25 : Répartition des filaments de desmine dans la cellule musculaire

<http://www.jci.org/articles/view/38027/figure/1>

Cette organisation en réseau fibreux rigide permet la transmission, à la membrane plasmique, des forces générées par l'appareil contractile. La communication dans le sens inverse est également assurée par intégration de signaux en provenance de la matrice extracellulaire vers les organites cytoplasmiques.

Dans le muscle, la desmine interagit avec de nombreux partenaires et ce, à différents niveaux. Dans le sarcolemme, elle s'associe avec la nébuline, l'actine, la titine, l' α -actinine ou encore la myosine et la dynéine. Au niveau des jonctions neuromusculaires, on la retrouve interagissant avec la tubuline et la dystrobrevine. A l'opposée, ses connexions aux lamines lui permettent d'entrer en interaction de manière indirecte avec d'autres protéines telle que l'émerine ou encore le facteur MyoD (Frock et al., 2006).

Le nombre croissant de partenaires de la desmine tend à penser qu'elle joue un rôle important dans la régulation de la fonction musculaire. Son implication dans des pathologies musculaires telles que la LGMD1E ou 2R semble le confirmer (Nigro and Savarese, 2014).

3.2.3. La fibre musculaire

Les fibres musculaires sont des entités cellulaires cylindriques dont la longueur est proportionnelle à celle du muscle auquel elles appartiennent. Chacune d'entre elles est formée de la fusion de plusieurs centaines de cellules musculaires – ou myoblastes – en un syncytium plurinucléé. Les nombreux noyaux qui les constituent sont situés à la périphérie du cytoplasme (sarcoplasma), accolés à la membrane plasmique (sarcolemme) qui est elle-même doublée d'une lame basale. La fibre musculaire striée a un diamètre qui varie entre 10 et 100 nm, elle contient tous les organites et inclusions cellulaires classiques tels qu'un appareil de Golgi, des vésicules, de nombreuses mitochondries, un réticulum endoplasmique lisse et un granuleux.

A. Structure et composition interne

a. Le sarcolemme

Comme toute membrane plasmique, le sarcolemme constitue une interface entre l'environnement cellulaire interne et le milieu extracellulaire. Il est formé d'une double couche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées de nombreuses protéines transmembranaires qui représentent environ la moitié de sa masse totale.

Parmi les fonctions de ces protéines, on notera des rôles importants dans :

- Le transport sélectif, actif ou passif, de petites molécules (ions, glucose, acides aminés) et ce, grâce à l'utilisation de pompes à solutés ou de canaux hydrophiles insérés dans la membrane. Ce processus de transfert ionique participe de manière centrale à la production et la propagation du potentiel d'action dans la fibre.
- La réception de messages chimiques délivrés par les hormones et les neurotransmetteurs au pôle extracellulaire de la cellule et notamment au niveau de la plaque motrice.
- L'ancrage d'éléments du cytosquelette à la matrice extracellulaire et à la membrane basale afin de stabiliser le sarcolemme que sa composition rend très fluide.
- La transmission de la force de contraction produite au niveau du sarcomère jusqu'à la membrane basale.

Sur la face externe du sarcolemme, la plupart des protéines transmembranaires et certains lipides sont conjugués à des chaînes de polysaccharides pour former des glycoprotéines et des glycolipides. Plusieurs dystrophies musculaires sont directement liées à des déficits en ces protéines ou en protéines interagissant avec elles.

b. Le tubule transverse

La présence de tubules transverses (tubule T) est caractéristique des cellules musculaires. Ce sont de profondes invaginations du sarcolemme qui courent transversalement au travers de la fibre pour former un réseau complexe de branches en contact avec les myofibrilles (figure 26).

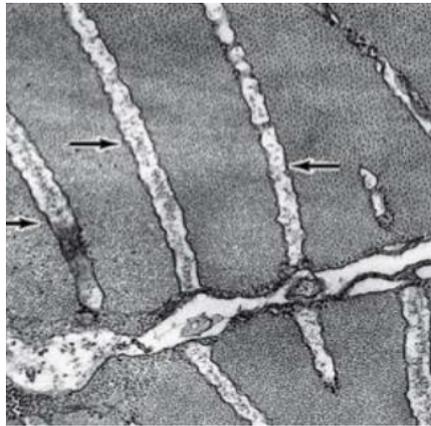


Figure 26 : Tubules transverses.

*Observation en microscopie électronique sur coupe longitudinale de fibres musculaires.
Les flèches indiquent les tubules T*

Extrait de « Junqueira's Basic Histology : Text and Atlas 12^e édition »

Ils permettent entre autres, d'apporter le potentiel d'action musculaire dans la profondeur de la cellule via leur contact avec les myofibrilles et l'appareil contractile. Les tubules T sont répartis régulièrement au sein de la cellule et sont positionnés à la jonction bande A/bande I.

c. Le réticulum sarcoplasmique

Dans la cellule musculaire, le réticulum endoplasmique lisse change de nom et devient le réticulum « sarcoplasmique », du fait du haut niveau de spécialisation qu'il acquiert notamment dans sa capacité à stocker et relarguer le calcium. C'est un sac membraneux complexe dont l'intérieur est entièrement séparé du cytoplasme de la fibre. Sa structure est faite de deux parties topographiquement distinctes : la première, appelée réticulum sarcoplasmique longitudinal apparaît tel un fin réseau qui court le long des myofibrilles. La seconde région est appelée réticulum sarcoplasmique jonctionnel, elle suit les tubules T à l'intérieur de la cellule et voit ses extrémités s'élargir en grosses protubérances, les citernes terminales (figure 27).

Cette différence structurale est assortie d'une différence fonctionnelle : le réticulum sarcoplasmique longitudinal est plus spécialement impliqué dans la recapture du calcium tandis que le jonctionnel est spécialisé dans sa libération.

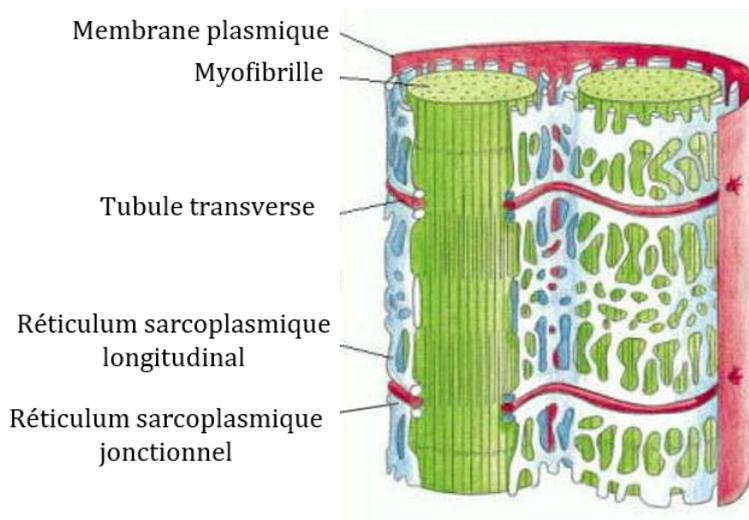


Figure 27 : Disposition du réticulum sarcoplasmique dans la cellule musculaire

Extrait de « Biologie moléculaire de la cellule – 5^e édition »

d. La triade

L'association d'un tubule T et des deux citernes terminales qui l'entourent forme une structure caractéristique appelée triade. Dans la zone de rencontre entre le tubule T et le réticulum sarcoplasmique, les deux membranes sont très proches l'une de l'autre c'est pourquoi, en microscopie électronique, on distingue des pieds de condensation liant les deux membranes (figure 28).

En section transversale sur ces mêmes coupes, les tubules T sont souvent vus aplatis, sous forme de triade avec une portion de réticulum sarcoplasmique arrondie de chaque côté. Ailleurs, leur section transversale a tendance à être circulaire.

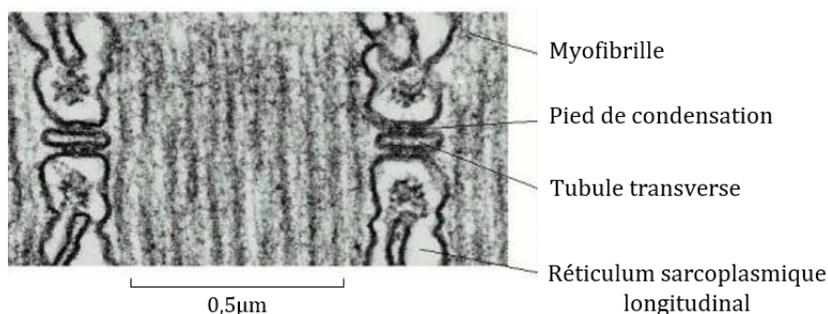


Figure 28 : Triades observées au microscope électronique

Extrait de « Biologie moléculaire de la cellule – 5^e édition »

Comme nous le verrons plus loin, la triade est un élément extrêmement important dans la cellule musculaire puisqu'elle renferme notamment des canaux calciques jouant un rôle crucial dans la contraction. Parmi les protéines qui la constituent, la triadine (*TRDN* ; 6q22) est un élément clé pour le maintien de sa structure et son fonctionnement optimal. En effet, quand elle est absente, comme c'est le cas dans le modèle murin KO-triadine, on observe une mauvaise orientation des tubules T et un aplatissement des citernes terminales (lumière du réticulum = 68nm chez la souris sauvage contre 26nm chez la souris KO) (figure 29) (Oddoux et al., 2009).

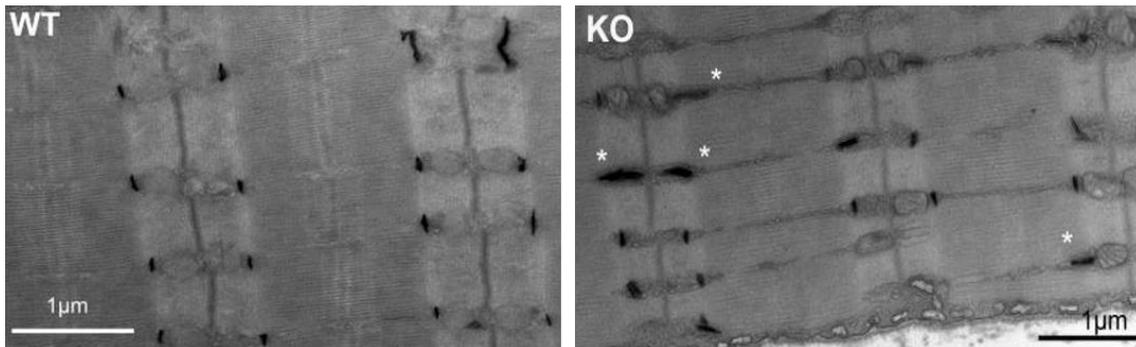


Figure 29 : Des défauts de structures du réticulum sarcoplasmique apparaissent chez la souris Ko-triadine.
Des tubules T sont retrouvés orientés perpendiculairement à la jonction bande A – bande I, et l'épaisseur de certaines citernes terminales est diminuée comparé au WT.

Oddoux et al., 2009

B. Environnement extérieur de la fibre

De toutes les interactions existantes entre les cellules d'un organisme pluricellulaire, celles intervenant dans le maintien des cellules entre elles sont les plus fondamentales. Elles peuvent être de différentes sortes, il peut s'agir d'adhésions entre cellules par l'intermédiaire de matériaux extracellulaires qu'elles sécrètent, de jonctions d'ancrage intercellulaires, de jonctions serrées... Quoi qu'il en soit, elles doivent d'une façon ou d'une autre, s'associer les unes aux autres pour constituer un tissu organisé. Ce chapitre se focalise sur l'environnement extérieur de la cellule musculaire.

a. La lame basale

La lame ou membrane basale se situe à l'extérieur de la membrane plasmique, c'est une fine feuille de matrice extracellulaire très résistante, qui sous-tend de près les épithéliums de tous les animaux multicellulaires. Chez les vertébrés, elle entoure chaque cellule musculaire et sépare les membranes plasmiques des cellules nerveuses et musculaires au niveau des synapses. C'est une structure librement perméable qui renferme des cellules spécifiques du muscle, les cellules satellites (voir page suivante). Au niveau de sa structure, la lame basale est formée d'un réseau de fibres qui s'organisent sur une ossature de glycoprotéines reliées les unes aux autres et maintenues serrées.

La composante fibreuse de cet espace est représentée par le collagène dont on connaît au moins dix-neuf variétés. Dans la cellule musculaire, la forme la plus abondamment retrouvée est le collagène de type VI assemblé en un réseau en forme de feuillet. Pour la fraction glycoprotéique, ce sont les molécules de laminine 2 qui sont majoritairement présentes, elles s'associent entre elles via leurs bras latéraux pour former un second réseau de soutien pour la cellule. Il faut ajouter à cela, le perlécane, un volumineux protéoglycane à héparane sulfate qui permet de souder les réseaux de collagène et de laminine entre eux. Enfin, on retrouve également dans la membrane basale, des intégrines et d'autres récepteurs sarcolemmaux.

Comme dans tous les épithéliums, la lame basale apporte un support mécanique au tissu musculaire et forme à la fois une interface et un point d'ancrage avec le tissu conjonctif lâche. Ce système d'amarrage entre les deux milieux permet à la cellule musculaire de s'adapter aux contraintes mécaniques, en particulier aux déformations qu'elle subit lors d'une contraction du muscle.

Elle peut néanmoins avoir d'autres rôles comme celui d'influencer la polarité et la différenciation cellulaire ou bien encore, servir de guide pour la migration des cellules satellites. En effet, après lésion d'une fibre musculaire, la membrane basale va former un cadre dans lequel aura lieu la régénération du muscle.

Dans la région synaptique, la lame basale a un caractère chimique distinct, avec des isoformes particulières du collagène IV et de la laminine, ainsi qu'un protéoglycane différent, l'agrine. Cette variation de composition lui permet de jouer un rôle central dans la reconstruction de la synapse après une lésion nerveuse ou musculaire. Elle va coordonner sa réorganisation spatiale dans chacun des deux types cellulaires qui forment la jonction neuromusculaire.

b. Les cellules satellites

Les cellules satellites sont appelées ainsi du fait de leur localisation en périphérie de la fibre, dans la lame basale (figure 30). Elles représentent une population de cellules myogéniques mononuclées non différenciées et sont responsables de la régénération musculaire.

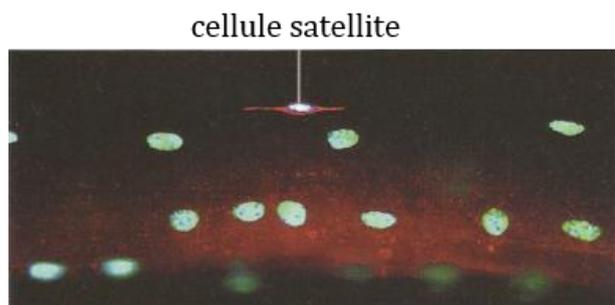


Figure 30 : Une cellule satellite dans une fibre musculaire squelettique

Extrait de « Biologie moléculaire de la cellule – 5^e édition »

En absence de lésion, elles sont maintenues dans un état quiescent en phase G0 du cycle cellulaire. Lors de leur activation, après une lésion d'origine génétique ou traumatique, elles sortent de cet état, repartent dans le cycle cellulaire et adoptent un phénotype activé caractéristique, très proche de celui des myoblastes embryonnaires. Elles vont par exemple ré-exprimer le facteur de transcription MyoD, proliférer puis sortir à nouveau du cycle cellulaire pour s'engager dans la voie de différenciation nécessaire à la réparation des fibres lésées.

Lors de leur activation, une minorité de cellules satellites échappent à la prolifération et retournent à un état quiescent sans s'être différenciées. Ce phénomène de division asymétrique permet de restaurer la population de cellules satellites précurseurs. Néanmoins, il a été démontré que la capacité proliférative de ces cellules est limitée chez l'être humain, elles se rapprochent plus dans ce sens de progéniteurs spécifiques musculaires que de véritables cellules souches.

Ainsi, dans le cas des dystrophies musculaires, cette population cellulaire pourra palier aux déficits engendrés par les protéines défectueuses mais ce, uniquement jusqu'à épuisement du stock de cellules de réserve. C'est à partir de cette étape que la maladie va progresser et que la dégénérescence musculaire va s'amplifier (Jiang et al., 2014).

c. Les costamères

Les costamères sont généralement décrits comme des épaississements de membrane disposés à intervalles réguliers sur la face interne du sarcolemme, en regard des stries Z. Leur rôle est identique à celui des contacts focaux observés au pôle basal des cellules épithéliales : ils servent à attacher et renforcer le contact entre la membrane sarcoplasmique et la lame basale. Ce sont des sites bien délimités dans lesquels on retrouve de nombreuses protéines, notamment la dystrophine, qui interviennent dans la mise en place des renforcements entre la cellule et son milieu extérieur.

Dans la partie intracellulaire, au niveau des costamères, diverses molécules telles que plectrine/desmïne ou encore vinculine/actine s'associent pour former des complexes qui vont interagir avec des intégrines, plus particulièrement les intégrines $\beta 1$, au niveau du sarcolemme. En regard de ces molécules, l'interaction se prolonge dans la lame basale, entre les intégrines et d'autres protéines comme la fibronectine.

La bonne mise en place d'un tel échafaudage protéique est indispensable à la survie et au bon fonctionnement des fibres musculaires. Comme nous le verrons dans les chapitres suivants, il est nécessaire de considérer la cellule musculaire comme un ensemble intégré où le dysfonctionnement d'un seul maillon de la chaîne retentit sur la capacité fonctionnelle du tout.

d. La matrice extra cellulaire et l'endomysium

Comme nous venons de le voir, la lame basale est une portion spécialisée de matrice extracellulaire, commune à tous les épithéliums et considérée comme un archétype exemplaire. Il faut donc la distinguer de la matrice extracellulaire dans sa forme classique, qui est plus volumineuse, plus variée et qui se trouve dans les tissus conjonctifs. Ces tissus renferment de nombreux fibroblastes qui sécrètent des éléments constituant la matrice extracellulaire. Il est intéressant de noter que les molécules qui constituent la lame basale et la matrice extracellulaire sont largement similaires mais qu'elles ne sont pas présentes dans les mêmes proportions et peuvent varier dans leur organisation.

Dans le muscle, les fibroblastes sont situés encore plus à la périphérie de la lame basale, entre les fibres musculaires. Ils sécrètent les fibres de collagène qui vont s'associer aux chaînes de glycosaminoglycanes et aux protéoglycanes pour former l'endomysium. Ceci constitue la « substance fondamentale », un gel fluide hydrophile au sein duquel ions et métabolites diffusent aisément.

Les intégrines, composants principaux de la matrice extracellulaire

Les cellules fabriquent la matrice extracellulaire, l'organise et la dégrade. La matrice en retour exerce de puissantes influences sur les cellules. Ces influences sont surtout exercées par des protéines transmembranaires d'adhésion cellulaire, qui agissent comme des récepteurs de la matrice. Ces récepteurs attachent la matrice extracellulaire au cytosquelette de la cellule, mais leur rôle ne s'arrête pas à cette simple liaison mécanique passive. Plusieurs types de molécules peuvent servir de récepteurs ou corécepteurs mais, sur les cellules animales, les récepteurs principaux sont les intégrines.

Comme les cadhérines qui servent principalement à attacher les cellules entre elles, ce sont des maillons transmembranaires dont le rôle est d'ancrer les protéines de la matrice extracellulaire au cytosquelette des cellules musculaires (généralement via des connexions avec l'actine). Elles jouent également un rôle dans les adhésions cellule à cellule ainsi que dans la migration et la différenciation des cellules au cours du développement.

Ces protéines réceptrices du sarcolemme sont des molécules dimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Il existe de nombreuses isoformes de ces molécules qui peuvent s'associer et donner naissance à une grande variété d'hétérodimères. Certaines sont spécifiques d'un tissu, comme la sous-unité $\alpha 7$ qui ne s'exprime que dans les muscles squelettiques et cardiaque. Dans ces organes, elle est retrouvée associée à la sous-unité $\beta 1$ avec laquelle elle forme un important récepteur cellulaire pour la laminine 2.

Les membres de cette famille ont la capacité de transmettre des signaux à travers la membrane plasmique, dans les deux sens. La liaison d'une composante de la matrice à une intégrine peut envoyer un message vers l'intérieur de la cellule, mais les conditions intracellulaires peuvent aussi envoyer un signal vers l'extérieur, pour contrôler la liaison de l'intégrine à la matrice. Une tension appliquée sur une intégrine fait qu'elle renforce sa prise sur les structures intra- et extracellulaires, à l'inverse, la perte de tension peut l'inhiber entraînant alors une séparation des complexes de signalisation moléculaire de chaque côté de la membrane. De cette façon, les intégrines peuvent non seulement servir à transmettre un signal, mais également à le convertir en un autre type de message.

e. Les cavéoles

Lorsque la fibre musculaire n'est pas sollicitée et qu'elle est maintenue à sa longueur de repos, son sarcolemme apparaît gondolé, couvert de petites dentelures, les cavéoles. Ce sont de petites invaginations de membrane en forme de vésicules rondes ouvertes vers l'extérieur qui permettent d'augmenter la surface musculaire de 60 à 80% pendant le développement et même à l'âge adulte.

Fixées dans la membrane et étroitement unies au système tubulaire transverse, elles jouent un rôle dans l'organisation de la membrane, le trafic membranaire, la pynocytose ou encore la transduction de signaux. Les cavéoles représentent également des sites d'arrimages pour protéines de signalisations dans les zones membranaires riches en lipides particuliers. Dans le muscle, une protéine spécifique intervient dans leur constitution, la cavéoline 3. Cette protéine, connue pour interagir avec la dystrophine et le complexe « *Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex* » (*DAGC*), joue un rôle clé dans la fusion des myoblastes en myotubes lors du processus de maturation des fibres musculaires.

3.3. Les faisceaux et enveloppes externes du muscle

Dans le muscle, les fibres musculaires sont groupées en faisceaux et assemblées entre elles par du tissu conjonctif organisé en trois enveloppes interconnectées.

3.3.1. L'endomysium

La première enveloppe conjonctive qui entoure individuellement chaque fibre musculaire est l'endomysium. Comme nous l'avons vu précédemment, il est essentiellement composé de matrice extracellulaire, un tissu conjonctif lâche qui renferme des fibroblastes, des capillaires, des fibres nerveuses sensibles et motrices mais également des mastocytes prêts à intervenir en cas de réactions inflammatoires.

3.3.2. Le périnysium

Le périnysium assemble les différentes fibres musculaires qui se regroupent pour former des fascicules. Ils renferment les faisceaux musculaires (chacun constitués de dix à cent fibres) ainsi que des artérioles et veinules qui donneront naissance, dans l'endomysium, au fin réseau de capillaires qui assure la vascularisation de chaque fibre musculaire. Dans cette enveloppe, on trouve également des rameaux nerveux constitués de fibres myéliniques dont les branches vont se ramifier dans l'endomysium pour terminer à la jonction neuromusculaire, au centre de chaque fibre qu'elles innervent.

3.3.3. L'épimysium

L'épimysium est l'enveloppe la plus externe, c'est un tissu conjonctif dense qui entoure plusieurs faisceaux pour constituer le muscle à proprement parlé. Il est traversé par de gros vaisseaux, artères et nerfs qui s'y ramifient avant de pénétrer dans les couches musculaires plus internes.

3.3.4. Les tendons

A l'extrémité des fibres musculaires, les membranes externes deviennent irrégulières, dentelées et se lient étroitement au tissu conjonctif pour former les tendons.

Le rôle des tendons est d'unir les muscles au squelette osseux et de réguler la contraction musculaire. Flexibles et très résistants, ils sont principalement composés de fibres de collagène I et d'élastine qui leur confèrent des propriétés viscoélastiques. Ils ont également une capacité à emmagasiner de l'énergie pour leur permettre de s'adapter à l'exercice physique.

Selon les pièces squelettiques sur lesquelles ils s'insèrent et en fonction du type de muscles auxquels ils sont attachés, la forme des tendons varie : ils peuvent être ronds, plats, courts ou longs. Sur le plan structural, les tendons peuvent être divisés en trois régions : la jonction musculo-tendineuse, le corps et la jonction tendino-osseuse. Chacune de ces régions intervient dans le transfert des forces mécaniques aux articulations et amortie ainsi les contraintes sur les structures péri-articulaires comme les ligaments.

4. Fonctionnement du muscle

4.1. Jonction neuromusculaire et membrane postsynaptique

La jonction neuromusculaire est une structure essentielle pour le fonctionnement du muscle car elle assure la transmission de la commande provenant du motoneurone α , qu'elle soit d'origine volontaire, automatique ou réflexe déclenchant ainsi la contraction musculaire grâce à un médiateur, l'acétylcholine.

Une jonction neuromusculaire est une connexion synaptique entre la branche axonale d'un motoneurone et la fibre musculaire. On ne la voit pas souvent en microscopie électronique sur des coupes issues de biopsies car il y a seulement une jonction par fibre et la probabilité que la coupe passe par cette région est faible. A ce niveau, le sarcolemme présente des replis très irréguliers ; il y a souvent des noyaux ainsi qu'une accumulation de glycogène et de mitochondries juste sous la jonction.

Dans la terminaison présynaptique, l'acétylcholine est stockée dans les vésicules avec de l'ATP et une hormone peptidique, le « *calcitonin gene-related peptide* ». Les potentiels d'action, qui arrivent au niveau de la terminaison axonale, ouvrent des canaux calciques voltage dépendants. L'afflux de calcium provoque alors la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane nerveuse présynaptique et la libération de leur contenu dans l'espace synaptique. Ce relargage est donc dépendant de la présence de calcium à l'extérieur, et est ralenti par une concentration élevée de magnésium. La quantité d'acétylcholine relâchée à partir d'une seule vésicule synaptique s'appelle un *quantum*.

La membrane postsynaptique de la fibre musculaire contient des récepteurs à l'acétylcholine qui sont situés sur les crêtes de plis. La cholinestérase, l'enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine, est synthétisée par la fibre musculaire et sécrétée dans l'espace synaptique où elle se lie à la lame basale qui remplit l'espace synaptique. La liaison de l'acétylcholine au récepteur postsynaptique entraîne une dépolarisation de la membrane de la fibre musculaire. La propagation de cette dépolarisation dépend du nombre de récepteurs liés à l'acétylcholine, qui dépend lui-même du nombre de vésicules synaptiques ayant libéré leur contenu dans la fente synaptique.

Un seul *quantum* d'acétylcholine produit une dépolarisation de la membrane appelée potentiel de plaque motrice miniature (MEPP). S'il y a suffisamment de *quanta* d'acétylcholine libérés en même temps, les MEPP vont s'additionner et produire une dépolarisation suffisamment importante pour déclencher un potentiel d'action. La membrane musculaire postsynaptique est riche en canaux sodiques, particulièrement dans ses plis ; cela assure la naissance d'un grand potentiel d'action à partir de la dépolarisation, qui va se propager le long du sarcolemme et des membranes des tubules T. Une fois hydrolysée, la choline libre est recaptée par la terminaison axonale présynaptique où elle est synthétisée de nouveau en acétylcholine.

4.2. Propagation du potentiel d'action et couplage excitation-contraction

Dès que l'influx nerveux arrive à la plaque motrice, l'acétylcholine est libérée dans la fente synaptique, se fixe sur les récepteurs nicotiques et déclenche leur ouverture. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des canaux ioniques activés par des ligands (*Ligand-Gated Ion Channels* ou LGIC). Ils sont composés de cinq protéines transmembranaires arrangées en un hétéropentamère comprenant deux sous-unités α et trois autres sous-unités distinctes : β , γ , et δ . L'ensemble forme un pore permettant le passage de cations à travers la membrane.

L'ouverture du récepteur nicotique provoque une entrée et une diffusion massive d'ions sodium dans le sarcoplasme qui font naître à leur tour, une vague de dépolarisation. La différence de potentiel ainsi créée va se propager tout le long du sarcolemme, dans les tubules T, et se diffuser jusqu'aux citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. Il en résulte un afflux massif de calcium dans le cytoplasme.

Dès lors, les ions calcium vont pouvoir se fixer sur la sous-unité C de la troponine et initier le changement de conformation du complexe tropomyosine/troponine/actine pour libérer les sites de fixation de la myosine sur les microfilaments. Par hydrolyse d'ATP, les têtes de myosine vont se mettre en mouvement et enclencher le glissement des filaments fins sur les filaments épais. Ce processus est connu sous le nom de couplage excitation-contraction car il permet la transformation d'un signal électrique en un travail mécanique (figure 31).

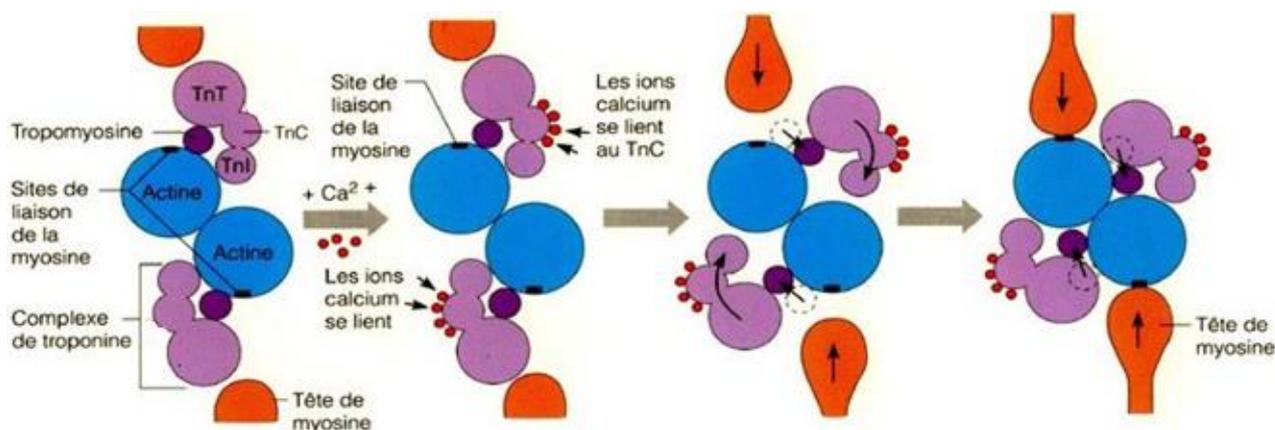


Figure 31 : Régulation de la contraction via le complexe tropomyosine/troponine

D'après : <https://coeuretmaladiescoronariennes.files.wordpress.com/2016/05/img411.jpg?w=1075>

4.3. Rôle du Calcium

Le calcium est l'élément clé dans la gestion de la contraction puisque c'est sa concentration intracellulaire qui détermine l'état d'activation du muscle. Au repos, elle est faible ($<0,1\mu\text{M}$) mais peut grimper jusqu'à mille fois plus pour atteindre $0,1\text{mM}$ lors d'une stimulation. De ce fait, les mouvements calciques dans la cellule doivent être strictement contrôlés pour que l'homéostasie cellulaire soit maintenue.

La plus grande partie des flux et reflux de calcium est sous la dépendance d'un gradient de concentration qui existe entre le compartiment cytosolique et le milieu extracellulaire. C'est l'utilisation de divers transporteurs ainsi que la gestion de l'ouverture ou de la fermeture de canaux situés sur la membrane plasmique qui va permettre un premier niveau de régulation. Un autre point de contrôle important s'effectue au niveau d'une réserve calcique intracellulaire, le réticulum sarcoplasmique (Harraz and Altier, 2014).

Plusieurs familles de canaux répartis sur différentes membranes, participent à l'entrée massive de calcium dans le sarcoplasme lors de la contraction ainsi qu'à sa sortie lors de la relaxation musculaire. Ils sont décrits plus en détails dans les paragraphes suivants.

4.4. Les canaux mis en jeu au cours de la contraction musculaire

4.4.1. Les canaux sarcolemmaux contrôlant l'entrée extracellulaire de calcium

A. Les canaux calciques voltage-dépendants (*Voltage-Dependent Ca²⁺ Channels (VDCC)*)

a. Le récepteur aux dihydropyridines (DHPR)

Ce premier groupe de canaux est le plus fréquemment retrouvé sur la membrane plasmique des cellules excitables. Les différents membres qui le constituent sont activés par des différences de potentiels bien définies. Le principal représentant de cet famille est le récepteur aux dihydropyridines (voir plus loin).

B. Les canaux calciques non voltage-dépendants

a. Les *Receptor-Operated Channels (ROC)*

Les premiers sont les *Receptor-Operated Channels (ROC)* qui s'ouvrent suite à la fixation de ligands tels que le diacylglycérol (DAG) sur leur domaine intracytosolique. Leur activation résulte de la mise en place d'une cascade de réactions mettant en jeu des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et des récepteurs tyrosine-kinase (RTK). Ces deux types de récepteurs activent la phospholipase C (PLC) qui va à son tour, hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). C'est cette dernière molécule qui activera les ROC pour permettre l'entrée de calcium extracellulaire.

b. Les Store-Operated Channels (SOC)

Autres membres de la famille des canaux calciques non voltage-dépendants, les *Store-Operated Channels* (SOC) encore appelés *Calcium Release-Activated Channels* (CRAC) ou *Calcium Induced Calcium Release* (CICR) s'activent lorsque la concentration calcique du réticulum sarcoplasmique diminue.

L'information est alors transmise au sarcolemme via un messenger « senseur calcique », STIM1, situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique. Ce processus d'activation est décrit plus en détail dans le paragraphe « couplage STIM1/SOC ».

c. Les échangeurs d'ions sodium/calcium (NCX)

Les échangeurs d'ions sodium/calcium (*Na⁺/Ca²⁺ exchanger* (NCX)) constituent la troisième et dernière famille de molécules permettant les mouvements d'ions calcium entre les milieux intra et extracellulaires. Ce sont des transporteurs sodiques et calciques contrôlés par un gradient ionique (3Na⁺/1Ca²⁺) de manière ATP-indépendante. Ils ont la particularité de fonctionner dans les deux sens, soit selon un mode « *forward* » couplant un influx de sodium à une extrusion calcique contre son gradient électrochimique, soit selon un mode « *reverse* » permettant une entrée de calcium dans la cellule et une sortie sodique simultanée (Altamirano et al., 2014). Retrouvés dans différents tissus et notamment dans le muscle cardiaque (Iwamoto et al., 2007; Philipson and Nicoll, 2000), les NCX sont principalement mis en jeu dans le sens *forward*.

Trois isoformes distinctes ont été identifiées : NCX1, NCX2 et NCX3. Seules les isoformes 1 et 3 sont retrouvées exprimées au niveau des tubules transverses et du sarcolemme dans le muscle squelettique. L'expression de NCX1 est prépondérante durant le développement embryonnaire et la maturation postnatale puis décroît graduellement et concomitamment avec l'augmentation de NCX3, qui sera elle, prédominante dans le muscle mature (Altamirano et al., 2014).

4.4.2. Les récepteurs membranaires contrôlant la sortie de calcium du réticulum sarcoplasmique

Comme nous l'avons vu précédemment, la contraction musculaire est due à une augmentation très importante du calcium cytosolique notamment via une libération massive de calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique.

A. Les récepteurs à la ryanodine

Plusieurs canaux participent à ce phénomène de relargage. Le principal est le récepteur à la ryanodine (RyR1) qui fait partie du complexe de relâchement du calcium décrit en détail plus loin.

B. Les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)

Sur la membrane du réticulum, on trouve également des récepteurs de type IP3R qui s'ouvrent lorsqu'ils fixent leur ligand, l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). Comme les molécules de diacylglycérol précédemment décrites, l'IP3 résulte du clivage du PIP2 par la protéine PLC. Ces récepteurs sarcoplasmiques sont donc activés de manière indirecte par les RCPG et les RTK.

C. Les récepteurs « senseur calcique »

Les derniers récepteurs auxquels nous nous intéresserons dans l'étude de l'augmentation cytosolique de calcium sont les récepteurs de type *STromal Interaction Molecule* (STIM). Ils sont majoritairement situés à la membrane du réticulum sarcoplasmique et servent de messenger pour les récepteurs SOC situés sur le sarcolemme.

4.4.3. Le complexe de relâchement du calcium (CRC)

Dans le muscle squelettique, le calcium est majoritairement libéré au niveau de la triade par l'association de deux canaux principaux qui forment le complexe de relâchement du calcium (CRC).

Le premier est un canal calcique voltage dépendant, le récepteur aux dihydropyridines (DHPR), situé sur la membrane du tubules T dans la triade. Il est activé par l'arrivée du potentiel d'action dans le tubule T.

Le second, situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique face au DHPR, est le récepteur à la ryanodine (RyR1). C'est ce récepteur-canal qui va permettre la sortie de calcium du réticulum vers le sarcoplasme.

La structure très spécifique du CRC permet un couplage physique entre le DHPR et le RyR1 qui est à la base de la libération de calcium. En effet, lors de l'arrivée de la vague de dépolarisation dans les invaginations du sarcolemme, la sous-unité $\alpha 1$ des récepteurs DHPR change de conformation permettant alors une interaction physique entre le DHPR et le RyR1. La communication entre les deux structures conduit à l'ouverture du canal RyR1 et à la libération des stocks de calcium depuis la lumière du réticulum vers l'espace cytoplasmique. Ce mécanisme est appelé le « *Voltage Induced Calcium Release* » (VICR) (Lamb, 2000). La sortie de calcium du réticulum va être massivement amplifiée par un autre mécanisme appelé « libération du calcium induite par le calcium » (*Calcium Induced Calcium Release* (CICR)). En effet, les premiers ions calcium libérés dans le cytoplasme vont très rapidement se fixer sur d'autres récepteurs membranaires voisins qui induiront à leur tour une augmentation du taux calcique intracellulaire.

4.4.4. Le couplage STIM1/SOC

Lorsque le muscle est au repos, une grande quantité d'ions calcium est présente à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique et certains de ces ions sont fixés sur la sous-unité intraluminaire de la protéine *STromal Interaction Molecule 1* (STIM1). Cette protéine transmembranaire de 90kDa est codée par le gène *STIM1* (11p15) dont le transcrit comporte 12 exons. La partie cytosolique qui la compose est de taille plus importante (figure 32).

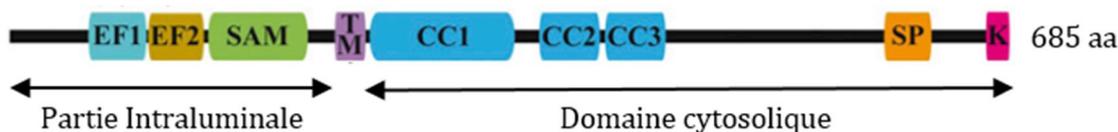


Figure 32 : Représentation schématique de la protéine STIM1

Tant que des molécules de calcium sont liées à ses deux domaines *EF-hand* intraluminaux, STIM1 reste inactive. Lorsque le phénomène de contraction musculaire survient, la quantité de calcium intra-sarcoplasmique diminue puisque le calcium se déverse dans le cytosol et les ions qui étaient fixés sur STIM1 s'en détachent ($K_D \approx 200 \mu M$) (Soboloff et al., 2012). La libération des *EF-hand* active alors la protéine qui s'homodimérise puis s'oligomérise, et se transloque dans des zones de contact entre sarcolemme et réticulum sarcoplasmique. C'est dans ces régions qu'elle va interagir avec des récepteurs partenaires de type « *Store Operated Channels* » et les activer. Parmi ces récepteurs, son principal partenaire avec qui elle interagit physiquement via son domaine SOAR (*Stim-Orai Activating Region*) est le récepteur ORAI1 (12q24) (figure 33) (Soboloff et al., 2012).

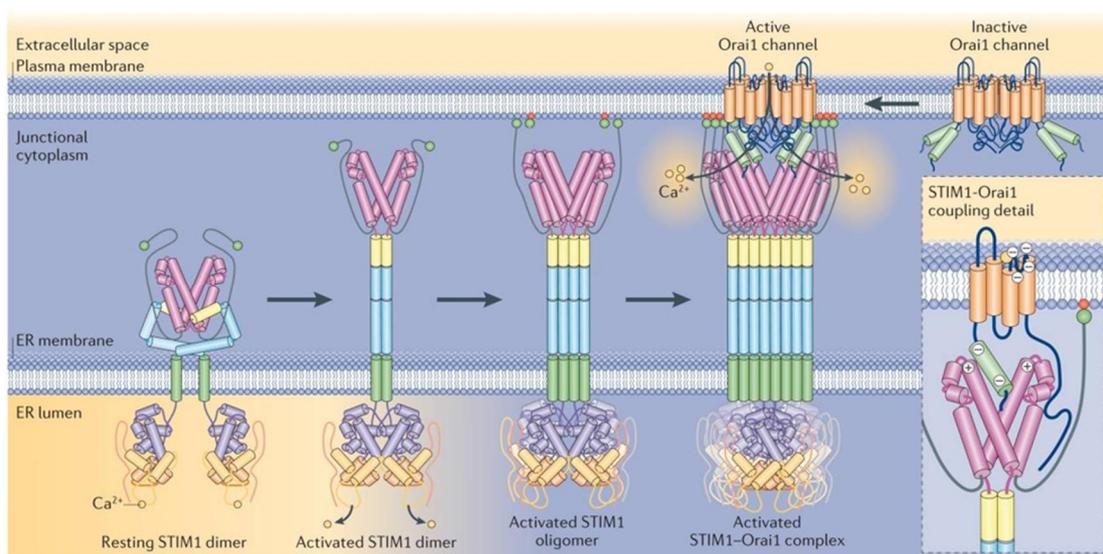


Figure 33 : Activation du récepteur membranaire ORAI1 par STIM1

L'activation de STIM1 est provoquée par le décrochage des ions calcium de ses sites EF-hand. S'en suit une dimérisation puis une oligomérisation de plusieurs molécules STIM1 qui iront activer ORAI1

Soboloff et al., 2012

L'étude de la dimérisation de STIM1 et de son interaction physique avec ORAI1 est un des quatre thèmes que j'ai abordé au cours de mes travaux de doctorat.

Dans une autre étude réalisée par Várnai et collaborateur, il est rapporté que STIM1 s'associe à une protéine, la « *End-Binding protein 1* » (EB1) codée par le gène *MAPRE1*(20q11), pour se transloquer vers la membrane (figure 34). Localisée à l'extrémité + des microtubules, EB1 a pour rôle de réguler la dynamique des microtubules et de favoriser leur élongation. Via ces actions, elle va déplacer les *clusters* de STIM1 dans la membrane sarcoplasmique et les amener dans des zones de contact avec le sarcolemme. Ainsi, les récepteurs STIM1 vont informer les récepteurs SOC qu'une déplétion calcique s'est produite dans le réticulum et que la contraction musculaire est en cours. Cela provoquera alors l'entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire (Várnai et al., 2009).

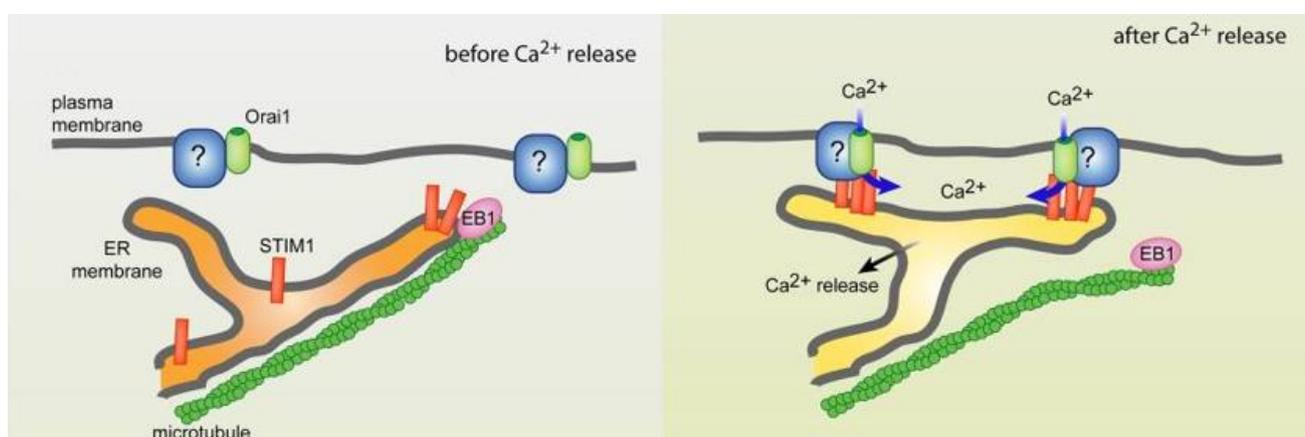


Figure 34 : EB1 interagit avec STIM1 pour l'amener à la membrane plasmique activer ORAI1

Várnai et al., 2009

4.4.5. STIM1L

Un transcrite alternatif nommé STIM1L (L pour long) a été mis en évidence, d'abord chez la souris dans de nombreux organes dont les muscles, puis chez l'homme dans des fibres musculaires adultes ainsi que dans des myotubes en culture. Plus long que le transcrite « classique », il est le résultat de la rétention d'une séquence de 318 nucléotides située tout de suite en aval de l'exon 11 (Darbellay et al., 2011). Ces 106 acides aminés supplémentaires portent un site de liaison à l'actine permettant l'ancrage de la protéine de 115kDa à la membrane.

Ainsi, cela favorise un « pré-groupement » au niveau du sarcolemme entre STIM1L et ORAI1, avant même qu'une déplétion calcique ne survienne. Lorsque cette dernière va se produire, la proximité entre ORAI1 et STIM1L va permettre une première activation rapide d'ORAI1 et l'ouverture de son canal. L'ouverture des autres canaux suite à l'association de STIM1 avec ORAI1 aura lieu environ deux minutes plus tard, le temps que les *clusters* de STIM1 soient amenés à la membrane.

4.4.6. STIM2

Une autre protéine de la même famille que STIM1, STIM2 (4p15) peut aussi se lier à ORAI1 et en déclencher l'ouverture : c'est la protéine issue du transcrite STIM2 α qui exerce ce rôle. Comme de très nombreux autres gènes, le gène STIM2 est soumis à l'épissage alternatif. La protéine produite par le transcrite STIM2 β , quant à elle, produit l'effet inverse lorsqu'elle se lie à ORAI1 : elle provoque la fermeture du canal calcique (figure 35). Ce phénomène semble se produire au cours de la différenciation cellulaire ou en réponse à différents signaux environnementaux (Rana et al., 2015).

L'hypothèse d'une régulation d'épissage dépendante de l'état physiologique de la cellule est avancée par les auteurs de l'étude : Lorsque l'expression de STIM2 β n'est pas nécessaire, la production de son transcrite est diminuée en faveur du transcrite STIM2 α et les protéines STIM2 β présentes dans le milieu sont dégradées (Rana et al., 2015).

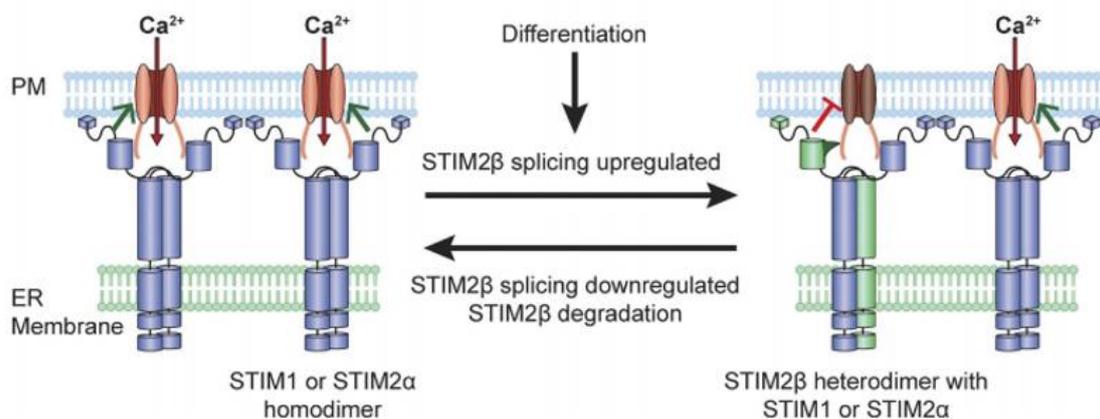


Figure 35 : Modèle de régulation des SOC par STIM2

Rana et al, 2015

4.5. Les récepteurs mis en jeu au cours du relâchement musculaire

Nous l'avons vu, la contraction est induite par une dépolarisation membranaire et une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Le relâchement musculaire est donc logiquement obtenu suite à la repolarisation des membranes et au retour, dans le cytosol, à un faible taux de calcium. Plusieurs phénomènes sont ainsi simultanément mis en jeu : les canaux sodiques et calciques décrits précédemment se referment tandis que d'autres canaux ioniques à effets antagonistes s'ouvrent.

4.5.1. Les récepteurs sarcolemmaux contrôlant la sortie de calcium

Pour que la concentration calcique intra-cytoplasmique diminue rapidement, la membrane du sarcolemme est équipée de protéines spécifiquement dédiées à la sortie active ou passive du calcium.

A. Les pompes Ca^{2+} /ATPase

Les pompes « *Plasmic Membrane Ca^{2+} ATPase* (PMCA) » utilisent l'ATP pour fonctionner activement contre le gradient ionique de la cellule. Pour une molécule d'ATP hydrolysée, deux molécules de calcium sont rejetées en dehors de la cellule.

B. Les échangeurs d'ions sodium/calcium (NCX)

Déjà décrits précédemment, les NCX sont contrôlés par un gradient électrochimique de sodium leur permettant de fonctionner dans les deux sens. Ainsi lors de la relaxation, les pompes à sodium voltage-dépendantes présentes sur la membrane plasmique sont fermées et les ions Na^{2+} ne peuvent plus rentrer dans la cellule. Les échangeurs d'ions sodium/calcium fonctionnent alors en faisant sortir une molécule de calcium à l'extérieur de la cellule pour faire rentrer trois molécules de sodium.

4.5.2. Les récepteurs membranaires du réticulum sarcoplasmique contrôlant le recaptage calcique

A. Les pompes SERCA (*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPases*)

Sur la membrane du réticulum sarcoplasmique comme sur le sarcolemme, il existe des canaux spécialisés dans le pompage actif du calcium en dehors du cytosol. Ces pompes SERCA (*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPases*) interviennent pour remplir les stocks intracellulaires de calcium tel que le réticulum sarcoplasmique afin qu'ils soient à nouveau disponibles lors de la prochaine contraction musculaire.

On estime que le temps nécessaire pour ramener le taux de calcium intracellulaire à sa valeur de repos est de l'ordre de 30ms. Quand la concentration basale de calcium est atteinte, aucune molécule n'est plus fixée sur la sous-unité C de la troponine. Ainsi, l'inhibition exercée par la troponine I sur la liaison actine-myosine est rétablie, ce qui induit alors la relaxation musculaire.

II. Les maladies génétiques

1. Des pathologies héritables et transmissibles

1.1. Hérité

L'hérité (du latin *hereditas*, « ce dont on hérite ») est définie comme la transmission de caractères génétiques, au sein d'une même espèce, d'une génération mère à une génération fille. Ces caractères sont codés par des gènes localisés sur les chromosomes sexuels et autosomiques. La ressemblance entre individus d'une même famille est une conséquence directe de cette capacité de transmission de l'information génétique.

Néanmoins, un des processus biologiques les plus importants est la capacité de générer des variations dans ces gènes, qui seront responsables de la diversité génétique entre individus d'une même espèce. Ces variants ou polymorphismes, peuvent être sans conséquence phénotypique ou permettre l'acquisition de fonctions protéiques nouvelles, bénéfiques pour l'individu qui les porte. On pourra alors qualifier ces modifications de « moteurs » de l'évolution.

A l'inverse, ces variations géniques peuvent avoir des effets pathogènes sur le fonctionnement cellulaire. On parle alors de mutations. Lorsqu'une maladie génétique est transmise de manière monogénique ou mendélienne, la ou les mutations qui en sont responsables n'affectent qu'un seul gène. Pour ces différentes pathologies, on distingue différents modes de transmission (*e.g.* : dominant et récessif).

1.1.1. Dominance

Comme nous l'avons vu précédemment, l'information génétique est codée par des gènes, eux-mêmes situés sur différents *loci* chromosomiques. Chez l'être humain comme chez la plupart des mammifères, chaque chromosome est présent en deux exemplaires dans les cellules. Ainsi, un gène peut s'exprimer sous différentes formes ou « allèles » selon qu'il se situe sur l'un ou l'autre des chromosomes homologues. On retrouve des gènes responsables de maladies génétiques aussi bien sur les autosomes que sur les gonosomes X et Y.

On qualifie une maladie génétique de dominante si elle se développe dès lors qu'une mutation est retrouvée sur un des deux allèles. Le statut génotypique des individus malades du fait de cette mutation peut alors varier : soit hétérozygote, porteurs de deux copies alléliques différentes dont une morbide et une sauvage ; soit homozygote, porteurs de deux copies identiques de l'allèle morbide.

1.1.2. Récessivité

Par opposition au caractère dominant, on parle de maladie génétique récessive si celle-ci se développe lorsque chaque allèle est porteur d'une mutation. Ainsi le profil génétique des malades souffrant de ce type de pathologie peut être de deux sortes : homozygote ou hétérozygote composite c'est-à-dire porteur de deux mutations différentes au même *locus*. On notera par ailleurs que l'émergence des maladies génétiques récessives et l'augmentation de leur nombre sont d'autant plus favorisées dans les populations consanguines. Ceci s'explique par le fait que le brassage allélique est réduit et que la fréquence d'apparition du trait morbide est augmentée.

1.2. Apparition « *de novo* »

Nous venons de le voir, les maladies génétiques sont majoritairement héritées d'un ou des parents et transmissibles à la descendance. Cependant parfois, certaines de ces pathologies apparaissent de manière inattendue dans une famille sans aucun antécédent. Elles sont alors dues à l'apparition de néomutations encore qualifiées de mutations *de novo* ayant pu survenir au cours de la méiose, de l'ovogénèse ou de la spermatogénèse.

2. Une palette de mutations très riche

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les variations géniques sont le moteur de l'évolution et de la diversité interindividuelle mais qu'elles peuvent aussi survenir dans des régions géniques ne tolérant aucune variation de séquence. Elles sont alors qualifiées de mutations et conduisent au développement de maladies génétiques diverses. Chez l'homme, la totalité des mutations dénommées comme telle a un impact sur le fonctionnement cellulaire. La cascade de réactions physiopathologiques qu'elles induisent dépend du type de mutation rencontrée.

Les mutations diffèrent par leur nature, leur déterminisme, leur localisation, leur impact moléculaire, leurs conséquences fonctionnelles et en dernière analyse, leurs manifestations cliniques.

2.1. Les micromutations ou mutations ponctuelles

Ce premier type de mutation constitue le degré le plus fin dans l'échelle des tailles de variations possibles du génome. Ce sont des modifications de séquence touchant un seul nucléotide ou un très petit nombre d'entre eux. Ce sont les mutations les plus fréquentes puisqu'elles représentent à elles seules les trois quarts des cas consignés dans la base de données de mutations pathologiques chez l'homme, « *Human Gene Mutation Database (HGMD)* ».

Le plus souvent, il s'agit de substitution (par définition mononucléotidique) mais une faible proportion de ces mutations consiste en des suppressions ou additions d'un seul ou de quelques nucléotides. Elles font alors parties de la catégorie des « INDEL ».

2.1.1. Les substitutions nucléotidiques

Les substitutions sont le seul type de mutations qui ne modifie pas le nombre de nucléotides. Elles font également parties de la catégorie de mutations ponctuelles la plus fréquemment retrouvée. Lorsqu'elles se produisent dans un exon, elles peuvent perturber le cadre de lecture en créant un codon stop prématuré (voir plus loin, « mutations non-sens »), ou en modifiant l'épissage de l'ARN pré-messager (voir « Mutations affectant la maturation du pré-ARNm » [III.4.1]).

La substitution nucléotidique consiste au remplacement d'une base par une autre. Elles sont classées en deux catégories, chacune définie par la classe de molécules à laquelle la base azotée de l'acide nucléique appartient. En effet, selon la nature du noyau aromatique qui constitue le squelette des quatre nucléotides, on différencie le groupe des purines contenant guanine et adénosine de celui des pyrimidines renfermant cytosine et thymine.

Lorsque la substitution induit un changement de classe de la base, c'est-à-dire, remplacement d'une purine par une pyrimidine ou inversement, on parle alors de transversion (huit possibilités). En revanche, si la substitution ne provoque pas de modification de groupe, on parle cette fois de transition (quatre possibilités).

On classe également les différentes substitutions nucléotidiques en fonction du changement qu'elles induisent au niveau de la séquence d'acides aminés codée par le gène qui les porte. Parmi elles, on distingue les mutations non-sens, faux-sens et isosémantiques.

A. Les mutations non-sens

On appelle mutation non-sens, les substitutions nucléotidiques qui conduisent à l'apparition d'un codon stop prématuré au moment de l'étape de traduction protéique. Elles ont pour effet de perturber le cadre de lecture de l'ARN messenger puisqu'elles l'interrompent avant la fin. Ceci peut entraîner la production d'une protéine tronquée dont l'activité fonctionnelle est réduite voire nulle ou tout simplement, l'absence de formation de la protéine.

B. Les mutations faux-sens

Les mutations faux-sens sont des substitutions qui entraînent un changement d'acide aminé. Leur impact peut être large puisque leur effet peut aussi bien s'exercer sur l'ARN messenger en modifiant l'épissage que sur la protéine elle-même. Elles peuvent avoir un effet délétère sur la structure macromoléculaire de la protéine, sa conformation dynamique, ses interactions avec divers partenaires, sa localisation ou son adressage cellulaire, sa maturation, ou encore son activité enzymatique.

C. Mutations synonymes ou isosémantiques

On qualifie de mutations synonymes ou isosémantiques les changements nucléotidiques n'ayant pas d'impact sur l'acide aminé codé par le triplet dont ils font partis. Cette « plasticité » de codon est liée au caractère dégénéré, redondant du code génétique qui confère la possibilité d'utiliser différentes combinaisons de nucléotides pour coder un même acide aminé.

Appelées à tort mutations silencieuses pendant de nombreuses années, elles étaient considérées comme des variations bénignes de la séquence nucléotidique. Il a finalement été démontré que ces mutations peuvent avoir un effet sur le fonctionnement cellulaire qui peut parfois être extrêmement pathogène. Un exemple de pathologie découlant de ce type de mutations est développé plus loin (voir « Mutations introniques et exoniques créatrices de sites cryptiques d'épissage » [III.4.1.4]).

2.1.2. Les INDEL : des petites insertions / délétions

Ce type de modification concerne généralement un petit nombre de nucléotides insérés ou délétés dans un exon. Lorsque le nombre de bases modifiées n'est pas un multiple de trois, cela provoque une perte de la phase de lecture du gène (ou *frameshift*), ce qui conduit à l'apparition d'un codon stop prématuré et à la formation d'une protéine tronquée qui, dans la majorité des cas, ne sera pas fonctionnelle. A l'inverse, lorsque la variation nucléotidique est un multiple de trois, le cadre de lecture est maintenu mais la protéine produite est différente de la version sauvage. En effet, l'ajout ou la suppression de quelques acides aminés codés par les nucléotides en question va modifier les séquences primaire, secondaire et tertiaire de la protéine, ce qui peut rendre la protéine non fonctionnelle ou toxique.

2.2. Les macromutations

Ces anomalies du génome se caractérisent par des modifications du nombre de bases. Il s'agit de délétions, de duplications, d'inversions, d'insertions, d'expansions de triplets ou encore de diminutions de répétitions de séquences.

2.2.1. Les délétions/ duplications

Les délétions résultent de l'excision d'un segment d'ADN avec rétablissement de la continuité de la double hélice. La perte de matériel est très variable, allant de quelques nucléotides à plusieurs mégabases, atteignant dans ce cas le seuil de détection des méthodes de la cytogénétique. Ce seuil peut parfois être largement dépassé dans les très grandes délétions qui emportent un segment chromosomique plus ou moins important voire même un chromosome entier. Dans ce dernier cas, on parle de monosomie. La seule monosomie viable est celle du X.

Les duplications sont le pendant des délétions, elles résultent de mécanismes similaires et peuvent concerner des segments d'ADN de toute taille jusqu'à la totalité d'un chromosome. Les trisomies des chromosomes 21 et X sont des exemples qui découlent de ce phénomène.

Parfois, les séquences délétées ou dupliquées peuvent conduire à la perte ou la duplication de gènes dans leur intégralité. C'est notamment ce que l'on observe dans certaines neuropathies (voir « la maladie de Charcot-Marie-Tooth », [IV.2.1]).

2.2.2. Les inversions et insertions

L'inversion est un changement d'orientation, tête-bêche, d'un segment plus ou moins long d'ADN, ce qui rompt le cadre transcriptionnel si l'événement touche des séquences transcrites.

L'insertion correspond quant à elle à l'introduction dans un gène d'une séquence endogène mobile de type transposons ou bien d'une séquence exogène virale.

2.2.3. Les expansions de triplets

Découvert plus récemment que les altérations géniques décrites ci-dessus (au début des années 1990), ce groupe de mutations instables a permis d'établir un diagnostic moléculaire pour une vingtaine de maladies pour lesquelles le mécanisme mutationnel était jusqu'ici inconnu. Caractérisées par l'expansion variable de séquences trinuécléotidiques polymorphes, répétées dans un gène spécifique, elles sont aussi dénommées « mutations dynamiques ».

Ces séquences dont le nombre de copies est variable mais limité au niveau des allèles normaux, augmentent brusquement pour dépasser un seuil pathologique dans les allèles mutés. Dans ce groupe, on retrouve entre autres, le syndrome de l'X fragile (XFRA), la chorée de Huntington (HD), six formes d'ataxies spinocérébelleuses autosomales dominantes (SCA), l'ataxie de Friedreich (FRDA) et la dystrophie myotonique de Steinert (DM1).

Leur mode de transmission présente pour la plupart d'entre elles des caractéristiques très inhabituelles avec un biais de transmission parentale des formes les plus sévères. En effet, au fur et à mesure des générations, l'augmentation de la taille de l'expansion observée lors de la transmission de la mutation à la descendance s'accompagne d'un âge de début de la maladie de plus en plus précoce avec des manifestations cliniques de plus en plus graves. On parle alors d'anticipation.

Comme nous le verrons plus loin, les expansions de triplets peuvent survenir à différents niveaux : dans les régions 5' ou 3' non codantes du gène (5' UTR et 3'UTR), dans un intron ou encore dans un exon avec apparition de poly-glutamines associées à des manifestations cliniques neurologiques.

Différents exemples de maladies provoquées par des expansions de triplets sont détaillées dans le chapitre III : « Les pathologies du muscle d'origines génétiques : classification ».

2.2.4. Les diminutions du nombre de répétitions de fragments d'ADN

A l'inverse de l'expansion de triplet qui vient d'être décrit, une maladie peut être due à une diminution du nombre de répétition d'une séquence d'ADN particulière. C'est notamment ce que l'on observe chez une très grande majorité des patients atteints de Dystrophie Fascio-Scapulo-Humérale (FSHD). En effet, dans la région subtélomérique du bras long du chromosome 4 (en 4q35), on trouve des séquences répétées en tandem de 3,3 kb appelées D4Z4.

Dans la population générale, on constate que les individus sains possèdent plusieurs dizaines de D4Z4, leurs nombres variant généralement entre onze et cent cinquante. Chez les malades souffrant de FSHD, ce nombre de répétitions est fortement réduit jusqu'à atteindre un seuil critique compris entre un et dix. Plus le nombre de D4Z4 est proche de un et plus la maladie est sévère (Salort-Campana et al., 2013).

Le mécanisme pathologique mis en place suite à la diminution du nombre de D4Z4 sera développé plus en détail dans la partie concernant la FSHD.

3. La synthèse protéique chez le sujet sain : rappel

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, on dénombre plusieurs types de mutations responsables de maladies génétiques. Selon les cas, ces variations nucléotidiques peuvent avoir un effet délétère à différents niveaux de la synthèse protéique. Elles peuvent affecter la transcription de l'ARN messager, sa traduction mais également impacter directement le fonctionnement de la protéine.

Afin de mieux comprendre les exemples de mécanismes physiopathologiques complexes mis en jeu dans les pathologies musculaires décrites au chapitre III : « Les pathologies du muscle d'origines génétiques : classification », les paragraphes suivants rappellent comment chaque étape de la synthèse protéique se déroule dans des conditions physiologiques normales chez un sujet sain.

3.1. La transcription : maturation du pré-messager en ARNm

La maturation des pré-messagers en ARNm est une des étapes-clés de la production de protéines fonctionnelles. Elle peut être subdivisée en plusieurs phases qui se déroulent dans le nucléoplasme des cellules.

3.1.1. Ajout de la coiffe en 5'

Dès qu'environ vingt-cinq ribonucléotides ont été transcrits par l'ARN polymérase II, le pré-messager subit une première modification qui consiste en l'ajout d'une coiffe de type 7-méthylguanosine sur le premier nucléotide de l'ARN, du côté 5' de la molécule. Cette adjonction s'effectue bien avant la fin de la transcription complète du gène car elle a pour vocation première de protéger le pré-messager de la dégradation par les exonucléases. Cette coiffe va ensuite être liée par un complexe protéique appelé *Cap Binding Domain* (CBD) qui sera indispensable pour faire sortir l'ARNm dans le cytoplasme. Une fois l'ARNm exporté hors du noyau, les protéines du complexes CBD se décrocheront de la molécule et la coiffe sera reconnue comme un site de recrutement pour certains facteurs d'initiation de la traduction tel que eIF4E.

3.1.2. Clivage et polyadénylation en 3'

A l'autre extrémité du pré-messager, en 3', un facteur tétramérique appelé *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor* (CPSF) reconnaît une séquence consensus de polyadénylation (AAUAA) et induit son clivage. Le résidu obtenu en aval du site de coupure est rapidement dégradé et une réaction de polyadénylation démarre à l'extrémité du pré-messager déjà coiffée en 5'. Cette réaction, effectuée et contrôlée par la *PolyA Binding Protein Nuclear 1* (PABPN1), consiste en l'ajout de quelques centaines de bases adénosine à l'extrémité 3' de la molécule.

A son tour, cette modification joue divers rôles importants. Tout d'abord, elle a pour but de protéger la molécule d'ARN de la dégradation et d'en assurer la stabilité. Ensuite, elle aura un rôle important dans l'export de l'ARN messager mature, du noyau vers le cytoplasme, où elle permettra le recrutement et la fixation de certaines protéines nécessaires à l'initiation de la traduction.

3.1.3. Epissage

L'épissage est un mécanisme complexe qui consiste en une modification radicale du transcrit primaire que constitue le pré-messager. En effet, la plupart des gènes eucaryotes sont constitués de petits fragments de séquences codantes appelés exons qui sont interrompus par de longues séquences non-codantes, les introns. C'est au cours de l'épissage, qui a lieu de manière synchrone avec la transcription, que les introns sont excisés de l'ARN en cours de synthèse et éliminés.

De façon séquentielle, les exons sont reliés entre eux pour donner naissance à une molécule d'ARNm mature. C'est seulement après cette dernière étape de maturation que l'ARNm pourra être exporté dans le cytoplasme où aura lieu sa traduction.

L'épissage est réalisé par le spliceosome, un important complexe ribonucleoprotéique constitué d'une centaine de protéines. Pour séparer de manière correcte les exons des introns, il reconnaît et utilise des sites consensus d'épissage retrouvés aux extrémités des introns. Ces motifs sont primordiaux dans le mécanisme de l'épissage puisqu'ils sont responsables de la synthèse correcte des ARNm matures qui conduiront à la formation d'une protéine fonctionnelle.

A. Les sites consensus d'épissage

Les différentes séquences consensus impliquées dans l'épissage sont au nombre de quatre. Elles comprennent le site donneur d'épissage, le point de branchement, le *polypyrimidine tract* et le site accepteur d'épissage. Ces différents sites sont décrits dans les sous-paragraphes suivants dans l'ordre dans lequel ils sont reconnus.

a. Le site donneur

Situé à l'extrémité 5' de l'intron et légèrement à cheval sur l'exon, le site donneur d'épissage est constitué de 3 bases exoniques ainsi que d'une petite dizaine de nucléotides introniques plus ou moins conservés selon leur position dans la séquence. Seules les 2 premières bases introniques de cette séquence consensus ne varient pas et sont toujours les mêmes : GU. Le site donneur est le premier site reconnu et utilisé par les différentes protéines qui forment le spliceosome. C'est à ce niveau que débute le mécanisme d'excision de l'intron.

b. Point de branchement

Toujours sur l'intron mais cette fois du côté 3' à l'opposé du site donneur d'épissage, on trouve une nouvelle séquence consensus appelée « point de branchement ». Généralement situé à une cinquantaine de nucléotides de la fin de l'intron, il sert de site de fixation pour certaines protéines du complexe spliceosome. Ce point de branchement tire son nom du fait qu'après clivage de l'intron du côté 5', le résidu de coupure est « branché » sur cette séquence consensus formant ainsi le lasso (voir plus loin, le paragraphe : « Le spliceosome : un complexe regroupant les principaux acteurs de l'épissage »).

c. Polypyrimidine tract

Cette troisième séquence consensus, longue d'une vingtaine de nucléotides, se situe entre le point de branchement et la fin de l'intron coté 3' (entre -40 et -5 en amont de l'exon). C'est une région d'une vingtaine de nucléotides, riche en bases pyrimidiques dont la majorité est de type uracile. Comme tous les sites d'épissage, le *polypyrimidine tract* est le site de liaison de plusieurs membres du spliceosome.

d. Site accepteur

Le quatrième et dernier site majeur d'épissage se trouve à l'extrémité 3' de l'intron. Comme le site donneur, le site accepteur d'épissage présente une séquence nucléotidique consensus formée des dix derniers nucléotides de l'intron et des 3 premiers nucléotides de l'exon qui suit. A l'exception des deux derniers nucléotides introniques qui sont toujours AG, le reste de la séquence du site 3' d'épissage peut plus ou moins varier.

Les quatre sites d'épissage qui viennent d'être décrits sont les cibles des principales protéines composant le spliceosome, les snRNP (*small nuclear RiboNucleoProtein*).

B. Le spliceosome : un complexe regroupant les principaux acteurs de l'épissage

La réalisation de l'épissage nécessite la mise en place d'un important complexe, le spliceosome, qui se constitue de manière séquentielle grâce à l'association successive d'une centaine de protéines. Certaines ont une fonction spécifique là où d'autres ont des actions pléiotropes.

Seules les protéines SR et snRNP seront étudiées plus en détails dans les paragraphes qui suivent.

a. Les protéines SR

Ces facteurs protéiques tirent leur nom de leur composition riche en acides aminés sérine (S) et arginine (R). Actrices les plus importantes du complexe parmi les protéines à effet pléiotrope, les protéines SR sont extrêmement bien conservées entre les différentes espèces, des plantes aux mammifères. Elles sont impliquées dans toutes les étapes de l'épissage mais interviennent principalement dans sa régulation, notamment au niveau de l'épissage alternatif.

Point de vue structural, on retrouve dans leur partie N-terminale, un motif appelé *RNA Recognition Motif* (RRM) dont la propriété est d'interagir de manière non spécifique avec les ARNs. Leur extrémité C-terminale quant à elle, est impliquée dans les interactions avec les autres protéines qui constituent le spliceosome.

b. Les *small nuclear RiboNucleoProtein* (snRNP) et leurs snRNA associés

Lors de l'épissage, les quatre séquences consensus décrites précédemment interagissent avec cinq membres de la famille des ribonucléoprotéines snRNP. Ces éléments clés de l'épissage sont constitués d'une part de petits ARNs et d'autre part de protéines. Les snRNA (50 à 250 nucléotides) sont une famille d'ARNs non codants et non polyadénylés dont les cinq représentants les plus importants sont appelés snRNA U1, U2, U4, U5, U6 du fait de leur richesse en nucléotides uracile. En ce qui concerne leur constitution protéique, on trouve huit protéines « Sm » qui forment le cœur de toutes les snRNP, auxquelles s'ajoutent quelques protéines spécifiques de chaque snRNP.

C. Les sites régulateurs d'épissage

On sait depuis plusieurs décennies que, chez les eucaryotes, un gène peut coder plusieurs protéines. Ceci est possible grâce au mécanisme d'épissage alternatif qui permet la synthèse d'ARNm différents à partir d'un même fragment d'ADN de départ. En effet, il existe des gènes qui comportent des exons alternatifs qui peuvent, selon la protéine à synthétiser, être ou non maintenus dans l'ARNm mature. Attention cependant à bien noter que tous les exons de tous les gènes ne sont pas alternatifs et ne peuvent être épissés.

En dehors des principales séquences introniques d'épissage précédemment décrites, il existe des séquences régulatrices localisées dans les exons. Elles peuvent être de différents types, *Exonic Splicing Enhancer* (ESE) ou *Exonic Splicing Silencer* (ESS). Ce sont des domaines de liaison pour certaines protéines du complexe spliceosome qui vont favoriser ou non l'inclusion des exons qui les renferment dans le messager mature.

On serait tenté de penser que de tels sites, capables d'influencer le spliceosome à intégrer ou non un exon, se retrouvent uniquement dans les exons alternatifs. En réalité, c'est l'inverse qui a été observé et on s'accorde aujourd'hui à penser qu'on trouve des séquences régulatrices d'épissage dans quasiment tous les exons. En effet, de telles séquences peuvent également être présentes dans des exons non alternatifs qui sont indispensables à la synthèse d'une protéine majeure afin de s'assurer de leur inclusion.

a. Les Exonic Splicing Enhancer (ESE)

Les séquences appelées *Exonic Splicing Enhancer* (ESE) sont des séquences stimulatrices, activatrices d'épissage. Elles favorisent l'inclusion de l'exon qui les porte dans l'ARNm mature. A la différence des quatre principaux sites d'épissage qui comportent des séquences fortement conservées, les ESE sont caractérisés par une grande variabilité de séquences, ce qui complique leurs détections. Lorsqu'une mutation apparaît dans ce type de site, elle peut diminuer ou abolir l'effet de l'ESE sur le splicing et provoquer un saut d'exon.

La plupart des ESE sont généralement les cibles de facteurs protéiques de type SR (voir plus loin).

b. Les Exonic Splicing Silencer (ESS)

Le rôle des *Exonic Splicing Silencer* (ESS) est contraire à celui des ESE puisqu'ils vont agir comme des séquences inhibitrices, extinctrices d'épissage. En effet, leur influence sur le spliceosome va conduire à l'excision de l'exon et à son élimination comme c'est le cas pour les séquences introniques. De même que pour les ESE, l'apparition d'une mutation dans un de ces sites inhibiteurs pourra être responsable d'une modification d'épissage. Dans ce cas-là, elle pourra favoriser une rétention d'exon au lieu de conduire à sa résection.

Il a également été démontré que le même genre de sites *Enhancer* et *Silencer* a été retrouvé dans des régions introniques. Ces séquences, alors appelées pour *Intronic Splicing Enhancer* (ISE) et *Intronic Splicing Silencer* (ISS) ont les mêmes fonctions que celles décrites précédemment mais sont cette fois situées dans les introns.

D. Déroulement séquentiel de l'épissage

La réalisation de l'épissage nécessite la mise en place de quatre complexes successifs (E, A, B et C) qui se constituent chronologiquement grâce à l'association de la molécule de pré-messager avec les snRNP et d'autres protéines spécifiques du mécanisme comme les protéines SR. C'est l'association finale de ces quatre complexes qui donne naissance au spliceosome (figure 36).

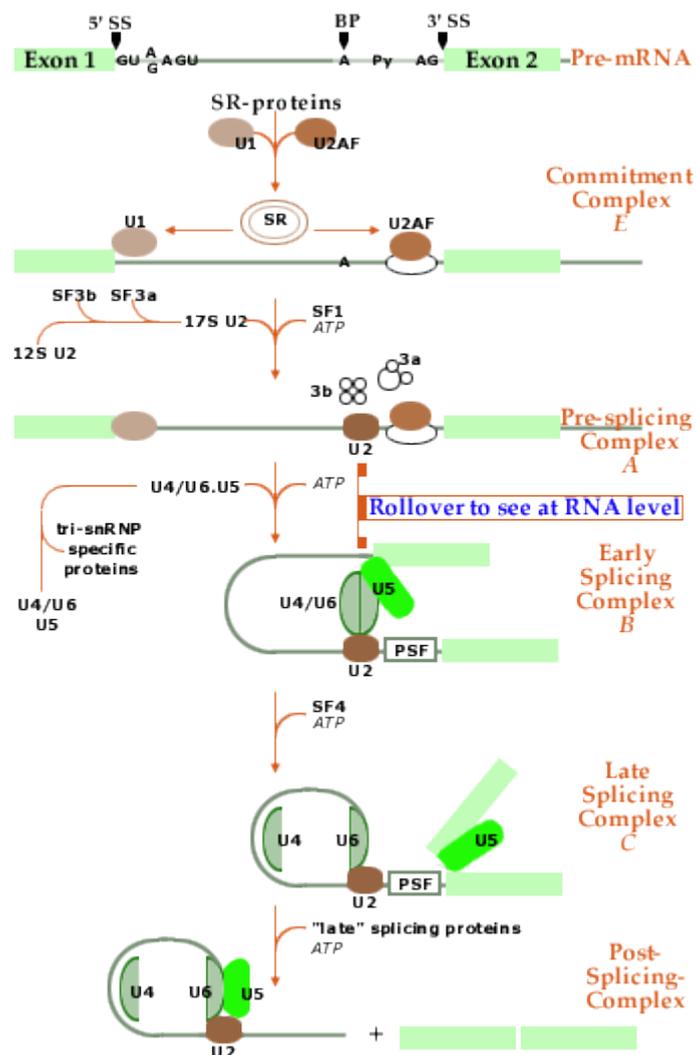


Figure 36 : Les différentes étapes de la formation du spliceosome

<http://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/splicing/pics/mechanism1.gif>

Lors de la première étape, la snRNP U1 s'associe avec l'extrémité 5' de l'intron grâce à une complémentarité de séquence entre le snRNA contenu dans U1 et le site donneur d'épissage. L'appariement des deux entraîne la fixation d'une seconde protéine nommée ASF/SF2. Cette dernière protéine joue un rôle majeur dans l'épissage alternatif puisque la reconnaissance de certains sites donneurs dépend de sa concentration nucléaire. Dans la région opposée de l'intron, en 3', une protéine SR nommée U2AF se fixe sur le site poly pyrimidique. Son ancrage dépend de l'intervention d'autres membres de la famille des protéines SR. Le tout constitue un premier complexe, le complexe E.

Dans une deuxième étape, c'est la snRNP U2 qui intervient. Elle passe d'une forme inactive (dont le coefficient de sédimentation est 12S) à une forme active (17S) lorsque les protéines SF3a et SF3b s'y associent. Ce changement d'état induit la fixation de U2 sur le point de branchement via sa séquence consensus. Cette étape nécessite de l'ATP et l'intervention d'un facteur SF1 ou *Branch-point Binding Protein* (BBP). L'ensemble de ces nouveaux éléments constitue le complexe C.

C'est à l'étape suivante qu'interviennent les trois autres ribonucléoprotéines. Les snRNP U4 et U6, qui sont associées entre elles par une hybridation de séquences entre snRNA, forment avec U5, un complexe ternaire qui va interagir avec U2 et l'extrémité 5' de l'intron. L'association du dimère U4/U6 avec U2 s'effectue via les snRNA par appariement de séquences. La snRNP U5 va quant à elle interagir avec U1 par l'intermédiaire des nombreuses protéines spécifiques qui la compose. Ces diverses liaisons ont entre autres pour but d'induire une courbure de l'intron et de mettre pratiquement bout à bout la fin de l'exon « n » et le début de l'exon « $n+1$ ». Cette configuration est celle du complexe B dite pré-catalytique.

Une succession de réactions ATP-dépendantes vont alors se produire pour activer le complexe B et conduire à son réarrangement profond, aussi bien au niveau constitutionnel que structural : la première réaction provoque la libération d'U4 par déshybridation des séquences ARNs qui la maintenaient associée à U6 ainsi que la dissociation de la snRNP U1 du site donneur d'épissage. La seconde induit la formation du lasso (ou lariat) grâce à une réaction de transestérification qui se produit entre la guanine localisée en 5' de l'intron et l'hydroxyle situé en 2' sur l'adénosine du site de branchement. On aboutit au complexe C qui catalyse à son tour une autre réaction de transestérification. Cette dernière s'effectue entre la dernière base du premier exon et la première base de l'exon suivant, mis exactement en regard l'un de l'autre grâce à U5. C'est seulement après cette dernière étape que l'intron est excisé.

Une fois le lasso libéré, il est débarrassé des snRNP qui lui étaient encore associées et dégradé par une RNase présente dans le milieu. Un nouveau cycle d'épissage peut alors commencer pour les ribonucléoprotéines à nouveau disponibles.

A la fin de l'étape de maturation, l'ARN messager est transféré dans le cytoplasme où il sera traduit en protéine.

3.2. La traduction

L'ARNm n'est qu'un intermédiaire entre le gène et la protéine. Il permet de résoudre le problème posé par le fait que, chez les eucaryotes, les gènes et le système de traduction sont localisés dans deux compartiments différents. En effet, la traduction de la séquence nucléotidique de l'ARNm en une protéine s'effectue dans le cytoplasme par un gros assemblage ribonucléoprotéique de grande taille, le ribosome.

Ce n'est cependant pas l'unique rôle de l'ARNm : l'étape de transcription permet la synthèse de nombreuses copies d'ARNm à partir d'un seul gène, chacune pouvant être traduite par plusieurs ribosomes. Il en résulte que, grâce à la molécule intermédiaire qu'est l'ARNm, la quantité de protéines synthétisées à partir de l'information d'un seul gène est considérablement amplifiée. Enfin, l'existence de l'ARNm permet d'introduire toute une série d'étapes de régulation possibles.

Il reste toutefois un problème que l'ARNm ne résout pas : celui de la différence de taille considérable entre l'acide aminé et le triplet nucléotidique.

3.2.1. L'ARN de transfert : l'intermédiaire qui résout le problème stérique

Les codons de l'ARNm ne reconnaissent pas directement les acides aminés qu'ils spécifient. La traduction du message en protéine dépend d'un intermédiaire : l'ARN de transfert (ARNt).

Ces ARNs sont localisés dans le cytoplasme, qui en contient quelques centaines de milliers de copies. Ils sont constitués d'un enchaînement de 75 à 85 nt et contiennent de très nombreux nucléotides atypiques qui résultent de modifications enzymatiques post-transcriptionnelles. Ils sont tous repliés en une structure tridimensionnelle précise, formée de quatre courts segments nucléotidiques complémentaires, ce qui produit une molécule en forme de feuille de trèfle. La feuille de trèfle subit d'autres repliements qui créent une structure tertiaire compacte en forme de L, maintenue par des liaisons hydrogènes supplémentaires entre les différentes régions de la molécule.

Deux régions comportant des nucléotides non appariés, situées à chacune des deux extrémités de la molécule en forme de L, sont cruciales pour les fonctions de l'ARNt dans la synthèse protéique. L'une d'elle forme l'anticodon, groupe de trois nucléotides consécutifs qui s'apparient au codon complémentaire de la molécule d'ARNm ; l'autre est une courte région simple brin située à l'extrémité 3' de la molécule qui correspond au site de fixation de l'acide aminé sur l'ARNt (figure 37).

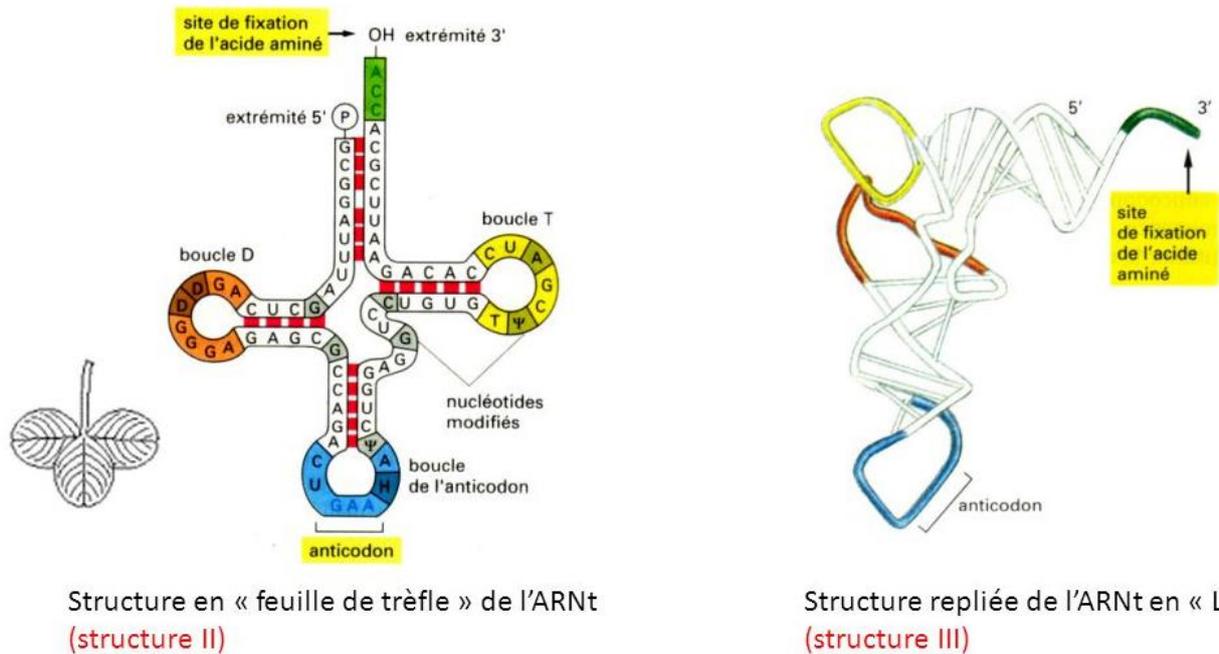


Figure 37 : Représentation schématique d'un ARN de transfert

http://images.slideplayer.fr/12/3822624/slides/slide_5.jpg

Lors du mécanisme de traduction, un appariement antiparallèle a lieu entre le codon codé par l'ARNm et l'anticodon porté par l'ARNt, ce qui va permettre la liaison de l'acide aminé sur la séquence protéique en cours de synthèse. Il existe une flexibilité dans l'appariement des bases en position 3 du codon et en position 1 de l'anticodon qu'on appelle le « *wobble* ». Ceci explique qu'on retrouve entre 40 et 60 ARNt différents dans une cellule : un acide aminé peut être codé par différents ARNt qu'on appelle alors des ARNt « iso-accepteurs ».

3.2.2. L'ARN messenger est décodé sur les ribosomes

La synthèse des protéines est guidée par les informations portées sur les molécules d'ARNm. Pour maintenir le bon cadre de lecture et éviter les erreurs, la synthèse protéique est effectuée dans le ribosome, important complexe catalytique composé d'une cinquantaine de protéines différentes et d'ARNs ribosomiaux (ARNr). On en trouve plusieurs millions dans le cytoplasme des cellules eucaryotes.

Les ribosomes sont constitués d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité qui s'adaptent l'une à l'autre pour former un ribosome complet.

La petite sous-unité fournit l'échafaudage qui fait correspondre exactement l'ARNt au codon de l'ARNm alors que la grande sous-unité catalyse la formation de la liaison peptidique qui relie les acides aminés entre eux dans la chaîne polypeptidique.

Lorsqu'elles ne sont pas en cours de synthèse active de protéines, les deux sous-unités sont séparées. Pour initier la traduction, la petite sous-unité ribosomale se fixe sur la molécule d'ARNm, près de son extrémité 5' au niveau du codon de départ (AUG). Cette séquence d'ARNm sera reconnue par une molécule initiatrice particulière d'ARNt. La grande sous-unité se fixe ensuite sur la petite pour former le ribosome complet et commencer la synthèse protéique.

Pendant cette phase, l'ARNm est lu et traduit en acides aminés au fur et à mesure de son passage à travers le ribosome. C'est par l'intermédiaire de l'appariement des bases complémentaires entre les codons de l'ARNm et les anticodons des ARNt que chaque acide aminé est ajouté à l'extrémité de la chaîne polypeptidique en croissance, selon la séquence correcte. Lorsqu'un codon d'arrêt est rencontré, un facteur de libération se fixe sur le ribosome, entraînant alors la fin de la traduction par libération de la protéine synthétisée et séparation des deux sous-unités ribosomales. Elles pourront alors être réutilisées pour commencer la synthèse d'une autre protéine sur une autre molécule d'ARNm.

4. Des conséquences physiopathologiques complexes

4.1. Mutations affectant la maturation du pré-ARNm

Comme nous venons de le voir au chapitre précédent, la molécule d'ARN messager sert d'intermédiaire entre le support de l'information génétique, l'ADN et son « produit d'expression », la protéine. La production d'un ARN messager mature a lieu suite à une succession de processus complexes. Ainsi, une mutation peut avoir un effet délétère à n'importe laquelle des étapes précédemment décrites (figure 38).

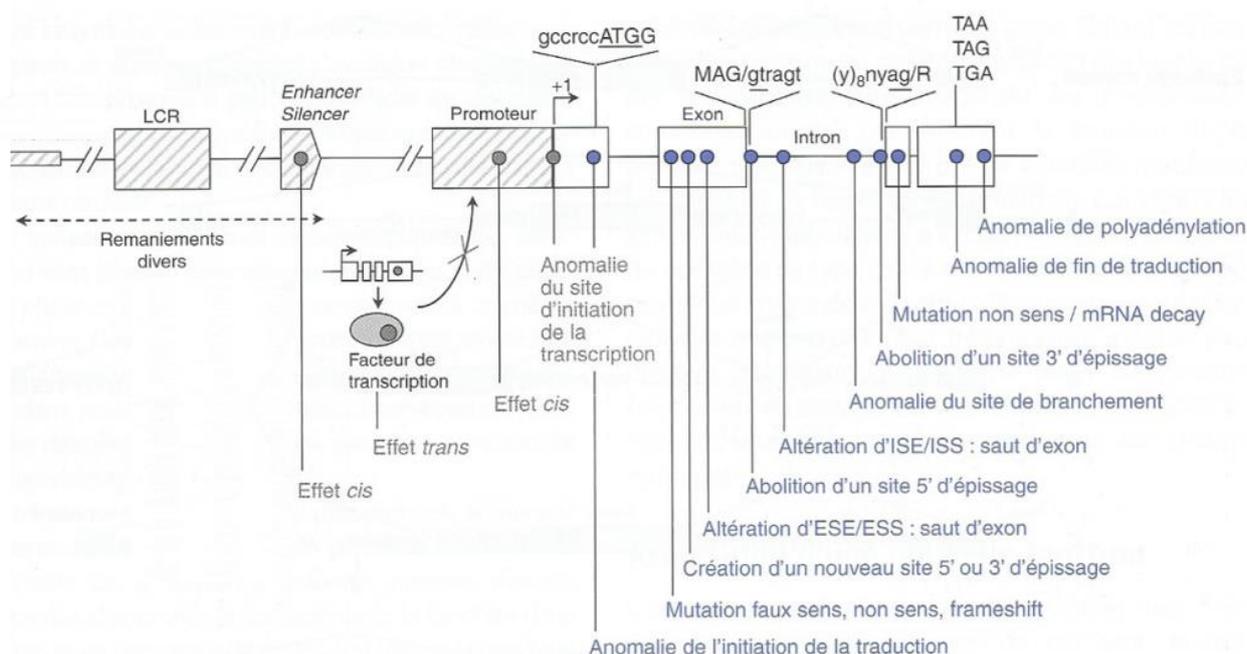


Figure 38 : Principales mutations ponctuelles pouvant toucher un gène et leurs conséquences

Les exons du gène sont représentés par des rectangles blancs. Les séquences impliquées dans la régulation de l'expression du gène sont représentées des rectangles hachurés en gris.

LCR : locus control region; ESE : exonic splicing enhancers; ESS : exonic splicing silencers.

M : A ou C ; R : G ou A ; n : a, t, g ou c ; r : g ou a ; y : t ou c.

Extrait de « Génétique médicale » Martin Krahn

Les différents impacts que peuvent avoir ces mutations sont détaillées dans les paragraphes suivants.

4.1.1. Mutations dans les séquences promotrices ou régulatrices de la transcription

Lorsqu'elle est localisée dans la séquence promotrice d'un gène (figure 38), une mutation peut casser un site consensus de liaison d'un ou plusieurs facteurs de transcription et entraîner une diminution voire une abolition de la transcription du gène. C'est le cas notamment de certaines mutations retrouvées dans le promoteur du gène F8 (Xq28) codant pour la protéine facteur 8 responsable de l'hémophilie A lorsqu'elle est mutée (Nougier et al., 2014).

D'autres maladies telles que la β -thalassémie (gène HBB ; 11p15), l'hypercholestérolémie familiale (gène LDLR ; 19p13) ou l'hémophilie B (gène F9 ; Xq27) peuvent également être dues à des mutations dans la séquence promotrice de leur gène (de Vooght et al., 2009).

De même, une mutation peut avoir un effet « en *cis* », lorsqu'elle est située dans des régions plus ou moins éloignées du promoteur au niveau de séquences régulatrices *enhancer* ou *silencer* (figure 39). Ces petites régions, souvent tissu-spécifiques, peuvent être des sites de fixation de facteurs de transcription mais aussi participer à la mise en place de l'échafaudage protéique constituant la machinerie d'épissage. Lorsqu'une mutation y est retrouvée, elle peut alors affecter l'une ou l'autre de ces fonctions (Hrdlickova et al., 2014).

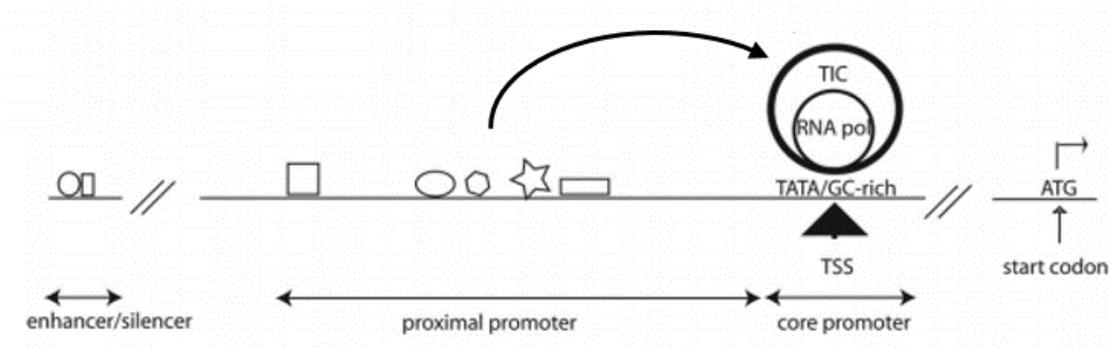


Figure 39 : Description schématique des différents éléments constituant un promoteur génique

Le promoteur principal (*core promoter*) régule la transcription du gène puisqu'il renferme des sites de liaisons pour l'ARN polymérase II et des facteurs de transcription.

Le promoteur proximal contient également des sites de liaison pour différents facteurs de transcription (représentés par des formes géométriques) qui vont influencer l'activité transcriptionnelle.

Les séquences régulatrices de type *enhancer* et *silencer* peuvent être situées très à distance du site d'initiation de la transcription (*TSS*)

TIC : Transcription initiation complex ; RNA pol : ARN polymérase II

de Vooght et al., 2009

Enfin, de manière beaucoup plus rare, des mutations dans des gènes codant des facteurs de transcription peuvent avoir un effet « en *trans* » sur la transcription de gènes qu'ils régulent. Un des exemples caractéristiques de ce phénomène concerne le gène *MECP2* (Xq28), impliqué dans le syndrome de Rett. La protéine MecP2 (pour *methyl-CpG-binding protein*) est un répresseur transcriptionnel qui agit en se fixant sur les îlots CpG se trouvant dans les régions promotrices de nombreux gènes. Lorsqu'elle est mutée, l'action répressive de la protéine est abolie et la transcription de ses gènes cibles dérégulée (Amir et al., 1999).

4.1.2. Mutations introniques et abolition de sites consensus d'épissage

Afin qu'exons et introns soient correctement séparés, le spliceosome est guidé et reconnaît des sites consensus d'épissage situés dans les parties introniques du gène. Puisqu'absentes de la séquence codante, on a longtemps considéré que les variations de nucléotides introniques étaient sans importance pour la maturation de l'ARNm et le devenir de la protéine. Or, bon nombre de mutations pathogènes répertoriées comme responsables de maladies génétiques se situent dans ces sites particuliers.

En effet, la modification de la séquence consensus de ces sites peut empêcher leur reconnaissance par le spliceosome : l'exon est alors considéré comme un intron et excisé. L'épissage se poursuit ensuite comme à l'ordinaire en raboutant les exons suivants sur le messager (figure 40) (Brea-Fernández et al., 2008; Kergourlay et al., 2014; Todeschini et al., 2016).

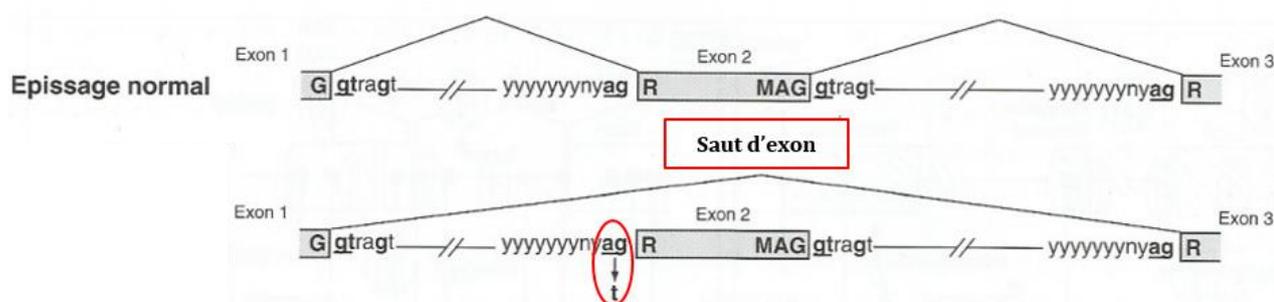


Figure 40 : Mutation dans un site accepteur d'épissage conduisant au saut de l'exon

Extrait de « Génétique médicale » Martin Krahn

Plusieurs conséquences peuvent découler de cette modification d'épissage lors de la traduction de l'ARNm. Si l'exon délété ne comporte pas un nombre de bases multiple de trois, son absence va nécessairement entraîner une modification du cadre de lecture (*frame-shift*). Cela fait en général apparaître tôt ou tard en aval de la mutation un codon non-sens prématuré qui donnera naissance à une protéine tronquée qui sera non fonctionnelle, la plupart du temps (Brea-Fernández et al., 2008).

Si la délétion de l'exon est en phase, la protéine traduite sera plus courte que la sauvage puisque délétée des acides aminés codés par l'exon manquant. Selon le type d'exon touché, selon la protéine impliquée, ce changement pourra avoir un impact plus ou moins important sur la fonction de la protéine (Sinnreich et al., 2006; Todeschini et al., 2016). Certaines protéines raccourcies ne pourront plus assurées leur rôle dans la cellule et seront détruites. Leur absence entraînera le développement de la maladie (Le Gloan et al., 2016).

Dans d'autre cas, la protéine sera toujours fonctionnelle mais moins efficace que sa version sauvage. On assistera alors à l'apparition d'un phénotype moins sévère que si la protéine était totalement absente. C'est le cas par exemple de ce qui a été rapportée pour une patiente atteinte de dysferlinopathie « légère » (Sinnreich et al., 2006) ou encore ce qu'on observe plus classiquement dans la dystrophie de Becker comparée à la dystrophie de Duchenne de Boulogne (Todeschini et al., 2016).

A l'inverse, l'absence d'une partie de la séquence protéique pourra entraîner l'acquisition d'une nouvelle fonction qui sera toxique pour la cellule (Ma et al., 2016).

Enfin, dans la dernière situation, la délétion exonique pourra être sans conséquence et passée inaperçue puisqu'elle n'affectera pas le phénotype.

Comme nous le verrons plus loin, des essais de thérapies géniques se sont développés ces dernières années en se basant sur ces principes de sauts d'exon. Ils ont pour but d'amenuiser le phénotype d'une maladie en rétablissant le cadre de lecture de la protéine (Barthélémy et al., 2015; Peccate et al., 2016; Scalet et al., 2016; Wein et al., 2010) (voir « le saut d'exon thérapeutique [V.3.3]).

4.1.3. Mutations exoniques et abolition de sites régulateurs d'épissage

Sur le même principe que celles décrites précédemment, on trouve aussi des mutations exoniques, telles que les mutations faux-sens et isosémantiques, qui impactent l'épissage et sont responsables de pathologies. Lorsqu'elles se situent dans des sites stimulateurs (*enhancer*) ou inhibiteurs (*silencer*) d'épissage, elles peuvent les casser et supprimer les signaux régulateurs qu'ils codent à destination du spliceosome (figure 41).

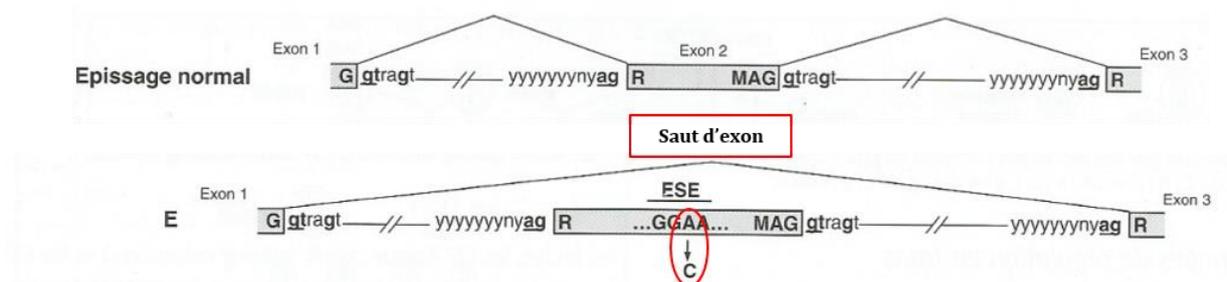


Figure 41 : Mutation dans un site exonique stimulateur d'épissage conduisant au saut de l'exon

Extrait de « Génétique médicale » Martin Krahn

Ainsi, certains exons seront plus ou moins épissés que d'ordinaire, entraînant alors une production de protéines non fonctionnelles ou bien, un déséquilibre de quantités des diverses versions protéiques. Ils pourront également être épissés ou retenus dans 100% des cas, engendrant alors les mêmes problèmes que ceux décrits au paragraphe précédent (Kergourlay et al., 2014).

4.1.4. Mutations introniques et exoniques créatrices de sites cryptiques d'épissage

Les mutations introniques ou exoniques qui impactent l'épissage n'entraînent pas toujours l'excision totale de l'exon, elles peuvent également être responsables de la création de sites cryptiques d'épissage. Cela signifie qu'elles peuvent créer de nouveaux sites donneurs ou accepteurs, des points de branchements ou encore de nouveaux sites stimulateurs ou inhibiteurs d'épissage. Ainsi, on peut observer la « création d'exons cryptiques » (figure 42), des exons raccourcis suite à la délétion d'une partie de leurs séquences (figure 43) mais aussi des exons rallongés suite à la rétention d'un morceau d'intron (figure 44).

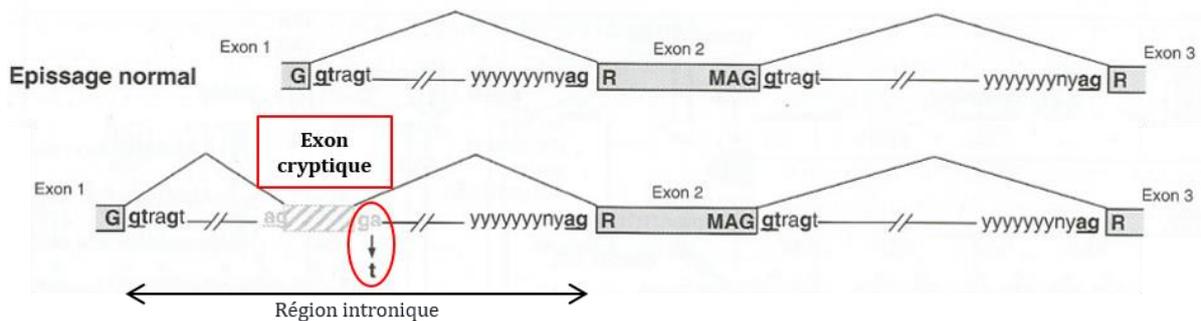


Figure 432 : Mutation responsable de la formation d'un exon cryptique

Extrait de « Génétique médicale » Martin Krahn

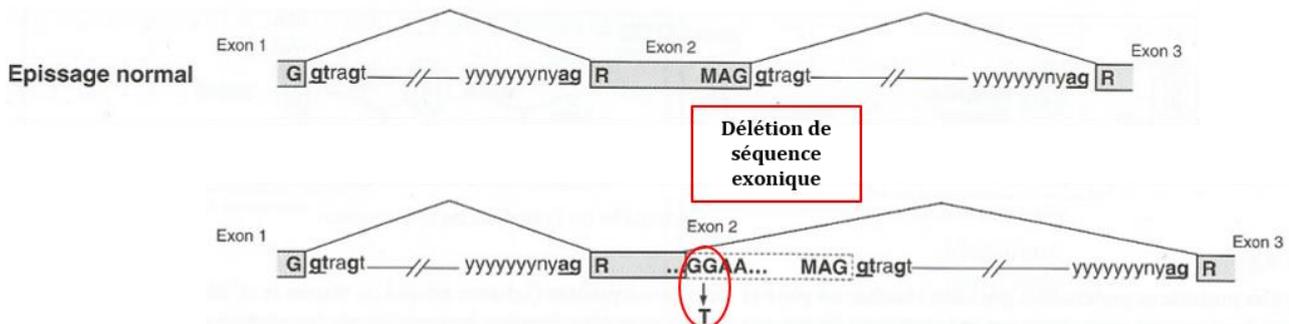


Figure 423 : Mutation intronique créatrice d'un site cryptique donneur d'épissage conduisant au raccourcissement de l'exon

Extrait de « Génétique médicale » Martin Krahn

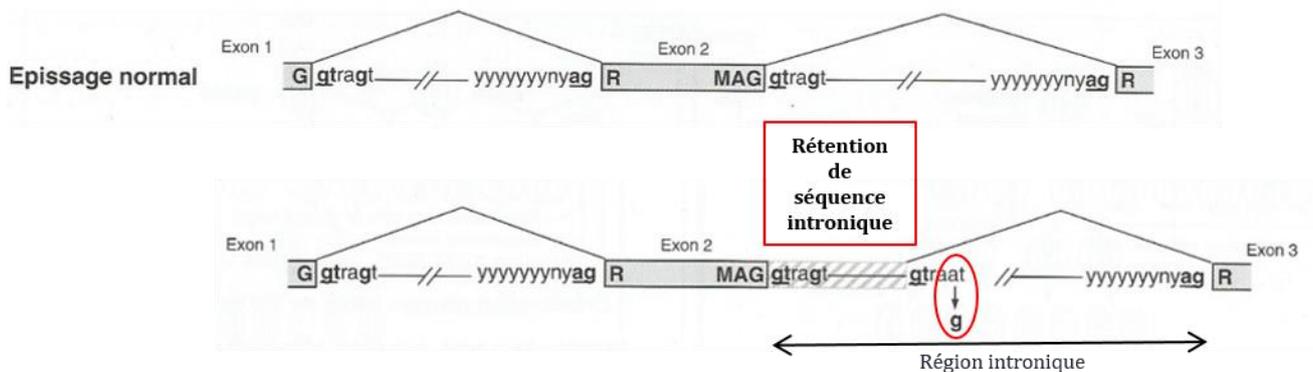


Figure 44 : Mutation exonique créatrice d'un site cryptique donneur d'épissage conduisant à l'allongement de l'exon

Un exemple de maladies due à la création de site cryptique d'épissage est le cas du syndrome de Hutchinson-Gilford encore appelé progéria (De Sandre-Giovannoli et al., 2003). Cette pathologie humaine rarissime et extrêmement grave, se caractérise par un vieillissement prématuré qui débute dès la période néonatale et une espérance de vie de l'ordre de 13 ans. La mutation causale de la progéria est une substitution de type transition (remplacement d'une cytosine par une thymine) qui se produit au niveau du dernier nucléotide d'un codon contenu dans l'exon 11 du gène LMNA (1q22), qui code la lamine A. Bien que la mutation soit isosémantique et donc sans impact sur l'acide aminé codé par le triplet qui la renferme (p.G608G), elle entraîne un défaut d'épissage en créant un site cryptique donneur qui conduit à la délétion en phase des cinquante derniers acides aminés de l'exon 11. La protéine ainsi produite est extrêmement toxique pour les cellules et conduit au phénotype gravissime observé chez les patients.

4.2. Mutations affectant la traduction

Nous l'avons vu, les mutations non-sens entraînent généralement l'absence de formation de la protéine ou la formation d'une protéine tronquée non fonctionnelle.

Les mutation faux-sens sont quant à elles responsables d'un changement d'acide aminé qui peut perturber la fonction de la protéine. Leur effet peut être très variable puisqu'elles peuvent affecter la maturation de la protéine, son adressage cellulaire, sa stabilité ou encore son activité enzymatique, sa capacité d'interaction avec ses partenaires. Du fait de cette diversité d'effet délétère, il est souvent nécessaire d'effectuer des tests fonctionnels pour déterminer la pathogénicité des variants.

La mutation faux-sens peut aussi bien entraîner une perte de fonction protéique qu'un gain de fonction. Plusieurs types de gain de fonction sont décrits.

Tout d'abord, lorsqu'elles sont présentes à l'état hétérozygote, certaines protéines mutantes peuvent exercer un effet dominant négatif sur les protéines codées par l'allèle sauvage. C'est ce que l'on observe pour certaines protéines de structure comme nous le verrons dans le cas de la dystrophie musculaire congénitale de type Ullrich [III.4.3.1.B].

Dans d'autres cas, la modification structurale peut conduire à l'acquisition d'une nouvelle fonction qui aura un effet « toxique », délétère pour la cellule qui l'exprime.

Enfin, le gain de fonction pathogène peut être dû à un excès de fonctionnement d'une protéine ou à sa surexpression comme nous le verrons dans le cas de la maladie de Charcot-Marie-Tooth [III.2.1].

En conclusion, on constate que les maladies neuromusculaires ont des origines très variables et que de très nombreux gènes sont impliqués dans leur développement. Du fait de la quantité croissante de ces gènes, une liste répertoriant l'ensemble des gènes responsables d'atteinte musculaire a été créée : la « *muscle gene table* ». Elle est disponible sur internet à l'adresse suivante : <http://www.musclegenetable.fr/> (Kaplan and Hamroun, 2015).

La plupart des approches de séquençage nouvelle génération se base sur cette liste pour choisir les gènes qui vont être intégrés dans leurs études diagnostics par panels de gènes (Gorokhova et al., 2015; Sevy et al., 2015). Les travaux de mon équipe montrent qu'il y a un total de 11467 mutations connues pour être responsables de maladies neuromusculaires parmi 306 gènes de la « *gene table* » (Gorokhova et al., 2015).

Une autre étude consacrée aux bases génétiques des phénotypes mendéliens estime que la moitié des gènes impliqués dans ce type de maladies n'a pas encore été découverte. Actuellement, seul 2937 gènes ont été identifiés sur les 4163 phénotypes mendéliens caractérisés (Chong et al., 2015).

Ces différentes données montrent bien la diversité des mutations et leur complexité.

III. Les pathologies du muscle d'origines génétiques : classification

1. Pathologies touchant le motoneurone

1.1. La sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La sclérose latérale amyotrophique (SLA), aussi connue sous le nom de maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative grave, d'apparition tardive (âge moyen de début entre 50 et 70 ans) de légère prédominance masculine (ratio H/F d'environ 1,5/1). Elle affecte à la fois les motoneurons centraux (du cortex moteur primaire) et périphériques (du tronc cérébral et de la moelle épinière). Ses caractéristiques cliniques se traduisent par une paralysie progressive des muscles impliqués dans la motricité volontaire avec parfois, un impact sur la phonation et la déglutition. Le plus souvent, c'est l'atteinte des muscles respiratoires qui cause le décès des patients dans les 3 à 5 ans après l'apparition de la maladie.

Bien que la sclérose latérale amyotrophique soit majoritairement sporadique, on dénombre environ 10% de cas familiaux d'origine génétique. Pendant longtemps, *SOD1* (21q22) fut le seul gène retrouvé muté chez les patients souffrant de cette maladie. La plupart des mutations répertoriées sont des substitutions exoniques et quelques cas de mutations introniques jouant sur l'épissage.

Au cours des quinze dernières années, d'autres gènes responsables tel que *TARDBP* (1p36), *VCP* (9p13) ou encore *C9ORF72* (9p21), dont la mutation est observée dans plus de 40% des formes familiales, ont été identifiés. Dans la majorité des cas, la transmission se fait selon un mode autosomique dominant (Ajroud-Driss and Siddique, 2015).

A l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'existe, la prise en charge est symptomatique, palliative et multidisciplinaire.

1.2. L'amyotrophie spinale proximale (SMA)

Les amyotrophies spinales proximales (ou SMA, du terme anglo-saxon « *Spinal Muscular Atrophy* ») sont un groupe de maladies rares, d'origine génétique, dues à la dégénérescence des motoneurons périphériques du tronc cérébral et de la corne antérieure de la moelle épinière.

Cliniquement, elles se caractérisent par une faiblesse musculaire liée à une paralysie plus ou moins importante, conséquence de l'atrophie des muscles proximaux et des muscles du tronc.

Parmi ces affections, on distingue quatre catégories qui sont classées en fonction de l'âge d'apparition des premiers symptômes, de l'atteinte musculaire, de ses conséquences sur les capacités motrices et le pronostic vital du patient. Les trois premiers types sont regroupés sous le terme d'amyotrophies spinales infantiles (ASI). Leur incidence est d'environ 1 naissance sur 10000 par an.

- le type I, appelé maladie de Werdnig-Hoffmann ou amyotrophie spinale infantile sévère est le plus communément retrouvé (60-70% des cas). Il apparaît avant l'âge de 6 mois et se caractérise par l'absence d'acquisition de la station assise. Le pronostic est, en général, réservé, le décès survenant au cours des deux premières années de la vie, dans la plupart des cas, par insuffisance respiratoire.

- le type II, ou amyotrophie spinale infantile intermédiaire, survient entre 6 et 18 mois avec une absence d'acquisition de la marche.

- le type III, aussi appelé amyotrophie spinale juvénile ou maladie de Kugelberg-Welander, se développe après l'âge d'acquisition de la marche (généralement entre 18 mois et 2 ans).

- le type IV ou amyotrophie spinale adulte, se manifeste à l'âge adulte.

La forme la plus fréquente est majoritairement due à des délétions homozygotes du gène *SMN1* (5q12.2-q13.3) qui code la protéine de survie du motoneurone SMN (pour *Survival Motor Neuron*). Elle se transmet généralement selon un mode autosomique récessif mais peut-être, dans 2% des cas environ, le fruit de mutations de novo. Chez un petit nombre de personnes atteintes ($\approx 10\%$) le gène *SMN1* est présent mais retrouvé muté et code donc une protéine non fonctionnelle.

Bien que la protéine de survie du motoneurone s'exprime de manière ubiquitaire, on n'explique toujours pas à ce jour pourquoi son absence conduit à la dégénérescence spécifique des motoneurons périphériques.

Chez 95% de la population générale et chez toutes les personnes atteintes de SMA, il existe un autre gène, *SMN2* (5q13.2), situé à proximité de *SMN1*, dont la séquence ne diffère que de cinq nucléotides par rapport à celle du gène *SMN1*. Cette variation a des conséquences au niveau de l'épissage de *SMN2* puisqu'elle conduit à la production, en quantité inégale, de deux transcrits d'ARNm. Le premier est synthétisé en quantité minime, c'est un transcrit entier, stable, identique à celui produit lors de la transcription de *SMN1*. Le second, très majoritaire, est un ARNm délété de l'exon 7 qui sera traduit en une protéine raccourcie, fragile, peu fonctionnelle et rapidement dégradée.

Bien que ce ne soit pas toujours exact, on constate généralement que la sévérité de l'amyotrophie spinale est inversement proportionnelle au nombre de copies de *SMN2*. En effet, 80% des patients atteints de SMA de type I ne possèdent qu'une ou deux copies du gène *SMN2*, 82% de ceux atteints de type II présentent 3 copies, et 96 % des patients atteints de SMA de type III présentent 3 ou 4 copies du gène *SMN2* (Medrano et al., 2016).

Le diagnostic repose sur les antécédents familiaux ainsi que l'examen clinique, et peut être confirmé génétiquement. En effet, l'absence de détection de l'exon 7 du gène *SMN1* conduit au diagnostic de SMA dans 95 % des cas.

Aujourd'hui, aucun médicament n'existe pour soigner ces pathologies. Le traitement reste symptomatique avec des prises en charge respiratoires et nutritives ayant pour but d'améliorer la qualité de vie. Cependant, des essais cliniques de thérapie génique très prometteurs ont été menés récemment aux Etats-Unis, ils visaient à apporter, chez quinze patients, une copie sauvage du gène *SMN1* à l'aide d'un vecteur AAV9. Les résultats de cette étude indiquent une amélioration importante du phénotype (Jerry Mendell, Oral communication, Myology 2016 congress).

2. Pathologies touchant le nerf périphérique : les neuropathies

2.1. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) représente un groupe de maladies neuromusculaires évolutives, cliniquement et génétiquement hétérogènes. Ce sont des neuropathies périphériques héréditaires sensibles et motrices, qui n'entament pas l'espérance de vie.

Elles se caractérisent par une atteinte des nerfs périphériques des membres supérieurs et inférieurs consécutive à une altération ou un déficit protéique au niveau de la gaine de myéline (formes démyélinisantes) (Bird, 1993a) ou de l'axone lui-même (formes axonales)(Bird, 1993b). Elles débutent la plupart du temps dans l'enfance ou chez l'adulte jeune par des difficultés à la marche ou des déformations des pieds.

De nombreuses formes de la maladie ont été décrites et sont classées selon trois critères :

- la nature de l'atteinte du nerf périphérique, évaluée à l'électroneuromyogramme et déterminée par les vitesses de conduction nerveuse obtenues ;
- le mode de transmission génétique (autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X) ;
- le gène responsable de la maladie (plus d'une quarantaine sont actuellement identifiés).

C'est la maladie neurologique héréditaire la plus fréquente puisqu'elle concerne entre 30000 et 50000 personnes en France (c'est-à-dire entre 1 personne sur 1500 et 1 personne sur 1200) (Rossor et al., 2016).

La forme de CMT de type 1A est la plus fréquente, elle est due à une duplication du gène *PMP22* (17p11-p12) qui entraîne la surexpression d'une protéine très abondante dans la myéline, la *Peripheral Myelin Protein 22* (Watila and Balarabe, 2015).

L'étude de ce gène a une nouvelle fois montré combien le rapport mutation/maladie peut être complexe car d'autres types de neuropathies mettant en cause *PMP22* ont été rapportées (Li et al., 2013). En effet, les patients porteurs d'une délétion de *PMP22*, développent quant à eux une maladie différente appelée neuropathie héréditaire avec hypersensibilité des nerfs à la pression (HNPP) (Li, 2014; van Paassen et al., 2014). Enfin, dans de plus rares cas, un troisième type de maladie, la CMT1E est également due à une anomalie du gène *PMP22*. Dans ce cas-ci, le nombre de copies de *PMP22* est normal mais le gène est porteur de mutations faux-sens dans sa séquence (Li et al., 2013).

Actuellement, aucun traitement n'existe pour soigner les malades souffrant de CMT. Seuls divers soins de kinésithérapie et de chirurgie orthopédique sont mis en place pour essayer de ralentir l'évolution de la maladie et améliorer la qualité de vie des patients.

Le diagnostic de CMT peut être fait de différentes manières : la plus fréquente est réalisée à l'aide d'un électromyogramme (EMG). Il est également possible de faire une analyse génétique à partir d'une prise de sang pour les formes de la maladie dont le gène est connu. Néanmoins il faut parfois recourir à une biopsie nerveuse pour les formes atypiques.

L'électromyogramme permet de distinguer les atteintes de la gaine de myéline avec diminution des vitesses de conduction motrice (souvent moins de 30 m/sec sur le nerf médian) de la dégénérescence axonale avec des vitesses de conduction motrice sensiblement normales. Ces examens aident à déterminer de quel type et de quel sous-type de CMT est atteint chaque patient (Dubourg, 2012).

Les CMT offrent une grande hétérogénéité génétique c'est-à-dire que, sous un même nom, on trouve des maladies dues à des gènes différents, situés sur des chromosomes différents, mais le tableau clinique reste sensiblement le même. Il y a plusieurs formes de CMT qui se différencient par leur mode de transmission, leur localisation génétique et la partie du nerf affectée :

Les CMT de type 1 (type démyélinisant) présentent une vitesse de conduction nerveuse ralentie du fait d'un dysfonctionnement de la gaine de myéline (Bird, 1993a). Les CMT de type 2 (type axonal) ont des vitesses de conduction nerveuse normales car le problème réside dans l'axone et non plus dans la gaine de myéline (Bird, 1993b). Les CMT liées à l'X ont une myéline anormale et des vitesses de conduction légèrement ralenties (Liu and Zhang, 2014). Chacun de ces types est ensuite subdivisé en sous-types (1A, 1B..., 2A, 2B...) en fonction du gène touché. Actuellement, plus d'une quarantaine de gènes sont responsable de CMT (Bird, 1993c).

2.2. Les Ataxies

On regroupe sous le terme d'ataxies un grand nombre de maladies dont le point commun est une perturbation de l'équilibre et de la coordination motrice volontaire qui n'est pas due à une déficience physique des muscles mais plutôt à une atteinte du système nerveux.

Pour des raisons de synthèse, seule l'ataxie héréditaire la plus fréquente va être décrite dans le paragraphe suivant.

2.2.1. L'ataxie de Friedreich

L'ataxie de Friedreich est une maladie neurodégénérative d'origine génétique, qui débute généralement chez l'enfant ou l'adulte jeune (en moyenne vers quinze ans, dans 80% des cas avant vingt ans). De transmission autosomique récessive, elle est presque toujours due à l'expansion du triplet GAA (normalement présent avec moins de quarante répétitions) situé dans l'intron 1 du gène *FRDA* (9q13) qui code une protéine mitochondriale : la frataxine (Muthuswamy and Agarwal, 2015).

Cette augmentation importante du nombre de répétitions (de 100 à 2000) du trinuéotide entraîne des modifications épigénétiques qui affectent la structure chromatinienne du gène *FRDA* et diminue son taux de transcription. Ainsi, par effet hypomorphe, la synthèse de la frataxine est diminuée, ce qui a un effet direct sur le métabolisme énergétique de la cellule (Sandi et al., 2014).

Cliniquement, l'ataxie de Friedreich se caractérise par des troubles de la coordination des mouvements, de l'articulation, associés à d'autres signes neurologiques (abolition des réflexes, troubles ostéo-articulaires) ainsi qu'une cardiomyopathie et parfois un diabète. Une atteinte des nerfs sensitifs périphériques est fréquemment mise en évidence par électromyogramme. Les facultés intellectuelles ne sont pas altérées. L'évolution est progressive et la marche devient impossible sans aide après dix à vingt ans d'évolution (Patel et al., 2016).

En France, cette pathologie touche environ 1 personne sur 50 000 aussi bien les hommes que les femmes.

Il n'y a pas de traitement permettant de guérir l'ataxie de Friedreich mais de nouveaux travaux visant à restaurer la fonction mitochondriale sont en cours d'évaluation (Abeti et al., 2015). La prise en charge consiste en un suivi neurologique, cardiologique et du diabète. La rééducation fonctionnelle occupe une place importante dans le traitement de la maladie.

Le décès survient à un âge très variable, du fait de complications cardiaques et respiratoires. Cependant, dans certains cas, la maladie peut progresser beaucoup plus lentement avec de longues périodes où les symptômes restent relativement stables.

3. Myopathies touchant la jonction neuromusculaire

Quelles que soient les causes qui les provoquent, les dysfonctionnements de la jonction neuromusculaire ont un point commun : ils se manifestent tous par un syndrome myasthénique. La caractéristique clinique essentielle de ce syndrome est la survenue d'une fatigabilité musculaire suivie d'un épuisement rapide et progressif de la force musculaire, au cours d'un effort répété ou maintenu. Cette faiblesse, liée à une anomalie dans le fonctionnement de la jonction neuromusculaire entraîne le blocage de la transmission de l'influx nerveux.

La jonction neuromusculaire est une structure essentielle pour le fonctionnement du muscle car elle assure la transmission de l'information provenant du motoneurone α (qu'elle soit d'origine volontaire, automatique ou réflexe) pour déclencher la contraction musculaire, grâce à un neuromédiateur, l'acétylcholine.

3.1. Les myasthénies

Les myasthénies peuvent être classées en deux groupes distincts, les myasthénies congénitales et les myasthénies auto-immunes acquises.

3.1.1. Les myasthénies congénitales

Ce groupe de myasthénies englobe les syndromes myasthéniques congénitaux (SMC). Beaucoup plus rares que les myasthénies auto-immunes, ils ont une prévalence de 1 à 2 pour 500000. Ils sont dus à un dysfonctionnement de la jonction neuromusculaire consécutif à une anomalie génétique des protéines qui la constituent. Débutant habituellement dans la période néonatale ou la petite enfance, il arrive plus rarement que ces affections apparaissent au cours de l'adolescence ou à l'âge adulte. Toutes se transmettent sur un mode autosomique récessif (sauf le syndrome du canal lent qui est dominant) (Abicht et al., 1993).

La présentation clinique la plus classique des syndromes myasthéniques congénitaux est une faiblesse musculaire des membres doublée d'atteintes oculaires, faciales et bulbaires. On peut également observer des troubles respiratoires dans les cas les plus sévères. Indépendamment du degré d'atteinte de la maladie, ces déficiences sont accentuées au cours de l'effort (Abicht et al., 1993).

Sur le plan moléculaire on distingue trois types de SMC qui sont classées en fonction de la zone d'expression de la protéine mutée responsable : les SMC présynaptiques, synaptiques et postsynaptiques (Ohno, 2012).

Les premiers, les plus rares, peuvent être dus, soit à une diminution des vésicules synaptiques avec la réduction des *quanta* d'acétylcholine qui en découle, soit à un défaut de la resynthèse de l'acétylcholine et de son stockage. Ils sont principalement dus à des mutations tronquantes qui surviennent dans le gène *ChAT*(10q11.2) codant la choline acétyltransferase (Schara et al., 2010).

Les deuxièmes sont consécutives à un déficit d'acétylcholinestérase de la plaque motrice. Dans ce type de pathologie, les protéines mutées sont localisées dans la queue riche en collagène de l'enzyme qui assure, en temps normal, sa fixation à la lame basale. La plupart des mutations retrouvées dans le gène *COLQ* (3p25) sont de type non-sens (Guyen et al., 2012) ou faux-sens (Azuma et al., 2015) et ont pour effet de réduire l'activité enzymatique de la protéine et donc de ne plus assurer sa fixation à la lame basale.

Enfin, on distingue les SMC postsynaptiques qui peuvent être d'origine différente mais qui sont considérés comme les plus fréquents. On peut par exemple retrouver des mutations dans des protéines formant le récepteur à l'acétylcholine qui entraîneront une anomalie dans leur fonctionnement et conduiront au « syndrome du canal lent ». Cette maladie se caractérise par un trop grand nombre de canaux calciques ouverts et par une durée d'ouverture supérieure à la normale, ce qui va impacter l'amplitude et le temps de décroissance des potentiels de plaque miniature. D'autres gènes tels que *RAPSN*(11p11), *MuSK*(9q31), ou encore *Dok7*(4p16) peuvent être responsable de ce type de pathologies (Ben Ammar et al., 2010; Lorenzoni et al., 2013; Luan et al., 2016; Muller et al., 2004).

Le gène *RAPSN*(11p11) code la rapsyne, une protéine dont le rôle est de s'associer aux récepteurs de l'acétylcholine pour les regrouper dans la membrane postsynaptique. Lorsqu'il est muté, ce gène est pratiquement toujours porteur de la même mutation, la mutation p.N88K. Une étude effectuée sur des patients d'origine ethnique diverse, européenne et indienne, et tous porteurs de l'allèle N88K a montré que cette mutation serait liée à l'effet fondateur d'un évènement apparu il y a longtemps dans la population Indo-Européenne (Muller et al., 2004).

A ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible pour cette pathologie. Il est également difficile de donner un pronostic fiable quant à l'évolution de la maladie et ce, quel que soit le gène mis en cause. Il existe cependant trois classes pharmacologiques de médicaments qui sont aujourd'hui utilisés pour moduler la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire : les anticholinestérasiques, la toxine botulique et les curares. Leurs mécanismes d'action mettent en jeu : l'inhibition de la dégradation de l'acétylcholine ou le blocage de sa libération pour les deux premiers. Les curares quant à eux peuvent soit bloquer les récepteurs postsynaptiques à l'acétylcholine ou bien provoquer une dépolarisation soutenue liée à une libération massive d'acétylcholine.

4. Myopathies touchant la fibre musculaire

4.1. Les myopathies congénitales

Le groupe des myopathies congénitales renferme de nombreuses affections musculaires cliniquement présentes dès la naissance, souvent sous la forme d'une hypotonie du nourrisson. Les lésions constatées dans le tissu musculaire sont caractérisées par une anomalie des structures qui le constituent, en l'absence d'aspect dystrophique ou de signes traduisant une atteinte du système nerveux ou périphérique. La gravité de ce type d'affection est variable d'une forme à une autre et c'est l'examen histologique du tissu qui permet seul le diagnostic.

Comme on observe différentes caractéristiques au niveau de la fibre, on peut classer les myopathies congénitales en plusieurs sous-groupes, généralement au nombre de quatre. On trouve le groupe des myopathies à noyaux centraux, celui des myopathies à cores, le groupe des myopathies avec accumulation de protéines et un dernier ensemble qui réunit toutes les autres myopathies congénitales.

4.1.1. Les myopathies à noyaux centraux

Le premier groupe comprend les myopathies centronucléaires et myotubulaires qui s'individualisent par la présence de centralisations nucléaires évocatrices de troubles de la myogénèse bloqués au stade de myotube. Plusieurs formes de transmission existent pour ce type de pathologies :

Les formes autosomiques dominantes sont liées à des mutations dans les gènes *DNM2* (19p13.2) et *BIN1* (2q14) qui codent respectivement les protéines « dynamine-2 » et « amphiphysine » (Jungbluth and Gautel, 2014). De manière intéressante, on notera que certaines mutations dans le gène *DNM2* sont également responsables de neuropathies de type CMT 2B (Echaniz-Laguna et al., 2007). Encore une fois, on constate que la mise en évidence de mutations génétiques est parfois insuffisante pour confirmer le type de maladie en présence et qu'il est indispensable de prendre en compte le tableau clinique du patient pour établir un diagnostic.

Le gène *BIN1* peut également être mis en cause dans des formes autosomiques récessives tout comme les gènes *RYR1* et *TTN* (Jungbluth and Gautel, 2014).

Enfin, une forme liée à l'X a également été rapportée, elle est due à des mutations du gène codant la myotubularine (*MTM1* ; Xq27.3-q28) (Jungbluth and Gautel, 2014).

4.1.2. Les myopathies à cores

En microscopie, les myopathies à cores sont caractérisées par la présence à l'intérieur de la fibre musculaire, de zones anormales, les cores, qui sont des désorganisations au niveau des sarcomères caractérisées par la présence de régions dépourvues d'activité oxydative. Selon le nombre, la forme, la taille ou la localisation des cores, on distingue les myopathies à cores centraux de celles à multi-minicores. Celles à cores centraux sont le résultat de mutations survenues dans le gène *RyR1* qui, comme nous l'avons vu, code un canal calcique très important lors de la contraction musculaire. Il existe plus de trois cents mutations identifiées sur la séquence complète de la protéine RyR1. De rares cas de myopathies à multi-minicores dues à des mutations récessives dans *RyR1* ont été rapportées (Jeong et al., 2008).

Cependant, certaines mutations retrouvées dans *RyR1* ne sont pas responsables de myopathies à cores centraux mais peuvent conduire à un autre type de maladie, l'hyperthermie maligne, une maladie pharmacogénétique héréditaire à transmission autosomique dominante (Brislin and Theroux, 2013). Chez les personnes porteuses de ces mutations, l'exposition lors d'une anesthésie, à des dérivés halogénés comme l'halothane peut être fatale. Elle conduit à une hyperthermie, une rhabdomyolyse, une hypercapnie, un hypermétabolisme et une contraction généralisée qui est fatale dans 70% des cas sans traitement. Seule l'administration rapide de dantrolène peut bloquer l'emballement de tout le processus (Kollmann-Camaiera et al., 2016). Un test IVCT (pour *in vitro contracture test*) réalisé à partir d'une biopsie peut mesurer la prédisposition d'un patient à l'hyperthermie maligne.

4.1.3. Les myopathies avec accumulation de protéines

Les myopathies avec accumulation de protéines sont caractérisées par la présence anormale d'amas de protéines dans les fibres musculaires. Ce groupe renferme, entre autres, les myopathies à bâtonnets ou myopathie à némaline, caractérisées par la présence d'inclusion en forme de bâtonnets dont la structure évoque fortement l'aspect de la strie Z. Les mutations qui sont à l'origine de cette myopathie congénitale concernent des gènes codant des protéines impliquées dans la structure et la fonction des filaments fins d'actine, ce qui impacte la formation de la strie Z.

Actuellement sept gènes sont identifiés mais aucune corrélation génotype/phénotype évidente n'a jusqu'ici pu être établie. Ce sont les gènes : *NEB* (2q23.3) qui code la nébuline, *TPM2* (9p13) et *TPM3* (1q21.2) qui codent les tropomyosine-2 et -3, *ACTA1* (1q42.13) pour l' α -actinine, *TNNT1* (19q13.4) codant la troponine-1, *CFL2* (14q12) pour la cofiline-2 et enfin le gène *KBTBD13* (15q22.31) (Malfatti and Romero, 2016).

4.1.4. Les myopathies congénitales rares

Cette catégorie renferme toutes les myopathies congénitales rares présentant des anomalies de structure à l'intérieur de la fibre et n'entrant pas dans les sous-groupes précédemment décrits.

Parmi elles, on trouve les myopathies à agrégats tubulaires pour lesquelles l'anomalie morphologique des fibres musculaires est caractérisée par une accumulation de tubules membranaires agencés de manière caractéristique (figure 45). Bien que l'anomalie histologique soit présente dès la naissance, les premiers symptômes eux, n'apparaîtront que beaucoup plus tard. Le cas d'une famille dans laquelle des individus asymptomatiques présentent ce type d'anomalies a également été décrit (Böhm et al., 2013). On classe donc dans ce groupe de pathologies, les formes de myopathies secondaires ou d'apparition tardive.

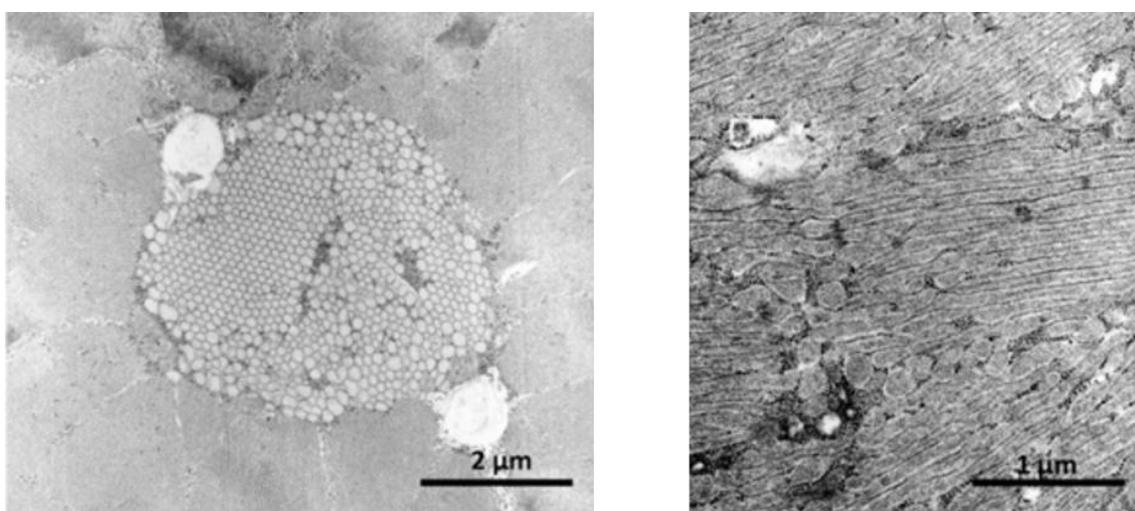


Figure 45 : Mise en évidence d'agrégats tubulaires sur une biopsie musculaire de patients.

Observations faites par microscopie électronique sur coupe transversale à gauche et longitudinale à droite.

Böhm et al., 2013

Des mutations dominantes de type faux-sens ont été identifiées dans les gènes *STIM1* et *ORAI1* et sont à l'origine de myopathies à agrégats tubulaires (Boehm et al., 2014; Böhm et al., 2013; Endo et al., 2015). Dans les deux cas, ces mutations confèrent un gain de fonction aux protéines *STIM1* et *ORAI1* qui restent actives quel que soit la concentration calcique à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique.

Lorsque la protéine *STIM1* est mutée, elle est « hyperactivée » et reste liée au récepteur-canal membranaire *ORAI1* qui va demeurer ouvert en permanence. De ce fait, l'équilibre calcique intracellulaire sera alors perturbé puisque, même en dehors des phases d'excitation-contraction, les molécules de calcium vont pouvoir diffuser librement à travers le canal jusqu'à atteindre un équilibre ionique (Lacruz and Feske, 2015).

Lorsque les mutations sont situées dans le gène *ORAI1*, elles sont aussi responsables d'un gain de fonction de la protéine qui conduit au même résultat : le calcium diffuse librement dans la cellule car le canal calcique est maintenu ouvert même lorsqu'il n'y a pas d'interaction avec *STIM1*.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'impact que peuvent avoir des mutations de *STIM1* sur ce mécanisme d'activation constitutif. En effet, suite aux travaux réalisés par une équipe de Strasbourg, en collaboration avec des membres de mon équipe, sur une famille de patients asymptomatiques porteurs de mutations *STIM1* découvertes fortuitement, j'ai voulu comprendre pourquoi eux, ne développaient pas la maladie (Böhm et al., 2013). Ainsi, j'ai étudié par calorimétrie, les mécanismes d'oligomérisation de la protéine et ceux permettant la fixation du calcium.

4.2. Les myopathies myofibrillaires

Les myopathies myofibrillaires (MMF) représentent un groupe de maladies neuromusculaires très rares qui touchent les myofibrilles et se développent à l'âge adulte. Bien qu'elles puissent avoir des manifestations cliniques diverses, leur caractéristique majeure est une faiblesse musculaire progressive plus ou moins rapide (Béhin et al., 2015). Du fait de mutations dans des gènes différents, le diagnostic de ce type de pathologies se fait lors d'analyses microscopiques sur des biopsies musculaires puisqu'elles partagent un phénotype morphologique commun.

En effet, on observe communément au niveau des cellules :

- Une désorganisation du réseau de myofibrilles entraînant des problèmes de contraction musculaire,
- Des inclusions intracellulaires anormales de protéines qui apparaissent sous forme d'agrégats.

Ces agrégats sont le fruit d'une accumulation excessive et toxique de protéines qui ne pourront non seulement plus jouer leur rôle dans la cellule mais entraîneront un déficit moléculaire.

A ce jour, six protéines sont responsables de ces phénotypes lorsqu'elles sont mutées (Béhin et al., 2015):

- La **desmine** [*DES* (2q35)],
- L' **$\alpha\beta$ -cristalline** [*CRYAB* (11q23)],
- La **myotiline** [*MYOT* (5q31)],
- La **protéine ZASP** [*ZASP* (10q23.2)],
- La **filamine C** [*FLNC* (7q32)],
- La **protéine BAG3** [*BAG3* (10q26)].

Comme nous l'avons déjà décrit, un même gène peut être responsable de maladies différentes quand il est muté. C'est notamment le cas ici pour le gène *DES* qui est impliqué dans des LGMD d'origine autosomique dominante ou récessive (Clemen et al., 2013; Nigro and Savarese, 2014) ou encore le gène *MYOT* également responsable de LGMD1A (Olivé et al., 2005).

4.3. Les dystrophies musculaires congénitales

Le nom de dystrophie musculaire congénitale (DMC) est donné à un groupe très hétérogène de maladies neuromusculaires rares et souvent sévères, d'origine génétique. Les symptômes qui les caractérisent apparaissent généralement à la naissance ou dès les premiers mois de la vie, avec la présence d'une nécrose et de signes de régénération, ce qui les oppose aux myopathies congénitales. L'affection est prédominante au niveau des muscles squelettiques, on observe une faiblesse musculaire, une hypotonie, une amyotrophie et un retard moteur. Plus rarement, des atteintes du système nerveux central ou des complications du type rétractions musculo-tendineuses et difficultés respiratoires sont présentes (Falsaperla et al., 2016).

Les dystrophies musculaires congénitales représentent la deuxième cause d'hypotonie congénitale d'origine musculaire, après les myopathies congénitales. Ce sont des affections qui touchent aussi bien les filles que les garçons et dont le diagnostic est souvent difficile du fait de la grande hétérogénéité clinique, immunohistochimique et génétique (plus d'une vingtaine de gènes responsables identifiés). Ainsi, l'observation de facteurs tels qu'un déficit intellectuel ou des taux de créatine kinase (CK) élevés permettent d'orienter le diagnostic vers un type de DMC plutôt qu'un autre. Pour cette même raison, la prévalence réelle est inconnue mais peut-être estimée à 5/100000 (Mendell et al., 2006).

Les anomalies observées dans ce type de pathologies peuvent impacter la cellule à différents niveaux (figure 46) (Jaalouk and Lammerding, 2009).

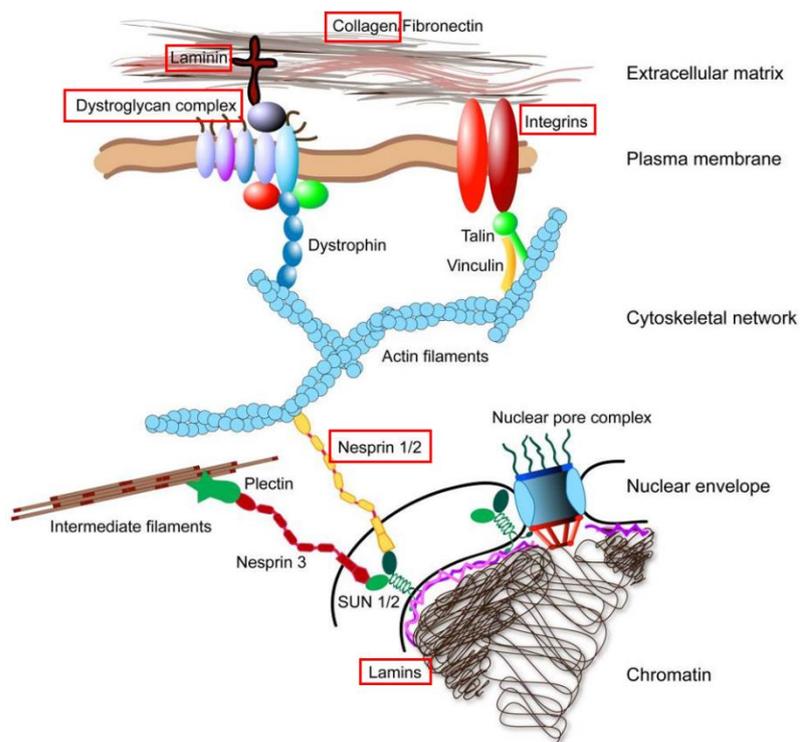


Figure 46 : Principales protéines impliquées dans les dystrophies musculaires congénitales

La cellule peut être impactée en différents points : au niveau de la matrice extracellulaire (laminine 2, collagène-VI), du sarcolemme (DAC, intégrine- α 7) ou de l'enveloppe nucléaire (nesprine-1, lamine A)

Jaalouk and Lammerding, 2009

Les protéines mutées peuvent se situer :

- Dans la matrice extracellulaire (DMC1A, DMC d'Ullrich et myopathie de Bethlem),
- Dans la membrane sarcoplasmique, au niveau du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine ou des récepteurs membranaires (α -dystroglycanopathies, intégrinopathies),
- A l'échelle de l'enveloppe nucléaire (DMC liées à la Nesprine-1 et à la lamine A).

De ce fait, en plus du tableau clinique, le diagnostic repose sur l'étude immunohistochimique d'une biopsie musculaire et d'un examen génétique moléculaire.

Afin de faciliter la lecture des prochains paragraphes, je classerai les différents types de DMC en suivant la nomenclature citée ci-dessus.

4.3.1. Les DMC avec anomalies des protéines liées à la matrice extracellulaire

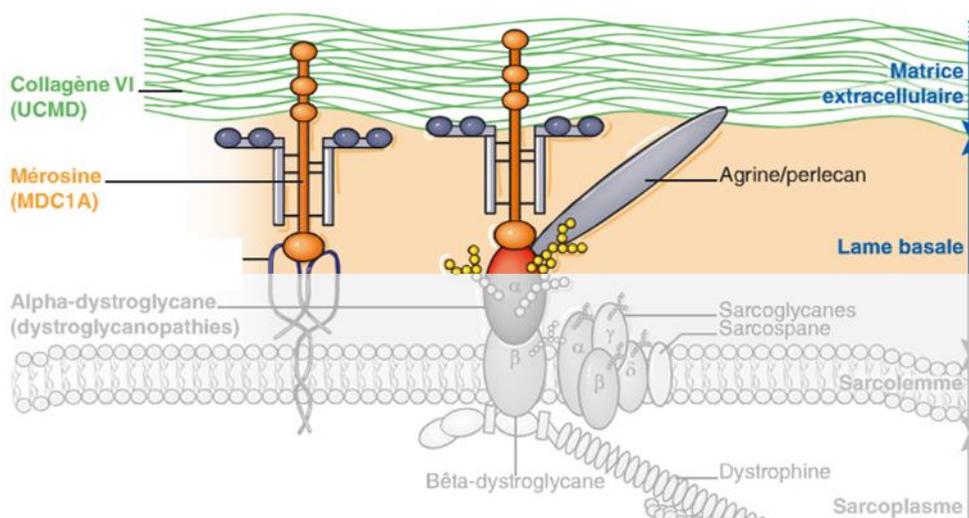


Figure 47 : Représentation schématique des différentes protéines impliquées dans les dystrophies musculaires congénitales (DMC) au niveau de la matrice extracellulaire

UCMD : syndrome d'Ullrich par mutation du collagène VI ; MDC1A : déficit en mérosine.

F. Rivier, M. Mercier, G. Hugon, D. Mornet, B. Echenne. Dystrophies musculaires congénitales. EMC - Neurologie 2010;1-16 [Article 17-173-A-20]

A. La dystrophie congénitale avec déficit primaire en mérosine (DMC1A)

La dystrophie musculaire congénitale de type 1A (DMC1A) ou DMC avec déficit primaire en laminine- α 2 (mérosine), est la forme la plus fréquente puisqu'elle représente environ 30 % à 40 % des dystrophies musculaires congénitales (prévalence estimée à 1/30 000) (Mendell et al., 2006; Turner et al., 2015). Outre les phénotypes cliniques habituellement retrouvés dans ce groupe de maladies, l'atteinte respiratoire est presque constante.

On observe également, chez les patients souffrant de mérosinopathies, un taux de créatine kinase quatre fois supérieur à la normale ainsi que des anomalies cérébrales, fréquemment au niveau de la substance blanche, dès l'âge de un an. Cependant, le développement intellectuel est normal (Jones et al., 2001 ; Leite et al., 2005 ; Mercuri E and Muntoni F, 2012).

La maladie se transmet de manière autosomique récessive. Elle est la conséquence de mutations retrouvées dans le gène *LAMA2* (6q22-q23) qui code une protéine constitutive de la lame basale des cellules musculaires : la mérosine ou laminine- $\alpha 2$. Comme nous l'avons vu, la lame basale assure l'ancrage de la cellule musculaire au tissu conjonctif qui l'entoure. Le déficit en mérosine, visible par immunocytochimie ou Western blot, s'observe également sur la biopsie musculaire et se caractérise par une fibrose importante et une inégalité de la taille des fibres. Peu de fibres en nécrose sont cependant observées dans cette pathologie par rapport à d'autres dystrophies musculaires (Mendell et al., 2006).

Les mutations *LAMA2* répertoriées dans les bases de données sont variées, on trouve aussi bien des délétions, des faux-sens, non-sens ou encore des mutations introniques jouant sur l'épissage (Turner et al., 2015).

L'évolution de cette DMC est assez stéréotypée dans l'ensemble. Une fois installé, le déficit musculaire n'est pas évolutif, ou s'il l'est, c'est à un rythme lent. L'absence actuelle de traitement curatif oriente l'attitude thérapeutique vers une prise en charge symptomatique et multidisciplinaire de la maladie.

Les progrès réalisés dans ces domaines et en matière de diagnostic ont permis d'améliorer la qualité et l'espérance de vie des enfants atteints. La majorité d'entre eux arrive à l'âge adulte malgré une situation de handicap très importante. Néanmoins, l'insuffisance respiratoire et l'atteinte cérébrale sont les principales causes de mortalité.

B. La dystrophie congénitale d'Ullrich (DMCU)

La dystrophie musculaire congénitale de type Ullrich (DMCU) se caractérise par une atteinte musculaire précoce de type dystrophique, une hypotonie sévère avec de multiples contractures des articulations proximales et une hyper-mobilité des articulations distales, le tout associé à une IRM et une intelligence normale. Les muscles respiratoires peuvent être affectés, le taux de créatine kinase sérique est généralement normal mais peut légèrement augmenter selon les patients.

C'est une pathologie rare qui semble pourtant être la deuxième cause de DMC la plus fréquente en France.

De transmission autosomique récessive, la DMCU est due à des mutations dans l'un des 3 gènes *COL6A1*(21q22.3), *COL6A2*(21q22.3) ou *COL6A3*(2q37) qui codent respectivement les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du collagène VI, molécule hétérotrimérique faite de l'association de ces trois sous-unités.

Ainsi, lorsqu'une des sous-unités est mutée, elle impactera la conformation finale de la molécule de collagène VI, empêchant alors la production d'une protéine fonctionnelle (Allamand et al., 2011).

Tout comme la laminine- α 2, le collagène VI est un des constituants principaux de la lame basale. Lorsqu'il est muté, il ne joue plus son rôle de soutien du tissu, ce qui entraîne une désorganisation de la fibre musculaire, une altération de sa membrane et l'apparition de la maladie. En général, des anomalies de structure (comme des différences de taille entre fibres musculaires, des traces de nécrose puis de régénération) sont bien visibles sur la biopsie musculaire et l'absence complète ou partielle de collagène VI peut facilement être mise en évidence. La détection des mutations dans les trois gènes *COL6A1*, *A2* et *A3* permet de poser définitivement le diagnostic.

La peau étant un tissu très riche en molécules de collagène et notamment en collagène VI, il n'est pas étonnant d'observer des problèmes de peau chez les patients souffrant de cette forme de DMC (Bozorgmehr et al., 2013; Zulian et al., 2014).

Comme dans la DMC1A, il n'existe pas de thérapie curative mais la prise en charge symptomatique dès le plus jeune âge peut grandement améliorer la qualité de vie des patients.

C. La myopathie de Bethlem (Collagène VI)

La Myopathie de Bethlem n'est pas réellement considérée comme une dystrophie musculaire congénitale mais est incluse dans la famille des collagénopathies de type VI. En effet, elle résulte de mutations dans les gènes *COL6A1*, *A2* ou *A3*, comme la dystrophie musculaire d'Ullrich (Bushby et al., 2014). Plusieurs divergences importantes peuvent néanmoins être mise en évidence pour différencier ces deux pathologies voisines : la myopathie de Bethlem s'exprime de manière beaucoup plus modérée que la DMCU et n'apparaît qu'à l'âge adulte (d'où le fait de ne pas la classer dans les DMC). Le mode de transmission de ces deux maladies est également distinct, la première se transmet selon un mode autosomique dominant tandis que la DMCU est autosomique récessive. Le caractère dominant des mutations dans la myopathie de Bethlem peut expliquer le phénotype beaucoup plus modéré de la maladie. En effet, d'après la probabilité, la moitié des molécules de collagène VI seront fonctionnelles car composées de sous-unités α codées par l'allèle sauvage (Bushby et al., 2014).

Enfin, la myopathie de Bethlem semble encore plus rare que celle d'Ullrich.

4.3.2. Les DMC avec anomalies des protéines liées à la membrane sarcoplasmique

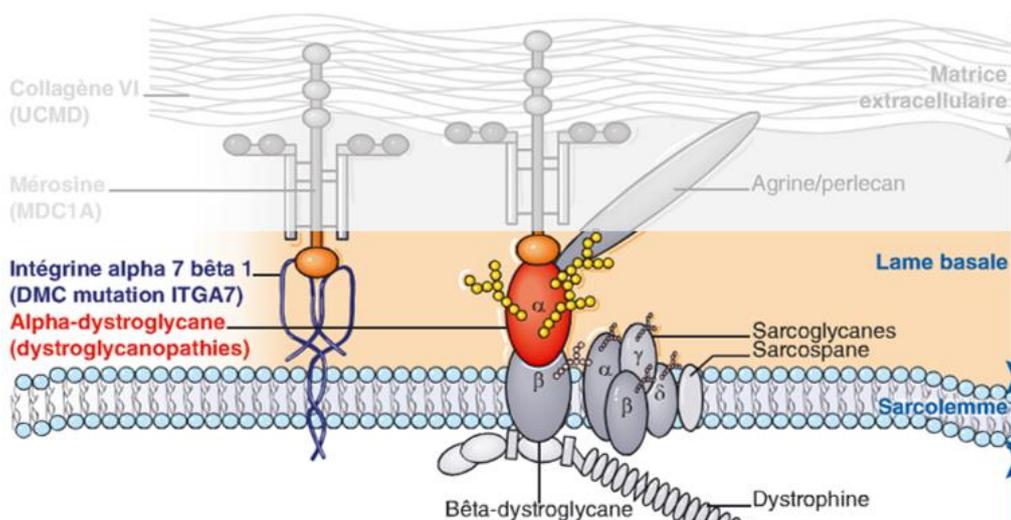


Figure 48 : Représentation schématique des différentes protéines impliquées dans les dystrophies musculaires congénitales (DMC) au niveau du sarcolemme

F. Rivier, M. Mercier, G. Hugon, D. Mornet, B. Echenne. Dystrophies musculaires congénitales. EMC - Neurologie 2010;1-16 [Article 17-173-A-20]

A. La dystrophie avec déficit en intégrine- $\alpha 7$

Quelques cas de dystrophies musculaires avec déficit en intégrine- $\alpha 7$ ont été décrits dans la littérature (Hayashi et al., 1998). En dehors du mode de transmission autosomique récessif mis en évidence, aucun phénotype précis n'a pu être identifié. Pour cette raison, cette maladie n'entre pas dans la classification officielle des DMC mais demeure une bonne candidate.

Sur le plan génétique, l'affection est due à des mutations retrouvées dans le gène *ITGA7* (12q13) qui code la sous-unité d'intégrine- $\alpha 7$ spécifique des muscles squelettiques et cardiaque. Les trois patients décrits par Hayashi et collègues sont soit porteurs de mutations impactant l'épissage, soit de délétions entraînant un décalage du cadre de lecture, soit leur ARNm est plus faiblement exprimé par rapport aux individus sains (Hayashi et al., 1998).

Dans les muscles, l'intégrine- $\alpha 7$ s'associe avec la sous-unité d'expression ubiquitaire $\beta 1$ pour former un des récepteurs membranaires les plus fréquemment retrouvés à la surface des cellules musculaires : l'intégrine $\alpha 7\beta 1$. Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe « Les intégrines, composants principaux de la matrice extracellulaire » [I.3.2.3.B.d], cette molécule interagit avec d'autres protéines de la lame basale, en particulier la laminine 2, et fait partie intégrante de l'échafaudage protéique mis en place pour maintenir la structure de la fibre. L'absence de laminine 2 étant responsable de la DMC1A (voir paragraphe plus haut), il ne serait pas étonnant qu'un déficit en une protéine partenaire telle que la sous-unité intégrine- $\alpha 7$ soit également responsable d'une dystrophie musculaire (Burkin and Kaufman, 1999).

B. Les dystroglycanopathies

On englobe dans le groupe des dystroglycanopathies, plusieurs maladies génétiques rares qui touchent très majoritairement la sous-unité α du complexe des protéines associées à la dystrophine. Ce complexe comprend deux glycoprotéines, l' α -dystroglycane, de 156 kDa, et le β -dystroglycane, de 43 kDa, tous deux produits d'un seul ARN messager et dont le gène *DAG1* est localisé sur le chromosome 3p21.

DAG1 est initialement traduit en une protéine précurseur de 97 kDa qui est ensuite clivée en deux peptides, les dystroglycanes. Après clivage, ces derniers restent étroitement associés et ont une distribution ubiquitaire dans tous les tissus. Ce sont des glycoprotéines, des molécules constituées d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés sur lesquelles viennent se greffer des oses par liaisons covalentes (oligosaccharides ou glycanes). La présence de ces nombreux résidus osidiques alourdit fortement les peptides et particulièrement la sous-unité α , ce qui explique le poids moléculaire observée.

L' α -dystroglycane est une protéine extracellulaire qui se fixe étroitement, d'une part à la laminine- α 2 dans la membrane basale du muscle, et d'autre part, au β -dystroglycane transmembranaire via des liaisons non covalentes. Ce dernier se lie à la dystrophine dans sa partie intracellulaire. L'ensemble constitue ce que l'on appelle le *dystroglycan binding domain*.

Seules les maladies impactant l' α -dystroglycane seront détaillées dans les paragraphes suivants.

a. Les α -dystroglycanopathies : des DMC avec anomalies de la glycosylation

Bien que les α -dystroglycanopathies représentent un groupe numériquement important dans l'ensemble des DMC, ce sont des formes assez rares en France. Elles se transmettent sur un mode autosomique récessif et sont la conséquence d'altérations qui surviennent dans des gènes impliqués dans la glycosylation de l' α -dystroglycane (Taniguchi-Ikeda et al., 2016). Des mutations dans le gène *DAG1* lui-même sont plus rarement retrouvées (Muntoni et al., 2011).

Dans ces pathologies, on observe des malformations cérébrales et/ou oculaires ainsi qu'un retard mental de sévérité variable, suggérant un trouble de la migration neuronale associé. Les différentes formes se manifestent souvent de manière très différente, mais partagent, outre l'atteinte musculaire dystrophique précoce, la présence d'anomalies d'intensité variable au niveau du système nerveux central (Taniguchi-Ikeda et al., 2016).

En condition physiologiques, les molécules d' α -dystroglycane sont fortement glycosylées. Les sucres qu'elles portent en surface servent de récepteur pour plusieurs protéines de la matrice extracellulaire telles que la laminine- α 2, l'agrine (une glycoprotéine synaptique impliquée dans la formation des jonctions neuromusculaires) ou encore la perlécane.

Comme décrit précédemment, elle s'associe au niveau de la membrane sarcoplasmique avec le β -dystroglycane qui, à son tour, interagit avec la dystrophine et d'autres protéines intracellulaires (figure 49) (Reed, 2009).

Cette organisation protéique est une des clés de voute de la structure de la fibre musculaire puisqu'elle assure le lien entre la lame basale et l'actine filamenteuse.

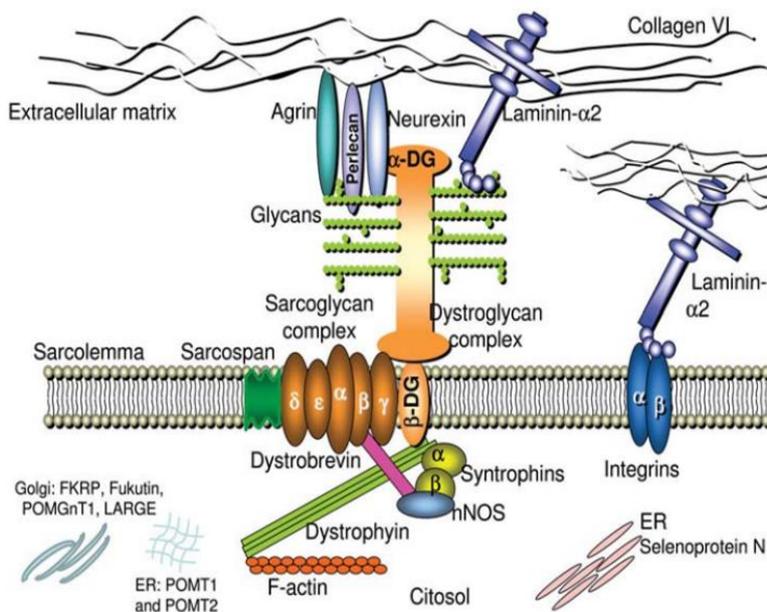


Figure 49 : Organisation du complexe protéique autour de l' α -dystroglycane dans les cellules musculaires
Reed, 2009

La glycosylation de l' α -dystroglycane fait intervenir plusieurs protéines dans un ordre bien précis pour que soit mis en place un échafaudage sucré particulier (figure 50).

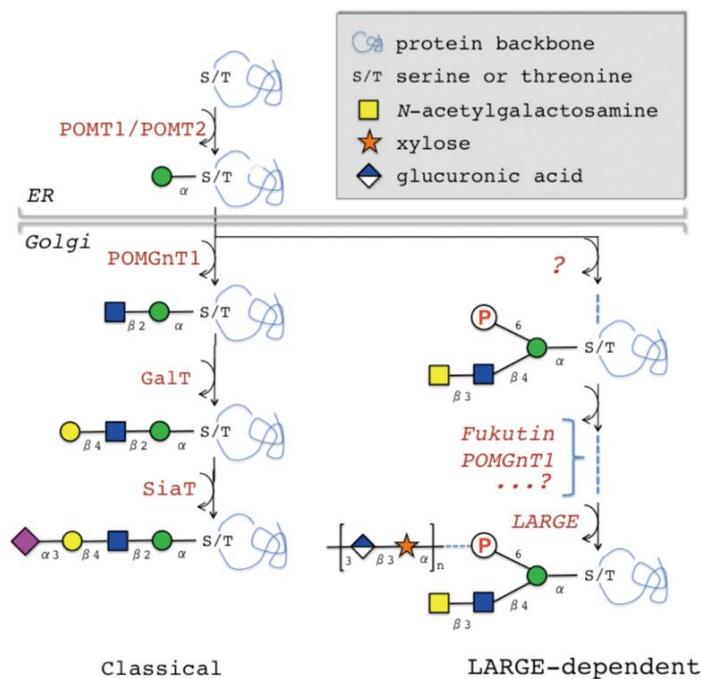


Figure 50 : Structure représentative d'O-glycosylation de l' α -Dystroglycane
Nakayama et al., 2013

De ce fait, il n'est pas étonnant de constater que le phénotype des patients est d'autant plus grave si les gènes mutés dont ils sont porteurs sont ceux codant les protéines chargées de déposer les premiers sucres de l'arborisation (Mendell et al., 2006; Nakayama et al., 2013).

Si la glycosylation est absente ou insuffisante, l' α -dystroglycane ne peut plus se lier aux protéines de la matrice extracellulaire, l'agencement protéique ne se fait plus et le lien entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est rompu. La glycoprotéine ne joue alors plus son rôle dans la résistance mécanique du tissu ce qui va fortement fragiliser la cellule musculaire et être à l'origine des différentes formes de dystrophies.

Parmi ces maladies, on trouve entre autres, le syndrome de Walker-Warburg, la DMC de type Fukuyama (FCMD), le syndrome muscle-œil-cerveau (*muscle-eye-brain*, MEB), ainsi que des DMC dues à des déficits en une protéine particulière telles que les DMC1B, 1C et 1D. Six gènes codant des enzymes intervenant dans la glycosylation de l' α -dystroglycane sont aujourd'hui identifiés comme responsables de la pathologie (Reed, 2009). Parmi eux, on trouve les gènes :

- *POMT1* (9q34) qui code la O-Mannosyltransferase 1,
- *POMT2* (14q24) qui code la O-Mannosyltransferase 2,
- *POMGnT1* (1p34) qui code la O-mannosyl bêta-1,2-N-acétylglucosaminyltransférase 1,
- *LARGE* (22q12) qui code la protéine acétyl-glucosaminyl-transférase like,
- *FKTN* (9q31) qui code la fukutine,
- *FKRP* (19q13) qui code la *fukutin-related protein*.

Ces gènes peuvent être liés à différentes formes cliniques d' α -dystroglycanopathies et inversement, une même α -dystroglycanopathie peut être la conséquence de mutations dans plusieurs d'entre eux.

L'évolution et le pronostic des α -dystroglycanopathies dépendent beaucoup de la forme qui touche le patient. Le syndrome de Walker-Warburg est en règle générale très grave et peu d'enfants survivent au-delà de la première année (Vajsar and Schachter, 2006). Pour les autres, du fait d'une évolution lente, l'espérance de vie est prolongée mais les malades souffrent d'un handicap sévère et à expression multiple. De manière générale, plus les anomalies cérébrales et oculaires sont importantes et moins le pronostic est bon, notamment au niveau intellectuel. Le cas des DMC avec déficit en *FKRP* est un peu particulier. Il en existe des formes tout à fait comparables aux formes sévères d' α -dystroglycanopathie mais dans d'autres cas, les capacités de marche et les fonctions intellectuelles sont préservées (Blaeser et al., 2013). Comme pour toutes les dystrophies musculaires congénitales, aucun traitement n'est aujourd'hui disponible.

4.4. Les dystrophies musculaires progressives

L'ensemble des affections génétiques incluses dans ce groupe sont liées à des dégénérescences primitives du tissu musculaire strié, avec ou sans atteinte cardiaque, et dont l'évolution est progressive. Elles se manifestent par un déficit de la force musculaire proximale et/ou distale au niveau de l'appareil locomoteur pouvant conduire à la perte de la marche, une amyotrophie, des rétractions tendineuses ainsi que des déformations vertébrales et/ou thoraciques.

Les dystrophies des ceintures touchent les muscles qui ont atteint leur maturité structurelle et qui sont le siège de nécrose aboutissant à la destruction de fibres. En parallèle de cette dégénérescence, des mécanismes de régénération musculaire se mettent en place pour restaurer l'intégrité anatomique et physiologique du tissu lésé. On peut donc nettement les distinguer des myopathies congénitales qui sont, elles, consécutives à un trouble du développement du tissu musculaire mais qui ne sont le siège ni de nécrose ni de régénération.

La nécrose est très rapidement suivie d'une infiltration de macrophages qui pénètrent dans le tissu lésé afin d'éliminer les débris nécrosés (figure 51). Cette étape, quasi concomitante avec la régénération, est essentielle pour que la réparation soit efficace. A ce moment-là, le tissu ne joue plus son rôle de barrière, sa perméabilité est anormale ce qui entraîne la sortie de protéines solubles du muscle dans le sang. S'en suit alors une augmentation du taux sanguin d'enzymes musculaires, telles que les créatines kinases, qui permettent alors d'apprécier l'importance de la destruction des fibres.

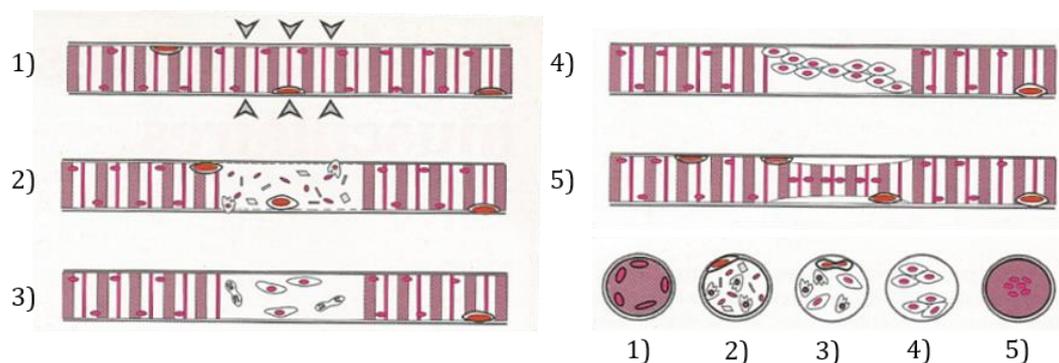


Figure 51 : Les différentes étapes de la régénération musculaire.

1. Une lésion détruit l'intégrité de la membrane cellulaire provoquant l'entrée du calcium extracellulaire.
2. Des protéases intrinsèques autolysent la région atteinte, mais la membrane basale et les cellules satellites persistent. Des macrophages pénètrent dans le tube endomysial et éliminent complètement les débris nécrotiques : les segments adjacents de la myofibre peuvent cicatriser.
3. Les cellules satellites sont activées et entrent dans le cycle cellulaire.
4. Les cellules satellites prolifèrent, guidées par la membrane basale.
5. Elles sortent du cycle cellulaire et fusionnent en myotube multinucléé. Noter la position centrotubulaire des noyaux à ce stade. La fusion ultérieure avec les myotubes de la zone cicatricielle restaurera la continuité de la fibre musculaire, tout en préservant un pool de cellules satellites.

Extrait de « pathologie du muscle strié » Jean de Recondo

Les signes dystrophiques classiquement observés en microscopie optique sur une biopsie musculaire sont une inégalité de calibre des fibres, des signes de nécrose comme la fibrose et des signes de régénération comme la centralisation de noyaux (figure 52). Ces noyaux centraux appartiennent aux myoblastes qui viennent de fusionner avec la fibre à réparer.

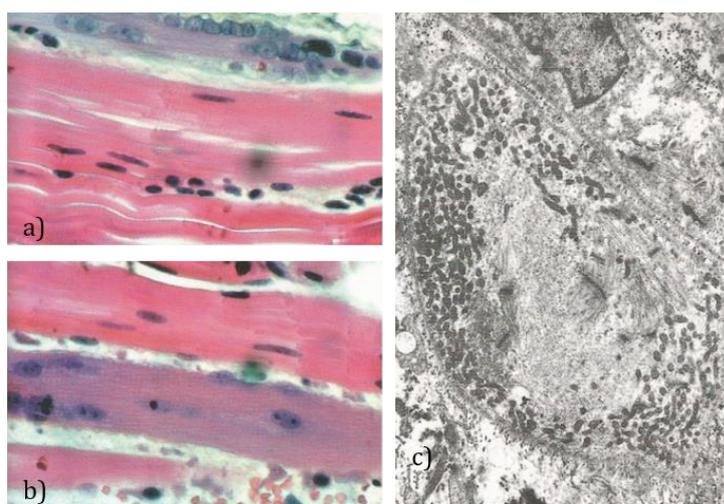


Figure 52 : Fibre musculaire en régénération

a) et b) Observation au microscope optique. Coloration hématoxyline-éosine, grossissement x400

c) Observation au microscope électronique. Coloration PTA (acide téréphtalique purifié), grossissement x4500

Extrait de « pathologie du muscle strié » Jean de Recondo

4.4.1. Les dystrophies touchant le sarcolemme

Dans cette catégorie, nous choisissons de nous pencher plus en détail sur le cas de deux dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour *Limb Girdle Muscular Dystrophy*) génétiquement bien déterminée et ayant un impact sur la membrane plasmique de la cellule musculaire : Les LGMD1C et 2B.

A. La dystrophie musculaire des ceintures de type 1C ou cavéolinopathies

Cette dystrophie musculaire, transmise de manière autosomique dominante, est provoquée par des mutations ponctuelles dans un gène hautement conservé à travers les espèces, le gène *CAV3* (3p25) qui code la cavéoline 3. Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe sur les cavéoles [I.3.2.3.B.e], la cavéoline 3 est une protéine spécifique du muscle et le composant majeur des cavéoles. C'est un partenaire direct de la dysferline, la protéine retrouvée mutée dans l'autre LGMD décrite ci-après.

La cavéoline 3 joue un rôle structural important dans le muscle puisqu'elle participe fortement à l'organisation de la membrane et au transport de petits solutés. C'est un maillon essentiel dans la formation des échafaudages protéiques qui existent entre la membrane plasmique et la lame basale. Elle favorise la transduction de signaux entre les milieux cellulaires externes et internes et intervient dans les mécanismes d'endocytose et de pinocytose.

Dans la majorité des cas lorsqu'elle est mutée, la cavéoline 3 devient inactive et seul l'allèle sauvage permet la synthèse d'une protéine fonctionnelle. Cependant, même quand il y a 50% du taux physiologique de protéines exprimées dans la cellule, cela ne suffit pas à empêcher le développement de la maladie. En effet, la réduction du taux de cavéoline 3 impacte les cascades de signalisation dans lesquelles elle intervient et conduit à une modification de l'intégrité structurale de la cellule musculaire qui finira par entrer en apoptose.

B. Les dysferlinopathies : LGMD2B et dystrophie de Miyoshi

a. Généralités

Les dysferlinopathies sont des dystrophies musculaires rares à transmission autosomique récessive, qui se présentent sous des formes cliniquement hétérogènes, allant d'affections peu symptomatiques à des déficiences fonctionnelles sévères. Elles sont dues à des mutations retrouvées dans le gène *DYSF* (2p13.1 – 2p13.3), un grand gène de 233 kilobases (kb) comportant 55 exons, qui code la dysferline (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998).

Le groupe des dysferlinopathies primaires renferme principalement deux pathologies distinctes que sont la Myopathie des Ceintures de type 2B ou *Limb-Girdle Muscular Dystrophy* (LGMD 2B) et la Myopathie Distale de Miyoshi (MDM).

La première se caractérise par une atteinte progressive des muscles squelettiques striés des ceintures pelvienne et scapulaire. Plus tardivement, l'atrophie peut atteindre les muscles proximaux des membres mais, même à un stade avancé de la maladie, les muscles distaux sont généralement préservés (Fanin and Angelini, 2016). Dans de nombreux cas, après plusieurs années d'évolution, la maladie aboutie à une perte de la marche.

La seconde débute par une dégénérescence progressive des muscles distaux antérieurs des bras et de ceux de la loge postérieure des jambes. La maladie évolue ensuite pour atteindre les muscles des ceintures et provoquer progressivement une perte de la marche (Fanin and Angelini, 2016). Dans les deux cas, les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement à l'adolescence ou chez le jeune adulte (15-35 ans).

Les autres formes de dysferlinopathies, beaucoup plus rares, ne seront pas détaillées dans ce document.

b. La protéine dysferline

La dysferline est une protéine transmembranaire de type II appartenant à la famille des ferlines. De poids moléculaire élevé (230 kDa) elle est composée de deux domaines Fer, un domaine DYSF et de sept domaines C2 qui pour certains, semblent avoir des fonctions similaires. Elle possède également un domaine transmembranaire à son extrémité C-terminale maintenant sa localisation au niveau du sarcolemme.

Elle ne s'exprime pas de manière ubiquitaire mais est retrouvée dans de nombreux organes tels que les muscles squelettiques et cardiaque, les monocytes et le placenta ainsi qu'en quantité moindre dans le foie, les poumons et le cerveau (Salani et al., 2004).

Dans les cellules musculaires, là où la protéine est la plus abondante, elle est localisée à différents niveaux : dans la membrane plasmique (Anderson et al., 1999), au niveau des tubules T (Fanin and Angelini, 2016) et dans des vésicules cytoplasmiques comme les enlargosomes (Bansal et al., 2003; Han and Campbell, 2007; Huang et al., 2007).

c. Fonctions majeures

La dysferline est connue pour jouer plusieurs rôles dans la cellule musculaire. Elle est impliquée dans la fusion membranaire entre myoblastes, la formation des tubules T mais également dans le trafic vésiculaire et la réparation membranaire.

Fusion des myotubes et trafic vésiculaire

Comme nous l'avons vu au chapitre « myogénèse et développement » [II.2.1], la formation des myofibrilles suit plusieurs étapes dont celle, cruciale, de la fusion des myoblastes entre eux qui donnera naissance aux myotubes. L'implication de la dysferline dans ce mécanisme a été montrée sur des modèles de souris KO pour le gène *DYSF* (Demonbreun et al., 2011). L'étude des biopsies musculaires de souris déficientes montre une accumulation de vésicules au centre des fibres ainsi que de nombreux noyaux centraux. On note également une augmentation du nombre de fibres corrélée à une réduction de leur taille. Le même constat a également été fait sur des myoblastes humains (de Luna et al., 2006).

Rôle dans le développement et la stabilité des tubules T

Plusieurs études rapportent l'implication de la dysferline dans la formation et le développement des tubules T. En effet, au cours des tout premiers stades de la régénération musculaire, la dysferline est majoritairement retrouvée au niveau des tubules T.

Elle migrera vers le sarcolemme au cours du temps et y sera retrouvée en plus grande quantité à la fin du processus de renouvellement cellulaire (Al-Qusairi and Laporte, 2011).

En 2014, les travaux effectués par Demonbreun et collègues montrent que la dysferline joue un rôle majeur dans le tubule T : leur modèle de souris KO-dysferline présente une malformation des tubules T, un réticulum sarcoplasmique dilaté ainsi que des dérégulations du potentiel de membrane à ce niveau (Demonbreun et al., 2014).

Enfin, une autre étude a pu mettre en évidence la présence de dysferline dans les tubules T en démontrant, par co-immunoprécipitation, son interaction avec le récepteur aux dihydropyridines (Ampong et al., 2005).

Mécanisme de réparation membranaire des fibres musculaires

A longueur de temps, du fait d'épisodes répétés de contraction/décontraction, les cellules musculaires sont soumises à des tensions mécaniques qui vont les léser, provoquant alors une entrée massive de calcium dans la fibre. Comme nous l'avons vu précédemment, la quantité de calcium intracellulaire est finement régulée puisque c'est la molécule qui joue le rôle de déclencheur du processus d'excitation contraction. Le maintien de l'intégrité du sarcolemme est donc d'une importance capitale pour lutter contre ces microlésions et garantir la survie de la cellule. Des mécanismes de réparation membranaire existent donc pour pallier les problèmes lésionnels, maintenir la fonction de barrière de la membrane plasmique et éviter ainsi la mort cellulaire.

En absence de dysferline, on observe des défauts de réparation membranaire et une augmentation importante de cellules en nécrose. Cette protéine est un des acteurs majeurs du processus de réparation cellulaire mis en place dans les cellules musculaires squelettiques. Elle fait partie d'un large complexe protéique qui intervient dans la formation d'un patch lipidique qui sera utilisé pour colmater la brèche formée par la lésion (Lek et al., 2013; Middel et al., 2016; Redpath et al., 2014).

Lorsqu'une entrée massive et incontrôlée de calcium survient dans la cellule, un des membres de la famille des calpaïnes, non identifié à ce jour, va venir cliver la dysferline au niveau d'un de ses exons alternatifs, l'exon 40a. La coupure va permettre la libération d'une « mini-dysferline_{C72} » qui pourra alors intégrer le complexe de réparation membranaire et participer à la réparation de la déchirure (figure 53)(Lek et al., 2013; Redpath et al., 2014).

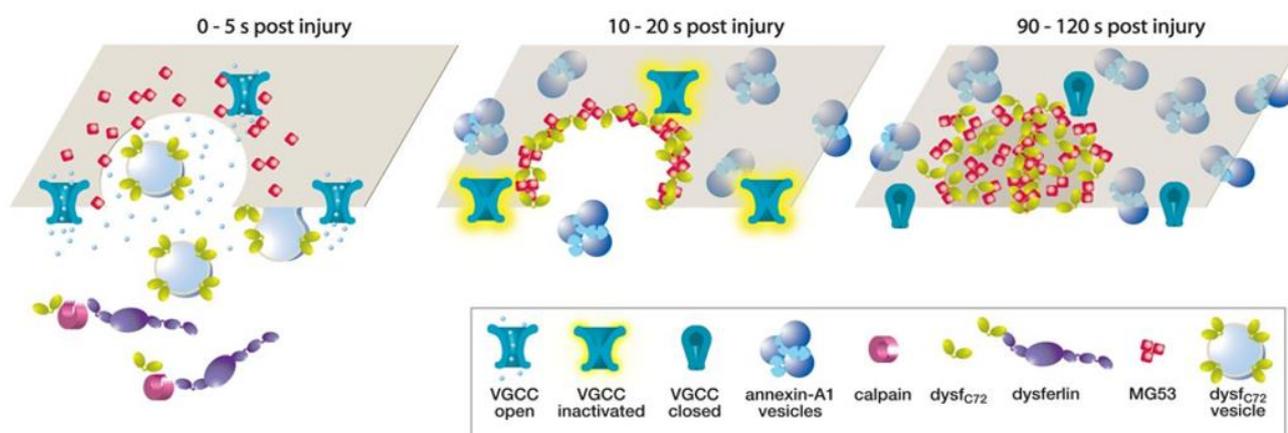


Figure 53 : La dysferline intervient dans le phénomène de réparation membranaire sous une forme clivée
Lorsqu'une lésion membranaire survient, de grandes quantités de Calcium se déversent dans le cytosol de la cellule. Cela entraîne l'activation d'une calpaïne qui va venir cliver les molécules de dysferline au niveau de l'exon 40a. La mini-dysferline C72, fruit de cette coupure va alors être recrutée pour former un complexe protéique avec MG53 et réparer la lésion en formant un « patch » membranaire.

Redpath et al., 2014

Au cours de ma thèse, la partie des travaux que j'ai réalisés sur la recherche de thérapie dans le cadre des dysferlinopathies a notamment porté sur le caractère indispensable ou non de l'exon 40a dans la mise en place du processus de réparation membranaire.

4.4.2. Myopathies Touchant l'appareil contractile, le sarcomère, l'appareil myofibrillaire

A. LGMD1D

Elle est causée par des mutations dominantes dans le gène *DNAJB6* (7q36) qui code une protéine chaperonne localisée au niveau de la ligne Z. Cette protéine joue un rôle dans le contrôle du repliement correct de certaines protéines et intervient également dans l'assemblage de différents complexes protéiques. Les mutations responsables de ce phénotype dystrophique sont toutes retrouvées au niveau d'un domaine « *hot-spot* » riche en glycine et phénylalanine. Elles ont pour conséquence une diminution de l'élimination des protéines mal repliées.

4.4.3. Myopathies Touchant le complexe DAP (Protéines associées à la dystrophine)

A. La dystrophie de Duchenne de Boulogne

La dystrophine, codée par le gène *DMD* (Xp21) est une protéine indispensable au maintien de la structure du sarcomère dans la cellule musculaire. Elle est connue pour être responsable de la dystrophie musculaire la plus fréquente, la dystrophie de Duchenne de Boulogne (DMD).

Cette maladie ainsi que les différentes fonctions assurées par la protéine qui en est responsable ne seront volontairement pas détaillées dans ce manuscrit.

B. Les sarcoglycanopathies (LGMD 2C, 2D, 2E, 2F)

Les sarcoglycanes sont des glycoprotéines transmembranaires appartenant à une famille composée de six membres dont quatre s'expriment dans les muscles cardiaques et squelettiques : ce sont les formes α , β , γ et δ . Ces différents membres font parties du complexe des protéines associées à la dystrophine qui joue un rôle central dans la liaison entre l'actine du cytosquelette de la cellule musculaire et sa matrice extracellulaire.

Toutes codées par des gènes différents, les sarcoglycanes sont responsables, quand elles sont mutées, d'une instabilité membranaire conduisant à une dégénérescence de la fibre musculaire. L'atteinte musculaire se traduit par le développement, généralement avant l'âge de dix ans, d'une LGMD caractérisée par une faiblesse musculaire progressive des ceintures pelvienne et/ou scapulaire. Chez les patients, le taux de créatine kinase (CK) sérique est toujours élevée et chez 20% d'entre eux, on constate la survenue de problèmes cardiaques.

Les sarcoglycanopathies se transmettent toutes sur un mode autosomique récessif et sont classées en fonction du type de sarcoglycane atteint (α , β , γ , δ). La confirmation diagnostic repose sur la réalisation d'une biopsie musculaire et sur la génétique.

La LGMD 2D est la plus fréquente des sarcoglycanopathies. Elle est causée par des mutations du gène *SGCA* (17q21) qui code l' α -sarcoglycane. La sévérité du phénotype est corrélée à l'importance du déficit musculaire en cette protéine. La prévalence de la LGMD2D est estimée à 1 sur 175000.

Les trois autres formes de sarcoglycanopathies sont regroupées sous les acronymes LGMD 2C, 2E et 2F. Elles sont respectivement dues à des mutations dans les gènes codant le γ -sarcoglycane *SGCG* (13q12), le β -sarcoglycane *SGCB* (4q12) et le δ -sarcoglycane *SGCD* (5q33). Toutes trois ont une prévalence globale estimée à 1 sur 200 000. On notera cependant que, dans au moins deux populations distinctes, la population d'origine gitane et la population maghrébine, la prévalence des γ -sarcoglycanopathies est beaucoup plus élevée, avec des mutations à effet fondateur. Dans le premier groupe, on retrouve fréquemment la mutation C283Y alors que la mutation del525T est plus communément retrouvée autour du bassin méditerranéen.

4.4.4. Myopathies touchant le noyau

Deux gènes sont actuellement connus comme responsables de myopathies touchant le noyau : le gène *EMD* responsable de la dystrophie d'Emery-Dreifuss et le gène *LMNA* responsable de LGMD1B.

A. Dystrophie d'Emery-Dreifuss (Emerine)

La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (DMED) est caractérisée par une faiblesse et une atrophie musculaire associées à des rétractions tendineuses précoces et une cardiomyopathie. La prévalence est estimée à 1/300 000. La sévérité et la progression sont variables d'une famille à une autre et au sein d'une même famille. Le mode de transmission est lié à l'*X*. Le gène responsable *EMD* (Xq28) code l'émerine, une protéine ubiquitaire de l'enveloppe nucléaire. Le diagnostic est fait par immunodétection de l'émerine sur divers tissus (muscle, lymphoblastes, peau) qui montrent son absence ou sa diminution. Il est confirmée par analyse du gène.

B. LGMD1B (Lamine A)

Parmi les différentes maladies génétiques dues à des mutations dans le gène *LMNA* (1q22) on trouve la dystrophie musculaire des ceintures de type 1B. En effet, certaines mutations dominantes retrouvées dans la protéine ubiquitaire Lamine A/C, entraînent le développement d'une pathologie similaire à la maladie d'Emery-Dreifuss. L'analyse moléculaire directe du gène *LMNA* pose le diagnostic.

C. LGMD 2A : dystrophie musculaire avec déficit en Calpaïne 3

Comme nous l'avons vu précédemment, la LGMD2A est due à des mutations récessives dans le gène *CAPN3*. Une des particularités de cette dystrophie est qu'elle n'est pas liée à l'altération d'une protéine de structure mais à la perte de son activité enzymatique.

Les lésions musculaires décrites dans d'autres types de dystrophie musculaire, n'atteignent pas les cellules satellites puisqu'elles sont à la base des phénomènes de régénération. Dans les déficiences en calpaïne, l'apoptose touche les noyaux des fibres musculaires morphologiquement intactes, où ils constituent des groupes caractéristiques, mais également les noyaux des cellules satellites. Il convient, d'ailleurs, de souligner que le potentiel de régénération est beaucoup moins important que dans la maladie de Duchenne.

Les mutations dans le gène *CAPN3* sont plus fréquemment retrouvées dans des populations telles que les amish, au Brésil, à la Réunion ou encore au Pays Basque (Allamand et al., 1995). Son incidence est difficile à préciser car elle a été surtout étudiée dans des isolats de populations, où la consanguinité est importante et l'effet fondateur indiscutable, si bien qu'elle peut représenter 30, voire 50% des dystrophies des ceintures observées dans une région donnée.

Ces chiffres sont nettement moins importants lorsqu'on s'adresse à une population non isolée car les mutations de *CAPN3* sont alors responsables d'environ 9,2% des dystrophies des ceintures. Le cas de l'île de la Réunion doit cependant être considéré différemment car de nombreuses mutations différentes ont été trouvées. On ne peut donc pas parler d'effet fondateur dans ce cas-là. Plusieurs études distinctes ont été menées à ce sujet, dont une proposant un modèle digénique (Beckmann, 1996), pour essayer d'expliquer ce que l'on nomme « le paradoxe de la Réunion ».

L'affection se présente comme une dystrophie des ceintures à transmission autosomique récessive (LGMD2A). Elle apparaît entre quatre et quinze ans, parfois plus tard, et s'individualise par une évolution lentement progressive. Le début se caractérise, en fonction des patients, par une marche sur la pointe des pieds, une fatigue avec rigidité des muscles du mollet dont l'hypertrophie, si elle existe est habituellement discrète, la survenue de crampes après l'effort et parfois une rétraction possible du tendon d'Achille. Dans un deuxième temps, et parfois d'emblée, survient une fatigabilité et fréquemment une atrophie des muscles des ceintures pelviennes et scapulaires avec une difficulté pour se lever à partir d'une position assise.

Le taux de créatine kinase est des plus variables, bien qu'habituellement élevé, avec une moyenne de 3300U/l. Le tissu musculaire prélevé par biopsie est le siège de modifications de nature dystrophique avec une variabilité du calibre des fibres, la présence de rares fibres nécrosées et d'autres en régénération et la possibilité d'une fibrose.

D. Dystrophie oculo-pharyngée (Poly(A) binding protein)

La dystrophie musculaire oculo-pharyngée (DMOP ou, en anglais, OPMD pour *Oculopharyngeal muscular dystrophy*) est une forme de myopathie lentement progressive qui débute à un âge tardif.

Elle se caractérise, comme son nom l'indique, par une atteinte spécifique des muscles de la oculaires et pharyngaux, souvent associée à une altération d'autres muscles de la face ou de la ceinture pelvienne (Harish et al., 2015). Du point de vue clinique, la maladie se déclare généralement vers l'âge de cinquante ans pour les formes dominantes et soixante ans pour les formes récessives, avec une dysphagie, un ptosis symétrique progressif et des altérations au niveau du crâne et des muscles proximaux des membres (Trollet et al., 1993).

La prévalence globale de la maladie en Europe est de l'ordre de 1 pour 100000 individus. Dans certaines communautés juives d'Israël et dans la population franco-canadienne, c'est une maladie beaucoup plus fréquente puisque sa prévalence est respectivement estimée à 1 pour 600 et 1 pour 1000 (Harish et al., 2015).

La dysphagie constitue un symptôme précoce de la maladie ; si elle est négligée, elle peut provoquer une régurgitation nasale et de grandes difficultés à avaler. Une faiblesse des muscles des ceintures est observée dans 72% des cas mais elle varie grandement selon les individus et ne dépend aucunement de la gravité du ptosis ou de la dysphagie. Les taux de créatine kinase peuvent être légèrement augmentés et l'électromyogramme peut révéler quelques signes myopathiques. Ces deux paramètres ne sont cependant pas relevant pour établir le diagnostic (Trollet et al., 1993).

La DMOP est transmise sur un mode autosomique dominant ou récessif. La forme récessive présente un phénotype atténué. L'altération génétique en cause dans cette maladie est de type « expansion de triplets » et se situe sur l'exon 1 du gène *PABPN1* (14q11) qui code la protéine *Poly(A)-Binding Protein Nuclear-1* (Harish et al., 2015). Elle se caractérise par l'addition dans la séquence protéique, d'un à sept résidus alanine supplémentaires, codés par un triplet nucléotidique de type « GCN » (GCA/GCC/GCG/GCT). En effet, chez les individus sains, on trouve dix répétitions du trinuécléotide GCN dans l'exon 1 alors qu'on en retrouve entre douze et dix-sept sur l'allèle muté des malades. Chez les patients touchés par la forme récessive de DMOP, les allèles sont chacun porteurs de onze répétitions GCN. A la différence d'autres maladies à expansion de triplets comme la dystrophie myotonique de type 1, aucun phénomène d'anticipation clinique n'a été observé dans cette maladie (Trollet et al., 1993).

L'élongation de la séquence N-terminale de la protéine entraîne son mauvais repliement et lui confère un gain de fonction toxique. La principale conséquence de cette activité nocive est visible sur la biopsie musculaire des patients : dans les muscles touchés, on observe la présence d'inclusions intranucléaires (INI pour *intranuclear inclusions*) retrouvées sous forme de longs filaments d'environ 250 nm de longueur et 8 nm de diamètre.

Ce type de dommages cellulaires est considéré comme la principale caractéristique histopathologique de la maladie. On en retrouve de 2 à 15% dans les noyaux des cellules touchées (Trollet et al., 1993).

Les autres muscles, qu'ils soient affectés ou non par la maladie, montrent un caractère dystrophique avec une variation de diamètre des fibres mais pas de signe de nécrose. Généralement, on note aussi la présence de vacuoles bordées.

Actuellement, dans le cadre de la prise en charge de la DMOP, il existe des traitements chirurgicaux qui visent à améliorer les conditions de vie des malades sans pour autant ralentir l'évolution la pathologie. Une opération ciblant les muscles releveurs de paupières est proposée lorsque des problèmes de visions apparaissent ou bien quand les douleurs nucales conséquentes à une rétroflexion constante du cou, sont trop importantes. De même, lorsque les troubles de la déglutition deviennent trop importants, une intervention chirurgicale est proposée : elle consiste à sectionner certains muscles du larynx dans le but de faciliter le passage des aliments (Trollet et al., 1993). Le recours à des injections botuliques dans ces muscles a également été suggéré (Restivo et al., 2000).

Cependant, ces différentes interventions ne permettent pas de soigner les patients. La mortalité est fréquemment due à la survenue d'infections pulmonaires répétées et à la perte importante de poids.

Récemment, un essai thérapeutique de transplantation de cellules autologues a été mené à Paris dans le cadre de la DMOP (Périé et al., 2014). Il consiste à prélever des myoblastes dans les muscles sains d'un patient, de les faire se différencier et proliférer *in vitro*, pour finalement revenir les lui injecter dans les muscles pharyngaux. Les résultats de cet essai montrent que le processus n'a pas de conséquence néfaste sur la santé des malades, que la transplantation de cellules autologues est bien tolérée et qu'aucun effet secondaire ne survient. Du point de vue de l'efficacité du traitement, une amélioration de la capacité à déglutir des patients est observée.

E. Dystrophie myotonique de type 1 ou Myopathie de Steinert

La dystrophie myotonique de type 1 aussi appelée maladie de Steinert est la plus fréquente des dystrophies musculaires de l'adulte, sa prévalence est estimée à 1/20 000. Elle se caractérise par une myotonie et une atteinte multisystémique associant, à des degrés divers, une faiblesse et une atrophie musculaire progressive, des troubles du rythme et/ou de conduction cardiaque, une altération des fonctions cognitives, une cataracte et une atteinte endocrinienne, entre autres (Nigro et al., 2012). Cette maladie est due à l'amplification instable d'un triplets nucléotidique CTG dans la région 3' non traduite du gène *DMPK* (*Dystrophia Myotonica Protein Kinase* ; (19q13)). Chez les individus sains, le nombre de répétition CTG est inférieur à 38 alors qu'il varie entre 50 et plusieurs milliers de copies chez les patients. Aucun individu avec un nombre de répétitions situé dans une fourchette « pré-mutationnelle » comprise entre 38 et 49 copies n'a jusqu'à présent été répertorié comme symptomatique.

On considère cependant que les enfants de ces personnes seront à haut risque d'hériter d'une expansion trinuécléotidique plus importante et donc de développer la maladie. En effet, la dystrophie myotonique de Steinert se transmet sur un mode autosomique dominant avec un phénomène d'anticipation observé d'une génération à l'autre dans une même famille. La taille de l'expansion est généralement proportionnelle à l'âge d'apparition de la maladie ainsi qu'à sa sévérité (Furling, 2012).

Du fait d'une forte variabilité phénotypique interindividuelle, quatre formes cliniques de la DM1 ont été décrites, selon l'âge d'apparition des premiers symptômes et leur sévérité : les formes congénitale, juvénile, adulte et tardive non asymptomatique. La première, associée à de très grandes expansions de plus de 1500 CTG, est la plus sévère et les patients qui en souffrent présentent généralement des déficiences motrices et intellectuelles (Furling, 2012).

Des travaux effectués en 2012 dans l'équipe du professeur Sablonnière ont mis en évidence un mécanisme de gain de fonction toxique dans les cellules des patients. En effet, après transcription nucléaire des deux allèles, sauvage et muté, les ARNm porteurs de l'expansion nucléotidique sont séquestrés dans le noyau et s'agrègent sous forme de *foci*, diminuant de ce fait les quantités de transcrits de *DMPK* (Huin et al., 2013). Ainsi l'hypothèse première du mécanisme pathologique mis en jeu dans cette maladie était liée à une réduction de la quantité de protéine DMPK. Cependant, aucun modèle murin généré sur cette hypothèse n'a jamais réussi à reproduire le phénotype observé chez les patients. L'idée que la toxicité cellulaire soit directement due à l'ARN muté s'est alors imposée et d'autres modèles murins ont été créés. Les souris transgéniques exprimant l'expansion de triplet sur leur ARNm reproduisaient le phénotype des patients et des *foci* étaient observées dans le noyau des cellules (Furling, 2012).

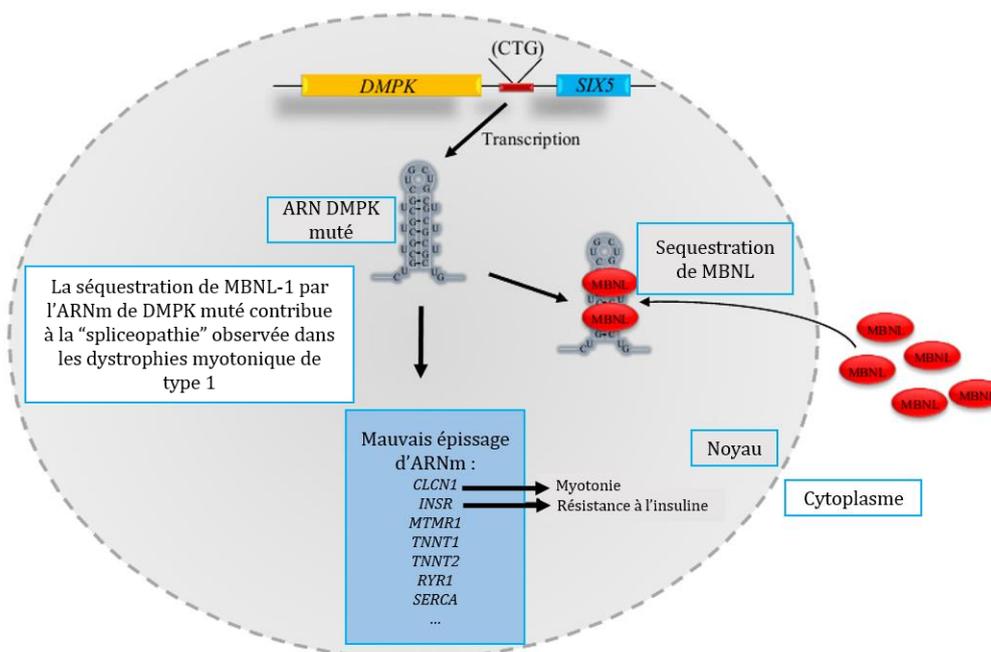


Figure 54 : Mécanisme pathologique mis en jeu dans la dystrophie myotonique de Steinert

CLCN1 ; *INSR* ; *MTMR1* ; *TNNT1* ; *TNNT2* ; *RYR1* ; *SERCA* :

<http://atlasofscience.org/methylation-profile-of-dmpk-gene-in-myotonic-dystrophy-type-1-dm1/>

Diverses études *in vitro* ont par la suite démontrées que les ARNs porteurs de l'expansion forment des structures secondaires en épingle à cheveux stabilisées par des ponts hydrogénés créés entre les bases cytosines et guanines. La création d'une telle ossature nucléotidique va interférer avec divers facteurs d'épissage telle que *Muscleblind-like 1 (MBNL1 ; 3q25)*, ce qui va provoquer la diminution de son activité et induire une « spliceopathie », c'est-à-dire la dérégulation de l'épissage de nombreux autres gènes (figure 54).

L'évolution est habituellement lentement progressive mais une dégradation rapide peut parfois être observée. L'espérance de vie est grevée d'une mortalité accrue par complications pulmonaires et cardiaques.

F. FSHD

La dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (FSHD) est la troisième myopathie la plus fréquente avec une prévalence estimée à une personne sur vingt mille. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement entre dix et vingt ans et se caractérisent par une dégénérescence progressive de certains muscles de la face, des régions scapulaires et humérales et pouvant se propager après quelques années, aux muscles distaux des membres. Certains tissus non musculaires sont également affectés, puisque 75% des patients souffrent de pertes auditives et 60% d'entre eux de problèmes rétinien (Wohlgemuth et al., 2004). Des cas d'épilepsies et des retards d'apprentissage ont également été observés chez des enfants atteints de formes précoces sévères (Saito et al., 2007).

Sur le plan génétique, la FSHD se transmet sur un mode autosomique dominant. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe « Les diminutions du nombre de répétitions de fragments d'ADN », la maladie est en grande majorité liée à la présence, en 4q35, d'un nombre de copies réduit (1 à 10) de D4Z4 (unités macrosatellites répétées de 3,3kb). Chez les individus sains, le nombre de copie de D4Z4 varie de onze à une centaine de copies. 95% des patients présentant le phénotype clinique classique de la maladie sont porteurs de cette variation subtélomérique et sont classés dans la catégorie FSHD1 (Richards et al., 2012). Une telle réduction d'unités D4Z4 entraîne un relâchement chromatinien qui, lorsqu'il est associé à la présence d'un haplotype permissif (4qA), permet la stabilisation d'un transcrite encodé par un rétrogène localisé dans le D4Z4 qui va conduire à la surexpression du facteur de transcription DUX4 (Gaillard et al., 2014).

Une forme différente de FSHD, appelée FSHD2 a également été observée chez 5% des patients. Sans lien avec une contraction de D4Z4 (aucune diminution d'unité macrosatellite n'est observée), cette forme pourrait être liée à la présence de mutation dans un gène, le gène *SMCHD1* (18p11) (Lemmers et al., 2012), connu pour jouer un rôle dans la compaction et le relâchement de la chromatine ainsi que dans la maintenance de l'inactivation du chromosome X (Mould et al., 2013).

L'association de *SMCHD1* mutant avec une hypométhylation des D4Z4s et la présence d'un haplotype 4q compatible engendrerait la stabilisation du transcrit DUX4 et sa surexpression, comme chez les patients FSHD1 (Calandra et al., 2016). La FSHD2 serait donc une maladie digénique impliquant les gènes *SMCHD1* et *DUX4* qui nécessiterait l'association des différents paramètres précédemment décrits pour se déclarer.

Différentes études ont montré que l'haplotype permissif 4qA peut être retrouvé chez des individus sains induisant la synthèse de transcrits DUX4 (Broucqsault et al., 2013; Jones et al., 2012; Scionti et al., 2012). Ainsi, l'expression de DUX4 seule ne peut être responsable de la maladie, d'autres gènes doivent agir en tant que facteurs modificateurs pour que la maladie se déclare.

Comme abordé dans le paragraphe [II.2.1.3], le gène *FAT1* est un bon candidat pour jouer ce rôle. Il intervient dans le processus de polarité cellulaire planaire mis en place dans les muscles plats et est responsable de défauts musculaires, oculaires et auditif semblables à ceux observés chez les patients lorsqu'il est hypométhylé chez la souris (Caruso et al., 2013).

Les travaux que j'ai réalisés sur une cohorte de patients cliniquement diagnostiqués comme atteints de FSHD2 ont montré qu'aucun d'entre eux ne présente d'hypométhylation des D4Z4 ni de mutation dans le gène *SMCHD1*. En revanche, dix malades sont porteurs de mutations dans le gène *FAT1* qui affectent son épissage (Puppo, Dionnet et al., 2015).

La mise en évidence de cette dérégulation de *FAT1* chez des patients souffrant de FSHD suggère donc que ce gène pourrait jouer un rôle important dans le développement de la maladie.

IV. Les stratégies thérapeutiques

Depuis les années 2000 où les premiers essais thérapeutiques par thérapie génique ont vu le jour chez l'homme, de nombreuses techniques à cibles thérapeutiques diverses ont été imaginées. On peut schématiquement les classer en deux groupes distincts qui seraient d'une part, le groupe des thérapies géniques dites « classiques, conventionnelles » et d'autre part, celui des thérapies « nouvelles, par édition génomique ».

Les premières ont généralement pour but d'apporter un ADN exogène dans des cellules malades dont l'expression viendra se substituer à celle de son homologue endogène muté. Les secondes quant à elles, ciblent directement les mutations pathogènes sur la molécule d'ADN génomique (*Genome editing approaches*). Parmi elles, on trouve notamment les techniques d'utilisation de TALEN (*Transcription activator-like effector nuclease*), de nucléases à doigts de zinc (ZFN) ou encore, la technique la plus prometteuse actuellement, la technique CRISPR/Cas9.

Dans les paragraphes qui suivent, seul le groupe des thérapies géniques conventionnelles sera abordé plus en détails.

1. Les vecteurs de type « virus associés aux adénovirus » (AAV)

L'utilisation de virus pour la mise au point de thérapies géniques a d'abord été amorcée par l'emploi de lentivirus et d'adénovirus. Cependant, devant le peu d'efficacité observé et surtout à cause des risques pathogènes associés, l'usage de ces vecteurs a peu à peu cessé pour laisser place à l'utilisation des virus associés aux adénovirus (AAV). Ce sont des virus à ADN simple brin, de la famille des *parvoviridae*, qui nécessitent un virus « *helper* » (de type adénovirus) pour leur assemblage (Zinn and Vandenberghe, 2014).

Les AAV sont utilisés pour apporter une copie viable d'un gène défectueux malgré une limite importante liée à la capacité d'encapsulation maximale du vecteur ($\approx 4,7$ kb). Cependant, différentes stratégies ont été mises au point ces dernières années pour contourner cette limite et faire s'exprimer *in vivo* des transgènes de taille supérieure. On trouve notamment les techniques de concatémérisation et de recombinaison de fragments (Pryadkina et al., 2015).

La concatémérisation est la première à avoir été mise en place. La technique repose sur la reconstitution de l'intégrité du transgène après l'administration de deux vecteurs AAV différents portant chacun un morceau de la séquence codante d'intérêt. L'un des vecteurs est composé du promoteur du gène, du début de sa séquence codante et d'un site donneur d'épissage, c'est le vecteur 5' ; le second comporte un site accepteur plus le reste de la séquence protéique et le signal de polyadénylation : c'est le vecteur 3'.

Une fois les deux éléments apportés dans la cellule, l'ADN simple brin est converti en ADN double brin. Le vecteur AAV utilise alors sa capacité de recombinaison portée par les séquence ITR (*inverted terminal repeat*) pour relier les deux séquences entre elles. Une limite à cette technique est à noter : la recombinaison peut avoir lieu dans n'importe quel sens, ce qui réduit la quantité d'ARNm mature produit (Lostal et al., 2014; Pryadkina et al., 2015). L'autre frein important à l'utilisation d'une telle technique dans le cadre d'une stratégie thérapeutique est lié à la nécessité d'injecter de trop grandes quantités de vecteurs pour obtenir une infection simultanée des deux AAV chez l'Homme (Lostal et al., 2010).

La seconde approche est similaire, elle est basée sur l'apport, via divers AAV, de plusieurs séquences codantes possédant chacun une partie chevauchante. Une fois les différents fragments synthétisés dans la cellule, un transcrit stable sera produit dans son intégralité par recombinaison homologue. Cette technique s'est révélée plus efficace que la concatémérisation pour restaurer, par exemple, l'expression de la dysferline et permettre une réparation membranaire efficace (Grose et al., 2012; Sondergaard et al., 2015).

2. Thérapies utilisant des mini-protéines

Comme nous venons de le voir, la principale limite quant à l'utilisation de vecteurs AAV réside dans la taille de la molécule à encapsider. En dehors des techniques utilisant plusieurs AAV pour apporter une molécule entière dans la cellule, une stratégie portant sur la synthèse de mini-protéines s'est également développée. Elle consiste à réduire la taille de la séquence codante apportée pour qu'elle puisse être entièrement intégrée dans un vecteur AAV tout en conservant ses propriétés thérapeutiques. Cette technique n'est cependant envisageable que pour les protéines porteuses de domaines répétés dont l'absence n'impacte pas la fonctionnalité. Ce genre d'approches thérapeutiques a été développé pour la mise au point de micro- et mini-dystrophines dans le cadre de la dystrophie de Duchenne (DMD) (Robinson-Hamm and Gersbach, 2016) et également de mini-dysferlines dans le cadre des dysferlinopathies (Azakir et al., 2012; Krahn et al., 2010).

Après de résultats prometteurs obtenus sur des modèles murins et canins de DMD (Bostick et al., 2008; Gregorevic et al., 2008), un essai clinique a été développé sur six jeunes garçons malades. Malheureusement, les résultats obtenus à la fin de l'étude ne furent pas concluants : une importante réponse immunitaire s'était développée contre les AAV (Mendell et al., 2010).

3. Thérapies ciblant l'ARN messager

3.1. Principe de l'épissage

Dans le chapitre « la transcription : maturation du pré-messager en ARNm » [II.3.1], nous avons vu comment l'épissage est catalysé par le spliceosome. C'est une étape de maturation des ARNs pré-messagers qui conduit à l'élimination des parties introniques présentes dans leur séquence. Le bon déroulement de la réaction dépend de la reconnaissance des différents sites consensus d'épissage que sont : le point de branchement, le *polypyrimidine tract* et les sites consensus accepteurs et donneurs d'épissage.

Etant donné que tous les facteurs entrant en jeu dans cette réaction se trouvent sur la même molécule, on peut qualifier ce processus d'épissage « en *cis* ». Cette dénomination est utilisée en opposition au mécanisme beaucoup plus rare et beaucoup moins connu d'épissage « en *trans* ».

3.2. L'épissage en *trans*, la technique de « *Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing* » (SMaRT)

De par sa fréquence de réalisation, l'épissage en *trans* peut être qualifié d'anecdotique. Cette étape de maturation suit exactement les mêmes étapes que le processus d'épissage *en cis* à la différence que ce n'est plus une seule molécule d'ARN pré-messager qui est impliquée mais deux molécules distinctes. En effet, l'ARN messager mature produit par *trans*-épissage est une molécule chimérique composée dans sa première partie, d'exons issus d'un pré-ARNm « A » et d'exons provenant d'une autre molécule d'ARN pré-messager « B » dans sa partie terminale (figure 55) (Berger et al., 2016).

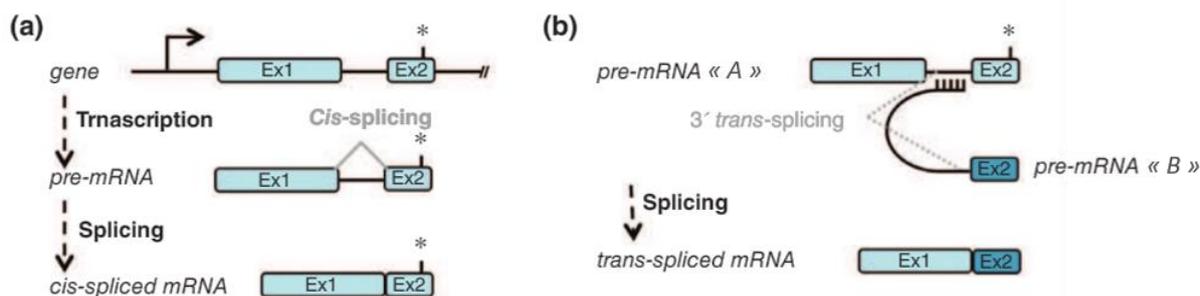


Figure 55 : Comparaison des mécanismes d'épissage en cis et en trans

- a) Mécanisme classique d'épissage en cis
 b) Mécanisme d'épissage en trans : intervention de deux molécules d'ARN pré-messager distinctes
 Berger et al., 2016

Les premières descriptions de ce mécanisme physiologique ont été faites sur différents eucaryotes primitifs, tel le trypanosome, au milieu des années 80 (Sutton and Boothroyd, 1986). Depuis, il a également été décrit chez différents mammifères tels que le rat ou encore l'homme, aussi bien au niveau de récepteurs aux œstrogènes qu'au niveau des cellules souches embryonnaires (Berger et al., 2016; Caudevilla et al., 1998; Flouriot et al., 2002).

D'après une étude menée par Dixon et collaborateur, ce processus naturel serait à l'origine de répétitions d'exons observées uniquement au niveau ARN et non au niveau génomique. En effet, ils ont identifié des séquences complémentaires dans les introns encadrant les exons sujets à répétition (Dixon et al., 2007). Ces observations suggèrent que le phénomène de redondance exonique pourrait être le résultat de mécanismes de *trans*-épissage. Il surviendrait entre deux pré-ARN messager issu d'un même gène et dont la proximité serait favorisée par la présence de ces sites introniques complémentaires. Le fait que les exons répétés proviennent exclusivement du même allèle est un point important qui permet de renforcer leur hypothèse.

Ainsi, pour promouvoir les phénomènes d'épissage en *trans* entre deux pré-messagers, il semble nécessaire de favoriser leur proximité en jouant sur les possibilités d'hybridation de séquences introniques complémentaires.

Suite à la découverte de ce phénomène de « raccomodage » moléculaire, l'idée d'utiliser la technique de « *Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing* » (SMaRT), pour remplacer un ARNm endogène muté par une séquence codante fonctionnelle, a vu le jour. C'est ainsi que les premières expériences de réparation moléculaire *in vivo* à visée thérapeutique ont été développées sur des modèles cellulaires de mucoviscidose (Liu et al., 2002). Dans cette étude et comme dans la plupart de celles qui ont suivi, un ARNm artificiel, appelé « *Pre-trans-splicing molecule* » (PTM), est synthétisé. Il est conçu pour cibler spécifiquement l'ARN pré-messager endogène muté juste avant qu'il ne soit épissé. Son but est d'induire une réaction de *trans*-épissage pour créer un ARN chimérique non muté dans la cellule (Berger et al., 2015; Lorain et al., 2013; Monjaret et al., 2014; Philippi et al., 2015; Tal-Goldberg et al., 2014). Pour que ce mécanisme soit efficace, il faut que la force des sites consensus d'épissage portés par le PTM soit supérieure à celle des sites portés par le pré-messager endogène. La quantité de molécules chimériques obtenue sera directement proportionnelle à l'efficacité du traitement. C'est à ce niveau que réside toute la difficulté de cette thérapie.

Afin que la molécule artificielle soit efficace, elle doit intégrer différents composants (figure 56) :

- Un domaine de liaison capable de reconnaître spécifiquement la séquence intronique à laquelle il doit se fixer de manière complémentaire. L'hybridation peut se faire en 3' ou en 5' de l'exon muté, voir même, de part et d'autre de ce dernier dans le cas où l'on ne souhaite remplacer qu'un seul exon (cas de *trans-splicing* « interne »),
- Un intron artificiel comportant : un point de branchement, un *polypyrimidine tract* et, pour induire la réaction d'épissage, un site donneur ou accepteur fort, selon que l'on souhaite réaliser un *trans-splicing* en 3' ou en 5', respectivement (dans le cas du *trans-splicing* « interne », il faudra apporter les deux sites),

- Une séquence nucléotidique correspondant à la séquence de substitution de l'ARN à réparer.

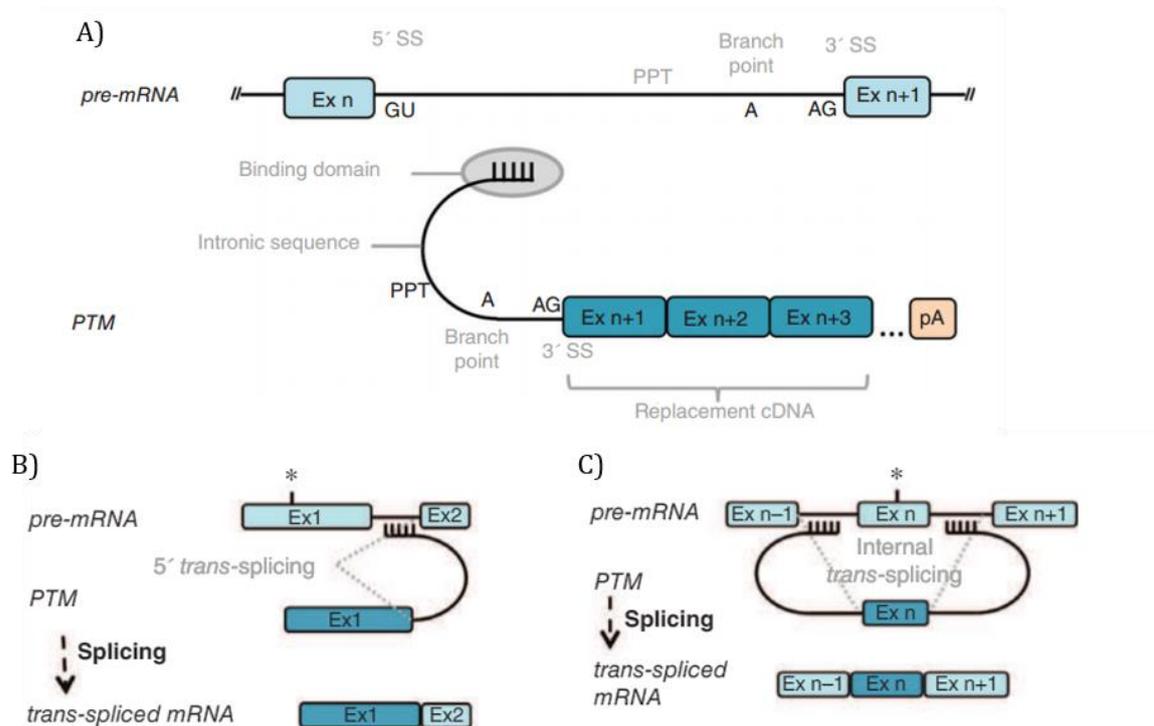


Figure 56 : Composition du PTM et représentation des différentes stratégies de trans-splicing existantes

- A) Cas de trans-splicing en 3'. Pour être fonctionnelle, le PTM doit contenir un domaine de liaison au pré-ARNm, une séquence intronique et une séquence d'ADN de remplacement.
 B) Cas de trans-splicing en 5'.
 C) Cas de trans-splicing « interne ».

Berger et al., 2016

L'utilisation des techniques de *trans-splicing* a plusieurs intérêts :

Tout d'abord, un seul et même PTM peut être utilisé pour corriger de nombreuses mutations différentes, à la différence des techniques de saut d'exon qui ne peuvent en cibler que peu à la fois. Ensuite, aucun problème de régulation de l'expression du transgène n'est à craindre puisque son expression est dépendante de celle de l'ARN pré-messager naturel. De plus, l'expression de cette molécule a un double intérêt : non seulement elle permet la synthèse d'un transcrite codant une protéine fonctionnelle, mais elle concourt également à réduire la production de la protéine mutée. Enfin, dans cette stratégie, la taille du PTM permet son intégration dans un vecteur AAV.

Les travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse ont notamment porté sur la mise au point d'une stratégie thérapeutique de *trans-splicing* en 3', dans le cadre des dysferlinopathies.

3.3. Le saut d'exon thérapeutique

Le saut d'exon(s) thérapeutique (*exon-skipping*) a pour but de supprimer un exon porteur de mutation(s) pathogène(s) pour que soit produite une protéine raccourcie mais suffisamment stable et fonctionnelle pour entraîner un bénéfice thérapeutique (figure 57).

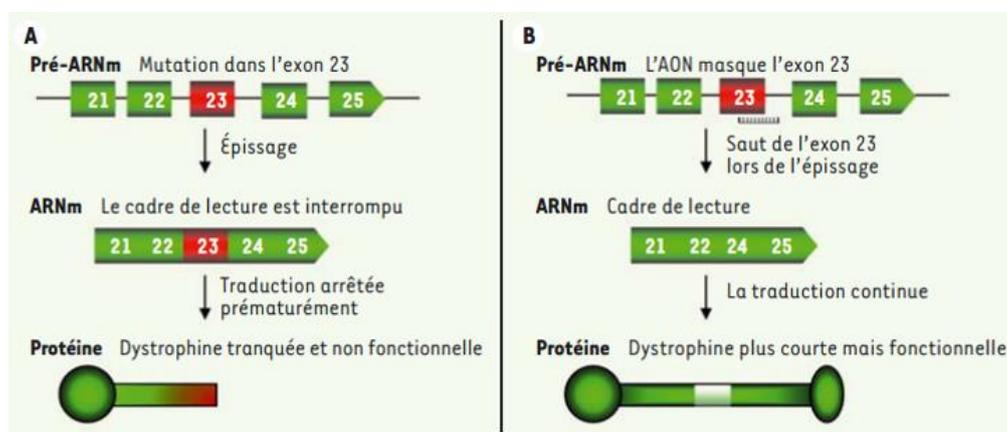


Figure 57 : Stratégie de réparation par saut d'exon, de la mutation de l'exon 23 de la dystrophine

A) Conséquences de la mutation sur la production de dystrophine

B) Mécanisme d'action de l'AON

<http://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/pdf/2015/03/medsci20153103p253.pdf>

La technique consiste à venir perturber le spliceosome en masquant, sur l'ARN pré-messager, les séquences consensus d'épissage de l'exon cible, à l'aide d'oligonucléotides antisens (AON). L'exon ne sera alors plus reconnu en tant que tel et épissé avec les introns qui l'entoure (Barthélémy et al., 2015). Les AONs sont de petites molécules nucléotidiques simples brins produites pour s'hybrider spécifiquement avec une séquence particulière d'un gène donné, et chimiquement modifiées pour augmenter leur stabilité.

Les premières études de saut d'exon effectuées *in vivo* sur le gène de la dystrophine ont donné de très bons résultats, ouvrant ainsi la voie à la mise en place d'essais thérapeutiques chez l'homme (Robinson-Hamm and Gersbach, 2016). Deux types d'AONs chimiquement différents ont été testés : les premiers sont appelés « 2'-O-methyl phosphorothioate (2OMeP) » et constituent les principes actifs du médicament « drisapersen ». Les seconds, connus sous la dénomination « phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMO) » sont retrouvés dans le médicament « Eteplirsen » (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Kole and Krieg, 2015). A la différence des 2OMeP qui sont chargés négativement, les PMO ne sont pas chargés au pH physiologique de la cellule. Ils ne sont pas non plus sujets à la dégradation enzymatique (Jearawiriyapaisarn et al., 2008).

Ces essais cliniques se sont révélés encourageants, aucune réaction immunitaire n'est apparue et, bien qu'elle n'ait été que transitoire, l'expression de la dystrophine a pu être observée. L'utilisation de PMO semblent toutefois plus efficace avec une expression un peu plus longue (Kole and Krieg, 2015).

En parallèle de ces études cliniques, des travaux utilisant l'association d'AONs avec des molécules impliquées dans la régulation de l'épissage, comme le snRNP-U7 pour vectoriser l'expression de ces AONs (voir paragraphe sur le spliceosome), ont démontré une efficacité durable de la correction phénotypique chez la souris *mdx* (modèle murin de référence pour l'étude de la DMD) (Goyenvalle et al., 2004, 2012).

Enfin, plus récemment, des AONs de conformation différente, plus stables ont vu le jour : les tricyclo-ADN (tcDNA) (Goyenvalle et al., 2015). Ces AONs de troisième génération appartiennent à une classe de molécules dont la conformation est proche de celle de l'ADN et possèdent donc de meilleures propriétés de liaison aux acides nucléiques. Ainsi, ils s'hybrident avec une très haute affinité sur l'ARN pré-messager cible, induisant une efficacité d'action plus importante chez la souris *mdx*. Une meilleure distribution tissulaire est également observée, la dystrophine est retrouvée exprimée dans le cœur, comparativement aux PMO et aux 2OMeP. Cette dernière caractéristique pourrait être liée au fait que les AON-tcDNA ont la capacité de former spontanément des agrégats de type « nanoparticules » supposés mimer l'effet de certains agents transfectants (Ezzat et al., 2015).

L'ensemble des recherches détaillées plus haut montrent bien que le saut d'exon est une approche thérapeutique prometteuse dans le cadre de maladies telles que la DMD. Il a l'avantage de cibler en même temps, toutes les mutations retrouvées dans un même exon malgré leur nature très différentes.

Cependant, pour les mêmes raisons que celles mises en avant dans les travaux effectués sur les mini-protéines, la technique de saut d'exon ne peut pas s'appliquer à toutes les protéines. Elle ne peut être développée que dans le cadre de maladies où l'expression de la protéine en cause est modulaire. En effet, un bénéfice thérapeutique ne pourra être obtenu que si la délétion du ou des exons de la séquence codante n'impacte pas les fonctionnalités de la protéine native. La dysferline entre dans la catégorie des protéines modulaires puisque une « quasi-dysferline », portant une délétion de l'exon 32 et conservant l'ensemble de ses capacités fonctionnelles, a été mise en évidence chez un individu ne présentant aucun symptôme dystrophique (Sinnreich et al., 2006). De ce fait, nous avons développé, comme nous le verrons plus loin, la technique de saut d'exon sur la dysferline (Barthélémy et al., 2015).

L'autre limite majeure de cette stratégie réside dans le fait qu'elle ne peut pas être appliquée à tous les exons. En effet, pour que le cadre de lecture de la séquence génique soit conservé, elle ne peut être développée que pour les exons en phase.

Résultats et discussions

I. Etude de l'implication du gène FAT1 dans la dystrophie Facio-Scapulo-Humérale

1. Contexte de la recherche

En 2013, une nouvelle fonction de la protocadherine fat1 est découverte par l'équipe de Françoise Helmbacher en collaboration avec mon équipe. Chez la souris, elle est impliquée dans l'orientation et la polarité des myoblastes via le processus de polarité cellulaire planaire ainsi que dans leur migration pendant le développement embryonnaire.

Le modèle murin hypomorphe pour *Fat1* développé par cette équipe, montre qu'une diminution de la quantité de protéine fat1 induit l'apparition d'un phénotype dystrophique asymétrique très similaire à celui observé chez les patients souffrant de dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (FSHD). De plus, les atteintes non musculaires, qu'elles soient auditives ou visuelles, sont potentiellement expliquées par les défauts dans *Fat1* et également retrouvées chez les souris. Enfin, chez l'homme, l'implication de fat1 dans le développement du muscle est confortée par la mise en évidence d'une dérégulation de son expression dans les tissus musculaires prélevés sur des fœtus atteints de FSHD1. L'étude s'achève en faisant l'hypothèse que *FAT1* agit comme un gène modificateur sur cette maladie (Caruso et al., 2013).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons démarré, en collaboration avec une équipe japonaise, une étude sur quarante-neuf patients japonais cliniquement diagnostiqués comme atteints de FSHD malgré l'absence de contraction ou d'hypométhylation des D4Z4 et de mutation dans le gène SMCHD1. Nous avons cependant identifié, via une approche de séquençage haut-débit, des mutations dans le gène FAT1 chez dix d'entre eux.

En premier lieu, nous avons sélectionné quatre mutations faux-sens conduisant à une substitution d'acides aminés dans des domaines cadhérines de fat1 (figure 58).

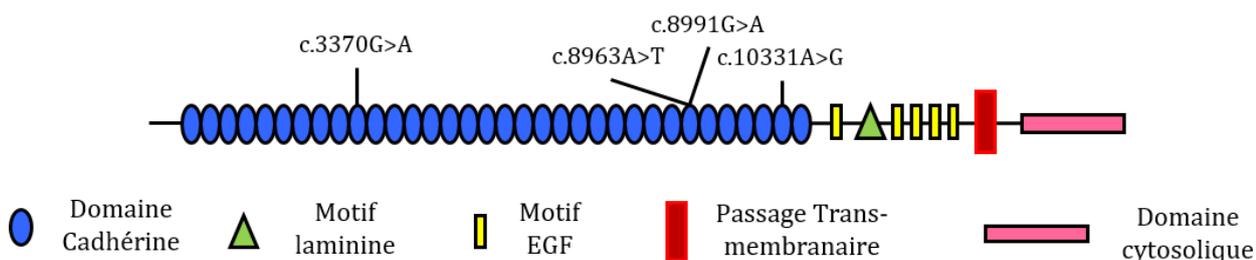


Figure 58 : Représentation schématique de la protéine FAT1 et de la localisation des quatre mutations testées

Ces domaines, qui sont au nombre de trente-quatre dans la protéine *fat1*, jouent un rôle important dans la fixation du calcium extracellulaire et dans le maintien de l'architecture tissulaire puisqu'ils interviennent dans la formation d'homodimères de *fat1* ou d'hétérodimères impliquant *fat1* et *Dachsous*, une autre protocadhérine partenaire. Afin de comprendre l'impact que les mutations peuvent avoir sur la structure tridimensionnelle des domaines cadhérines qui les contiennent ou sur leur capacité à lier le calcium, différentes études structurales ont été mises en place en collaboration avec l'équipe de Sophie Zinn au CEA de Saclay.

Les versions sauvages et mutés des différents domaines ont été produits dans des bactéries puis analysés par Thermofluor et spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Dans un cas, les résultats obtenus ont montré qu'indépendamment de la présence de calcium, la mutation ne modifie pas la structure tridimensionnelle du domaine. En revanche, ce dernier devient particulièrement instable dans un milieu dépourvu de calcium.

Comme nous n'avons pas pu mettre en évidence l'impact franc des mutations sur la formation des dimères protéiques ou sur l'affinité des domaines à fixer le calcium, nous avons choisi d'orienter nos recherches sur l'étude de mécanismes survenant plus en amont. Ainsi, j'ai regardé si les quatre mutations sélectionnées, trois faux-sens et une isosémantique, perturbaient la maturation de l'ARNm de *fat1* en jouant sur son épissage.

2. Résultats

L'étude de l'effet des mutations sur l'épissage de *fat1* a été effectuée à l'aide d'un système de vecteur rapporteur de type « minigène ». J'ai intégré les exons à tester, sous forme sauvage ou mutante, dans le vecteur pCAS2 que j'ai ensuite transfecté dans des cellules HEK293. Après extraction d'ARNs, RT-PCR et séquençage Sanger, j'ai démontré pour la première fois que ces mutations jouaient sur l'épissage de l'ARNm de *fat1* et impactaient les domaines cadhérines dans lesquels elles se trouvaient. Selon que la mutation casse un ESE ou crée un site accepteur d'épissage, j'ai également testé la co-transfection de pCAS2 et d'AONs ciblant la zone dans laquelle se trouve la mutation. Dans un cas, j'ai reproduit le saut d'exon en masquant l'ESE sur l'exon sauvage, et dans l'autre, j'ai aboli l'utilisation du site cryptique accepteur d'épissage en le masquant dans l'exon muté (figure 59).

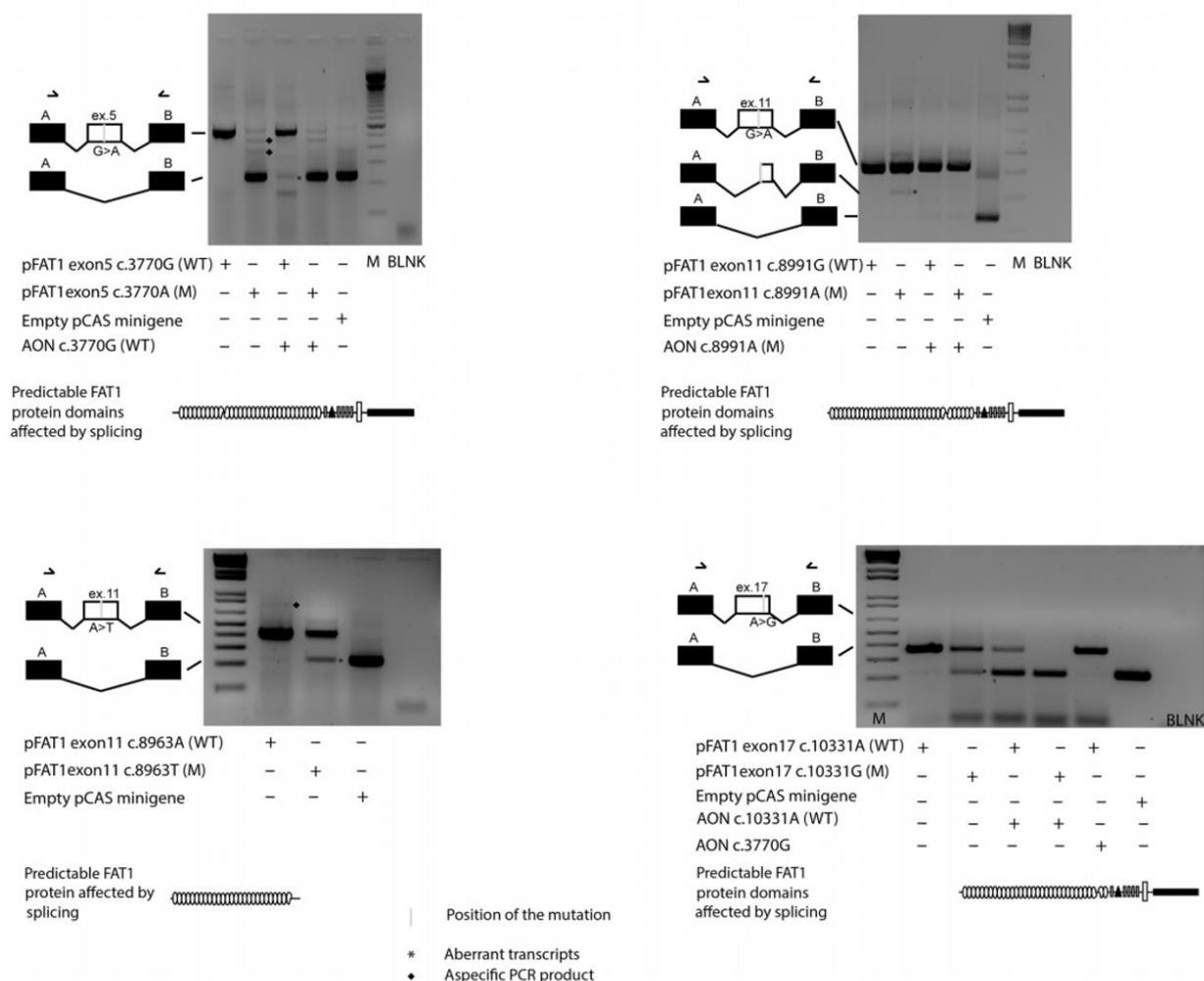


Figure 59 : Les quatre mutations testées modifient l'épissage de FAT1. L'utilisation d'AON reproduit ou annule leur effet

Tous les effets observés sur gels d'électrophorèse après RT-PCR ont été confirmés par séquençage Sanger. Les transcrits produits suite à un défaut d'épissage sont indiqués par des astérisques rouges et les transcrits aberrants par un point noir. Se référer à la publication pour plus de détails.

Puppo, Dionnet et al., 2015

3. Discussion

L'ensemble des travaux auxquels j'ai participé sur le gène FAT1 a donné lieu à une publication dans le journal « *Human Mutation* » en avril 2015 que je signe en co-premier auteur (Puppo, Dionnet et al., 2015).

Suite à l'obtention de ces résultats encourageant, nous aurions souhaité rechercher la présence des transcrits aberrants chez les patients japonais porteurs de ces mutations. Or, aucune biopsie musculaire ni cellule n'était disponible pour ces derniers. En effet, du fait des améliorations diagnostiques obtenues suite à l'émergence des techniques de séquençage haut-débit, il est aujourd'hui plus rare d'effectuer des opérations invasives comme les prélèvements musculaires chez les malades. Notre étude n'a donc pas pu être enrichie par la confirmation *in vivo* des mécanismes pathologiques.

Identification of Variants in the 4q35 Gene *FAT1* in Patients with a Facioscapulohumeral Dystrophy-Like Phenotype

Francesca Puppo,^{1,2†} Eugenie Dionnet,^{1,2†} Marie-Cécile Gaillard,^{1,2} Pascaline Gaildrat,³ Christel Castro,^{1,2} Catherine Vovan,⁴ Karine Bertaux,⁴ Rafaele Bernard,⁴ Shahram Attarian,^{1,2,5} Kanako Goto,⁶ Ichizo Nishino,⁶ Yukiko Hayashi,⁷ Frédérique Magdinier,^{1,2} Martin Krahn,^{1,2,4} Françoise Helmbacher,⁸ Marc Bartoli,^{1,2,4*‡} and Nicolas Lévy,^{1,2,4‡}

¹Aix Marseille Université, GMGF, Marseille, France; ²Inserm, UMR, S 910, Marseille, France; ³Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), Inserm, UMR 1079, University of Rouen, Rouen, France; ⁴Département de Génétique Médicale et de Biologie Cellulaire, AP-HM, Hôpital d'Enfants de la Timone, Marseille, France; ⁵Department of Neurology and Neuromuscular Diseases, CHU La Timone, Marseille, France; ⁶NCNP, National Institute of Neuroscience, Tokyo, Japan; ⁷Department of Neurophysiology, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan; ⁸Aix Marseille Université, CNRS, IBDM, UMR 7288, Marseille, France

Communicated by Mireille Claustres

Received 16 June 2014; accepted revised manuscript 11 January 2015.

Published online 23 January 2015 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.22760

ABSTRACT: Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is linked to copy-number reduction ($N < 10$) of the 4q D4Z4 subtelomeric array, in association with DUX4-permissive haplotypes. This main form is indicated as FSHD1. FSHD-like phenotypes may also appear in the absence of D4Z4 copy-number reduction. Variants of the *SMCHD1* gene have been reported to associate with D4Z4 hypomethylation in DUX4-compatible haplotypes, thus defining FSHD2. Recently, mice carrying a muscle-specific knock-out of the protocadherin gene *Fat1* or its constitutive hypomorphic allele were shown to develop muscular and nonmuscular defects mimicking human FSHD. Here, we report *FAT1* variants in a group of patients presenting with neuromuscular symptoms reminiscent of FSHD. The patients do not carry D4Z4 copy-number reduction, 4q hypomethylation, or *SMCHD1* variants. However, abnormal splicing of the *FAT1* transcript is predicted for all identified variants. To determine their pathogenicity, we elaborated a minigene approach coupled to an antisense oligonucleotide (AON) assay. In vitro, four out of five selected variants induced partial or complete alteration of splicing by creating new splice sites or modifying splicing regulators. AONs confirmed these effects. Altered transcripts may affect *FAT1* protein interactions or stability. Altogether, our data suggest that defective *FAT1* is associated with an FSHD-like phenotype.

Hum Mutat 36:443–453, 2015. © 2015 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: neuromuscular pathology; facioscapulohumeral dystrophy; *FAT1*-protocadherin

Introduction

Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD; MIM #158900) [Justin Besancon et al., 1964; Balatsouras et al., 2007]

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

†These authors should be considered first co-authors.

‡These authors contributed equally to this article.

*Correspondence to: Marc Bartoli, Aix Marseille Université, GMGF, UMR_S 910, Faculté de Médecine 27, Bd Jean Moulin, Marseille 13385, France. E-mail: marc.bartoli@univ-amu.fr

Contract grant sponsors: Association Française contre les Myopathies (AFM)-Téléthon (strategical pole MNH Decrypt); Fondation Maladies Rares.

is the third most common human neuromuscular disease. Symptoms mainly appear during the second decade of life and are characterized by progressive weakness of the facial, scapular, and humeral muscles, later spreading toward the lower limb muscles. Nonmuscular tissues are also frequently affected in FSHD; hearing loss manifests in 75% of patients, and retinal telangiectasia occurs in 60% of patients [Wohlgemuth et al., 2004]. Learning difficulties and epilepsy may also occur as atypical symptoms in subsets of severely affected children [Saito et al., 2007].

Genetically, FSHD is linked to the presence of a reduced copy number (1–10 copies) of a tandemly repeated 3.3-kb segment (D4Z4 macrosatellite) on chromosome 4q35, whereas in healthy individuals, this repeat varies from 11 to 100 copies [Wijmenga et al., 1990; van Deutekom et al., 1993]. This main form of FSHD, referred to as FSHD1, accounts for approximately 95% of cases [Richards et al., 2012]. Such a heterozygous D4Z4-array reduction is associated with chromatin relaxation on specific permissive haplotypes [Lemmers et al., 2002], which might result in stabilization of the DUX4 transcript, encoded by the retrogene located in D4Z4, and expression of this transcription factor [Gabriëls et al., 1999; Dixit et al., 2007; Lemmers et al., 2010; Spurlock et al., 2010; Vanderplanck et al., 2011]. A form of FSHD not linked to D4Z4 contraction accounts for 5% of patients (contraction-independent FSHD) [van Overveld et al., 2003]. In a majority of these patients described at present, now referred to as FSHD2, variants of *SMCHD1* (MIM #614982; GenBank NM_015295.2) [Lemmers et al., 2012; Larsen et al., 2014; Lemmers et al., 2015], a gene known to play a role in chromatin relaxation and maintenance of X chromosome inactivation [Blewitt et al., 2008; Gendrel et al., 2012], have been reported to associate with D4Z4 hypomethylation in DUX4-compatible 4q haplotypes, thereby leading to DUX4 overexpression as well.

Nevertheless, large-scale studies performed on healthy individuals and FSHD patients have shown that the permissive haplotype (4qA161) on FSHD-sized repeats, although rare, is present in the healthy population, thus constituting a rare uncommon polymorphism [van Overveld et al., 2000; Lemmers et al., 2007; Scionti et al., 2012a, 2012b] and indicating that DUX4 protein expression is not in itself sufficient to trigger FSHD symptoms. Furthermore, DUX4 RNA and protein have been detected, although at low levels, in muscle biopsies of healthy individuals carrying DUX4-compatible haplotypes in the absence of 4q contraction [Jones et al., 2012; Broucq-sault et al., 2013]. This finding indicates that although necessary, DUX4 activation is not sufficient on its own to trigger the appearance

of symptoms [Jones et al., 2012], implying the existence of modifier genes/mutations that contribute to this complex syndrome. As such, SMCHD1 variants were recently shown to constitute modifier alleles of FSHD1 [Sacconi et al., 2013; Larsen et al., 2014]. Therefore, evidence of cosegregation for multiple genetic factors began to accumulate, contributing to the genotype–phenotype correlation in a proportion of FSHD families. However, other cases of contraction-independent FSHD are not explained by SMCHD1/DUX4 synergy, leaving room for the identification of other genes involved in FSHD pathogenesis.

Recently, mouse models carrying a muscle-specific knock-out of the protocadherin gene *Fat1* or its constitutive hypomorphic allele have been shown to develop defects in the shape and position of specific groups of muscles in the shoulder and face [Caruso et al., 2013]. The human *FAT1* gene (MIM #600976; GenBank NM_005245.3) is composed of 27 exons spanning a region of 139 kb and encodes a 506-kDa transmembrane protein with 34 cadherin domains followed by a laminin and five EGF motifs in its extracellular part. Studies on the protocadherin *Fat1* demonstrated its influence on smooth muscle cell motility [Hou and Sibinga, 2009], actin accumulation at neuronal synapses [Moeller et al., 2004], the Hippo signaling pathway [Bennett and Harvey, 2006; Cho et al., 2006], and cell polarity [Skouloudaki et al., 2009]. While constitutive loss of *FAT1* leads to a significant degree of perinatal lethality in mice [Ciani et al., 2003; Caruso et al., 2013], incomplete alterations of the *FAT1* gene have been identified in rare developmental 4q syndromes characterized by mild facial dysmorphisms, abnormalities in skeletal and cardiac development, and growth and mental retardation [Ockey et al., 1967; Bendavid et al., 2007; Kitsiou-Tzeli et al., 2008]. Genetic links between *FAT1* gene polymorphisms and susceptibility to bipolar disorder or schizophrenia have also been established [Blair et al., 2006; Abou Jamra et al., 2008; Jung and Jun 2013]. Finally, somatic mutations inducing high expression of *FAT1* or its variant isoforms have been associated with both acute lymphoblastic leukemia [de Bock et al., 2012] and breast cancer progression [Lee et al., 2012], whereas other mutations (and CNV [copy number variation]) causing *FAT1* protein loss of function are associated with glioblastoma, colorectal, or head and neck cancers [Morris et al., 2013a].

For the first time, in a study by Caruso et al. (2013), *FAT1* was shown to control muscle patterning by modulating the polarity of myoblast migration during embryonic development, to be involved in regionalized muscle wasting, and to have a role in adult muscle fiber functions. Mice also exhibit extramuscular defects, such as retinal vasculopathy and abnormal inner ear patterning, which possibly represents a hearing impairment [Caruso et al., 2013]. Furthermore, misregulation of *FAT1* expression was observed in fetal FSHD1 muscle tissue, and a CNV mapping in a putative regulatory enhancer of *FAT1* preferentially segregated with FSHD-like patients who presented no D4Z4 contraction [Caruso et al., 2013]. Although FSHD-like symptoms only represent a subset of *FAT* loss-of-function phenotypes, the map of muscles that show developmental impairment in *FAT1* mutants strongly resembles one affected by human FSHD, raising the provocative hypothesis that *FAT1* acts as a modifier gene to the disease.

Here, we sought to identify *FAT1* variants in 49 Japanese cases affected by neuromuscular disease that closely resembles FSHD, according to the diagnostic criteria defined by the European Expert Group on FSHD [Padberg et al., 1991] and presenting no D4Z4 copy-number reduction in either 4q35 or 10q26, no reciprocal rearrangements [Yamanaka et al., 2004], no hypomethylation at D4Z4, and no SMCHD1 mutations. In 10 out of 49 cases analyzed, we identified 10 different variants of the *FAT1* gene. To determine their

pathogenic effect on *FAT1* splicing, we elaborated a minigene approach, coupled to an antisense oligonucleotide (AON) assay. The *in vitro* results showed a partial or complete alteration of splicing either by creating a new acceptor splice site or by modifying splicing regulators in *FAT1* variants. AONs confirmed the effect of these nucleotide substitutions. Altogether, our data suggest that a defective *FAT1* protein may be associated with an FSHD-like phenotype.

Methods

Study Subjects and Samples DNA Preparation; PCR and Sanger Sequencing Are Reported in the Supp. Methods

Bioinformatic predictions

Amino acid substitutions were predicted for their impact on protein function by three online algorithms: polymorphism phenotyping v2 (PolyPhen-2), SIFT, and prophyler (see Web links for references and Supp. Table S1 for results). PolyPhen-2 version 2.2.2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) calculates the impact of amino acid substitutions using protein sequences from the UniProt database, structural data from PDB/DSSP, and comparative considerations from UCSC multiple alignments of 45 vertebrate genomes. For a mutation, PolyPhen-2 calculates the probability that this mutation is damaging and estimates a false-positive rate (the chance that the mutation is classified as damaging when it is in fact nondamaging). Based on the threshold of this rate, a mutation is qualitatively defined as benign, possibly damaging, or probably damaging. SIFT (v1.03, <http://sift.jcvi.org>) predictions are based on the degree of conservation of amino acid residues in sequence alignments derived from closely related sequences. The score ranges from 0 to 1. The amino acid substitution is predicted to be damaging if the score is ≤ 0.05 . The impact of variants on *FAT1* splicing was predicted by Human Splicing Finder (HSF; version 2.4.1) (cut-off for donor or acceptor sites is 55%) [Desmet et al., 2009] and Alamut Visual 2.2, released in June 2012. This software integrates four different algorithms for splicing prediction: SpliceSiteFinder (<http://www.umd.be/HSF/>; cut-off for donor and acceptor sites 70%), MaxEntScan (no cut-off provided), NN Splice (score for donor and acceptor ranges between 0 and 1, cut-off is 0.4), and GeneSplicer (no cut-off provided). For HSF, as well as for Alamut, the threshold for ESEFinder is the following: SF2/ASF, 1.956; SC35, 2.383; SRp40, 2.67; and SRp55, 2.676. Predictions were considered strong enough to be tested in a minigene reporter assay in the following cases: nucleotide substitutions that create or break regulatory ESE or SSE splicing sites or determine the creation of a new splicing site stronger than the natural one. The inclusion criteria for experimental analysis of variants also accounted for available data from dbSNP137 and included a minor allele frequency lower than 0.005 (Table 1; Supp. Table S1).

Methylation analysis

For sodium bisulfite sequencing, 2 μ g of genomic DNA was denatured for 30 min at 37°C in 0.4 M NaOH and incubated overnight in a solution of 3 M sodium bisulfite, pH 5, and 10 mM hydroquinone using a previously described protocol [Ehrlich et al., 1982]. Converted DNA was then purified using the Wizard DNA CleanUp kit (Promega, Marseille, France) following manufacturer's recommendation and precipitated with ethanol. Modified DNA was amplified using the forward 5'-AAATATGTAGGGAAGGGTGTAAAGTT-3' and

Table 1. Molecular and Clinical Details for Selected Mutations

FAT1 CDS sequencing results	J2	J6	J7	J15	J16	J20	J21	J29	J41	J51	Exon	East Asian allele count/allele number	General allele count/allele number
c.2215A>G p.Met739Val							X				2	1/8892	2/124670
c.3770G>A p.Arg1257Gln					X						5	12/8894	22/124752
c.4358G>A p.Arg1453His		X									8	15/8724	195/120308
c.4723G>A p.Ala1575Thr			X	X							9	0	0
c.4959G>A p.Val1653Val						X					10	9/8878	9/124606
c.8963A>T p.Lys2988Ile								X			11	141/8888	155/124660
c.8991G>A p.Thr2997Thr	X										11	0	20/124668
c.10331A>G p.Asn3444Ser										X	17	9/8890	9/124578
c.12051C>T p.Cys4017Cys									X		22	0	25/124654
c.13374 G>A p.Gln4458Gln							X				27	2/8894	2/124730
Age of onset	Birth	30–50	>50	<10	10–>20		20–30	20>30		10>20			
FSH	+++	++	+	++	+++	++	++	++	+++	++			
Lower limbs	++			+		+	++	++	+	+			

X indicates the presence of mutation relative to cDNA sequence and relative to GenBank reference NM_005245.3. Nucleotide numbering uses +1 as the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence, with the initiation codon as codon 1. Black shadow indicates validated effect on splicing, whereas gray one stresses potentially damaging amino acid changes. Last two columns represent minor allele count in East Asian and general healthy population, respectively, as reported by Version 0.2 ExAC (Exome Aggregation Consortium) database.

reverse 5'-GGAGAGAGGGTTTGGTATATTTAAG-3' primer set designed with the MethPrimer software [Bird 2002] to amplify 21 CpGs (275 bp) within the D4Z4 proximal region [Gaillard et al., 2014]. We avoided CpGs in the primer sequence in order to amplify methylated and unmethylated DNA with the same efficiency. Amplification was conducted using the High Fidelity Taq polymerase (Roche, Paris, France) according to manufacturer's instructions. After initial denaturation, the amplification conditions were the following: 94°C for 20 sec, 54°C for 30 sec, 72°C for 1 min for 10 cycles, and then the elongation was increased by 30 sec at each subsequent cycle for 25 cycles. The PCR products were then purified using the Wizard SV gel and PCR Purification System (Promega) and cloned using the pGEM[®]-T Easy Vector cloning kit (Promega). Randomly selected colonies were grown overnight at 37°C with ampicillin selection and PCR amplified directly using T7 and SP6 primers. At least 10 independent colonies were sequenced according to the Sanger method by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) with either T7 or SP6 primers.

Sequences were analyzed using BiQ Analyzer software, and the average methylation score was calculated as the number of methylated CpGs for the total number of CpGs in the reference sequence (Table 2).

Cell culture

HEK293 cells (human embryonic kidney cell line) were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco, Saint Aubin, France) supplemented with 15% fetal calf serum and 1% PSA (penicillin streptomycin actinomycin) in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

Generation of constructs for splicing minigene reporter assay

The splicing minigene assay has been previously described [Gaillard et al., 2010]. DNA fragments corresponding to FAT1 wild-type and mutant exons surrounded by upstream and downstream intronic sequences were amplified from genomic DNA of patients heterozygous for the nucleotide substitution by using exon-specific forward and reverse primers (Supp. Table S2) carrying 5' tails with BamHI (or BglII) and MluI restriction sites, respectively

(underlined in Supp. Table S3). After digestion with BamHI (or BglII) and MluI, the PCR products were inserted into the BamHI and MluI cloning sites in the intron of the pCAS2 vector containing a two-exon splicing reporter minigene. The insert was then sequenced to identify the minigene constructs containing the FAT1 exon carrying the wild-type or substituted nucleotide and to ensure that no extra substitutions were added during amplification or cloning.

Transfection and analysis of RT-PCR products

The wild-type and mutant minigene constructs were transiently transfected into HEK293 cells using the promofectine transfection reagent, according to manufacturer's instructions (PromoKine, Heidelberg, Germany). Cells were collected 24 hr post-transfection. Total RNA was extracted using the PureLink[®] RNA Mini Kit (Ambion; Life Technologies, Saint Aubin, France), according to the manufacturer's instructions, followed by a DNase treatment with the DNA-free Kit (Ambion; Life Technologies). The RT-PCR reactions were performed using the SuperScript OneStep RT-PCR with Platinum Taq kit (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions, with 500 ng RNA as a template in a 50- μ l reaction volume. Reactions were performed using 300 nM of forward pCAS-KO1F (5'-TGACGTCGCCGCCATCAC-3') and reverse pCAS2R primers (5'-ATTGGTTGTTGAGTTGGTTGTC-3') [Gaillard et al., 2010]. The reverse transcription program had one cycle: 50°C for 30 min. The PCR program had 35 cycles of amplification of 96°C for 45 sec, 50°C for 45 sec, and 72°C for 1 min. RT-PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose 1000 (Invitrogen, Saint Aubin, France) gels containing ethidium bromide and visualized by exposure to nonsaturating ultraviolet light.

AON design and transfection

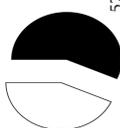
AONs with full-length 2-O-methyl-substituted ribose moieties and phosphorothioate internucleotide linkages were purchased from Eurogentec (Angers, France). AONs were designed according to several criteria: sequences targeting exon 5 (5'-U*U*U*C*C*C*G*C*U*C*A*G*G*G*A*G*U*C*U*G-3') and exon 17 (5'-G*A*C*A*C*U*G*U*A*G*U*U*U*C*C*U*G*G*A-3') were designed complementarily to the wild-type sequence. In parallel, the AON sequence for exon 11

Table 2. 5'-DAZ4 Methylation Percentage and SMCHD1 (GenBank NM_015295) Screening Results

5'-DAZ4 methylation percentage Patents	J2	J6	J7	J15	J16	J21	J29	J51
SMCHD1 exons and SNPs identified	1	14	18/19	21	22	26	28	
	HTZ rs2430853 MAF gp (G) = 46% MAF jp (C) = 29%	HTZ rs377473058 HTZ rs635132	HTZ rs377473058 HTZ rs635132	HTZ rs2430853 HTZ rs377473058 HMZ rs8090967 HTZ rs8090988 MAF gp = 31% MAF jp = 36%	HTZ rs377473058 HTZ rs635132	HTZ rs377473058 HMZ rs8090967 HTZ rs8090988	HTZ rs2430853 HTZ rs377473058 HTZ rs635132	HTZ rs377473058 HTZ rs635132 HTZ rs8090988
	84%	65%	71%	80%	57%	65%	74%	72%
	PCR not available	PCR not available	PCR not available	PCR not available	PCR not available	PCR not available	PCR not available	PCR not available
	MAF gp = 22% MAF jp = 31% HTZ rs10638660 MAF gp = 34% MAF jp = 39% HMZ rs8094260 MAF gp = 35% MAF jp = 38% PCR not available	HTZ rs10638660 HMZ rs8094260	HTZ rs10638660 HMZ rs8094260	HTZ rs16943716 MAF gp = 28% MAF jp = 31%	HTZ rs10638660 HMZ rs8094260	HTZ rs10638660 HMZ rs8094260	HTZ rs10638660 HMZ rs8094260	HTZ rs10638660 HMZ rs8094260

(Continued)

Table 2. Continued

5'-D4Z4 methylation percentage	J2	J6	J7	J15	J16	J21	J29	J51
31/32	 HTZ rs2019793 MAF gp = 18% MAF jp = 31% HTZ rs2304861 MAF gp = 16% MAF jp = 31% HTZ rs2304860 MAF gp = 22% MAF jp = 31% HTZ rs2304859 MAF gp = 33% MAF jp = 38%	 HMZ rs2019793 HMZ rs2304861 HMZ rs2304859	 HTZ rs2019793 HTZ rs2304861 HTZ rs2304859	 HMZ rs2304860 MAF gp = 22% MAF jp = 31%	 HMZ rs2019793 HMZ rs2304861 HMZ rs2304859	 HMZ rs2304860	 HTZ rs2019793 HTZ rs2304861 HTZ rs2304859	 HMZ rs2019793 HMZ rs2304861 HMZ rs2304859
33	HTZ rs71365197 MAF gp = 33% MAF jp = 38% HTZ rs200589679 MAF gp = 0% MAF jp = 1% HMZ rs300293 MAF gp = 3% MAF jp = 0% HMZ rs300291 MAF gp = 3% MAF jp = 1% HTZ rs3214732 MAF gp = 32% MAF jp = 39%	HMZ rs71365197 HMZ rs300293	HTZ rs71365197 HMZ rs300293	HMZ rs300293 HMZ rs7237908 MAF gp = 22% MAF jp = 31%	HMZ rs2019793 HMZ rs300293	HMZ rs300293 HMZ rs7237908	HTZ rs71365197 HMZ rs300293	HMZ rs71365197 HMZ rs300293
40	HMZ rs300291 MAF gp = 3% MAF jp = 1% HTZ rs3214732 MAF gp = 32% MAF jp = 39%	HMZ rs300291 HTZ rs3214732	HMZ rs300291 HTZ rs3214732	HMZ rs300291 HMZ rs3214732	HMZ rs300291	HMZ rs300291 HMZ rs3214732	HMZ rs300291 HTZ rs3214732	HMZ rs300291
42	HMZ rs10468730* MAF gp = 18% MAF jp = 32% HMZ rs3213926*	HMZ rs10468730*	HMZ rs10468730*	HMZ rs10468730*	HMZ rs10468730*	HMZ rs10468730*	HMZ rs10468730*	HMZ rs10468730*
43/44	HTZ rs3213926* MAF gp = 33% MAF jp = 39% HTZ rs35853884 MAF gp = 27% MAF jp = 29%	HTZ rs764718 MAF gp = 1% MAF jp = 2%	HTZ rs3213926* HTZ rs3213926*	HMZ rs35853884	HMZ rs35853884	HMZ rs35853884	HTZ rs3213926*	HTZ rs3213926*
48								

In upper part of the table, black sections of pie charts represent percentage of proximal D4Z4 methylated CpG/sequence in eight out of 10 patients carrying FA11 variants. In the lower part of the table, Minor Allele Frequencies from general population (gp) and from Asian population (jp) are expressed as MAF for the SNPs detected each of the eight patients analyzed. No variants were depicted in exons not showed in this table.

(5'-A*U*C*A*G*U*U*G*C*U*G*U*G*A*U*A*G*U*A*A-3') was designed complementarily to the variant sequence.

HEK293 cells (4×10^5 cells) grown in 12-well plates to 80% confluence were transfected with 1.1 μg of AON and 0.5 μg of pCAS2 constructions using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). Total RNA was isolated from cultured cells 24 hr after transfection, and RT-PCR analysis was performed as described above.

Results

In this work, 49 Japanese cases affected by neuromuscular disease were selected based on the homogeneity of muscles presenting clinical signs (Table 3) and closely resembling FSHD according to the diagnostic criteria defined by the European Expert Group on FSHD [Padberg et al., 1991]. No patients presented with D4Z4 copy-number reduction [Yamanaka et al., 2004]. The age distribution of patients with available clinical information was 60.8% of patients under the age of 30 at the time of disease presentation. The facial, scapular, and humeral muscles were simultaneously affected in 45.8% of patients, and 89.6% of them had at least two out of the three muscle groups affected. Progression of the disease toward the lower limbs was present in 72.9% of patients, with most affected at the proximal limb muscles. Other myopathies presenting with similar phenotypic appearances but specific histological defects were ruled out in 47 out of 49 individuals by muscular biopsy examination. Specifically, muscle from the J21 case showed scattered fibers with rimmed vacuoles. Protein analyses showed normal expression of dystrophin, sarcoglycans, dystroglycans, merosin, collagen 6, dysferlin, caveolin-3, calpain 3, and emerin. A sequence analysis of the *GNE* gene was normal (data not shown). Moreover, J51 was diagnosed with Nemaline myopathy based on the muscular biopsy (data not shown), whereas no variants in the *ACTA1* gene were found [Wallefeld et al., 2006]. Finally, clinical data from other members of the patients' families were not available for any individual included in this study.

Among these patients, we found nucleotide substitutions in the *FAT1* gene with a potentially damaging effect on transcript processing in 10 cases (Table 1; Supp. Tables S1 and S4). In particular, three of the substitutions have not been previously reported (c.4723G>A; c.4959G>A and c.12051C>T). In all patients, the *FAT1* variants were present on one allele and distributed in different exons without a specific mutation hotspot. The transition type of nucleotide substitution was overrepresented and corresponded to nine out of 10 nucleotide substitutions. The age of onset was under the age of 30 for six out of 10 patients carrying *FAT1* nucleotide variants, and for two individuals, the age of symptom appearance was not available. The facial, scapular, and humeral muscles were simultaneously affected in three out of these 10 cases, and nine of them had at least two out of the three muscle groups affected. Progression of the disease toward the lower limbs was present in seven of the patients (details in Table 1).

Several publications have reported that D4Z4 hypomethylation, in the context of a DUX4-permissive haplotype associated with variants in the *SMCHD1* gene, may cause FSHD2 and contribute to FSHD1 [Lemmers et al., 2012; Sacconi et al., 2013; Lemmers et al., 2015] with moderate but significant differences in the methylation level between asymptomatic carriers and individuals with clinical FSHD [Gaillard et al., 2014; Lemmers et al., 2015]. To determine whether variation in the *FAT1* gene segregates with D4Z4 hypomethylation in our different cases, we used the sodium bisulfite sequencing method to measure the level of methylation of the 21

CpGs in the proximal D4Z4 region in eight out of the 10 patients carrying *FAT1* variants. The results, reported in Table 3, show that less than 50% of CpGs displaying D4Z4 hypomethylation associated with the appearance of the muscular defects clinically similar to FSHD.

Furthermore, we screened and excluded *SMCHD1* variants in all patients carrying nucleotide variants for *FAT1* (Table 2; Supp. Table S5); thus, eight out of 10 FSHD-like patients do not carry any of the genetic features and epigenetic marks usually observed in FSHD1 and *SMCHD1*-linked FSHD2 patients.

Interestingly, for some of the *FAT1* variants identified, the minor allele count in the East Asian and general population relative to the total allele number is available for 63,000 exomes by the Exome Aggregation Consortium (ExAC), Cambridge, MA (URL: <http://exac.broadinstitute.org>) [11/2014], as reported in Table 1. However, these variants are not reported as SNPs in any of the Japanese SNP databases that we could access (HAPMAP, KYUGEN JPK2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, and JSNP, <http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>). The main criteria for inclusion in our functional investigations accounted for a frequency of the minor allele in the general population lower than 0.002. The frequency of *FAT1* SNPs that we found in our group of patients compared with the Japanese and general Caucasian population is indicated in Supp. Table S3.

Six out of 10 nucleotide substitutions that we observed lead to amino acid substitutions in different extracellular cadherin domains of *FAT1*. For all of the substitutions, anomalies in splicing of the *FAT1* transcript have been predicted using Human Splicing Finder, HSF, and Alamut software (see methods for URLs), as detailed in Supp. Table S1 [Desmet et al., 2009]. The drastic loss of splicing regulator sites or the creation of new splicing sites stronger than the natural ones was predicted in seven cases. Five of the six amino acid substitutions were also predicted to have a deleterious impact on protein function by several algorithms (see *Methods* for URL references and Supp. Table S1 for detailed results).

To evaluate the splicing effect of selected *FAT1* variants, we performed a functional assay based on a comparative analysis of the splicing pattern of wild-type and mutant sequences in the pCAS2 minigene-expressing vector [Gaildrat et al., 2010]. Five variants were selected based on their suitability for the experimental conditions of the test and the strength of *in silico* splicing predictions. Fragments corresponding to the *FAT1* exons studied, surrounded by 150 bp of upstream and downstream intronic sequences, were amplified from genomic DNA of patients and subcloned into the pCAS2 vector. After transient transfection in HEK293 cells, the splicing patterns and efficiency of wild-type and mutant *FAT1* exon incorporation in the minigene were analyzed by RT-PCR and sequencing. As reported in Figure 1, we showed that four cases, c.3770G>A (pArg1257Gln), c.8963A>T (pLys2988Ile), c.8991G>A (pThr2997Thr), and c.10331A>G (pAsn3444Ser), result in partial or complete splicing defects. One defect may lead to nonsense-mediated decay for c.8963A>T, which implies a loss of frame of aberrant mRNA. In the other three cases, shorter half-lives of the aberrant mRNAs or deleterious forms of the translated *FAT1* protein may be produced. In contrast to *in silico* predictions, no splicing effect in HEK293 cells was depicted for the c.4723G>A (p.Ala1575Thr) amino acid substitution, (Supp. Fig. S1) but *in vivo* tissue-specific splicing effects cannot be excluded. Among the nucleotide substitutions with a splicing effect in the functional minigene assay, the c.3770G>A transition (identified in patient J16) induced complete skipping of exon 5 from the mutant transcript, as indicated in Figure 1a, suggesting an effect on splicing either by disrupting an exonic splicing enhancer (ESE) element and/or by creating an exonic

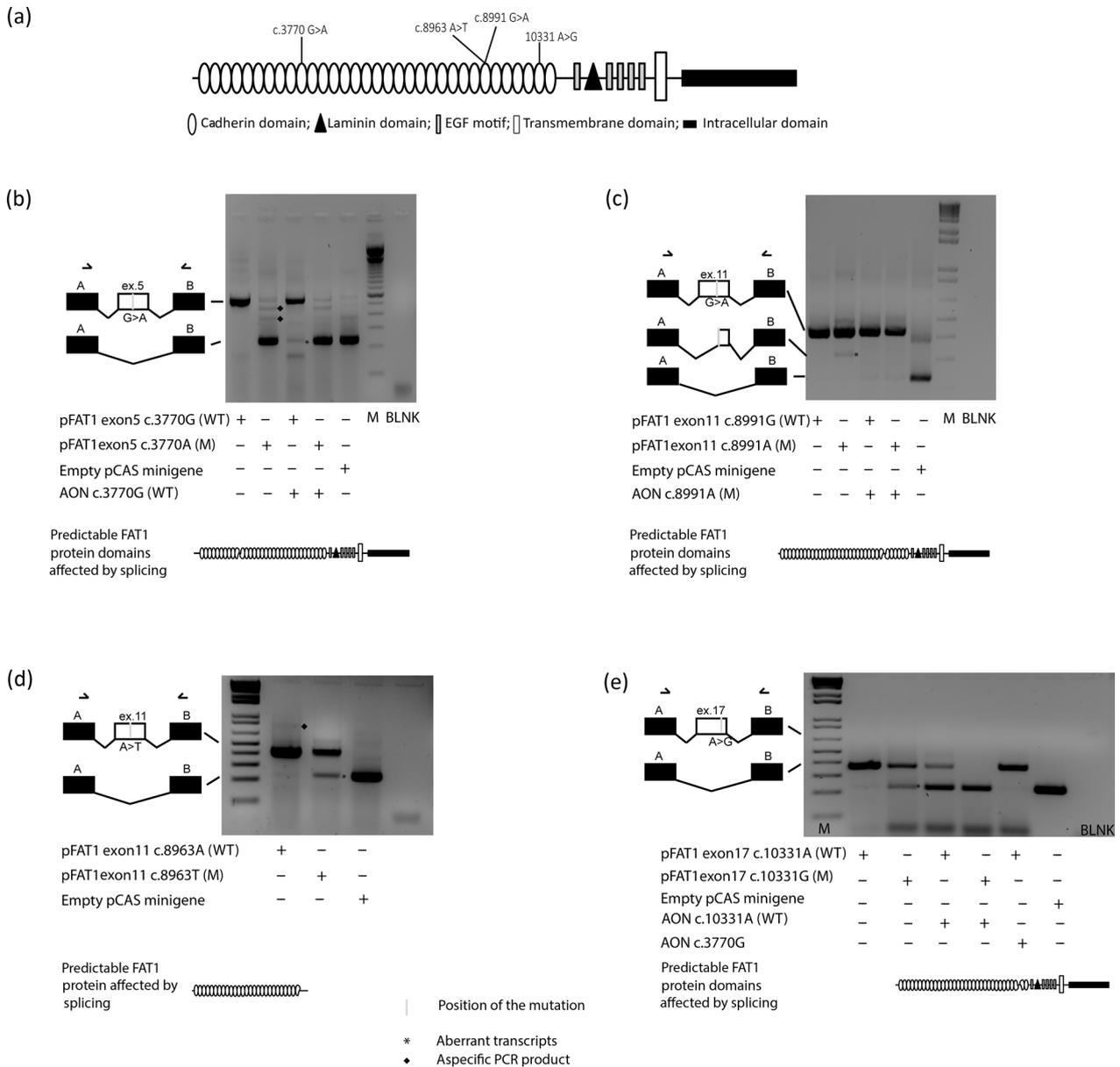


Figure 1. Abnormal splicing in *FAT1*-derived transcripts. **A:** Diagram representing *FAT1* protein domains with the positions of the four variants tested by the minigene splicing assay coupled with the AON assay. Briefly, wild-type and mutant pCAS2 minigene constructs containing different *FAT1* exons of interest were transfected into HEK293 cells alone or in combination with an AON specifically directed against the variant or wild-type allele. At 24 hr after transfection, the splicing patterns of the minigenes were monitored by RT-PCR. All variants are expressed as the cDNA sequence and refer to GenBank NM_005245.3. **B:** Transcripts amplified from constructs containing wild-type (pFAT1 Exon5 c.3770G) and variant (pFAT1 Exon5 c.3770A) alleles of *FAT1* exon 5 in the presence or absence of AON c.3770G and the empty pCAS2 minigene were separated on an agarose gel. The transcript amplified from the exon 5 variant construction containing exons from the pCAS2 minigene only is indicated by a star (*). The effect of cotransfection of AON c.3770G and the wild-type exon 5 construct is presented together with a representation of the predicted effect on the protein. **C:** Agarose gel electrophoresis of transcripts produced from minigene constructs containing no insert (empty pCAS2 minigene), wild-type *FAT1* exon 11 (pFAT1 Exon11 c.8991G), or mutant *FAT1* exon 11 (pFAT1 Exon11 c.8991A) alone or cotransfected with AON c.8991A (mut). A star (*) indicates the transcript specifically produced from the variant exon 11 minigene and corresponding to 114 nucleotides deleted from exon 11. AON c.8991A rescued the exon 11 variant allele, allowing expression of the complete wild-type form of the exon. The potential effect on the *FAT1* protein is also represented. **D:** Transcripts produced from constructs containing wild-type (pFAT1 Exon11 c.8963A) or variant (pFAT1 Exon11 c.8963T) *FAT1* exon 11 and from the empty pCAS2 minigene were analyzed by agarose gel electrophoresis. Star (*) indicates transcript amplified from exon 11 carrying nucleotide substitutions with complete skipping of it. Potential effect on the *FAT1* truncated protein is reproduced. **E:** Agarose gel electrophoresis of transcripts produced from constructs containing wild-type (pFAT1 Exon17 c.10331A) or variant (pFAT1 Exon17 c.10331G) *FAT1* exon 17 in the presence or absence of AONs (c.10331A, c.3770G) and the pCAS2 minigene. As indicated by a star (*), the transcript amplified from the exon 17 variant construct only contains exons from the pCAS2 minigene. The effect of cotransfection of AON c.10331A with the pFAT1 Exon17 c.10331G minigene is also presented together with the schema of the effect on the translated *FAT1* protein. AON c.3770G from exon 5 does not have a specific splicing effect on wild-type exon 17.

Table 3. Summary of Neuromuscular Clinical Signs Found in Patients Presented in This Study

AGE at onset	Individuals	%	Clinical details							
			Facial	Scapular	Humeral	Abdominal	Proximal (lower limbs)	Distal (lower limbs)	Axial	
Birth/first decade	11/46	23.9%	81.8%	90.9%	72.7%	27.3%		72.7%	63.6%	63.6%
Second/third decade	17/46	36.9%	58.8%	94%	88.2%	23.5%		76.5%	64.7%	47.1%
Third/fifth decade	10/46	21.7%	80%	90%	80%	20%		80%	70%	50%
Older	8/46	17.4%	50%	75%	75%	25%		50%	25%	37.5%
Total with age and diagnosis available	46									
Total with diagnosis available	48		66.7%	89.6%	77.1%	22.9%		70.8%	60.4%	54.2%
Facioscapulohumeral deficit				45.8%						
Two off three muscles				89.6%						
Progression to lower limbs								72.9%		

splicing silencer, as predicted by HSF and Alamut (Supp. Table S1). Interestingly, cotransfection with the AON carrying the wild-type sequence (c.3770G) induced a partial skipping of the exon, suggesting that this AON masks the predicted ESE element (Fig. 1a). The aberrant transcript missing exon 5 (RNA r.3643_3972del) produced by the variant allele would result, if translated, into an in-frame deletion of 110 amino acids at the protein level (p.Val1215_Ser1324del) with partial truncation of the cadherin 10 and 11 extracellular domains.

The second nucleotide substitution with an evident effect on splicing was the c.8963A>T transversion, located in exon 11 and identified in patient J29. The minigene assay showed the production of two transcripts: a primary one corresponding to normal exon inclusion and an aberrant minor transcript (5% expression ratio versus the full-length transcript), which skips exon 11 (Fig. 1c). These results suggest that this variant alters splicing by disrupting ESE motifs, in agreement with the prediction (Supp. Table S1). If translated, the misspliced RNA (RNA r.8879_9075del) would result in a frameshift with the creation of a premature stop codon (p.Gly2960Asp*9) between exons 10 and 12.

The third *FAT1* variant, a c.8991G>A transition, identified in patient J2, also induced an alteration in exon 11 splicing. Indeed, the results depicted in Figure 1b show that the exon 11 minigene construct carrying the variant produces two transcripts, a primary one corresponding to the normal inclusion of the full-length exon and a second minor transcript (average expression ratio of 8% vs. the full-length transcript) in which the first 114 exonic nucleotides are deleted (RNA r.8879_8992del). This effect is in agreement with the Alamut and HSF predictions suggesting the creation of an acceptor splice site at position c.8992/c.8993 with a score slightly higher than the natural one (Supp. Table S1). We designed an AON (c.8991A) carrying the variant nucleotide to mask the created splicing acceptor site. Cotransfection of AON c.8991A and the variant minigene rescued normal splicing (Fig. 1b) and eliminated the aberrant transcript. This RNA would be translated in an in-frame deletion (p.Gly2960_Thr2997del) that corresponds to a truncation of cadherin domain 27 in the *FAT1* protein.

Finally, the c.10331A>G transition, found in patient J51, induced a minor skipping of exon 17 (27% average expression ratio vs. the full-length transcript) in the splicing minigene assay (Fig. 1d), and produced a transcript with 144 exonic nucleotides removed (RNA r.10207_10351del). This result could be the consequence of the predicted loss of an ESE element (Supp. Table S1) located in exon 17, thus interfering with the inclusion of exon 17 in the altered transcript. Transfection of AON c.10331A (wild type) with the wild-type exon 17 construct led to partial skipping, whereas in the presence of exon 17 carrying the nucleotide substitution, it leads to complete skipping of the exon (Fig. 1d). Finally,

cotransfection of the AON specific for exon 5 (c.3770G) and a wild-type exon 17 construct did not interfere with exon 17 splicing. Thus, these results confirm that the wild-type AON specifically masks an element involved in exon inclusion. The main consequence of exon 17 skipping is likely the truncation of the cadherin 32 and 33 domains (p.Thr3403_Glu3451 del) without the loss of the downstream reading frame.

Other nucleotide substitutions were also predicted to interfere with splicing, but they could not be easily tested, as they were not suitable for the conditions required for the minigene assay. In particular, patient J21 carries two different substitutions: c.2215A>G (p.Met739Val) and c.13374G>A (p.Gln4458Gln). Testing these two variants using a minigene-based assay was not possible because of their location in *FAT1* exons 2 and 27, respectively. As present, the parents' DNA is required to determine whether one of the two substitutions is a de novo substitution or if both substitutions are carried on the same allele. Both substitutions are predicted to affect splicing with equal strength, and an analysis of their respective impact on *FAT1* transcription in the patient's biological samples, such as a muscle biopsy, would be interesting.

Discussion

In this study, we identified 10 different variants in the *FAT1* gene in 10 out of 49 Japanese patients affected by an FSHD-like neuromuscular disease. The diagnosis was based on criteria defined by the European Expert Group on FSHD [Padberg et al., 1991]; the patients presented no D4Z4 copy-number reduction in either 4q35 or 10q26 and no reciprocal rearrangements [Yamanaka et al., 2004]. To rule out myopathies presenting similar phenotypic appearance but specific histological defects, a muscular biopsy examination was performed in 47 out of 49 individuals. For J21, the muscle biopsy showed nonspecific scattered fibers with rimmed vacuoles, and the J51 diagnosis of Nemaline myopathy was based on histological examination of his muscle biopsy (data not shown). In both cases, neither mutations in known genes nor expression defects in myopathy-related proteins were observed. Thus, mutations in new genes responsible for the neuromuscular phenotype have not been ruled out. Interestingly, as the simultaneous presence of hypomethylation in D4Z4 regions in the context of a DUX4-permissive haplotype and variants in the *SMCHD1* gene may cause FSHD2 and contribute to FSHD1 [Lemmers et al., 2012; Sacconi et al., 2013; Larsen et al., 2014; Lemmers et al., 2015], we measured the D4Z4 methylation level according to the methods and results recently published by our group [Gaillard et al., 2014]. In that publication, a significant reduction in the DNA methylation level at the D4Z4 proximal region was reported for individuals with clinical FSHD but not carrying a

copy-number reduction (FSHD2) by sodium bisulfite sequencing, with a global level of methylated CpG/sequence below the threshold of 50% [Gaillard et al., 2014]. In the group of patients investigated here, the average methylation level in the proximal D4Z4 region was above 50% (72%), meaning that in these patients, FSHD symptoms are not associated with epigenetic changes at the 4q35 region (Table 2). Furthermore, no mutations in SMCHD1 were detected in any of the patients carrying nucleotide variants for FAT1 (Table 2). Even if the diagnosis of FSHD is based on the clinical evaluation of symptoms, genetic testing is required to confirm FSHD1 or FSHD2. However, a small proportion of patients with FSHD-like symptoms are not associated with D4Z4 copy-number reduction or with hypomethylated 4qA alleles and SMCHD1 variants, as reported here. In this situation, while the diagnosis may be questioned and reevaluated for some, it remains likely that the specific FSHD clinical signs might result from other genetic changes that affect processes also involved in FSHD. Identifying such genetic causes of FSHD-like cases would likely teach us about the biological mechanisms of this pathology. Thus, hypomorphic Fat1 mice presenting a FSHD-like phenotype [Caruso et al., 2013] and the identification of FAT1 variants in FSHD-like patients raise the challenging idea that FAT1 might be a disease gene associated with FSHD-like symptoms.

For some of the FAT1 variants depicted here, the minor allele count in the general and Japanese populations is reported, when available, in Table 1. Thus, we propose that these variants might represent very rare mutations that were possibly identified in presymptomatic individuals. Nonetheless, incomplete penetrance may not be excluded at this point. Consistently, a CNV located in a putative regulatory enhancer of *FAT1* has previously been shown to preferentially segregate with FSHD in noncontracted FSHD-like patients, hence constituting the basis of tissue-specific alterations in *FAT1* expression [Caruso et al., 2013].

The variants identified here fall into two categories that are not incompatible with each other. Six out of 10 variants led to amino acid substitutions localized in different extracellular cadherin domains of FAT1 and have been predicted to have a deleterious impact on protein function by several algorithms. Moreover, for all nucleotide substitutions, the drastic loss of splicing regulator sites or the creation of new splicing sites stronger than the natural ones have been suggested to give rise to partial or complete splicing defects. These defects would lead to shorter half-lives of aberrant mRNAs or the production of deleterious forms of the translated FAT1 protein. Thus, to demonstrate their pathogenic effect on *FAT1* transcript splicing, we elaborated a minigene approach coupled to an AON assay. Some of these variants showed potential splicing alterations as well as deleterious amino acid changes, suggesting that both possibilities can occur; for example, any abnormally spliced mRNA, if translated, could result in a functionally aberrant protein. Therefore, only further experimental validation will determine the true functional relevance of each process. The FAT1 protein can be considered a “model protein,” allowing us to correlate predictions to experimental findings. Moreover, the results shown here indicate that selected nucleotide substitutions have splicing effects in *in vitro* minigene assays. Interestingly, splicing defects might also depend on the chromosomal context or the presence of tissue-specific regulatory elements, which could only be analyzed in biological samples derived from patients. Nonetheless, our group recently showed that a minigene *in vitro* approach is reliable for confirming endogenous splicing defects [Kergourlay et al., 2014], supporting the idea that an actual damaging effect can be considered for variants showing an *in vitro* effect, even in the absence of *in vivo* confirmation.

In particular, the absence of an effect in c.4723G>A (p.Ala1575Thr) (Supp. Fig. S1) does not exclude the impact of this

variant on the endogenous transcript. This nucleotide substitution is strongly predicted to cause a deleterious amino acid substitution, as detailed in Supp. Table S1. To further validate the reliability of prediction algorithms at the experimental level, proteomic approaches as well as functional tests focusing on cadherin domain structure are in development. In the case of the c.3770G>A (p.Arg1257Gln), c.8991G>A (pThr2997Thr), and c.10331A>G (p.As3444Ser) transitions with a validated impact on splicing, aberrantly spliced mRNA isoforms may have more rapid turnover and shorter half-lives, thereby affecting intracellular FAT1 concentrations. The splicing effect is also compatible with an additional issue at the protein level because these aberrant transcripts, if translated, have been predicted to contribute to deleterious amino acid substitutions as well. For one of these variants (c.3770G>A), we showed that it completely prevents the *in vitro* inclusion of exon 5 in the transcript, thus producing an r.3643_3972del mRNA. If translated, the corresponding protein would lack the cadherin 10 and 11 extracellular domains without loss of the downstream reading frame. Nevertheless, the effect of this variant on splicing *in vivo* could be less drastic, allowing the partial integration of exon 5 carrying the variant nucleotide in the transcript. Thus, it would be interesting to investigate the importance of the arginine 1257 change to glutamine on FAT1 protein function as well as the potential dominant-negative effect due to the coexistence of multiple FAT1 protein-splicing isoforms in cells. Along the same line, c.10331A>G p.As3444Ser may contribute to two coexisting mRNA transcripts: the aberrant mRNA r.10207_10351del (p.Thr3403.Glu3451del) and the normal transcript, which may be translated into a FAT1 protein with a serine replacing the aspartic acid in position 3444. Even if these variants are compatible with FAT1 protein frame conservation, extracellular cadherin domains are expected to be lost and likely affect the stability and/or protein–protein interactions. Similar consequences may be predicted for c.8991G>A (pThr2997Thr) in which the aberrant mRNA r.8879_8992del, coexisting with the normal transcript, may be translated into a FAT1 protein truncated for cadherin domain 27. Interestingly, patient J29 carries a c.8963A>T transversion (p.Lys2988Ile) that is predicted to disrupt the ESE motifs Tra2 β and 9G8 and to create a new hnRNP A1 site, whereas amino acid substitution is not expected to have deleterious consequences on the protein. Here, we show the partial production of a variant transcript missing exon 11. The juxtaposition of exons 10 and 12 would create a frameshift in the *FAT1* transcript and a premature stop codon 23 nucleotides after the beginning of exon 12 (p.Gly2960Asp*9). This incomplete *FAT1* mRNA, if translated into a truncated FAT1 protein, may exert dominant-negative activity. Alternatively, the misspliced RNA (r.8879_9075del) may be eliminated by the nonsense-mediated mRNA decay pathway, causing haploinsufficiency reminiscent of the *fat1* mouse model [Caruso et al., 2013].

AONs recognize and block special sequences in the neotranslated RNA that are otherwise bound by splicing protein complexes [Wein et al., 2010]. Based on the targeted splicing sequence, AONs may lead to the partial or total skipping of flanking exons. In our case, the AONs were designed to precisely recognize either the substituted or wild-type alleles, allowing us to demonstrate the specific effect of *FAT1* alterations *in vitro*. Next, we will apply the AONs that mimic nucleotide substitutions to *FAT1*-expressing cells and animal models to characterize the functional consequences of these substitutions on the translated proteins. Moreover, for c.8991G>A, the second minor transcript in which the first 114 exonic nucleotides were deleted, as observed using the minigene test, was rescued by cotransfection of AON c.8991A, which carries the variant nucleotide to mask the created splicing acceptor site. Animal models reproducing this variant are under development to evaluate the

therapeutic consequences of AON injection and splicing rescue in vivo.

Some recent algorithms, which have been developed for functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data, suggest that *FAT1* is a dispensable human gene based on the number of stop codons identified in the study [Wang et al., 2010]. Interestingly, our study did not identify stop codons in any of the screened individuals or in healthy controls, whereas the constitutive loss of *FAT1* function leads to perinatal lethality [Ciani et al., 2003; Caruso et al., 2013]. Thus, in independent functional and genetic studies, the partial preservation of *FAT1* function would still be compatible with life. Accordingly, defective forms of the protein would have tissue-specific impacts and would be exerted at low doses by a dominant-negative effect. Hence, altered *FAT1* would play a pathogenic role by affecting only specific interactions with protein partners and only during specific stages of development. Nevertheless, consistent with mice carrying the tissue-specific knock-out of *FAT1* or its constitutive hypomorphic allele [Caruso et al., 2013], we cannot rule out haploinsufficiency as the pathogenic mechanism, at least for some of the variants reported here.

In addition to our present results, other germline mutations in the *FAT1* gene may lead to developmental defects in subtle pathologies, such as schizophrenia and bipolar disorder susceptibility [Ockey et al., 1967; Blair et al., 2006; Bendavid et al., 2007; Abou Jamra et al., 2008; Kitsiou-Tzeli et al., 2008; Jung and Jun 2013]. Similarly, somatic mutations contribute to Wnt/ β -catenin pathway misregulation and cancer progression in specific tissues by both overexpression and inactivation of *FAT1* protein function [de Bock et al., 2012; Lee et al., 2012; Morris et al., 2013a, 2013b]. Thus, aberrant *FAT1* expression or incomplete or complete loss of function cause defects in tissues unrelated to FSHD, indicating that *FAT1* has pleiotropic implications that may lead to a range of clinical consequences, with only a subset of those sharing similarities with FSHD. Thus, we propose the existence of a heterogeneous pathological entity, named FATopathy.

In perspective, adding *FAT1* to the panel of neuromuscular disease-causing genes routinely tested for molecular diagnosis will be needed both to investigate the broader significance of *FAT1* in disease pathogenesis and to better define the implication of multiple genetic interactions in neuromuscular disease appearance.

Conclusion

According to the evidence from the mouse model recently published and the identification of the CNV located in a transcriptional enhancer of the human *FAT1* gene, which segregates in noncontracted FSHD-like patients, our genetic data further strengthen the link between the *FAT1* gene and FSHD-like neuromuscular diseases.

Acknowledgments

The authors would like to thank all patients for their participation. We thank Christophe Pécheux, Mohamed Mesrati, and Cécile Mouradian for technical assistance. All the samples explored in this study were prepared by the Center of Biological Resources, Department of Medical Genetics, la Timone, France. We thank Vincent Meyer, Emmanuelle Salort-Campana, and Pr Jean Pouget for medical and scientific discussion. Jacques Beckmann and Isabella Ceccherini are warmly acknowledged for their assistance in reading the manuscript and their critical comments and suggestions. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Abou Jamra R, Becker T, Georgi A, Feulner T, Schumacher J, Stromaier J, Schirmbeck F, Schulze TG, Propping P, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S. 2008. Genetic variation of the *FAT* gene at 4q35 is associated with bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 13:277–284.
- Balatsouras DG, Korres S, Manta P, Panoussopoulou A, Vassilopoulos D. 2007. Cochlear function in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Otol Neurotol* 28:7–10.
- Bendavid C, Pasquier L, Watrin T, Morcel K, Lucas J, Gicquel I, Dubourg C, Henry C, David V, Odent S, Levéque J, Pellerin I, et al. 2007. Phenotypic variability of a 4q34→qter inherited deletion: MRKH syndrome in the daughter, cardiac defect and Fallopian tube cancer in the mother. *Eur J Med Genet* 50:66–72.
- Bennett FC, Harvey KF. 2006. Fat cadherin modulates organ size in *Drosophila* via the Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Curr Biol CB* 16:2101–2110.
- Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6–21.
- Blair IP, Chetcuti AF, Badenhop RF, Scimone A, Moses MJ, Adams LJ, Craddock N, Green E, Kirov G, Owen MJ, Kwok JBJ, Donald JA, et al. 2006. Positional cloning, association analysis and expression studies provide convergent evidence that the cadherin gene *FAT* contains a bipolar disorder susceptibility allele. *Mol Psychiatry* 11:372–383.
- Blewitt ME, Gendrel A-V, Pang Z, Sparrow DB, Whitelaw N, Craig JM, Apedaile A, Hilton DJ, Dunwoodie SL, Brockdorff N, Kay GF, Whitelaw E. 2008. *SmcHD1*, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. *Nat Genet* 40:663–669.
- de Bock CE, Ardjmand A, Molloy TJ, Bone SM, Johnstone D, Campbell DM, Shipman KL, Yeadon TM, Holst J, Spanevello MD, Nelmes G, Catchpoole DR, et al. 2012. The *Fat1* cadherin is overexpressed and an independent prognostic factor for survival in paired diagnosis-relapse samples of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26:918–926.
- Broucqsault N, Morere J, Gaillard M-C, Dumonceaux J, Torrents J, Salort-Campana E, Maues De Paula A, Bartoli M, Fernandez C, Chesnais AL, Ferrebouef M, Sarda L, et al. 2013. Dysregulation of 4q35- and muscle-specific genes in fetuses with a short D4Z4 array linked to facio-scapulo-humeral dystrophy. *Hum Mol Genet* 22:4206–4214.
- Caruso N, Herberth B, Bartoli M, Puppo F, Dumonceaux J, Zimmermann A, Denadai S, Lebossé M, Roche S, Geng L, Magdini F, Attarian S, et al. 2013. Deregulation of the protocadherin gene *FAT1* alters muscle shapes: implications for the pathogenesis of facioscapulohumeral dystrophy. *PLoS Genet* 9:e1003550.
- Cho E, Feng Y, Rauskolb C, Maitra S, Fehon R, Irvine KD. 2006. Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat Genet* 38:1142–1150.
- Ciani L, Patel A, Allen ND, French-Constant C. 2003. Mice lacking the giant protocadherin *mFAT1* exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol* 23:3575–3582.
- Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Colod-Béroud G, Claustres M, Béroud C. 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37:e67.
- van Deutekom JC, Wijmenga C, van Tienhoven EA, Gruter AM, Hewitt JE, Padberg GW, van Ommen GJ, Hofker MH, Frants RR. 1993. FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. *Hum Mol Genet* 2:2037–2042.
- Dixit M, Anseau E, Tassin A, Winokur S, Shi R, Qian H, Sauvage S, Mattéotti C, van Acker AM, Leo O, Figlewicz D, Barro M, et al. 2007. *DUX4*, a candidate gene of facioscapulohumeral muscular dystrophy, encodes a transcriptional activator of *PITX1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:18157–18162.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. 1982. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10:2709–2721.
- Gabriëls J, Beckers MC, Ding H, De Vriese A, Plaisance S, van der Maarel SM, Padberg GW, Frants RR, Hewitt JE, Collen D, Belayew A. 1999. Nucleotide sequence of the partially deleted D4Z4 locus in a patient with FSHD identifies a putative gene within each 3.3 kb element. *Gene* 236:25–32.
- Gaildrat P, Killian A, Martins A, Tournier I, Frébourg T, Tosi M. 2010. Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 653:249–257.
- Gaillard M-C, Roche S, Dion C, Tasmadjian A, Bouget G, Salort-Campana E, Vovan C, Chaix C, Broucqsault N, Morere J, Puppo F, Bartoli M, et al. 2014. Differential DNA methylation of the D4Z4 repeat in patients with FSHD and asymptomatic carriers. *Neurology* 83:733–742.
- Gendrel A-V, Apedaile A, Coker H, Termanis A, Zvetkova I, Godwin J, Tang YA, Huntley D, Montana G, Taylor S, Giannoulatou E, Heard E, et al. 2012. *SmcHD1*-dependent and -independent pathways determine developmental dynamics of CpG island methylation on the inactive X chromosome. *Dev Cell* 23:265–279.
- Hou R, Sibinga NES. 2009. Atrophin proteins interact with the *Fat1* cadherin and regulate migration and orientation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 284:6955–6965.

- Jones TI, Chen JCJ, Rahimov F, Homma S, Arashiro P, Beermann ML, King OD, Miller JB, Kunkel LM, Emerson CP, Wagner KR, Jones PL. 2012. Facioscapulohumeral muscular dystrophy family studies of DUX4 expression: evidence for disease modifiers and a quantitative model of pathogenesis. *Hum Mol Genet* 21:4419–4430.
- Jung Y-E, Jun T-Y. 2013. Association between FAT gene and schizophrenia in the Korean population. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 11:67–71.
- Justin Besancon L, Pequignot H, Contamin F, Delavierre P, Rolland P. 1964. [Myopathy of the landouzy-d'ejérine type. Report of a historical case]. *Sem Hôp* 40:2990–2999.
- Kergourlay V, Raï G, Blandin G, Salgado D, Bérout C, Lévy N, Krahn M, Bartoli M. 2014. Identification of splicing defects caused by mutations in the dysferlin gene. *Hum Mutat* 35:1532–41.
- Kitsiou-Tzeli S, Sismani C, Koumbaris G, Ioannides M, Kanavakis E, Kolialexi A, Mavrou A, Touliaoutou V, Patsalis PC. 2008. Distal del(4) (q33) syndrome: detailed clinical presentation and molecular description with array-CGH. *Eur J Med Genet* 51:61–67.
- Larsen M, Rost S, El Hajj N, Ferbert A, Deschauer M, Walter MC, Schoser B, Tacik P, Kress W, Müller CR. 2014. Diagnostic approach for FSHD revisited: SMCHD1 mutations cause FSHD2 and act as modifiers of disease severity in FSHD1. *Eur J Hum Genet*. doi:10.1038/ejhg.2014.191 [Epub ahead of print]
- Lee S, Stewart S, Nagtegaal I, Luo J, Wu Y, Colditz G, Medina D, Allred DC. 2012. Differentially expressed genes regulating the progression of ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer Res* 72:4574–4586.
- Lemmers RJLF, Goeman JJ, van der Vliet PJ, van Nieuwenhuizen MP, Balog J, Vos-Versteeg M, Camano P, Ramos Arroyo MA, Jerico I, Rogers MT, Miller DG, Upadhyaya M, et al. 2015. Inter-individual differences in CpG methylation at D4Z4 correlate with clinical variability in FSHD1 and FSHD2. *Hum Mol Genet* 24:659–669.
- Lemmers RJLF, de Kievit P, Sandkuijl L, Padberg GW, van Ommen G-JB, Frants RR, van der Maarel SM. 2002. Facioscapulohumeral muscular dystrophy is uniquely associated with one of the two variants of the 4q subtelomere. *Nat Genet* 32:235–236.
- Lemmers RJLF, Tawil R, Petek LM, Balog J, Block GJ, Santen GWE, Amell AM, van der Vliet PJ, Almomani R, Straasheijm KR, Krom YD, Klooster R, et al. 2012. Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nat Genet* 44:1370–1374.
- Lemmers RJLF, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camaño P, Dauwerse JG, Snider L, Straasheijm KR, van Ommen GJ, Padberg GW, Miller DG, Tapscott SJ, et al. 2010. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science* 329:1650–1653.
- Lemmers RJLF, Wohlgemuth M, van der Gaag KJ, van der Vliet PJ, van Teijlingen CMM, de Knijff P, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. 2007. Specific sequence variations within the 4q35 region are associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 81:884–894.
- Moeller MJ, Soofi A, Braun GS, Li X, Watzl C, Kriz W, Holzman LB. 2004. Protocadherin FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. *EMBO J* 23:3769–3779.
- Morris LGT, Kaufman AM, Gong Y, Ramaswami D, Walsh LA, Turcan S, Eng S, Kannan K, Zou Y, Peng L, Banuchi VE, Paty P, et al. 2013a. Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. *Nat Genet* 45:253–261.
- Morris LGT, Ramaswami D, Chan TA. 2013b. The FAT epidemic: a gene family frequently mutated across multiple human cancer types. *Cell Cycle* 12:1011–1012.
- Ockey CH, Feldman GV, Macaulay ME, Delaney MJ. 1967. A large deletion of the long arm of chromosome no. 4 in a child with limb abnormalities. *Arch Dis Child* 42:428–434.
- van Overveld PGM, Lemmers RJLF, Sandkuijl LA, Enthoven L, Winokur ST, Bakels F, Padberg GW, van Ommen G-JB, Frants RR, van der Maarel SM. 2003. Hypomethylation of D4Z4 in 4q-linked and non-4q-linked facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat Genet* 35:315–317.
- van Overveld PG, Lemmers RJ, Deidda G, Sandkuijl L, Padberg GW, Frants RR, van der Maarel SM. 2000. Interchromosomal repeat array interactions between chromosomes 4 and 10: a model for subtelomeric plasticity. *Hum Mol Genet* 9:2879–2884.
- Padberg GW, Lunt PW, Koch M, Fardeau M. 1991. Diagnostic criteria for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1:231–234.
- Richards M, Coppée F, Thomas N, Belayew A, Upadhyaya M. 2012. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled? *Hum Genet* 131:325–340.
- Sacconi S, Lemmers RJLF, Balog J, van der Vliet PJ, Lahaut P, van Nieuwenhuizen MP, Straasheijm KR, Debipersad RD, Vos-Versteeg M, Salviati L, Casarin A, Pegoraro E, et al. 2013. The FSHD2 gene SMCHD1 is a modifier of disease severity in families affected by FSHD1. *Am J Hum Genet* 93:744–751.
- Saito Y, Miyashita S, Yokoyama A, Komaki H, Seki A, Maegaki Y, Ohno K. 2007. Facioscapulohumeral muscular dystrophy with severe mental retardation and epilepsy. *Brain Dev* 29:231–233.
- Scionti I, Fabbri G, Fiorillo C, Ricci G, Greco F, D'Amico R, Teramanini A, Vercelli L, Tomelleri G, Cao M, Santoro L, Percesepe A, et al. 2012a. Facioscapulohumeral muscular dystrophy: new insights from compound heterozygotes and implication for prenatal genetic counselling. *J Med Genet* 49:171–178.
- Scionti I, Greco F, Ricci G, Govi M, Arashiro P, Vercelli L, Berardinelli A, Angelini C, Antonini G, Cao M, Di Muzio A, Moggio M, et al. 2012b. Large-scale population analysis challenges the current criteria for the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 90:628–635.
- Skouloudaki K, Puetz M, Simons M, Courbard J-R, Boehlke C, Hartleben B, Engel C, Moeller MJ, Englert C, Bollig F, Schäfer T, Ramachandran H, et al. 2009. Scribble participates in Hippo signaling and is required for normal zebrafish pronephros development. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8579–8584.
- Spurlock G, Jim H-P, Upadhyaya M. 2010. Confirmation that the specific SSLP microsatellite allele 4qA161 segregates with facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) in a cohort of multiplex and simplex FSHD families. *Muscle Nerve* 42:820–821.
- Vanderplanck C, Anseau E, Charron S, Stricwant N, Tassin A, Laoudj-Chenivresse D, Wilton SD, Coppée F, Belayew A. 2011. The FSHD atrophic myotube phenotype is caused by DUX4 expression. *PLoS One* 6:e26820.
- Wallefeld W, Krause S, Nowak KJ, Dye D, Horváth R, Molnár Z, Szabó M, Hashimoto K, Reina C, De Carlos J, Rosell J, Cabello A, et al. 2006. Severe nemaline myopathy caused by mutations of the stop codon of the skeletal muscle alpha actin gene (ACTA1). *Neuromuscul Disord* 16:541–547.
- Wang K, Li M, Hakonarson H. 2010. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38:e164.
- Wein N, Avril A, Bartoli M, Beley C, Chaouch S, Laforêt P, Behin A, Butler-Browne G, Mouly V, Krahn M, Garcia L, Lévy N. 2010. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum Mutat* 31:136–142.
- Wijmenga C, Frants RR, Brouwer OF, Moerer P, Weber JL, Padberg GW. 1990. Location of facioscapulohumeral muscular dystrophy gene on chromosome 4. *Lancet* 336:651–653.
- Wohlgemuth M, van der Kooi EL, van Kesteren RG, van der Maarel SM, Padberg GW. 2004. Ventilatory support in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 63:176–178.
- Yamanaka G, Goto K, Ishihara T, Oya Y, Miyajima T, Hoshika A, Nishino I, Hayashi YK. 2004. FSHD-like patients without 4q35 deletion. *J Neurol Sci* 219:89–93.

II. Amélioration du diagnostic dans la LGMD2A : Etude de l'impact de mutations faux-sens sur l'épissage de CAPN3

Comme pour l'étude précédemment décrite, j'ai voulu analyser l'impact sur l'épissage de mutations retrouvées dans le gène *CAPN3*. Cependant, bien que l'outil utilisé pour les différents tests soit le même, dans ce cas le contexte d'étude de la maladie a été différent. En effet, les calpainopathies sont des pathologies autosomiques récessives bien connues, pour lesquelles le gène responsable est identifié depuis vingt ans. Malgré tout, il demeure environ 25% de patients pour qui, l'une ou les deux mutations n'ont pas encore été identifiées. De plus lorsque des mutations sont identifiées leur caractère pathogène n'est pas toujours évident et rarement vérifié.

C'est donc dans un but d'amélioration diagnostic que j'ai décidé de tester l'impact des mutations sur l'épissage de *CAPN3*. En effet, je souhaite démontrer qu'il ne faut pas sous-estimer les modifications d'épissage car elles peuvent être responsables, chez une bonne partie de la population malade, de la synthèse d'ARNs instables ou tronqués, conduisant à des défauts de synthèse et de fonctionnement protéique voire même à son absence totale. Les mutations faux-sens sont particulièrement intéressantes à étudier dans ce contexte car elles peuvent à la fois jouer sur la séquence aminée des protéines, impactant alors leur fonction, mais également en amont, sur la maturation des ARNs. Ce dernier point est trop souvent négligé alors qu'il suffirait parfois de l'étudier pour éviter de mettre en place des recherches difficiles et coûteuses portant sur la structure de la protéine. En effet, cette dernière peut être tronquée ou absente à cause d'une dérégulation survenue au moment de l'épissage de l'ARNm qui la code.

1. Contexte de la recherche, choix des mutations à tester

Pour établir la liste des mutations faux-sens à tester, je me suis rendue sur la base de données « Leiden Open Variation Database » (http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php?select_db=CAPN3) où sont répertoriées de nombreux variants de *CAPN3*. Mon choix a été orienté selon plusieurs critères :

- Sélectionner une mutation par exon en dehors du premier et du dernier exon (soit vingt-deux mutations) ;
- Choisir des variants pour lesquels aucune donnée ARN n'a encore été rapportée ;
- Quand plusieurs mutations faux-sens ont été rapportées pour un même exon, choisir celle ayant les prédictions d'aberrations les plus fortes d'après « HSF » (*Human Splicing Factor*), un logiciel de prédiction bioinformatique dont l'algorithme estime la pathogénicité des mutations d'épissage (<http://www.umd.be/HSF3/>).

Par exemple, quand j'étais face à un choix entre une mutation favorisant l'apparition d'un site cryptique donneur ou accepteur d'épissage et une autre prédisant uniquement un impact sur un site stimulateur ou inhibiteur d'épissage (respectivement *ESE* et *ISE*), j'ai choisi la première au détriment de la seconde. En effet, les séquences consensus des sites donneurs et accepteurs ainsi que les mécanismes mis en place par le spliceosome pour choisir préférentiellement un site cryptique plutôt que le site endogène, sont aujourd'hui beaucoup mieux compris que ceux impliqués dans la détermination et la reconnaissance des sites *ESE* ou *ISE*. Ce manque de connaissances se répercute sur les algorithmes de prédiction qui sont de ce fait moins fiables à ce niveau.

Une fois le premier criblage effectué, j'ai également vérifié si les variants étaient répertoriés, et à quelle fréquence, dans la base de données « ExAC » (*Exome Aggregation Consortium*) (<http://exac.broadinstitute.org/>).

Ainsi, après cette seconde sélection, j'ai obtenu une liste de dix-sept mutations faux-sens à tester avec la technique de minigène, toutes situées dans des exons différents. En effet, pour cinq des vingt-deux exons de *CAPN3* que je souhaitais tester, aucune mutation faux-sens n'a pu être retenue. Les principales raisons à cela sont :

- L'absence de mutation faux-sens répertoriée dans la base de données LOVD : du fait de la petite taille des exons, (souvent <40pb), ces derniers sont moins souvent le siège de mutation,
- L'absence de prédiction de modification d'épissage par HSF, pour les variants répertoriés.

Additionné à ces dix-sept faux-sens, j'ai choisi de tester trois autres mutations connues pour avoir un effet sur l'ARN que j'utiliserai comme contrôles de mon système de minigène rapporteur « pCAS2 ».

2. Résultats

Les cellules musculaires humaines étant délicates à maintenir en culture et difficiles à transfecter, j'ai choisi de tester les constructions de pCAS2 dans deux types de lignées cellulaires différentes. La première est composée de cellules humaines non musculaires, la lignée HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) et la seconde de cellules musculaires murines de type C2C12. En effectuant des tests identiques dans deux populations cellulaires différentes, j'ai voulu voir si les mécanismes d'épissage mis en jeu étaient les mêmes en condition humaine non musculaire et en condition musculaire non humaine. Quarante-huit heures après transfection, j'ai comparé les transcrits produits à partir du minigène par RT-PCR et séquençage Sanger (figures 59 et 60).

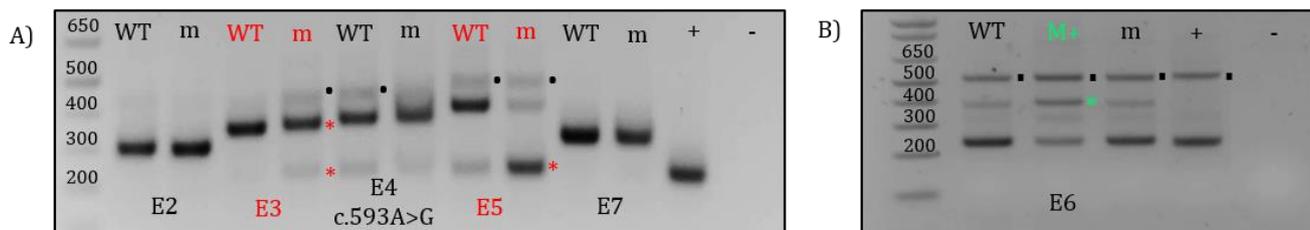


Figure 59 : Analyses transcriptionnelles des mutations sélectionnées dans les exons 2 à 7 de CAPN3

A) : Les mutations *c.352A>G* (exon 2), *c.593A>G* (exon 4) et *c.1002C>G* (exon 7) sont sans effet sur l'épissage. Les transcrits obtenus par RT-PCR sont les mêmes, que ce soit dans le cas de la transfection du plasmide porteur de la séquence sauvage ou de celui contenant la mutation.

Les mutations *c.352A>G* (exon 3) et *c.743T>G* (exon 5) impactent l'épissage. Dans le cas de l'exon 3, la mutation entraîne la synthèse de deux transcrits aberrants : la bande la plus haute correspond à la séquence de l'exon 3 additionné des 5 derniers nucléotides de l'intron 2, entouré des exons A et B portés par le minigène. La bande la plus basse indique quant à elle le saut de l'exon 3.

Dans le cas de l'exon 5, la mutation entraîne la synthèse d'une majorité de transcrits délétés de l'exon 5.

B) : La mutation *c.848T>C* (exon 6) ne modifie pas l'épissage. Les mêmes transcrits sont obtenus en quantité équivalente pour le plasmide sauvage et celui porteur de la mutation *c.848T>C* annoté « m ».

L'effet sur l'épissage de la mutation contrôle *c.802-9G>A* (intron 5), observé chez des patients est retrouvé avec le test minigène. La bande la plus haute retrouvée dans le puit annoté M+, correspond à la séquence de l'exon 6 additionné des 7 derniers nucléotides de l'intron 5, entouré des exons A et B portés par le minigène.

NB : WT : transcrits obtenus après transfection du pCAS2 sauvage ; M+ : transcrit obtenu après transfection du pCAS2 porteur d'une mutation contrôle ; m : transcrits obtenus après transfection du pCAS2 porteur d'une mutation à tester. Les astérisques rouges et verts indiquent les transcrits aberrants. Les points noirs désignent les bandes aspécifiques. Les puits notés « + » correspondent aux transcrits obtenus après transfection du vecteur vide ; les puits « - » indiquent les contrôles négatifs de RT-PCR.

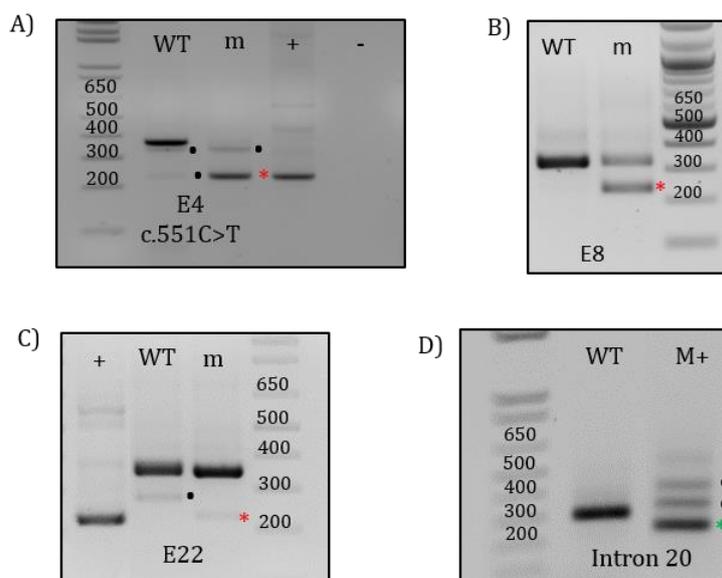


Figure 60 : Analyses transcriptionnelles des mutations sélectionnées dans les exons 4, 8 et 22 ainsi que dans l'intron 20 de CAPN3

A) : La mutation *c.551C>T* (exon 4) entraîne le saut total de l'exon. Plus aucun transcrit ayant intégré l'exon 4 n'est détecté.

B) : La mutation *c.1063C>G* (exon 8) impacte l'épissage. La mise en évidence de la bande la plus basse indique qu'une partie des transcrits produits sont délétés de l'exon 8.

C) : Comme pour la mutation testée dans l'exon 8, la mutation *c.2306G>A* (exon 22) entraîne le saut partiel de l'exon. La mise en évidence de la bande la plus basse indique qu'une faible quantité de transcrits produits est délétée de l'exon 22.

D) : L'effet sur l'épissage observé chez les patients porteurs de la mutation contrôle *c.2185-16A>G* (intron 20) est retrouvé. Aucun transcrit incluant l'exon 21 n'est retrouvé. On observe uniquement la bande indiquant le saut d'exon.

NB : WT : transcrits obtenus après transfection du pCAS2 sauvage ; M+ : transcrit obtenu après transfection du pCAS2 porteur d'une mutation contrôle ; m : transcrits obtenus après transfection du pCAS2 porteur d'une mutation à tester. Les astérisques rouges et verts indiquent les transcrits aberrants. Les points noirs désignent les bandes aspécifiques. Les puits notés « + » correspondent aux transcrits obtenus après transfection du vecteur vide ; le puit « - » indique le contrôle négatif de RT-PCR.

Les résultats obtenus pour chaque mutation sont détaillés dans le tableau 1. Deux mutations ont finalement été testées pour l'exon 4.

Exon n°	Taille exon	Mutation	Tests dans HEK293	Tests dans C2C12
2	70	c.352A>G	Sans impact	
3	119	c.498G>A	IMPACT : en présence de la mutation, 2 transcrits produits 1 transcrit avec <u>saut d'exon</u> : perte de la phase + 1 transcrit avec ajout des 5 derniers nt de l'intron 2 à l'exon 3 : perte de la phase	
4	134	c.551C>T	IMPACT : en présence de la mutation, 1 transcrit majoritaire avec <u>saut d'exon</u> : perte de la phase	Test en cours
		c.593A>G	Sans impact	
5	169	c.743T>G	IMPACT : en présence de la mutation, 2 transcrits produits 1 transcrit avec <u>saut d'exon</u> fortement exprimé : perte de la phase + 1 transcrit normal faiblement exprimé (ExA-ex5-exB)	
Intron 5	CONTROLE : c.802-9G>A		Impact confirmé : ajout des 7 derniers nt de l'intron 5 à l'exon 6 : perte de la phase	
6	144	c.848T>C	Profil identique à celui obtenu pour l'exon sauvage : semble sans impact	
7	84	c.1002C>G	Sans impact	
8	86	c.1063C>G	IMPACT : en présence de la mutation, 2 transcrits produits 1 transcrit avec <u>saut d'exon</u> : perte de la phase + 1 transcrit normal (ExA-ex8-exB)	
10	161	c.1333G>A	Sans impact	
11	170	c.1466G>A	Sans impact	IMPACT : 1 transcrit avec <u>saut d'exon</u> : perte de la phase
13	209	c.1622G>A	Sans impact	IMPACT : <u>Saut d'exon</u> 13 : perte de la phase + 1 transcrit avec E13 délété des 87 derniers nt : respect la phase
16	114	CONTROLE : c.1872C>T	Impact confirmé : délétion des 44 derniers nt de l'exon 16 : perte de la phase	
16		c.1913A>C	Profil identique à celui obtenu pour l'exon sauvage : semble sans impact	IMPACT : en présence de la mutation, 1 transcrit unique : <u>saut d'exon</u> : perte de la phase
17	78	c.1979A>G	Test en cours	Sans impact
19	65	c.2114A>G	Que ce soit dans la construction sauvage ou la muté, le site donneur endogène de l'exon 19 n'est pas reconnu par le spliceosome. La mutation ne crée pas de site donneur cryptique	
Intron 20	CONTROLE : c.2185-16A>G		Les vecteurs pCAS2 contiennent la séquence « exon 20 - intron 20 - exon 21 » : Problème pour l'exon 20 : toutes les constructions sont délétees de l'exon 20 impact confirmé pour la mutation contrôle : ajout des 16 derniers nt de l'intron 20 à l'exon 21 : perte de la phase	
20 et 21	148	c.2184G>A et c.2243G>A	La mutation dans l'exon 21 n'a pas d'impact sur l'épissage	
22	117	c.2306G>A	IMPACT : en présence de la mutation, 2 transcrits produits 1 transcrit avec <u>saut d'exon</u> : respect de la phase + 1 transcrit normal (ExA-ex22-exB)	
23	59	c.2390A>C	Sans impact	

Tableau 1: Résultats des tests d'épissage réalisés sur 21 mutations retrouvées dans CAPN3

Chaque mutation faux-sens a été choisie en fonction de l'exon dans lequel elle est retrouvée et de sa prédiction de pathogénicité par l'outil bioinformatique HSF. La première mutation sélectionnée et testée dans l'exon 4 (c.593A>G) étant sans effet, j'ai choisi d'en tester une autre, la c.551C>T.

Parmi les dix-huit mutations sélectionnées, huit ont un impact sur l'épissage alors que huit autres ne le modifient pas. On ne peut en revanche rien conclure quant à l'effet des mutations retrouvées dans les exons 19, 20 et 21, du fait des mauvaises constructions de plasmide pCAS2.

Les tests effectués en pCAS2 sur les trois mutations contrôles, deux introniques et une faux-sens, confirment l'altération d'épissage qui a déjà été décrite précédemment.

Les expériences ont montré que l'on retrouvait l'effet sur l'épissage des trois mutations contrôles testées. Parmi les dix-huit mutations faux-sens, huit ont un impact sur l'épissage du gène et huit autres ne le modifie pas. Les tests effectués sur l'exon 20 n'ont pas fonctionné et le cas de l'exon 19 est décrit plus loin.

Dans tous les cas en dehors du cas particulier de l'exon 16, cela va conduire à la synthèse d'un transcrit aberrant qui ne permettra pas de traduire une protéine fonctionnelle. L'exon 16 étant un exon alternatif, on pourrait penser que la synthèse d'un transcrit CAPN3 ne l'intégrant pas serait sans conséquence. Cependant, il semblerait qu'il ne soit retrouvé épissé que pendant le développement embryonnaire. De plus, le fait qu'il comporte un site de liaison à la titine permet de penser qu'il joue un rôle indispensable dans le muscle mature.

Pour certaines mutations, l'erreur de transcription peut provoquer une rupture de la phase de lecture et conduire à l'apparition d'un stop prématuré suite à :

- La création d'un site cryptique accepteur d'épissage, comme c'est le cas pour la mutation **c.498G>A** située dans l'exon 3 et induisant l'ajout des cinq derniers nucléotides de l'intron 2 dans l'exon 3 ou pour les deux mutations contrôles **c.802-9G>A** (intron 5) et **c.2185-16A>G** (intron 20) provoquant respectivement l'ajout des sept derniers nucléotides de l'intron 5 à l'exon 6 et celui des seize derniers nucléotides de l'intron 20 à l'exon 21,
- La création d'un site cryptique donneur d'épissage, comme c'est le cas pour la mutation contrôle **c.1872C>T** située dans l'exon 16 provoquant la délétion des quarante-quatre dernières bases de l'exon,
- La rupture d'un site régulateur d'épissage de type ESE qui entraîne le saut d'un exon qui n'est pas en phase comme c'est le cas pour les mutations **c.551C>T** (exon 4), **c.743T>G** (exon 5), **c.1063C>G** (exon 8) et **c.1466G>A** (exon 11).

Dans d'autres cas, la mutation peut induire la création de sites cryptique ou la rupture d'ESE sans provoquer le décalage du cadre de lecture. C'est ce qu'on observe pour les mutations **c.1913A>C** (exon 16) et **c.2306G>A** (exon 22) qui cassent des ESE et entraînent un saut d'exon en phase, ou pour la mutation **c.1622G>A** (exon 13) qui crée un site cryptique donneur d'épissage, conduisant à la délétion des quatre-vingt-sept derniers nucléotides de l'exon 13 sans changer le cadre de lecture. Cependant, bien que la phase de lecture soit conservée, l'ARNm obtenu à la fin de l'étape de transcription ne permettra pas la traduction d'une protéine fonctionnelle que ce soit dans le cas de l'exon 13 ou du 22. Comme je l'ai rappelé plus haut, le saut de l'exon 16 induira quant à lui la synthèse d'un transcrit délété du site de fixation à la titine, qui n'a jamais été caractérisé dans des cellules musculaires matures.

En ce qui concerne l'exon 19, que ce soit en testant la construction de pCAS2 sauvage ou la mutée, nous n'avons pas réussi à obtenir de transcrit l'ayant correctement intégré. Pour chaque expérience, nous avons constaté l'utilisation du site accepteur endogène par le spliceosome mais jamais celui du site donneur (figure 61). La force de ce dernier étant extrêmement faible (64,38), il n'a pas été reconnu par notre système artificiel de test d'épissage.



Figure 61 : Transfection des constructions pCAS2 comprenant les exons 19 sauvage et muté
 Les amplicons obtenus ont été séquencés et correspondent à l'exon A + l'exon 19 et l'intégralité de la séquence intronique avale sélectionnée pour le clonage + l'exon B.

A la différence d'autres protéines comme la dystrophine ou la dysferline, l'expression de la calpaïne 3 n'est pas modulable, elle n'est pas constituée de domaines répétés. Tous ses domaines sont indispensables à son bon fonctionnement et toute suppression d'une partie de sa séquence aura pour conséquence de la rendre non fonctionnelle. La synthèse du transcrit délété de l'exon alternatif 6 n'est retrouvée qu'à l'état embryonnaire car, si l'on se réfère aux travaux effectués par Spenser et collègues, son expression dans des cellules musculaires adultes s'avère aussi pathogène que l'absence de la protéine (Spencer et al., 2002).

De manière intéressante, j'ai constaté que certaines mutations n'avaient pas le même effet sur l'épissage en fonction du type cellulaire dans lequel je les testais. C'est le cas pour les mutations retrouvées dans les exons 11, 13 et 16.

- Pour l'exon 11 : le test effectué dans les C2C12 montre que la mutation diminue l'efficacité du site régulateur d'épissage ESE dans lequel elle se situe, et provoque un saut d'exon. Cependant, lorsque celui-ci est réalisé dans des HEK293 aucun fragment délété de l'exon 11 n'est amplifié par RT-PCR, indiquant que la mutation ne modifie pas l'épissage (figure 62).

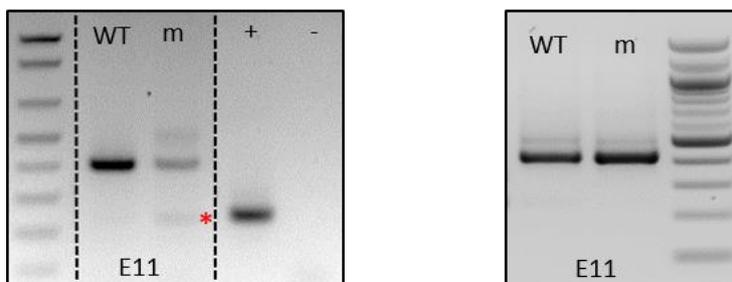


Figure 62 : Transfection des constructions pCAS2 comprenant les exons 11 sauvage et muté
 A gauche transfection dans un modèle cellulaire C2C12 ; à droite dans un modèle HEK293.
 L'astérisque rouge indique le transcrit obtenu après saut d'exon. Le puit noté « + » correspond au transcrit obtenu après transfection du vecteur vide ; le puit « - » indique le contrôle négatif de RT-PCR.

- Pour l'exon 13 : dans les cellules C2C12, le résultat du test minigène nous indique qu'en plus de la bande correspondant au transcrit sauvage incluant l'exon 13, on trouve deux transcrits anormaux.

La bande la plus basse correspond au saut de l'exon. Comme pour la mutation de l'exon 11, il semble que celle-ci diminue l'efficacité d'un site ESE, ce qui va parfois empêcher la reconnaissance de l'exon par le spliceosome. Cet exon n'étant pas en phase (il fait 209pb), son absence provoque un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un stop prématuré.

La bande de taille intermédiaire montre quant à elle une intégration partielle de l'exon 13 dans le messenger, on le retrouve délété des quatre-vingt-sept derniers nucléotides (figure 63).

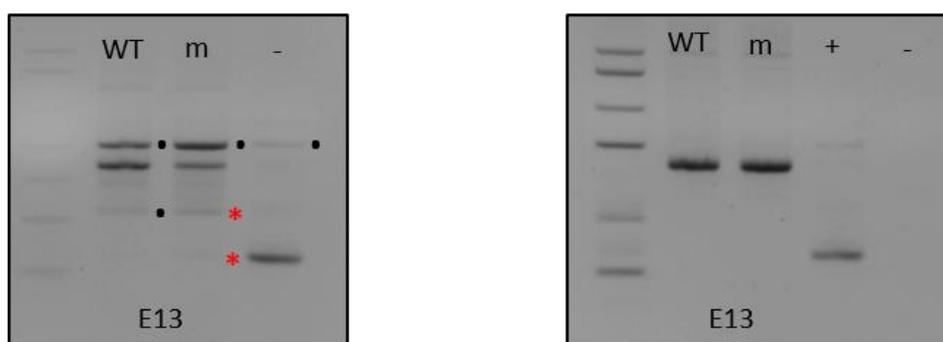


Figure 63 : Transfection des constructions pCAS2 comprenant les exons 13 sauvage et muté

A gauche, transfection dans un modèle cellulaire C2C12, à droite transfection dans un modèle HEK293.

Les points noirs indiquent les amplicons aspécifiques ; l'astérisque rouge le transcrit obtenu après saut d'exon. Le puit noté « + » correspond au transcrit obtenu après transfection du vecteur vide ; le puit « - » indique le contrôle négatif de RT-PCR.

Ce résultat indique qu'en plus d'avoir cassé un ESE, la mutation a augmenté la force d'un site cryptique donneur d'épissage situé trente-six paires de bases après la mutation. La bande retrouvée au même niveau dans la construction sauvage a été séquencée et correspond à un amplicon aspécifique. De nouveaux tests sont en cours pour confirmer ces observations.

Ces deux bandes supplémentaires ne sont pas visibles lorsque la transfection est effectuée dans les cellules HEK.

- Pour l'exon 16 : dans les cellules C2C12, le résultat du test minigène diffère entre les exons sauvage et muté : La mutation c.1913A>C semble être responsable d'un saut d'exon constant, il n'y a plus de trace du transcrite incluant l'exon 16. Dans les HEK, le profil de séparation des amplicons par électrophorèse semble être le même pour le sauvage et le muté. Dans ces conditions, la bande correspondant à l'inclusion de l'exon 16 est aussi absente chez le sauvage (figure 64).

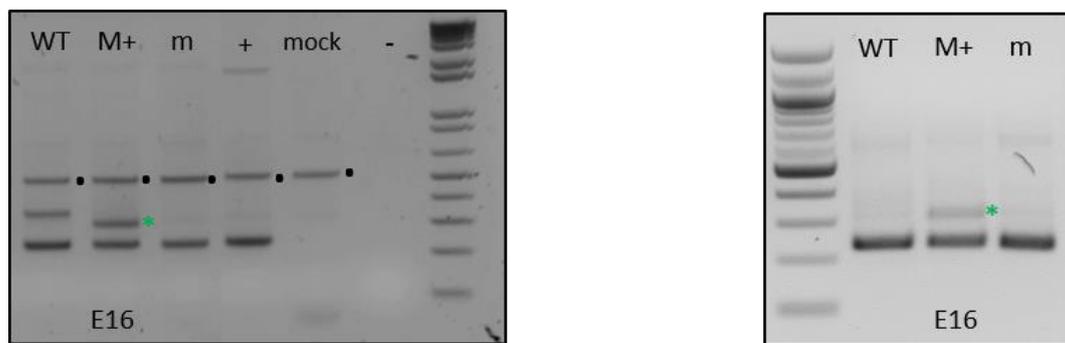


Figure 64 : Transfection des constructions pCAS2 comprenant les exons 16 sauvage et mutés

A gauche, transfection dans un modèle cellulaire C2C12, à droite transfection dans un modèle HEK293.

M+ : mutation contrôle c.1872C>T ; m : mutation à tester c.1913A>C. Les points noirs indiquent les amplicons aspécifiques ; l'astérisque vert indique le transcrite aberrant attendu, retrouvé chez les patients. Le puit noté « + » correspond au transcrite obtenu après transfection du vecteur vide ; le puit « mock » correspond au contrôle cellulaire non transfecté, le puit « - » indique le contrôle négatif de RT-PCR.

3. Discussion

L'ensemble des observations faites suite aux tests réalisés sur les différentes mutations faux-sens prouve que la moitié d'entre elles ont un effet sur l'épissage. Ainsi, je pense qu'il faut désormais prendre en compte ce paramètre de manière systématique lorsque l'on recherche les mutations pathogènes pour améliorer le diagnostic des calpainopathies et d'autres pathologies. En effet, le système étant assez facile et rapide à mettre en œuvre, il pourrait être généralisé sans problème pour l'étude d'autres mutations dans d'autres maladies. Nous avons tout de même pu constater sa limite lors de nos tests effectués sur l'exon 19. Malgré une force de site donneur endogène extrêmement faible, cet exon est constamment intégré à tous les transcrits produits en conditions physiologiques normales. Dans notre système rapporteur d'épissage artificiel, nous n'avons pas apporté les éléments qui permettent sa reconnaissance par le spliceosome.

Mes différentes analyses ont prouvé que le type cellulaire dans lequel elles sont réalisées peut modifier les résultats obtenus. Les facteurs de transcription différant d'un type cellulaire à l'autre, cela peut expliquer les variations observées. Il est donc important, pour obtenir un résultat concordant avec ce qui se produit en condition physiologique, d'effectuer les tests minigène dans un modèle cellulaire le plus proche possible de celui dans lequel la protéine s'exprime naturellement.

Je constate cependant que lorsque le mécanisme d'épissage est modifié par effet de la mutation dans les cellules HEK, il est toujours retrouvé dans les C2C12. Il est donc préférable de conserver un type cellulaire identique, d'origine non humaine, plutôt que des cellules humaines provenant d'un tissu différent.

La suite de mes travaux sur ce projet consiste à rechercher la présence de ces transcrits aberrants chez des patients pour lesquels nous disposons de biopsies musculaires. En effet, il suffira alors d'effectuer une extraction d'ARN total à partir des tissus musculaires et de réaliser des RT-PCR ciblant les exons flanquant ceux porteurs des mutations d'intérêt. Je souhaiterai également mettre en place le même type de tests sur une sélection de variants isosémantiques afin de déterminer s'ils sont responsables de modifications d'épissage ou s'ils peuvent être considérés comme de simples polymorphismes. Comme pour les faux-sens, il faudra par la suite vérifier les résultats obtenus en minigène sur des ARNs de patients extraits à partir de biopsies musculaires. Dans les deux cas, disposer de tissus musculaires provenant des patients pourrait également permettre de réaliser des études à plus grande échelle, par la mise en place de techniques de RNAseq.

Le même genre d'étude a déjà été menée sur des gènes tels que *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2* ou encore *DYSF* dans notre équipe. Dans chacune, les auteurs montrent que de nombreuses mutations faux-sens et synonymes jouent sur l'épissage. Il est donc fort probable que d'autres gènes responsables d'autres maladies génétiques soient le siège de modifications d'épissage similaires. Pour cette raison, nous aimerions développer en routine le système pCAS2, afin d'étudier de manière systématique l'impact des mutations sur l'ARN et ainsi améliorer considérablement le diagnostic de nombreuses maladies.

III. Mutations dans le gène STIM1, quelles conséquences sur la protéine ?

1. Contexte de la recherche

En 2014, en collaboration avec une équipe de l'IGBMC de Strasbourg, mon équipe a montré que des mutations dans le gène STIM1 étaient responsables de cas de myopathies à agrégats tubulaires. L'étude a porté sur 3 familles de Strasbourg sévèrement atteintes et une famille marseillaise asymptomatique (Boehm et al., 2014). Cette dernière famille a été incluse dans l'étude suite à la découverte fortuite, lors d'un contrôle médical, d'un taux de créatine kinase très élevé chez le père et deux de ses fils. Ce constat a incité les médecins à réaliser des biopsies musculaires sur les patients. Les prélèvements ont révélé un phénotype musculaire caractéristique de myopathies à agrégats tubulaires identique à celui observé chez les malades alsaciens. En histogénèse, les agrégats tubulaires se caractérisent par une accumulation de réticulum proliférant et par la présence d'inclusions de taille variable, sous-sarcolemmiques et intermyofibrillaires. De nombreuses protéines intervenant dans la recapture, le stockage et le relargage du calcium sont retrouvées emprisonnées dans ces agrégats et d'autres n'ont pas encore été identifiées (Chevessier et al., 2005).

Par la suite, un séquençage d'exome a été réalisé sur l'ensemble des patients de ces quatre familles. L'analyse des résultats a permis de caractériser quatre mutations dominantes distinctes dans le gène STIM1, chacune ségrégeant entre les différents membres atteints des familles.

Toutes les mutations sont situées dans la partie intraluminaire de STIM1, au niveau des domaines *EFhand*, domaines connus pour fixer le calcium (figure 65).

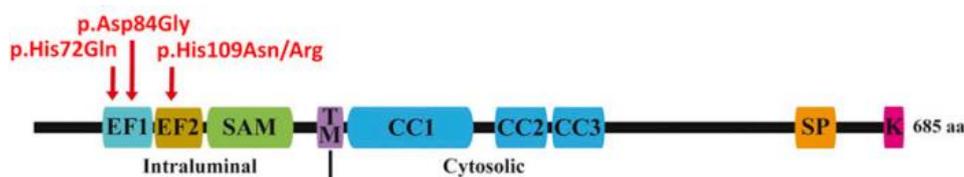


Figure 65 : Représentation schématique de la protéine STIM1 et des différentes mutations étudiées

EF1, EF2 : EF-hand 1 et 2 ; SAM : Steril α -Motif ; TM : Transmembrane Domain ; CC : coiled-coil domain ; SP : serine- and proline-rich domain ; K : polylysine

Boehm et al., 2014

Afin de comprendre pourquoi les individus de la famille marseillaise ne développaient aucun symptôme myopathique alors que ceux des autres familles étaient sévèrement touchés, nous avons choisi d'étudier la capacité des différentes protéines, mutantes et sauvages, à se dimériser et à fixer le calcium.

2. Résultats

2.1. Production des plasmides

L'ensemble des mutations à tester étant localisées dans le domaine intraluminal de STIM1, j'ai produit la séquence codante sauvage de cette région par RT-PCR, et l'ai ensuite clonée dans deux types de vecteurs d'expression bactériens. A partir de ces vecteurs et par mutagénèse dirigée, j'ai créé quatre autres versions plasmidiques, chacune porteuse d'une mutation d'intérêt.

Les plasmides utilisés permettent de produire les protéines d'intérêt associées à une étiquette d'affinité (ou *tag*) auto-clivable qui sera utile lors de leur purification. Ce *tag* se situe à l'extrémité N ou C-terminale de la protéine, en fonction du plasmide choisi, et est constitué de deux protéines distinctes : une intéine et un domaine de liaison à la chitine (ou CBD pour *Chitin Binding Domain*). Il sera utilisé lors de la phase de purification par chromatographie d'affinité et sera finalement éliminé grâce à la propriété auto-clivante de l'intéine (figure 66).

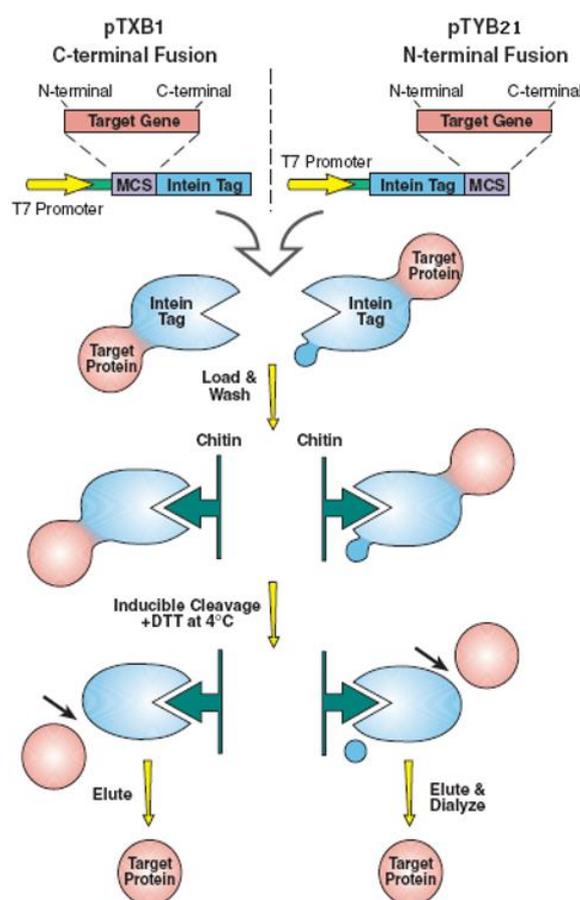


Figure 66 : Production et purification du domaine intraluminal de STIM1

La séquence codante du domaine intraluminal de STIM1 est insérée dans les vecteurs PTXB1 et pTYB21 et la protéine est synthétisée dans des bactéries. Elle est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de chitine puis éluee par séparation de son tag intein-CBD, après induction de l'auto-clivage de ce dernier.

<https://www.neb.com/products/e6901-impact-kit>

Le domaine intraluminal de STIM1 comprend, entre les acides aminés 1 et 22 un domaine de signalisation nucléaire (NLS) putatif que j'ai choisi de ne pas intégrer dans mes constructions. Le domaine transmembranaire ne commence quant à lui qu'à partir de l'acide aminé numéro 214. L'idéal aurait donc été de synthétiser une séquence allant de l'acide aminé 23 à 213. Pour des raisons techniques, j'ai choisi une séquence légèrement plus courte.

Pour le plasmide pTXB1 produisant la protéine tagguée en C-ter (figure 66), j'ai amplifié la séquence codante de STIM1 entre les nucléotides c.79 et c.636 afin que soient traduits les acides aminés 27 à 212. Pour le plasmide pTYB21 la séquence choisie se situait entre les nucléotides c.67 et c.621 suivi d'un triplet codant un codon stop, pour obtenir un peptide taggué du côté N-terminal (figure 66) et comprenant les acides aminés 23 à 207.

La présence du CBD sur la protéine pouvant empêcher son bon repliement tridimensionnel, j'ai fait le choix de réaliser mes constructions dans ces deux types de plasmides pour augmenter mes chances d'obtenir des protéines dont la conformation 3D se rapproche un maximum de la naturelle.

2.2. Production bactérienne et purification des constructions protéiques

Une fois tous les plasmides construits, j'ai commencé par produire mes protéines à partir du vecteur pTXB1 (CBD localisée en C-ter). La première étape a consisté à étudier leur expression dans les bactéries. Un taux de production suffisamment satisfaisant a été atteint, pour chacune, à 37°C, 3 heures après induction à l'IPTG.

Pour les cinq constructions, on retrouve une forme majeure à 50kDa, taille à laquelle nos protéines sont attendues, mais également une forme mineure autour de 95kDa qui pourrait résulter de leur dimérisation (figure 67).

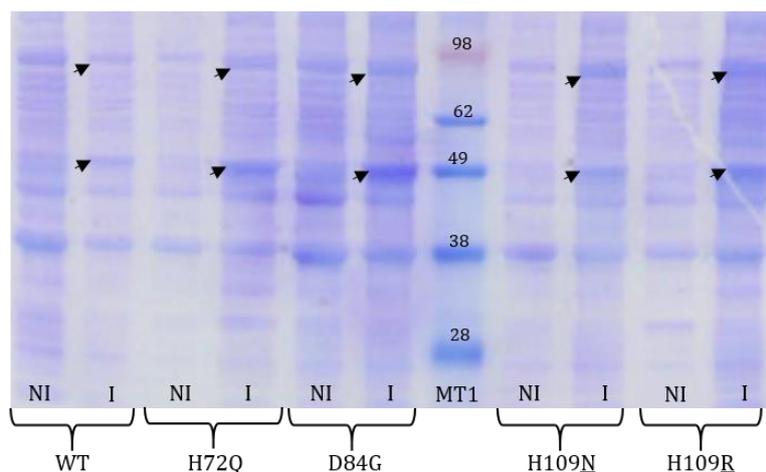


Figure 67 : Expression bactérienne des différentes constructions protéiques

Toutes les protéines sont retrouvées exprimées dans les bactéries induites à l'IPTG. Dans tous les cas, deux formes protéiques distinctes sont présentes : l'une de 50kDa et l'autre d'environ 95kDa.

Les protéines des extraits bactériens totaux ont été séparées par SDS-PAGE 12% puis colorées au bleu de coomassie.

NI : bactéries Non induite à l'IPTG ; I : bactéries Induite à l'IPTG ; MT1 : Marqueur de Taille 1

J'ai ensuite vérifié qu'elles étaient solubles dans les bactéries : on retrouve une partie des protéines produites incluses dans le culot, refermant le matériel insoluble (corps d'inclusion) et les membranes et une autre partie dans la fraction soluble (figure 68).

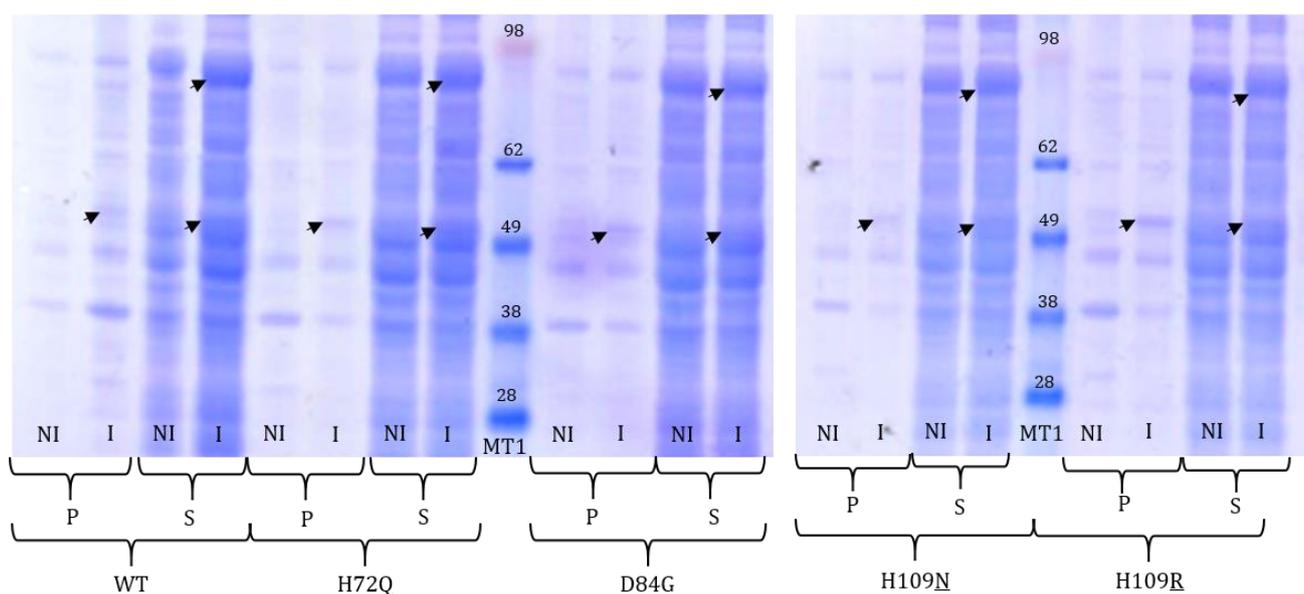


Figure 68 : Une partie des protéines exprimées est retrouvée dans la fraction soluble des extraits bactériens
 Les protéines de 95kDa sont retrouvées dans la fraction soluble des bactéries induites à l'IPTG alors que celles de 50kDa sont aussi bien retrouvées dans les culots que dans les fractions solubles.

Les culots et fractions solubles issus des extraits bactériens ont été séparés par SDS-PAGE 12% puis colorés au bleu de coomassie.
 NI : bactéries Non induite à l'IPTG ; I : bactéries Induite à l'IPTG ; P : culot (pellet) ; S : fraction soluble ; MT1 : Marqueur de Taille 1

Afin de m'assurer que les bandes observées par coloration de coomassie se rapportent bien à mes protéines d'intérêt, j'ai effectué un Western blot (WB) avec un anticorps dirigé contre leur tag CBD. Ainsi, j'ai obtenu la confirmation que les bandes observées correspondent bien à ma construction STIM1 (figure 69).

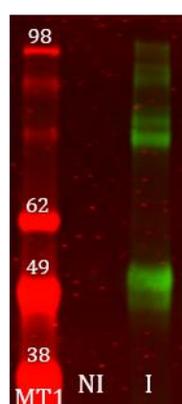


Figure 69 : Western blot dirigé contre le tag CBD des constructions STIM1
 NI : bactéries Non induite à l'IPTG ; I : bactéries Induite à l'IPTG ; MT1 : Marqueur de Taille 1.

Une fois cette étape achevée, j'ai produit toutes les constructions STIM1 en grande quantité et les ai purifiées par chromatographie d'affinité. De cette façon, seules les protéines porteuses du *tag* CBD sont restées fixées sur la colonne de chitine. Elles ont finalement été éluées après induction de l'auto-clivage de l'intéine.

Pour vérifier la qualité de la purification, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) 12% puis colorées au bleu de coomassie (figure 70).

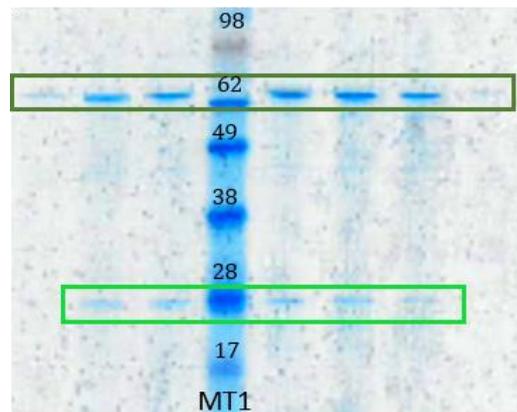


Figure 70 : Contrôle de purification de STIM1 WT

Les protéines sont éluées de la colonne en plusieurs fractions, séparées par SDS-PAGE 12% et colorées au bleu de coomassie. Deux bandes distinctes sont mises en évidence : une à 28kDa et une plus intense à 62kDa.

Comme pour les gels précédents, on retrouve deux bandes distinctes après purification : une, un peu plus basse que le marqueur de 28kDa et l'autre plus intense, située plus haut au niveau du marqueur de 62kDa. La bande la plus petite pourrait correspondre à la construction STIM1 (21kDa attendue). De même, la bande supérieure pourrait correspondre au dimère de protéines puisqu'elle est retrouvée à une taille à peu près égale au double du monomère.

Afin de confirmer cette hypothèse, j'ai effectué un WB avec un anticorps dirigé contre la séquence N-terminale de STIM1 : Seule la bande à 28kDa a été reconnue par l'anticorps (figure 71).

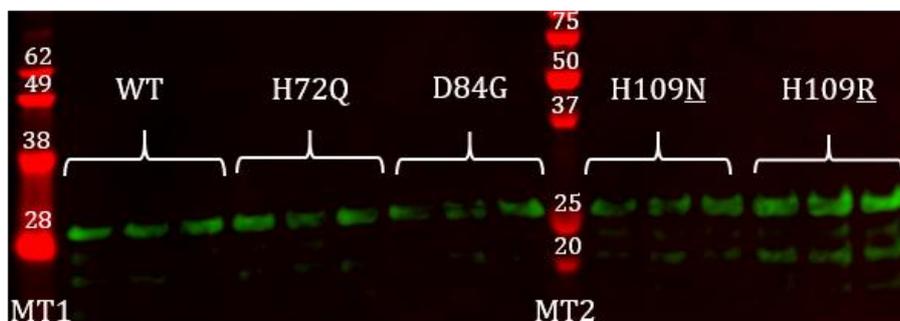


Figure 71 : Identification des constructions STIM1 par Western blot

La fixation de l'anticorps sur la protéine observée à 28kDa confirme qu'il s'agit bien des constructions STIM1.

L'absence de marquage de la bande la plus haute peut-être due au masquage du site de fixation de l'anticorps lors de la formation du complexe dimérique de STIM1.

Une fois les protéines purifiées, je les ai dialysées et concentrées dans le tampon qui sera utilisé pour les futures manipulations de titration calorimétrique isotherme (ITC pour *Isothermal Titration Calorimetry*).

2.3. Analyses par ITC de la fixation du calcium et de la capacité des protéines STIM1 à se dimériser

Comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit, la protéine STIM1 change de conformation en fonction du taux de calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Quand la fibre musculaire est au repos, la concentration calcique intraluminaire est de l'ordre du millimolaire et des ions calcium sont fixés sur les monomères de STIM1. Lorsque la contraction survient, elle provoque une déplétion calcique dans le réticulum ce qui va avoir pour conséquence de décrocher les ions fixés sur les molécules de STIM1 et induire leur oligomérisation.

C'est dans le but de mesurer les interactions existantes entre le calcium et les constructions de STIM1 ainsi que leur capacité à se dimériser entre elles que les tests d'ITC ont été effectués. La titration calorimétrique isotherme consiste à déterminer la capacité de liaisons entre biomolécules. Les mesures sont calculées en fonction des changements de température provoqués par la formation de ces liaisons. Le calcium est injecté progressivement dans la cellule contenant la construction de STIM1 étudiée, et le système détecte l'absorption ou la libération de chaleur qui survient si des liaisons se forment ou se rompent en présence de calcium. Les différences de températures mesurées permettent de calculer les variations d'enthalpie induites par le système et informent sur les affinités de liaisons existantes entre le ligand et son récepteur ou sur la dimérisation de la protéine. Dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe de François Devred, ces expériences ont été réalisées dans son laboratoire par Philipp Tsvetkov et Andrei Roman de la faculté de Pharmacie de Marseille.

Contrairement à ce qui a pu être décrit dans la littérature (Stathopoulos et al., 2006), l'expérience que nous avons réalisée sur les constructions de STIM1 sauvage et mutée « H72Q », n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque interaction, que ce soit entre protéines, ou entre STIM1 et le calcium (figure 72).

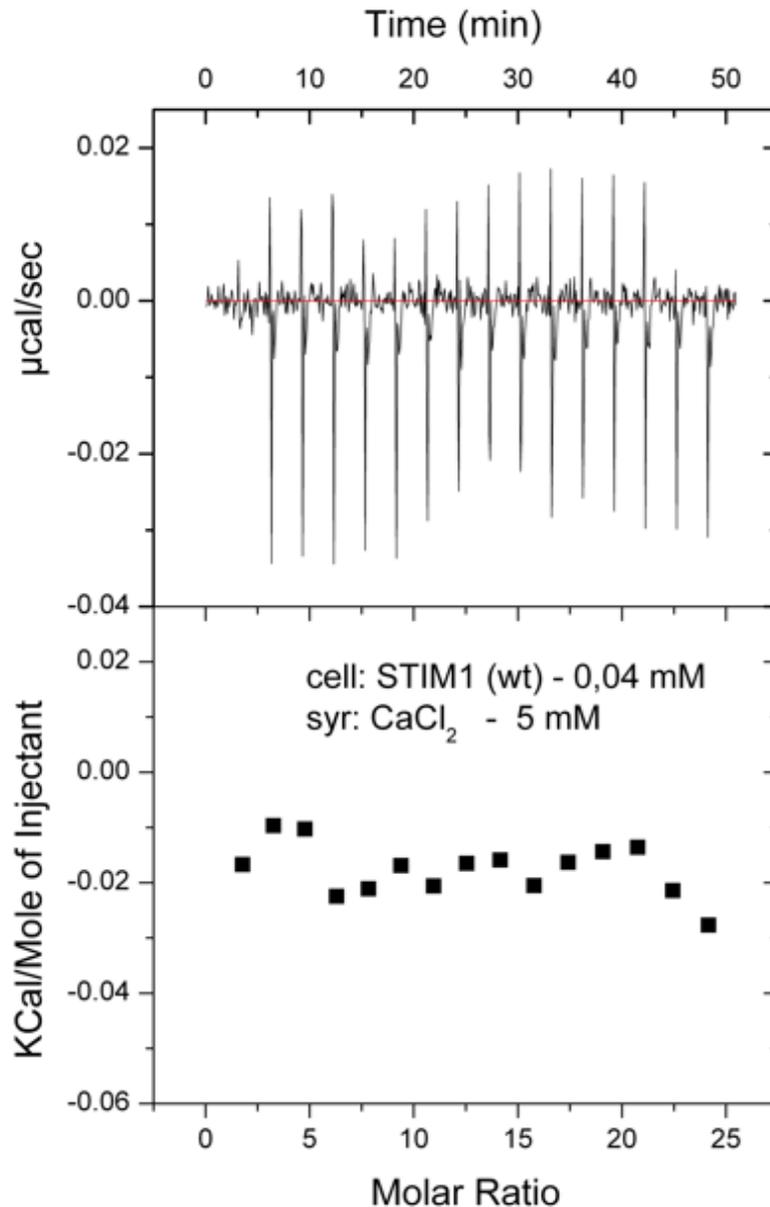


Figure 72 : Quantification par ITC de l'oligomérisation de STIM1 WT et de sa capacité à fixer le calcium

Une solution de chlorure de calcium concentrée à 5mM est injectée dans un milieu contenant la protéine STIM1 WT concentrée à 40 μM .

Aucune interaction entre protéines ni fixation de calcium n'est observée.

3. Discussion

Les travaux que j'ai menés sur STIM1 avaient pour but d'améliorer notre compréhension sur les mécanismes mis en jeu au niveau de son domaine intraluminal. Ainsi, je souhaitais comprendre pourquoi certaines mutations présentes dans les domaines EF-hand de STIM1 étaient responsables d'un phénotype pathologique sévère alors que d'autres n'induisaient aucun symptôme.

Les premiers résultats que j'ai obtenus suite aux expériences d'ITC n'ont pas permis de mettre en évidence la capacité d'oligomérisation de STIM1 ni celle de fixation du calcium via ses domaines EF-hand, que ce soit pour les constructions sauvages ou mutées. En effet, aucune modification d'enthalpie n'a été mesurée au cours des différentes manipulations. Pour autant, on ne peut pas conclure qu'il n'y a pas de liaison calcique ou de dimérisation moléculaires : le phénomène peut se produire mais de manière trop isolée pour être détecté. Il est également possible qu'une contrainte stérique empêche le calcium de reconnaître son site de fixation ou que ce dernier soit déjà occupé par d'autres ions.

Les recherches menées sur le sujet par l'équipe de Stathopoulos et collègues, en utilisant des systèmes d'analyses différents de l'ITC, avaient permis de mettre en évidence ces deux interactions. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences de résultats.

Tout d'abord, les auteurs canadiens ont fait le choix de synthétiser une partie plus réduite du domaine intraluminal de STIM1, leur séquence comportant trente et un acides aminés de moins du côté N-terminal et onze de moins en C-ter. Ainsi, ils ont réduit leur étude aux bornes des deux domaines EF-hands et à celles du domaine SAM, s'affranchissant de ce fait, des éventuelles contraintes stériques apportées par les autres acides aminés de la séquence intraluminaire. Cela peut être à l'origine d'un repliement protéique différent de celui mis en place dans mes constructions et dans la cellule. Lorsque, pour des raisons de faisabilité de l'étude, on choisit de produire ce genre de constructions chimériques, il faut constamment garder à l'esprit que les conditions d'études sont très loin de ressembler à celles existant *in vivo*. Ainsi, c'est pour essayer de me rapprocher au maximum de ce qui survient dans la cellule que j'ai choisi de produire la plus grande partie du domaine intraluminal. De cette manière, j'espère favoriser la mise en place de la conformation naturelle de la protéine, malgré l'absence du domaine transmembranaire.

Ensuite, une autre différence majeure qui pourrait expliquer des résultats discordants, porte sur la présence d'un *tag* histidine localisé du côté N-terminal sur les protéines produites par les canadiens. En effet, pour les mêmes raisons qu'expliquées précédemment, le fait de conserver le *tag* utilisé lors des étapes de purification, nous éloigne encore un peu plus du profil tridimensionnel adopté par la protéine dans la cellule. De plus, les *tag* histidine sont connus pour leur capacité à chélater des cations tels que le nickel, le fer ou le cobalt. La liaison du calcium observée dans l'étude peut en fait être le résultat d'une interaction avec le *tag* histidine et non avec STIM1 lui-même. L'avantage de la technique que nous avons utilisée réside en partie dans la possibilité d'éliminer cette étiquette et de récupérer des protéines composées uniquement d'acides aminés existant à l'état naturel dans sa séquence.

C'est pourquoi, pour ces raisons et parce que les expériences réalisées ne sont pas les mêmes, on peut difficilement comparer les deux études. La présence de l'étiquette histidine ainsi que la diminution de la taille du domaine produit a pu favoriser le repliement de la protéine dans une conformation différente de celle adoptée *in vivo*, et modifier ses capacités d'interaction avec le calcium.

D'autres recherches sont en cours dans mon équipe pour analyser ces deux mêmes paramètres mais en étudiant cette fois-ci les modifications d'interaction protéine-protéine et protéine-calcium par électrophorèses sur gel polyacrylamide natif. Nous souhaitons réaliser ces manipulations en présence et en absence de calcium afin de comparer les profils des mutants et du sauvage. Ainsi, nous allons observer si les mutations faux-sens provoquent des changements stériques au niveau du repliement des protéines ou au niveau de leur interaction entre elles. Nous pourrions également répondre à la question que nous nous posons quant à l'effet provoqué par la substitution d'acide aminés chargés, positivement ou négativement, par un autre acide aminé non chargé ou de charge opposée. La mise en parallèle des profils de migration obtenus pour les différentes protéines, en présence ou en absence de calcium, permettra d'estimer si le phénomène d'oligomérisation se produit et si les mutations peuvent en modifier les paramètres. Elles pourraient provoquer un changement du nombre de monomères intégrés dans l'oligomère construit en absence de calcium.

IV. Mise au point d'un outil thérapeutique par technique de « *Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing* » (SMaRT) dans le cadre des dysferlinopathies

1. Contexte de la recherche

Nous avons vu dans l'introduction de ma thèse que les dysferlinopathies sont des dystrophies musculaires caractérisées par une dégénérescence et une atrophie progressive des muscles squelettiques. A ce jour, aucun traitement n'existe pour soigner les patients qui en souffrent.

La technique de « *Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing* » (SMaRT) est d'ordinaire utilisée dans le cadre des maladies monogéniques pour rétablir la fonction d'une protéine mutée qui induira une correction phénotypique. Pour ce faire, une molécule d'ARN simple brin est conçue pour cibler spécifiquement les ARNs pré-messagers mutés juste avant qu'ils ne soient épissés. Le but est d'induire une réaction de *trans*-épissage entre le pré-messager endogène et le PTM (*Pre-Trans-splicing Molecule*) pour créer un ARN chimérique non muté dans la cellule. La traduction de cet ARN permettra la synthèse de protéines chimères capables des mêmes fonctions que la protéine native.

La dysferline n'étant pas fonctionnelle chez les malades, la mise en place d'un tel procédé dans le cadre des dysferlinopathies a tout son sens. De plus, une étude réalisée dans le cadre de la myopathie de Duchenne de Boulogne a montré un sauvetage de la dystrophine aussi bien dans des cellules musculaires de souris *mdx* que dans celles de patients (Lorain et al., 2013). Dans ces travaux, le PTM est délivré dans les cellules à l'aide d'un vecteur AAV dans lequel sont introduites différentes séquences exoniques du gène DMD.

L'ARNm de la dysferline a une taille de 6,8kb pour 55 exons (plus ou moins quelques exons alternatifs), ce qui rend impossible son encapsidation entière dans un vecteur AAV (capacité maximale d'encapsidation 4,7kb). Cependant, on sait d'après les travaux de Lek et collaborateurs que, dans un contexte physiologique normal, un mécanisme de réparation d'urgence est mis en place lorsqu'un myotube subit des lésions membranaires. L'entrée massive de calcium dans la cellule entraîne l'activation de calpaïnes qui vont aller cliver les dysferlines au niveau de leur exon alternatif « 40a » (Lek et al., 2013; Redpath et al., 2014). La mini-dysferline_{C72}, partie C-terminale de la protéine tronquée, est recrutée sur le site de la lésion pour initier le mécanisme de réparation membranaire. Mon projet a eu pour cœur de cible cette sous-population protéique.

Dans un premier temps, j'ai souhaité apporter la séquence codante de la mini-dysferline_{C72} via un PTM pour qu'elle s'exprime dans des cellules dépourvues de dysferline et qu'elle atténue fortement la dégénérescence musculaire. J'ai appuyé mon hypothèse sur le cas d'une patiente précédemment décrit par mon équipe, porteuse d'une large délétion dans le gène *DYSF* et atteinte d'une forme très atténuée de la maladie. Cette anomalie génique entraîne la transcription d'un ARNm délété des exons 2 à 40 lui-même traduit en une mini-dysferline fonctionnelle dont la capacité à réparer les membranes est conservée. De plus, aucun défaut histologique n'a été mis en évidence sur les biopsies musculaires de cette patiente (Krahn et al., 2010). A partir de ces données encourageantes, un premier essai de thérapie génique consistant à délivrer la mini-dysferline exprimée par cette patiente à l'aide d'un vecteur AAV, a été effectué sur des souris. Les données obtenues sur ce modèle *in vivo* ont montré l'expression de la protéine, sa stabilité ainsi que sa capacité à réparer la membrane (Krahn et al., 2010).

En 2012, une seconde étude destinée à évaluer l'efficacité thérapeutique de cette mini-dysferline a été réalisée. A nouveau, les capacités réparatrices de la mini-protéine ont été retrouvées mais une toxicité a été mise en évidence sur les coupes histologiques de tissus prélevés chez les animaux traités (Lostal et al., 2012). Le caractère dystrophique observé était dû à la surexpression de la mini-dysferline dans les tissus traités. En effet, cette dernière étant sous la dépendance d'un promoteur artificiel fort, il peut être responsable d'une surexpression protéique et donc de l'apparition de la toxicité. Ce constat a été une des raisons pour laquelle j'ai choisi d'orienter mon étude vers le développement de la technique de *trans-splicing* pour produire la mini-dysferline_{C72}. Ce système supprime le problème de surexpression puisque la synthèse de l'ARNm qui code la protéine thérapeutique est sous la dépendance du promoteur naturel du gène. Ainsi, la production de mini-dysferline_{C72} ne se fera jamais à des taux supérieurs de ceux retrouvés habituellement pour la dysferline sauvage et uniquement dans des cellules l'exprimant naturellement.

Dans un second temps, je souhaite tester ma molécule PTM *in vivo* en l'injectant dans des muscles de souris déficientes en dysferline. Pour cela, je dispose d'un modèle murin KI mis au point par mon équipe et comportant un codon stop dans l'exon 32 de la dysferline.

2. Stratégie envisagée et résultats

Avant de commencer le design de la molécule de *trans-splicing*, j'ai vérifié par RT-PCR que les cellules musculaires de souris KI (*Knock-in*) exprimaient l'ARN pré-messager de la dysferline (figure 73).

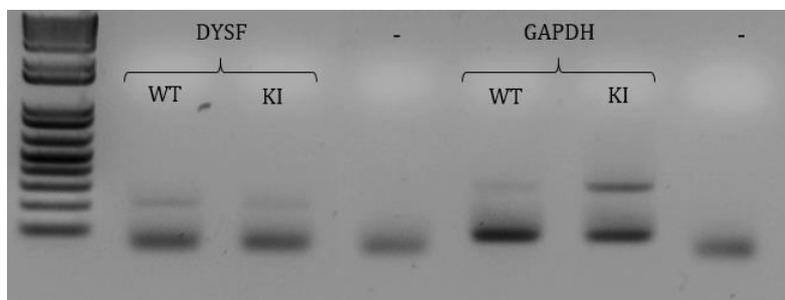


Figure 73 : Le pré-ARNm est amplifié par RT-PCR chez les souris sauvages et KI

Une fois ce point validé, j'ai vérifié par PCR quantitative que son expression s'effectuait à des taux similaires chez les souris KI et sauvages. J'ai ainsi pu constater que le pré-ARNm de dysferline est produit en quantités assez importantes et de manière équivalente dans les deux populations murines. Le phénomène « d'aiguillage moléculaire » pourra donc se produire lorsque le PTM s'exprimera.

Ma stratégie a alors consisté à introduire, dans la première partie du PTM, une séquence complémentaire de l'intron 4. En effet, l'exon 4 est en phase avec l'exon 40a ce qui permet de maintenir le cadre de lecture et ainsi d'obtenir une mini-protéine chimère fonctionnelle, constituée des exons 1 à 4 et 40a à 55. L'avantage d'une telle méthode est de cibler tous les patients porteurs de mutations dans les exons 5 à 55 soit plus de 95% des patients. L'idée de créer un PTM pour initier le mécanisme de *trans-splicing* après l'exon 2, également en phase avec le 40a, n'a pas été retenue et ce, malgré le fait que la molécule aurait pu cibler une population plus importante de malades (ceux porteurs de mutations dans les exons 3 et 4 en plus de ceux précédemment cités). En effet, j'ai considéré, au vu de la force très élevée du site accepteur d'épissage de l'exon 3 (98,14), que le spliceosome aurait certainement privilégié le mécanisme de *cis-splicing* au détriment du trans-épissage.

A la suite du site de liaison sur l'intron 4, j'ai ajouté une séquence nucléotidique contenant un point de branchement, un *polypyrimidine tract* et un site accepteur fort ayant déjà montré leur efficacité dans d'autres études de *trans-splicing* (Rodriguez-Martin et al., 2005; Tal-Goldberg et al., 2014). En aval, j'ai ajouté la séquence codante murine de l'exon 40a de *DYSF* suivie, en phase, de celle de la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*).

Le tout a été cloné dans un vecteur AAV (appelé « AAV-PTM1 »), qui a été transfecté dans des cellules musculaires murines de type C2C12 dans lesquelles j'avais préalablement contrôlé que le transcrit sauvage de la dysferline s'exprimait (figure 74).

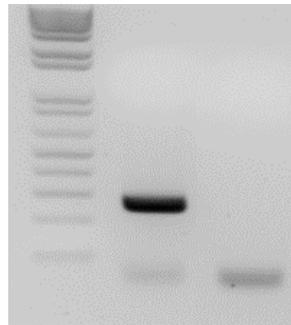


Figure 74 : Amplification par RT-PCR des exons 4 à 6 de la dysferline à partir d'un extrait d'ARNs total de C2C12

48h après transfection, j'ai observé des cellules vertes au microscope à fluorescence, obtenant ainsi la première preuve de principe que la technique pouvait fonctionner. Les protéines exprimant la GFP sont celles dans lesquelles le mécanisme de trans-épissage s'est produit (figure 75).

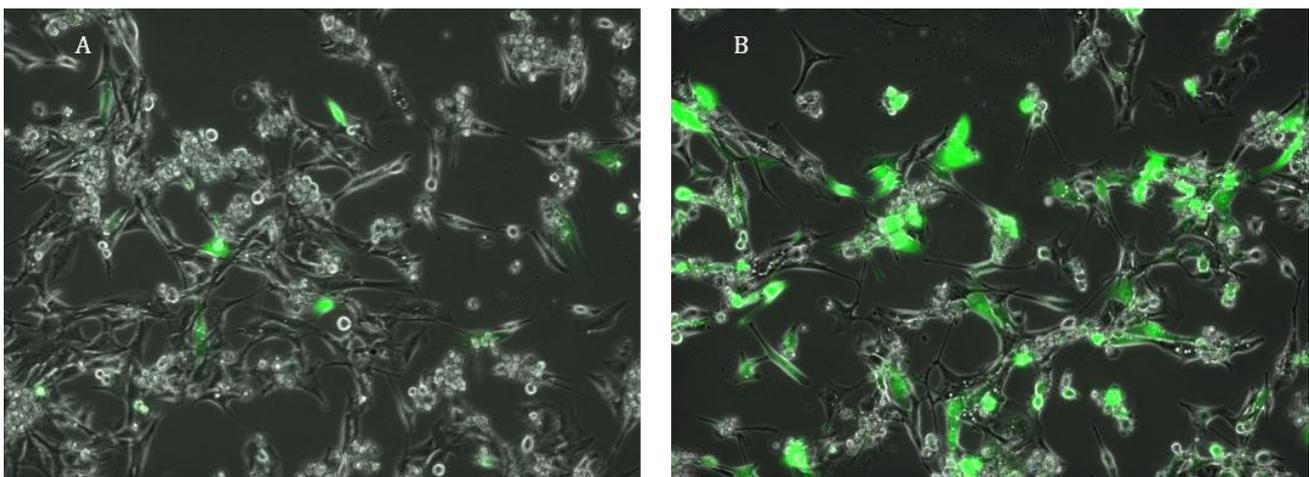


Figure 75 : Confirmation de la survenue du phénomène de trans-splicing après transfection de « l'AAV-PTM1 » dans des cellules C2C12

A : Les cellules exprimant la GFP ont produit la protéine chimère après synthèse de sa séquence codante par trans-splicing

B : Contrôle de l'efficacité de transfection utilisant un vecteur contenant la séquence de la GFP

Observation des cellules C2C12 au microscope à fluorescence, grossissement x10, 48h après transfection

Après cette première étape encourageante démontrant la faisabilité du mécanisme, j'ai décidé de poursuivre mon travail en transfectant ma construction « AAV-PTM2 » dans les mêmes cellules. Ce PTM2 diffère du PTM1 à deux niveaux : tout d'abord, la séquence codant la dysferline a été prolongée de l'exon 40a à l'exon 55, soit toute la séquence codante de la dysferline jusqu'à son codon stop, ensuite la séquence codant GFP a été retirée. N'ayant plus de moyen de contrôle visuel m'indiquant la production de la molécule dans les cellules, j'ai voulu mettre en évidence la présence du transcrit chimère par RT-PCR. Malgré le fait que j'ai réussi à obtenir des produits d'amplification par RT-PCR, je n'ai pas réussi à séquencer la séquence correspondant au transcrit chimère.

3. Discussion

Les premiers résultats que j'ai obtenus au cours de mes travaux visant à créer une molécule de dysferline, chimérique et thérapeutique, m'ont confirmés la faisabilité du mécanisme de *trans-splicing* et le *design* correct de ma molécule PTM. En effet, j'ai observé des cellules transfectées avec le PTM1, exprimer de la GFP en microscopie à fluorescence. Je n'ai cependant pas réussi à amplifier par RT-PCR, le transcrit chimère produit par *trans-splicing* dans les cellules. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela :

- Le taux d'ARN chimérique peut être produit à un niveau trop faible dans les différentes cellules pour être détectés. Cependant, ce n'est pas une hypothèse que je privilégie puisque même lorsque j'ai effectué mes transfections sur un plus grand nombre de cellules (1200000 cellules), je n'ai pas obtenu de meilleurs résultats.
- La force du site accepteur que j'ai choisi d'intégrer dans mon PTM n'est pas suffisamment élevée pour que le spliceosome se dirige plus fréquemment vers ma molécule plutôt que vers l'ARN endogène. A l'inverse, la force du site accepteur de l'exon 5 est encore trop importante pour que le PTM soit plus souvent sélectionné.
- Le domaine de liaison sélectionné ne favorise pas assez la survenue du *trans*-épissage. En effet, plusieurs publications ont démontré que le choix du site d'hybridation du PTM était d'une importance cruciale pour l'efficacité du mécanisme (Berger et al., 2015; Koller et al., 2014; Murauer et al., 2013; Puttaraju et al., 2001; Tockner et al., 2016).

Lors du design de la molécule, mon choix du site de liaison à l'ARN pré-messager s'était porté sur le masquage du site accepteur de l'exon 5. En effet, je me suis basée sur des données diagnostics qui montrent qu'une grande majorité des mutations introniques impactant le site accepteur d'un exon (en -1, -2) sont responsables du saut de ce dernier. Néanmoins, il semblerait que cibler ce domaine ne soit pas toujours synonyme de survenue fréquente de *trans*-épissage. C'est notamment ce qu'ont démontré Berger et collaborateurs dans leur étude sur la rétinite pigmentaire : Selon la séquence cible choisie pour hybrider le PTM, l'efficacité de synthèse de la molécule *trans*-épissée peut varier d'une valeur quasi nulle à environ 25% (Berger et al., 2015). De même, une autre équipe travaillant sur l'épidermolyse bulleuse a vu son efficacité de production de transcrits *trans*-épissés varier entre 8 et 60% selon le site de liaison qu'ils utilisaient pour leur PTM (Murauer et al., 2013). La conformation tridimensionnelle adoptée par l'ARN messager lors de sa maturation semble jouer pour beaucoup sur l'efficacité de fixation du PTM sur sa cible et sur le choix du spliceosome. L'utilisation d'un PTM porteur d'une délétion de cinquante bases lui permettant de former une boucle dans sa séquence de liaison au pré-ARNm endogène, a d'ailleurs démontré une bonne efficacité de synthèse de transcrits chimères (Puttaraju et al., 2001).

En prenant en compte ces divers éléments, j'ai mis au point une nouvelle stratégie d'approche consistant à tester de nouveaux sites de liaison intronique. Ils ciblent des régions introniques profondes et l'une des constructions est dessinée de telle sorte que le site de liaison pourra former une boucle au niveau de son site de liaison à l'ARN. En parallèle, j'ai également décidé de tester des PTM dirigés contre l'intron 7 pour vérifier si le phénomène de *trans*-épissage peut être favorisé s'il est développé en amont d'un exon ayant un site accepteur faible. Ces travaux sont actuellement en cours au sein de mon équipe.

S'il s'avère que nous réussissons à produire les protéines chimères attendues, il faudra être vigilants quant à la possibilité de toxicité suscitée par les transcrits obtenus par *trans-splicing*. En effet, une étude menée dans l'équipe d'Isabelle Richard à Généthon, a démontré qu'il est possible de traduire des molécules de dysferline à partir de transcrits *trans*-épissés, mais que ces derniers peuvent être responsables de la synthèse d'un nombre non négligeable de protéines aberrantes. En effet, l'étude a montré qu'ils sont porteurs de cadres de lecture ouverts qui vont être utilisés pour produire des protéines anormales et potentiellement toxiques. Les auteurs ont également démontré que des sites cryptiques consensus d'épissage étaient présents et utilisés dans la séquence du PTM qui ne doit normalement pas être transcrite. Ils les ont mis en évidence par RT-PCR. Ces transcrits *trans*-épissés de taille différente, sont issus de la reconnaissance par le spliceosome d'un site cryptique donneur d'épissage situé dans le domaine de liaison à l'ARN du PTM (Monjaret et al., 2014).

L'ensemble de ces observations nous montre que lors de nos prochains travaux, si notre protéine chimère est produite à des taux suffisamment importants, nous devons impérativement vérifier que nos molécules PTM n'entraînent pas les mêmes effets collatéraux indésirables. Dans tous les cas, je suis convaincue que le fait de créer, par *trans-splicing*, une protéine porteuse du site de clivage permettant la libération de la mini-dysferline_{C72} apportera un bénéfice aux cellules traitées. Elles auront alors la capacité d'exprimer une protéine existant naturellement chez tous les individus et dont les capacités réparatrices au niveau de la membrane ont été démontrées (Lek et al., 2013; Redpath et al., 2014).

V. Confirmation du statut pathogène de mutations CAPN3 découvertes par séquençage haut débit

1. Contexte de la recherche

Grâce à l'expérience que j'ai acquise dans le domaine de l'épissage au cours de mes années de doctorat, j'ai participé au projet de séquençage haut débit développé par mon équipe sur une cohorte de patients souffrant de myopathies distales (Sevy et al., 2015).

2. Résultats

L'étude a été mise en place dans le but d'évaluer l'efficacité d'une technique de « séquençage ciblé de nouvelle génération » (NGS ; *Next Generation Sequencing*) basée sur un panel de 298 gènes ayant été préalablement sélectionnés pour leur implication connue dans certaines maladies neuromusculaires (gènes répertoriés dans la *gene table* évoquée dans l'introduction). Le travail a porté sur un groupe de dix-sept cas index, tous cliniquement diagnostiqués comme atteints de myopathie distale mais pour lesquels les gènes responsables n'avaient pas encore été identifiés malgré de précédentes explorations génétiques par séquençage Sanger.

Le rendement diagnostique obtenu en fin d'analyse a été de 47%, soit huit patients génétiquement diagnostiqués sur dix-sept. Une moyenne de 710 variants par patient a été détectée avec une couverture moyenne de 95% à 10X et une profondeur d'analyse moyenne égale à 196X. Les résultats obtenus pour le gène CAPN3 chez une malade ont particulièrement attiré mon attention pour deux raisons :

- La première était liée au fait que le pourcentage de couverture obtenu pour les exons 7, 8 et 9 était deux fois moins important chez cette patiente que chez les autres (figure 76). Cela soutenait sans difficulté l'hypothèse d'une délétion de ces trois exons sur un des deux allèles de la patiente.
- La seconde portait sur l'identification d'une mutation isosémantique dans l'exon 3 (c.477C>T ; p.Tyr159Tyr). Comme nous l'avons vu en détail dans l'introduction de ce manuscrit, les mutations synonymes peuvent être responsables, lorsqu'elles se produisent dans des séquences régulatrices d'épissage, de la synthèse de transcrits aberrants, codant pour des protéines non fonctionnelles.

RefSeqName	GeneSymbol	Numero EXON	taille Exon	patient S1-1	patient S1-2	patient S1-3	patient S1-4	patient S1-5	patient S1-6	patient S1-7	patient S1-8	patient S1-9	patient S1-10	patient S2-2	patient S2-3	patient S2-4	patient S2-5	patient S2-6	patient S2-7	patient S2-8	min	moy	SD	3SD	2,5SD	2SD
NM_000070	CAPN3	1	309	245,98	224,22	258,06	265,5	306,08	273,85	285,35	263,61	330,9	337,53	359,73	301,22	348,3	303,23	291,02	303,43	357,92	205	282	43,1	0	0	0
NM_000070	CAPN3	2	70	24,83	28,14	29,63	28,07	46,8	33,86	40,84	37,1	61,59	43,44	46,44	39,64	61,77	36,6	43,33	45,87	55,47	17,3	40,5	12,7	0	0	0
NM_000070	CAPN3	3	119	18,39	20,08	17,94	23,53	20,66	21,47	26,37	25,37	27,94	25,28	20,24	12,24	15,62	15,47	9,76	17,29	20,42	9,76	20,9	6,21	0	0	0
NM_000070	CAPN3	4	134	237,44	254,02	302,34	319,25	327,46	317,43	444,36	356,06	344,43	408,43	383,11	365,25	457,93	435,84	361,1	415,73	348,74	237	368	58,7	0	0	1
NM_000070	CAPN3	5	169	167,46	206,28	230,28	235,99	226,57	259,32	326,41	278,34	319,5	310,72	263,04	309,51	358,73	278,53	260,13	285,05	303,96	167	270	43	0	0	1
NM_000070	CAPN3	6	144	220,6	215,83	249,7	240,57	293,32	243,07	288,51	284,72	305,75	327,29	325,24	262,32	363,46	276,2	273,15	295,95	303,52	197	276	40,8	0	0	0
NM_000070	CAPN3	7	84	233,98	209,38	243,51	202,27	130,17	257,38	331	274,3	327,44	340,33	263,77	234,82	297,48	265,2	256,35	291,64	295,44	130	258	46	0	1	1
NM_000070	CAPN3	8	86	294,7	287,49	321,2	279,38	197,84	359,44	346,92	364,16	427,16	406,15	446,2	338,01	478,27	393,38	384,49	449,52	395,35	198	349	66,1	0	1	1
NM_000070	CAPN3	9	78	358,79	355,71	437,82	394,08	185,47	441,32	488,26	407,9	471,17	470,5	399,13	390,35	464,99	403,88	386,03	406,73	396,15	185	400	56,1	1	1	1
NM_000070	CAPN3	10	161	86,81	84,78	111,77	112,06	110,05	145,84	147,44	161,99	170,13	147,82	138,85	129,16	159,67	120,48	123,79	145	109,71	82,9	128	23,7	0	0	0
NM_000070	CAPN3	11	170	61,91	69,45	84,26	65,24	86,1	92,36	106,64	103,34	125,78	127,62	123,21	106,99	128,45	122,91	109,73	118,77	132,28	61,9	98,5	21,8	0	0	0
NM_000070	CAPN3	12	12	363,67	387,75	403	436	552,33	541,75	645,33	574,92	656,25	604,08	659,08	531,42	658,83	591,5	520,92	603,58	660,42	364	530	92	0	0	0
NM_000070	CAPN3	13	209	305,46	321,41	329,87	328,61	398,78	400,76	463,96	471,01	486,91	446,62	457,76	387,74	521,53	472,93	421,86	471,51	467,1	305	421	59,9	0	0	0
NM_000070	CAPN3	14	37	468,43	487,11	529,49	494,46	659,86	532,51	588,73	537,81	699,73	669	753,19	673,16	869,43	740,03	691,03	731,22	756,89	405	630	134	0	0	0
NM_000070	CAPN3	15	18	121,39	162,94	171,44	232,17	208,22	257,89	314,67	282,11	304,28	274,94	176,22	114,83	309,22	206,11	138,67	222,44	171,17	115	215	52,8	0	0	0
NM_000070	CAPN3	16	114	315,68	321,73	363,74	328,35	448,05	381,32	414,46	410,39	588,61	452,83	608,88	458,43	576,87	365,11	323,39	464,18	447,89	216	388	107	0	0	0
NM_000070	CAPN3	17	78	229,13	255,04	273,21	280,65	340,53	301,55	333,94	343,33	399,17	363,81	381,83	330,68	401,69	334,33	369,1	325,65	344,85	229	333	49,4	0	0	1
NM_000070	CAPN3	18	58	179,4	157,02	192,33	217,1	232,31	246,36	255,24	226,38	295,16	287,33	300,28	243,62	265,95	266,76	267,74	284,72	284,62	157	249	43,7	0	0	1
NM_000070	CAPN3	19	65	115,12	92,43	121,18	133	192,72	184,48	164,28	165,29	213,4	230,77	131,86	139,54	185,92	143,88	184,58	127,05	135,38	92,4	150	30,8	0	0	0
NM_000070	CAPN3	20	69	185,65	187,52	218,62	225,67	234,45	258,67	303,38	260	310,8	272,74	297,32	268,43	363,65	272,58	263,87	279,26	290,94	186	264	42,7	0	0	0
NM_000070	CAPN3	21	79	416,71	397,54	413,66	416,49	454,52	466,49	637,94	525,42	559,41	509,75	510,03	526,1	600,85	615,61	545,66	548,43	553,91	396	515	70,3	0	0	0
NM_000070	CAPN3	22	117	267,63	263,86	264,1	283,16	317,62	342,4	351,49	325,3	413,17	433,71	473,2	347,9	413,47	391,43	368,16	416,2	383,92	190	350	67,3	0	0	1
NM_000070	CAPN3	23	59	494,03	453,95	525,95	513,03	509,75	514,81	672,83	547,49	821,49	705,32	689,17	624,07	763,8	780,95	807,1	745,17	672,29	454	623	111	0	0	0
NM_000070	CAPN3	24	27	258,89	294,74	259,93	277,89	329,15	344,89	309,67	419,44	502,78	335,56	378,52	316,33	396,22	306,04	344,15	441,96	328,85	201	317	75,8	0	0	0

Figure 76 : Identification de la délétion des exons 7, 8 et 9 chez le patient S1-5
La profondeur de lecture est plus faible de moitié dans la zone délétée, encadrée en rouge

Ayant à disposition un échantillon de biopsie musculaire effectuée chez cette patiente, j'ai donc décidé de confirmer la présence de la délétion allélique et de vérifier si la mutation isosémantique impactait l'épissage du gène.

Les résultats obtenus après RT-PCR sur les ARNs extraits de la biopsie musculaire, ont confirmé la présence de la délétion et le caractère pathogène de la mutation isosémantique. Cette dernière provoque la rupture d'un site régulateur d'épissage de type « Exonic Splicing Enhancer (ESE) », ce qui entraîne le saut de l'exon 3, un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré, quatorze acides aminés plus loin (figure 77).

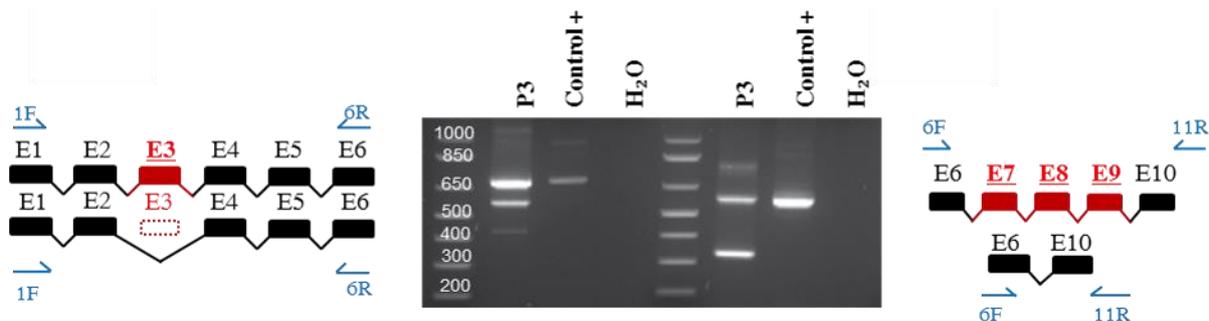


Figure 77 : Caractérisation du saut de l'exon 3 et de la délétion génomique des exons 7, 8 et 9 du gène CAPN3 chez une patiente de la cohorte

Les résultats sont obtenus par RT-PCR effectuées sur des ARNs totaux extraits de biopsie musculaire.
Sevy et al., 2015

En ce qui concerne la délétion des exons 7 à 9 mise en évidence, je me suis attelée à chercher à quel niveau de la séquence génomique la délétion s'était produite. J'ai ainsi pu mettre en évidence qu'elle était due à un remaniement qui s'était produit entre deux séquences « alu » respectivement comprises dans l'intron 6, 932pb en aval de la fin de l'exon 6, et dans l'intron 9, 428pb en amont du début de l'exon 10.

3. Discussion

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous montrent bien que les analyses par séquençage haut-débit contribuent à améliorer grandement le diagnostic génétique. Elles permettent d'identifier, dans certaines conditions, des anomalies génomiques touchant plusieurs exons, indétectables par séquençage Sanger classique. Dans d'autres cas, nous l'avons montré, elles servent à détecter des mutations dans des gènes qui n'ont pas été investigués en première intention par séquençage Sanger, car le patient présente un phénotype clinique atypique. C'est notamment le cas dans notre étude pour la patiente atteinte d'une myopathie distale et ayant un statut hétérozygote composite pour le gène *CAPN3*. En effet, chez une très large majorité de malades souffrant de calpaïnopathie, les atteintes sont retrouvées au niveau des muscles des ceintures.

Cependant, identifier une mutation n'est pas l'aboutissement pour établir le diagnostic moléculaire, il faut pouvoir être sûr de son caractère pathogène si elle n'est pas répertoriée. C'est ce que nous avons réussi à faire dans ce cas précis. Ces travaux confirment donc qu'il est absolument nécessaire d'effectuer des tests fonctionnels.

LETTER

Improving molecular diagnosis of distal myopathies by targeted next-generation sequencing

INTRODUCTION

Distal myopathies are a heterogeneous group of muscle diseases sharing the clinical pattern of predominant weakness in the feet and/or hands. The classical approach for molecular diagnosis is based on targeted gene-by-gene analysis guided by currently existing combinatorial algorithms.¹ Many patients remain undiagnosed. Within the last 5 years, next-generation sequencing (NGS) has emerged as a successful and rapid approach to simultaneously analyse multiple genes in neuromuscular disorders.² Our objective was to evaluate the efficiency of a targeted NGS approach using a panel of neuromuscular genes on patients with distal myopathies. We first tested its validity in a control group of six index cases (IC) with known molecular diagnosis. Then, we prospectively evaluated this approach by testing a group of 17 IC without molecular diagnosis.

SUBJECTS AND METHODS

Patients

We prospectively included 54 patients (37 IC and 17 relatives) with a diagnosis of distal myopathy, followed at the Neuromuscular Diseases and ALS Reference Centre of La Timone Hospital, Marseille, France, between 1989 and 2014. Among these 37 IC previously explored by Sanger sequencing, 20 IC had an identified molecular diagnosis: six IC constituted the control group. The remaining 17 undiagnosed IC constituted the test group. A targeted-NGS approach was used to search mutations in 298 neuromuscular genes in both groups. Samples analysed in this study have been prepared and stored by the Center of Biological Resources, Department of Medical Genetics, La Timone Hospital, Marseille, and used following the ethical recommendations of our institution and according to the Declaration of Helsinki. All included patients gave their written consent prior to the genetic study, in accordance with French law recommendations.

Targeted massively parallel sequencing of patient samples

We selected 298 genes implicated in neuromuscular diseases and cardiomyopathies listed in the Gene Table of Neuromuscular

Disorders (see online supplementary data 1).³ For details on sequencing protocols, bioinformatic analysis and assessment of variant pathogenicity, see online supplementary data 2.

Multidisciplinary analysis for the determination of variant pathogenicity

Experts in neuromuscular diseases, including neurologists, pathologists, medical geneticists, biomedical researchers and bioinformaticians, reviewed all variants obtained through this initial selection process in the light of the clinical, muscle imaging and histopathological findings of each patient. Four groups of patients were established, based on degree of certainty of their molecular diagnosis. The group with 'definite diagnosis' included patients carrying either not previously published variants with pathogenicity confirmed by functional tests, or patients carrying previously published pathogenic mutations and presenting with a clinical phenotype consistent with the corresponding mutation. The group with 'probable diagnosis' included patients carrying a novel variant with a Universal Mutation Database (UMD)-predictor score >65% and having a clinical phenotype consistent with previously reported diseases caused by mutations in a given gene. The group with 'possible diagnosis' was defined as above, except that the clinical presentation was atypical. For the 'no established diagnosis' group, no variant compatible with the patient's phenotype was found. Four variants were subsequently confirmed by Sanger sequencing (*CAPN3* and *DYSF*).

RESULTS

We identified all eight previously known disease-causing mutations in the control group. In the test group, mean sequence coverage was 95% at 10X and mean sequencing depth was 196X. On average, 710 variants were detected per patient. For each patient, potential disease-causing variants identified are listed with their predicted pathogenicity in [table 1](#).

We obtained a molecular diagnosis yield of 47% (8/17 IC): definite diagnosis was obtained for two IC. Two novel variants in *CAPN3* disrupting the reading frame were found for P1, assessed by functional studies (available on online supplementary data 3). For P2, we found a previously reported mutation in *TTN* segregating with hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF).⁴ Probable diagnosis was obtained for six IC. We retained novel variants in *DYSF* for siblings P3 and P4. For P5, the novel *TTN* variant was found at the same amino acid

position as a recently reported *TTN* mutation segregating with HMERF.⁴ P6 had a variant in the previously known dominant distal hereditary motor neuropathy AARS gene. For P7, P8 and P9, variants were respectively located in *KLHL9*, *KBTBD13* and *CAV3*.

Possible diagnosis was obtained for three IC (mutations in *TTN*), whereas six IC remained without molecular diagnosis.

DISCUSSION

In our test group with an initial negative result of targeted single-gene analyses, we found a final diagnostic yield of 47% underlying the efficiency of this diagnostic approach in a cohort previously explored. A combination of Sanger sequencing and NGS techniques for the entire cohort of distal myopathies allowed us to reach 76% yield of molecular diagnosis.

Reasons for undiagnosed cases are discussed. Since we included previously molecularly explored patients, they had a higher probability of carrying mutations in yet undiscovered disease-causing genes, thus being absent from our panel. Technical issues could also underlie lack of diagnosis in certain patients: mutations could be missed if they were located in regions with suboptimal coverage of targeted sequences or in intergenic regions.

Using NGS permitted the sequencing of large-sized genes such as *TTN*, which is not routinely performed, allowing the identification of variants in five IC. Assessment of pathogenicity of *TTN* variants needs, nevertheless, further confirmation, even though functional analysis of *TTN* mutations is extremely difficult due to the exceptionally large size and high variability of this protein.⁵ Further segregation studies could help to confirm these variants' pathogenicity.

For four cases in our study, the implicated disease-causing gene was not sequenced during the initial targeted gene-by-gene analysis due to atypical phenotypes. It is only thanks to simultaneous analysis of a large number of candidate genes that we were able to identify likely pathogenic variants in *CAPN3*, *CAV3*, *KBTBD13* and *KLHL9*. Mutations in these two first genes mainly present as a limb-girdle muscular dystrophy phenotype even though distal weakness has been rarely reported for both. For the last two genes recently described, future identification of novel pathogenic variants and proofs of variable penetrance could extend their related phenotype spectrum.

Another advantage of the NGS approach is its ability to directly explore genes implicated in other neuromuscular

Table 1 Analyses of pathogenicity for each identified variant in patients with definite, probable and possible diagnoses

Patient	Gender	Variant	UMD-predictor	SIFT	PolyPhen 2	HSF splicing prediction	Fq 1000G	Depth/Sanger	EVS score
Patients with definite diagnosis (2 IC)									
P1	F	<i>CAPN3</i> (NM_000070)c.477C>T (p.Tyr159Tyr)*	Polymorphism	Tolerated	Benign	Probable*	NA	Sanger	–
		<i>CAPN3</i> (NM_000070)Deletion exons 7-8-9*	–	–	–	–	NA	Sanger	–
P2	M	<i>TTN</i> (NM_133378) c.87430T>C (p.Cys29144Arg)	Pathogenic 100%	Damaging	Probably damaging	Uncertain	NA	168/380	–
Patients with probable diagnosis (6 IC)									
P3	F	<i>DYSF</i> (NM_003494)c.1168G>A (p.Asp390Asn)	Probably pathogenic 72%	Damaging	Probably damaging	Possible	NA	Sanger	–
		<i>DYSF</i> (NM_003494)c.5302C>T (p.Arg1768Trp)	Pathogenic	Damaging	Probably damaging	Possible	NA	Sanger	–
P4	M	<i>DYSF</i> (NM_003494)c.1168G>A (p.Asp390Asn)	Probably pathogenic 72%	Damaging	Probably damaging	Possible	NA	Sanger	–
		<i>DYSF</i> (NM_003494) c.5302C>T (p.Arg1768Trp)	Pathogenic	Damaging	Probably damaging	Possible	NA	Sanger	–
P5	F	<i>TTN</i> (NM_133378)c.87667G>C (p.Gly29223Arg)	Pathogenic 99%	Damaging	Probably damaging	Not affected	NA	43/88	–
P6	F	<i>AARS</i> (NM_001605) c.1019A>G (p.Asn340Ser)	Probably pathogenic 69%	Tolerated	Benign	Uncertain	NA	76/157	–
P7	F	<i>KLHL9</i> (NM_018847)c.953G>A (p.Arg318Gln)	Pathogenic 84%	Tolerated	Benign	Not affected	NA	23/39	–
P8	M	<i>KBTD13</i> (NM_001101362) c.89G>A (p.Gly30Asp)	Probably pathogenic 72%	Tolerated	Benign	Uncertain	0.0037	78/188	0.0056
P9	M	<i>CAV3</i> (NM_001234) c.216C>G (p.Cys72Trp)	Pathogenic 88%	Tolerated	Possibly damaging	Uncertain	0.003	270/536	0.00277
Patients with possible diagnosis (3 IC)									
P10	F	<i>TTN</i> (NM_133378) c.58823C>T (p.Ser19608Phe)	Pathogenic 93%	Damaging	Benign	Not affected	NA	116/247	–
P11	M	<i>TTN</i> (NM_133378) c.17060A>G (p.N5687Ser)	Pathogenic 78%	Damaging	Probably damaging	Possible	NA	84/203	0.000822
P12	F	<i>TTN</i> (NM_133379) c.13432_13433insA (p.Thr4478fs)	NA	NP	NP	NP	NA	36/63	–

HSF splicing prediction:

► **Probable:** strong splicing effect due to broken DS (donor site) or AS (acceptor site) and/or new DS/AS creation and/or strong possibility of broken ESE (Exonic Splicing Enhancer) site

► **Possible:** medium splicing effect predicted due to new DS/AS and/or medium possibility of broken ESE site

► **Uncertain:** mild splicing effect due to new DS/AS and/or low possibility of broken ESE site

► **Not affected:** weak or no splicing effect predicted

*Confirmed by RT-PCR from patient biopsy.

EVS, Exome Variant Server; Fq, frequency; HSF, human splicing finder; IC, index cases; NA, not available; NP, not performed; RT, retrotranscription; SIFT, scale-invariant feature transform; UMD, Universal Mutation Database.

diseases such as hereditary motor neuropathies, which are considered the main differential diagnoses of distal myopathies. For P6, diagnosis was initially misleading due to mixed findings on needle electromyography and histological findings suggestive of a myopathic process. A probable causative variant in the *AARS* gene responsible for distal motor neuropathy was found, enabling correction of the diagnosis.

Targeted NGS generates a large number of sequence variants for each analysed sample, which is time-consuming to validate. The constant interplay of various levels of clinical, genomic and bioinformatics expertise was crucial to identify true causative mutations among the large amount of genomic data. Further studies of variants' segregations in the families of IC are ongoing to confirm the pathogenicity of the variants.

CONCLUSION

Our results demonstrate the efficiency of next generation sequencing of candidate genes in diagnosing distal myopathies. Our diagnostic yield in a cohort previously explored by Sanger sequencing was 47%. For the majority of these patients, the diagnosis was only possible through a multidisciplinary team effort. This approach emphasises the value of NGS to diagnose atypical phenotypes of distal myopathies. Optimisation of variant calling parameters and predicted pathogenicity filters will further improve this approach and will undoubtedly lead to an even more efficient diagnostic yield.

Amandine Sevy,^{1,2} Mathieu Cerino,^{2,3} Svetlana Gorokhova,² Eugénie Dionnet,² Yves Mathieu,² Annie Verschuere,¹ Jérôme Franques,¹ André Maues de Paula,^{2,4} Dominique Figarella-Branger,⁴ Arnaud Lagarde,² Jean Pierre Desvignes,² Christophe Bérout,^{2,3}

Shahram Attarian,^{1,2} Nicolas Levy,^{2,3} Marc Bartoli,^{2,3} Martin Krahn,^{2,3} Emmanuelle Campana-Salort,^{1,2} Jean Pouget^{1,2}

¹APHM, Department of Neurology, Neuromuscular and ALS Reference Center, La Timone University Hospital, Marseille, France

²Aix Marseille Université, INSERM, GMGF, Marseille, France

³APHM, Département de Génétique Médicale, Hôpital Timone Enfants, Marseille, France

⁴APHM, Department of Anatomopathology, La Timone University Hospital, Marseille, France

Correspondence to Dr Amandine Sevy, Neuromuscular and ALS Reference Center, La Timone University Hospital, Aix-Marseille University, 264 rue Saint-Pierre, Marseille 13385, France; amandine.sevy@ap-hm.fr

EC-S and JP contributed equally to this study.

Acknowledgements The authors would like to thank the patients and their families for allowing us to share their stories. They also thank Karine Bertaux and Cécile Mouradian for supplying the DNA samples; and Pascale Richard for allowing molecular diagnosis with conventional technique.

PostScript

Competing interests None.

Patient consent Obtained.

Ethics approval Ethical recommendations of our institution and according to the Declaration of Helsinki.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2014-309663>).



CrossMark

To cite Sevy Amandine, Cerino M, Gorokhova S, *et al.* *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;**87**:340–342.

Received 10 October 2014

Revised 30 December 2014

Accepted 2 March 2015

Published Online First 17 March 2015

J Neurol Neurosurg Psychiatry 2016;**87**:340–342.

doi:10.1136/jnnp-2014-309663

REFERENCES

- 1 Udd B. Distal myopathies—new genetic entities expand diagnostic challenge. *Neuromuscul Disord NMD* 2012;22:5–12.
- 2 Vasli N, Böhm J, Le Gras S, *et al.* Next generation sequencing for molecular diagnosis of neuromuscular diseases. *Acta Neuropathol* 2012;124:273–83.
- 3 Kaplan J-C, Hamroun D. The 2014 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear

genome). *Neuromuscul Disord NMD* 2013;23:1081–111.

- 4 Toro C, Olivé M, Dalakas MC, *et al.* Exome sequencing identifies titin mutations causing hereditary myopathy with early respiratory failure (HMERF) in families of diverse ethnic origins. *BMC Neuro* 2013;13:29.
- 5 Chauveau C, Rowell J, Ferreiro A. A rising titan: TTN review and mutation update. *Hum Mutat* 2014;35:1046–59.



Improving molecular diagnosis of distal myopathies by targeted next-generation sequencing

Amandine Sevy, Mathieu Cerino, Svetlana Gorokhova, Eugénie Dionnet, Yves Mathieu, Annie Verschueren, Jérôme Franques, André Maues de Paula, Dominique Figarella-Branger, Arnaud Lagarde, Jean Pierre Desvignes, Christophe Bérout, Shahram Attarian, Nicolas Levy, Marc Bartoli, Martin Krahn, Emmanuelle Campana-Salort and Jean Pouget

J Neurol Neurosurg Psychiatry 2016 87: 340-342 originally published online March 17, 2015
doi: 10.1136/jnnp-2014-309663

Updated information and services can be found at:
<http://jnnp.bmj.com/content/87/3/340>

These include:

Supplementary Material

Supplementary material can be found at:
<http://jnnp.bmj.com/content/suppl/2015/03/17/jnnp-2014-309663.DC1.html>

References

This article cites 5 articles, 0 of which you can access for free at:
<http://jnnp.bmj.com/content/87/3/340#BIBL>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

VI. Récupération de la capacité de réparation membranaire portée par la dysferline après saut de l'exon 32

Une nouvelle fois mais dans un contexte différent, j'ai pu apporter mon expertise dans le domaine de la transcription génique dans le cadre de travaux de recherche effectués en parallèle. L'étude mise en place par mon équipe était destinée à démontrer que les capacités réparatrices de membrane portées par la dysferline, pouvaient être restaurer par saut d'exon, chez des patients atteints de dysferlinopathies et porteurs de mutations dans l'exon 32.

1. Contexte de la recherche

Notre travail a été initié suite la mise en évidence du maintien des capacité réparatrices d'une dysferline délétée de l'exon 32 chez une personne ne présentant aucun signe de dysferlinopathie. La synthèse de cette « quasi-dysferline » est due à une mutation dans le point de branchement de l'exon 32 (c.3443-33A>G) qui modifie l'épissage et entraîne le saut de l'exon. Nous avons donc considéré l'absence totale de symptôme dystrophique chez cet individu comme une preuve de principe « naturel » du maintien de la fonctionnalité de la protéine. Et, partant de ce postulat, nous avons voulu explorer la possibilité de réverter la perte de fonction protéique observée chez des patients porteurs de mutations dans l'exon 32 en développant une stratégie de saut d'exon thérapeutique sur ce dernier (Barthélémy et al., 2015).

Sur le même principe que celui expliqué dans le paragraphe de l'introduction concernant le saut d'exon, notre idée a été de venir masquer, avec des oligonucléotides antisens (AON), les sites consensus d'épissage de l'exon 32 afin d'en provoquer le saut. Cela permettra alors la synthèse du transcrit produit suite au rattachement de l'exon 31 avec l'exon 33, et la traduction de la quasi-dysferline. De cette manière, nous avons fait l'hypothèse que cette nouvelle molécule, stable et fonctionnelle, apportera un bénéfice thérapeutique aux cellules qui l'exprimeront et entraînera un ralentissement de l'évolution de la maladie.

2. Résultats

Après étude de la séquence ADN de *DYSF* autour de l'exon 32, nous avons dessiné deux AONs ciblant chacun une partie différente de la séquence. Le premier, l'AON B a pour rôle de venir masquer un site ESE situé au début de l'exon 32 et le second, l'AON D est, lui, dirigé contre le site donneur d'épissage de ce même exon. Afin de vérifier séparément l'efficacité de l'AON B, je l'ai transfecté dans les cellules d'un patient puis j'ai effectué une RT-PCR sur un extrait d'ARNs total, ce qui m'a permis de mettre en évidence le saut de l'exon 32 (figure 78).

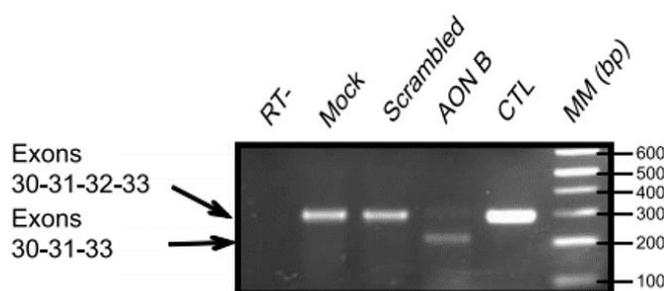


Figure 78 : Induction du saut de l'exon 32 de dysferline à l'aide d'oligonucléotides antisens (AON B) dans des cellules de patients.

Par la suite, nous avons également caractérisé la production de quasi-dysferline par Western blot dans des cellules de patients. Pour s'assurer que les capacités réparatrices de la protéine étaient bien présentes, un test de lésion membranaire avec un laser bi-photon a été effectué. De cette manière, nous avons non seulement pu caractériser la production de quasi-dysferline mais également montré qu'elle était efficace pour réparer les lésions provoquées par le laser au niveau de la membrane des cellules déficientes en dysferline.

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons prouvé que l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre des sites consensus ou régulateurs d'épissage de l'exon 32 de la dysferline entraîne le saut de cet exon. Les transcrits raccourcis ainsi produits, sont suffisamment stables pour être traduits en une quasi-dysferline déléetée des vingt-six premiers résidus du domaine C2D. On note cependant un écart important entre le niveau élevé de transcrits déléetés synthétisés, et la quantité relativement faible de protéines exprimées. Néanmoins, ce taux réduit de quasi-dysferline est suffisant pour qu'un mécanisme de réparation membranaire efficace soit mis en place dans les cellules de patients traitées.

Ainsi, nous avons pu caractériser que l'utilisation d'AONs dans le cadre des dysferlinopathies est une technique qui peut être envisagée pour ralentir efficacement l'évolution de la maladie chez les patients porteurs de mutations dans l'exon 32 du gène codant la dysferline.

Research Report

Exon 32 Skipping of Dysferlin Rescues Membrane Repair in Patients' Cells

Florian Barthélémy^{a,b}, Cédric Blouin^{c,d,1}, Nicolas Wein^{a,b,1}, Vincent Mouly^{e,f,g}, Sébastien Courrier^{a,b}, Eugénie Dionnet^{a,b}, Virginie Kergourlay^{a,b}, Yves Mathieu^{a,b}, Luis Garcia^{e,f,h}, Gillian Butler-Browne^{e,f,g}, Christophe Lamaze^{c,d}, Nicolas Lévy^{a,b,i}, Martin Krahn^{a,b,i} and Marc Bartoli^{a,b,i,*}

^aAix Marseille Université, UMR_S 910, Faculté de Médecine de la Timone, Marseille, France

^bGMGF, INSERM UMR_S 910, Marseille, France

^cCNRS UMR 144, 26 rue d'Ulm, Paris Cedex 05, France

^dInstitut Curie, Centre de Recherche, Laboratoire Trafic, Signalisation et Ciblage Intracellulaires, 26 rue d'Ulm, Paris Cedex 05, France

^eINSERM UMR_S 974, Institut de Myologie, Paris, France

^fCNRS, UMR7215, Institut de Myologie, Paris, France

^gUniversité Pierre et Marie Curie, UM76, Paris, France

^hUniversité Versailles-Saint-Quentin, Versailles, France

ⁱAP-HM, Hôpital d'Enfants de la Timone, Département de Génétique Médicale et de Biologie Cellulaire, Marseille, France

Abstract. Dysferlinopathies are a family of disabling muscular dystrophies with LGMD2B and Miyoshi myopathy as the main phenotypes. They are associated with molecular defects in *DYSF*, which encodes dysferlin, a key player in sarcolemmal homeostasis. Previous investigations have suggested that exon skipping may be a promising therapy for a subset of patients with dysferlinopathies. Such an approach aims to rescue functional proteins when targeting modular proteins and specific tissues.

We sought to evaluate the dysferlin functional recovery following exon 32 skipping in the cells of affected patients. Exon skipping efficacy was characterized at several levels by use of *in vitro* myotube formation assays and quantitative membrane repair and recovery tests. Data obtained from these assessments confirmed that dysferlin function is rescued by quasi-dysferlin expression in treated patient cells, supporting the case for a therapeutic antisense-based trial in a subset of dysferlin-deficient patients.

Keywords: Therapy, membrane, neuromuscular diseases, dysferlinopathy, exon-skipping

INTRODUCTION

Mutations in *DYSF* (MIM# 603009, 2p13, GenBank NM_003494.2) [1, 2], the gene encoding dysferlin,

cause a variety of muscular dystrophies collectively referred to as dysferlinopathies, the most significant of which are LGMD2B (LGMD2B; MIM# 253601) and Miyoshi Myopathy (MM; MIM# 254130) [1, 2].

At the onset of disease, usually in the second decade of life, proximal muscles in LGMD2B and distal muscles in MM are the principal muscle groups to be affected. In the early stages of disease, serum levels of creatine kinase are elevated and the histology appears clearly dystrophic with numerous inflammatory foci. In both phenotypes, most patients present

¹These authors contributed equally to the work presented in this manuscript.

*Correspondence to: Marc Bartoli, "Myologie Translationnelle" Team, Faculté de Médecine de Marseille, Aix Marseille Université, UMR_S 910 "Génétique Médicale et Génomique Fonctionnelle", Marseille, France. Tel.: +33 491 324 906; Fax: +33 491 804 319; E-mail: marc.bartoli@univ-amu.fr.

with generalized muscle weakness after several years of disease progression, though in some cases, the early presentation is a proximo-distal muscle weakness [3]. Nevertheless, scapular winging is uncommon, and cardiac and respiratory complications do not typically develop amid the typical progression of these dysferlinopathies.

Dysferlin interacts with different muscle proteins involved in at least two pathways: membrane repair and myoblast/myotube membrane fusion. The process of membrane repair is now better understood since many actors have been identified at each of the different stages in the process. Among these participating factors, we have found specific types of lipids, sarcolemmal proteins like dysferlin as well as MG53 and annexins, and also muscle ubiquitous protein like calpain 3 [4–12]. The myoblast/myotube fusion, a key process for muscle formation during development and regeneration, is also poorly described but it appears to be associated with a substantial cytoskeletal rearrangement following the recruitment of a large protein network including dysferlin [10, 13–15]. The abnormalities observed in patients carrying function-modifying mutations in *DYSF* demonstrate the crucial role of dysferlin for muscle physiology and functionality.

As for some muscular dystrophies, several therapeutic strategies are currently being evaluated for dysferlinopathies, including gene therapy approaches [6, 16–19]. Based on the promising results of clinical trials for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) using Antisense Oligonucleotide (AON) approaches for exon 51 skipping of the dystrophin pre-mRNA [20–23] (Sarepta therapeutics and BioMarin, Inc., unpublished data), we recently evaluated the feasibility of a similar strategy for application in dysferlinopathies. In contrast to DMD where exon skipping strategies are intended to restore the reading frame (for patients presenting out-of-frame deletions), in dysferlinopathies the aim is to bypass the mutation in exon 32 without altering the reading frame and function. A prior report had described a mildly affected patient with a mutation causing in-frame skipping of exon 32 at one allele (caused by a lariat branch point mutation) together with a null-allele [24]. We considered these data to constitute a “natural” proof of principle than an exon 32-skipping approach could be therapeutic in dysferlinopathies. In a previous study, we were able to demonstrate its efficient skipping in patient cells carrying mutations in this specific exon, and thus demonstrated the feasibility of exon skipping targeting *DYSF* [25]. In the present work, we sought to

characterize the functional recovery following exon 32 skipping in patient cells with the aim of translating our results to future clinical applications. The efficiency of the exon skipping was assessed by immunoblotting and immunochemistry. In addition, based on the role of dysferlin in myotubes, several functional tests were developed to quantify functional recovery. Our results demonstrate for the first time the rescue of dysferlin functions by a quasi-dysferlin generated by exon skipping in patient cells.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The relevant sample was provided, anonymously, by Myobank (Myology Institute) affiliated at EuroBioBank (www.eurobiobank.org). This affiliation certifies that the biopsy was obtained in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki and the directive 2004/23/EC of the European Parliament.

Patients

Patient biopsies were obtained from a patient affected with Miyoshi myopathy: Patient 1 NM_000349.3: c.[3477C>A]+[5979dupA]; p.[Tyr1159*] (stop codon in exon 32)+[Ala1993_Glu1994insArg; Ser1995*] (stop codon in exon 53); and a patient affected with LGMD2B: Patient 2: NM_000349.3: c.[342+1G>A] (intron 4, splicing defect) +[3516_3517delTT]; p.[Ser1173*] (stop codon in exon 32). Mutational data are described using the nomenclature of the Human Genome Variation Society (www.hgvs.org/mutnomen).

Cell cultures

Myoblasts were expanded in Skeletal Muscle Cell Growth Medium (Promocell) adjusted at 20% FBS final, supplemented with 100 µg/ml of gentamycin (Sigma-Aldrich). At confluence, the medium was changed for a differentiation medium based on the Skeletal Muscle Cell Differentiation medium (Promocell) and supplemented with 100 µg/ml of gentamicin, 10 µg/ml of doxycycline (Sigma-Aldrich) and 100 µg/ml of apotransferrin (Sigma-Aldrich). When needed, cells have been differentiated into myotubes, maintained in cell culture supports coated using collagen I (BD Biosciences).

Identification of target sequences for dysferlin exon 32 skipping

Bioinformatics analyses, to find targetable sequences within exon 32 of the DYSF gene and its surrounding intronic sequences, were realized using www.umd.be/HSF/ and <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process5home> [25–27].

AONs and transfection

The antisense oligonucleotides (AONs) used are as follows: AON B 5'-GCGUAGAUGGUAGCGGUUCC-3'; AON D 5'-ACCUACCAGAAAAAGAGUCCUU-3'. AON were synthesized by Eurogentec and contain 2'-O-methyl RNA and full-length phosphorothioate backbones (Figure S1-A). Myoblast cultures were transfected using oligofectamine (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Each AON was transfected one, two or three times at 800 nM every two days starting at day 0 of differentiation. Mock experiments were performed using the transfection reagent (oligofectamine) without AON. Control conditions were tested using a non-specific AON: 5'-GGAUCCCGCUCAGGAGUGCUG-3'. All experiments were conducted 48 hours after last transfection (day 6 of differentiation).

RNA extraction

RNAs were extracted from cultured cells using PureLink™ RNA Mini Kit (Life technologies) and RNA was purified using DNase Free Kit (Life technologies). Five hundred ng of RNA was reverse transcribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Saint Aubin, France) primed by random hexamers according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed with 1 μL of RT-product using primer pairs flanking the targeted exons (Forward: 5'-CCAGGAGCCAGAGATTCG-3' Reverse: 5'-TGCTTTCAATGTCCTCCTTG-3') for 35 cycles. Dysferlin RNA exon skipping was analyzed by classical RT-PCR for AON study. The products of PCR were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with 5% ethidium bromide.

Immunoblot

Detection of dysferlin was performed using the following protocol with primary anti-dysferlin antibodies (NCL-Hamlet 2, Cliniscience) diluted 1:300

or (NCL-Hamlet, Abcam) diluted 1:200 on untreated and treated patient cell protein extracts. Immunoblots were done using a whole protein extract sample prepared in lysis buffer (100 mM Tris buffer at pH 6.8, 4% SDS, 10% glycerol and 1% 2-mercaptoethanol). A 1% reducing agent (Life Technologies) was added and the samples were boiled for ten minutes. 20 μg of sample was loaded onto each lane of a 3–8% NuPage SDS-PAGE (Life Technologies). Proteins were then separated under electrophoresis at 80 volts at room temperature. Proteins were finally transferred onto nitrocellulose membranes (at 260 mA for 2 h at 4°C). Membranes were incubated with blocking buffer (1% non-fat milk powder in TBS-T) for one hour at room temperature. Primary antibodies were then diluted in blocking buffer and incubated with the membranes at room temperature for 1 h, with constant agitation. After washing in TBS-T, membranes were then incubated with the relevant secondary antibodies, which were diluted 1:10,000 in blocking buffer, for one hour at room temperature. The membranes were finally washed in TBS-T and developed using Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). GAPDH (Millipore) was detected using a dilution of 1:10,000.

Immunofluorescence

Cells were grown on Lab-TEK II™ (Fisher Scientific) according to the previously explained protocol. Throughout the procedure, cells were kept at room temperature. After treatment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes and then washed in PBS for 10 minutes. Cells were then incubated for 10 minutes with a permeabilization solution (200 μL of PBS 1X +0.5% triton X-100 + protease inhibitors cocktail) (Roche). From there, cells were exposed to a blocking buffer (PBS+ 1%BSA + protease inhibitors cocktail) for 30 minutes. The primary antibody was applied in blocking buffer for 3 hours at room temperature, followed by one wash in PBS for 10 minutes and 1 hour of contact with the secondary antibody in blocking buffer. After a wash in PBS for 10 minutes, cells were fixed using a 4% paraformaldehyde solution in PBS for 10 minutes, then washed again. Finally, coverslips were mounted with Vectashield-Dapi 25 ng/mL, and kept at 4°C until pictures were taken. Dysferlin was detected using NCL-Hamlet at a dilution of 1:200. Caveolin-3 (BD Biosciences) was detected using a dilution of 1:1,000, and desmin (Fischer Scientific) using a dilution of 1:100. Scale bars are indicated on each picture.

Observation was performed using a Zeiss apotome microscope, and images were processed with AxioVision software and/or ImageJ software.

Membrane wounding assay

To induce damage, an area of the sarcolemma of the myotubes was irradiated at full power for 1 second with a two-photon laser-scanning microscope. The Multi-Photon apparatus consisted of a mode-locked Titanium-Sapphire laser system tuned to a 1035 nm excitation with 100 fs pulses at 76 MHz. The microscope was an inverted LEICA SP3. Images were captured for 3 minutes after the irradiation at 7-second intervals. Images were analyzed with ImageJ software.

Osmotic shock assay

Prior to osmotic shock, myotubes were incubated with 10 μ M calcein-AM and 25 μ g/ml DAPI (Life Technologies) for 20 minutes, followed by washing out the cells with PBS. Hypo-osmotic shock was performed by incubating cells with a differentiation medium diluted appropriately in deionized water [1:9 dilution (complete differentiation medium: H₂O) approximating 30 mOsm hypo-osmotic shocks]. Wide-field epifluorescence microscopy was performed using a 10X 0.3 NA objective and an EMCCD camera (Hamamatsu Photonics) in a Zeiss Axiovert 200 inverted microscope. Cell fluorescence was followed for 450 seconds immediately after medium change to hypo-osmotic medium. Acquisitions were performed with a time interval of 3 seconds. Images were analyzed with ImageJ software. Myotubes were selected as cells containing two or more nuclei as indicated by DAPI staining. Scale bars are indicated on each picture.

Statistical analysis

Individual means were compared using the parametric Student's *t*-test or with the non-parametric Mann-Whitney test. The powers of the tests were strictly superior at 75%. Differences were considered to be statistically significant if $p < 0.01$ and the size of the effect was $>20\%$.

RESULTS

As reported previously, we were able to efficiently bypass exon 32-containing mutations in *DYSF* by use of AONs (Wein et al, 2010). We thus evaluated the efficacy of the AON-induced splicing event on muscle

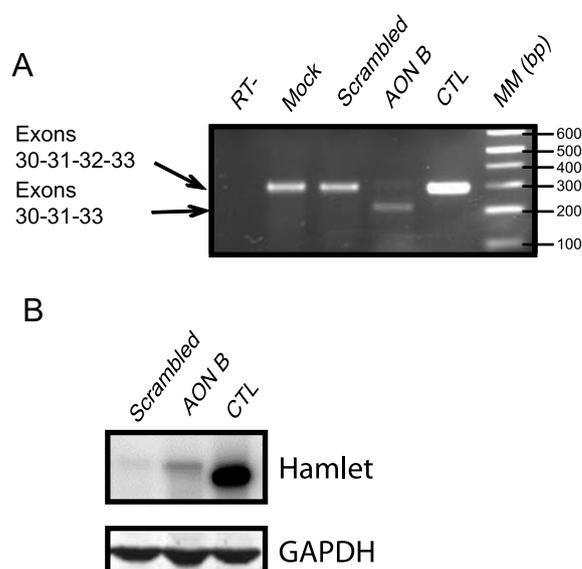


Fig. 1. AON B efficiently skips dysferlin exon 32 in human patient cells. (A) Efficiency of exon skipping using AON B was assessed by RT-PCR on cells from patient 2. PCR was used to amplify the region between exons 31 and 33 (293 bp with or 215 bp without exon 32). RT::negative control of reverse transcription. Mock: negative control of transfection. Scrambled: nonspecific AON sequence. AON B: single transfection of AON B. CTL: positive control, cells were transfected with dysferlin full-length (native dysferlin). MM: molecular marker. (B) Western Blot experiment performed with proteins from (AON B or scrambled) treated patient cells or control cells. Hamlet was used to detect dysferlin and GAPDH was used for normalization.

cells from a control individual. These cells were transfected, using oligofectamine, with two AONs (B and D) (Figure S1A). In mock conditions, the transfection reagent (oligofectamine) without AON was used. RT-PCRs were done using a forward primer at exon 31 and a reverse primer at exon 33. We were able to demonstrate exon 32 skipping by the presence of a 215 bp transcript corresponding to an mRNA deleted of the 78 nucleotides of exon 32. In this experiment both AONs were found to be efficient and were used in all subsequent experiments (Figure S1B). As dysferlin is supposed to be expressed during myotube formation, we chose to perform our AON treatment during the differentiation process. We performed single or multiple treatments (every two days) on cells from Patients 1 and 2, starting at cellular confluence until 6 days of differentiation, when myotubes are present. The presence of a 215 bp band indicated that exon 32 was successfully skipped by both AONs, and exon-exon boundaries were verified (Fig. 1A, Figure S1B-D).

We then determined that the quasi-dysferlin protein generated following the exon 32 skipping is stable in

treated patient cells. The predicted molecular weight of the quasi-dysferlin is close to the full-length isoform, 238 kDa and 241 kDa respectively. In protein extracts from cells treated with AONs B and D, we observed the expression of the quasi-dysferlin (Fig. 1B, Figure S2A). This protein is observed as early as 48 hours after the start of the treatment.

We evaluated the gain of function brought about by the expression of the quasi-dysferlin using different tests. Quasi-dysferlin is present and localized at the plasma membrane of myotubes only in treated patients' cells. Co-localization with caveolin 3 labeling confirmed the membrane targeting of quasi-dysferlin (Fig. 2).

We decided to verify if quasi-dysferlin could restore the myotubes' membrane repair capacities, which is the main function described for dysferlin [4].

We performed membrane wounding/repair assays both on muscle cells obtained from patient 1 as well as controls. To analyze this function we set up a laser wounding assay on *in vitro* culture. The extent of the lesion on myotubes was quantified in the presence of FM 1-43 dye and either with or without calcium as described previously [4, 6, 17]. In this assay, we observed that myotubes treated with AON successfully repaired membrane lesions in the presence of calcium, as seen by the low incorporation of FM1-43,

whereas untreated patient myotubes exhibited a substantial level of incorporation (Fig. 3A). Quantitative analysis confirmed that both AON treatments restored the ability of patient cells to repair their membranes to a level which was similar to that observed in control myotubes (Fig. 3B).

In order to further investigate the function of the quasi-dysferlin, we carried out an osmotic shock assay adapted from a previous study [28]. Hypo-osmotic shock rapidly induces cell swelling which increases the membrane tension, and therefore applies a mechanical stress at the cell surface. Patient and control myotubes were subjected to a 30 mOsm hypo-osmotic shock for 7.5 min. To monitor the integrity of the plasma membrane, we followed the intracellular accumulation of calcein-AM, a cell-permeable non-fluorescent molecule that becomes fluorescent inside intact cells and leaks out of the cells if the plasma membrane is ruptured (Fig. 4A). We could restrict our analysis to fully differentiated myotubes by selecting cells with polynucleated syncytia as revealed by DAPI staining of the nucleus (data not shown). The level of fluorescence is maintained around its initial value in myotubes whose plasma membrane remains intact during osmotic shock. In contrast, cell bursting events lead, in all observed cases, to a ratio signal value that is below 0.5 and therefore represents the bursting

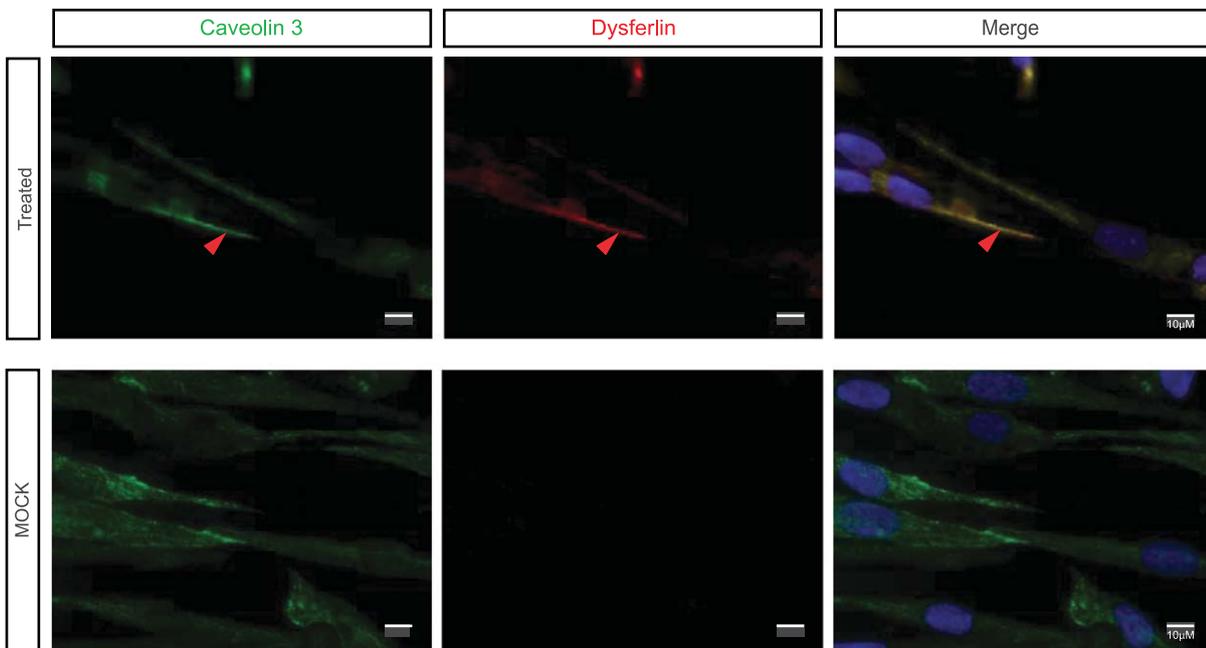
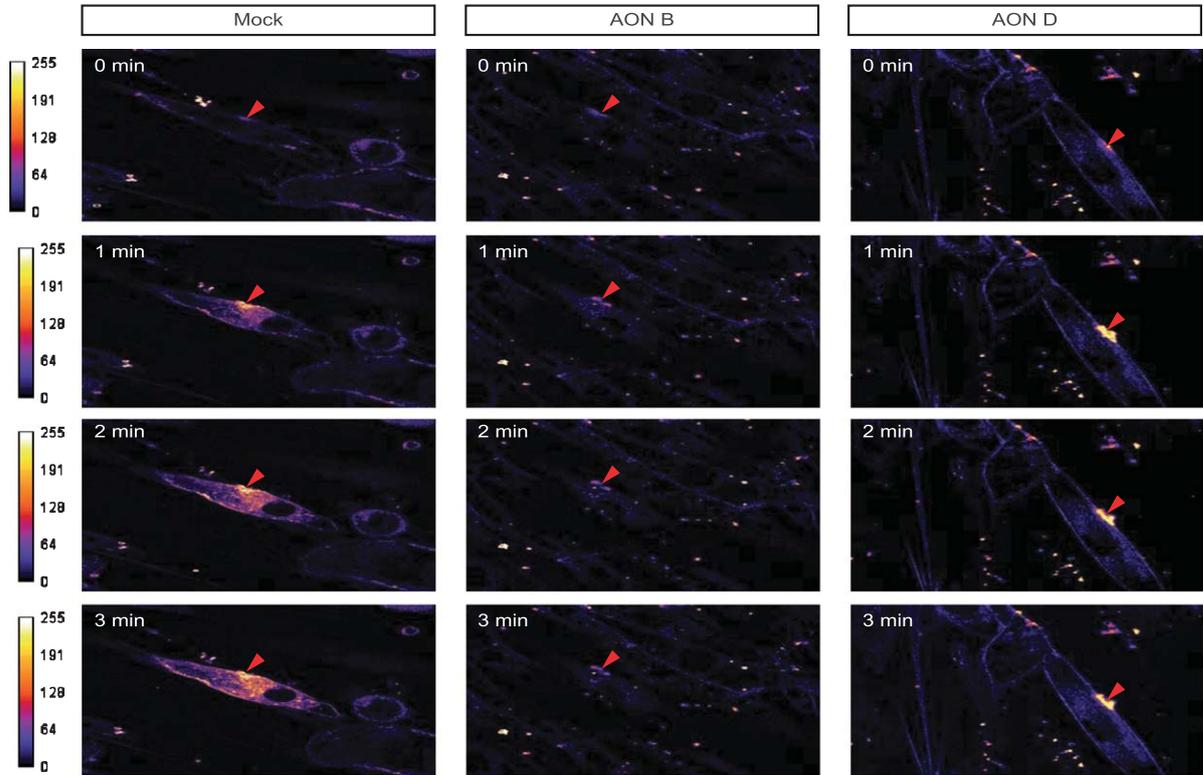


Fig. 2. Exon 32-skipped dysferlin is correctly localized. Caveolin 3 labeling: maturation of myotubes and production of dysferlin were evidenced by Hamlet 1 labeling (Bars = 10 μ m, arrow pointed to colocalized signal). DAPI was used as a nucleus marker. All images were captured by an apotome microscope.

A



B

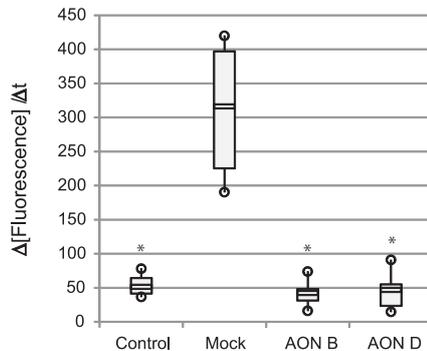


Fig. 3. Quasi-dysferlin increases the membrane repair capacity. (A) Membrane repair consequent to a bi-photon laser injury at the sarcolemma was visualized in presence of FM1-43 dye. Mock treated cells along with AON B and AON D treated cells from patient 1 were compared for three minutes at intervals of 7 seconds. Pictures at 0, 1, 2 and 3 minutes are shown. Arrows indicate the site of lesion. The scale (of false colors used) is represented on the left. (B) Box plots represent the rate of change of fluorescence ($\Delta[\text{fluorescence}]/\Delta t$) in the myotubes from control ($n=9$), mock-treated patient cells ($n=9$), AON B treated patient cells ($n=10$) and AON D treated patient cells ($n=9$). Boxes extend from the 25th to the 75th percentile values. Minimum and maximum values are indicated by the dots at the ends of the vertical lines. Horizontal bars indicate the median value. * $p < 0.01$ compared to mock-treated patient cells.

threshold. Mock-transfected patient myotubes showed a high rate of bursting events (85.2%) compared to control cells (36.5%), in agreement with the known defect of membrane repair observed in these patients (Fig. 4B). One single AON transfection in patient cells

was sufficient to increase membrane integrity since the measured level of bursting was close to that of control myotubes (41.9%) (Fig. 4B). These results show that restoration of dysferlin by AON treatment protects patient cells from mechanical stress. The total number

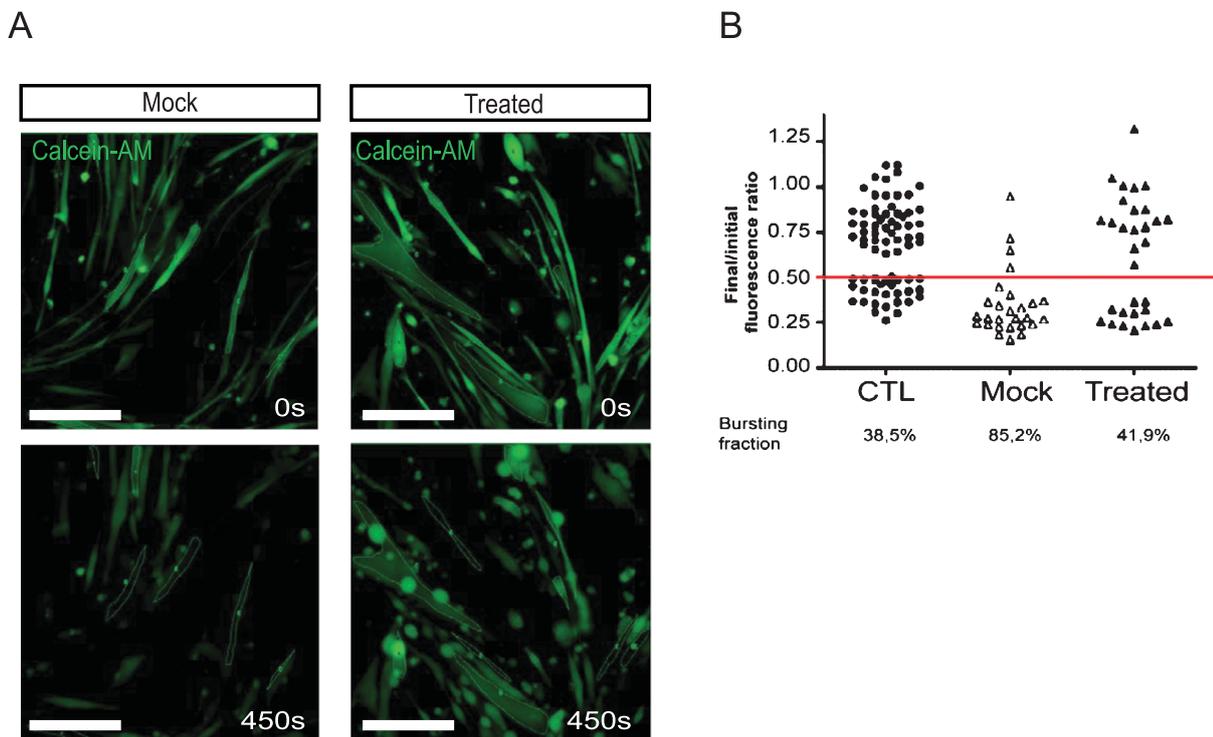


Fig. 4. AON-treated patients cells are resistant to hypo-osmotic shock. (A) Membrane rupture in response to hypo-osmotic shock was assessed using calcein-AM to distinguish between intact and burst cells. Low-magnification epifluorescence snapshots of calcein-AM in mock and treated cells at the beginning ($t=0$ s, top) and at the end ($t=450$ sec, bottom) of the hypo-osmotic shock (Bar = 100 μ m). (B) Plot of final/initial fluorescence intensity ratio for control myotubes (WT, $n=74$, dark dots), for patient 2 myotubes untreated (MOCK, $n=27$, white triangles), treated with AON D ($n=31$, dark triangles) during the hypo-osmotic shock. The bursting fraction corresponds to the cell population whose fluorescence ratio is below the selected bursting threshold. The bursting threshold has been set to 0.5 of normalized fluorescence intensity (horizontal red line).

of nuclei per cells in these experiments was also calculated and represented as a graph in Figure S2B.

DISCUSSION

This study demonstrates the possibility of restoring functionality in dysferlin-deficient human muscle cells by skipping of an exon bearing a deleterious mutation. The functional normalization was obtained using AONs targeting exon 32. Both AONs induced the splicing out of exon 32 and the expression of a deleted isoform of dysferlin in two different patient cell lines. To evaluate the functionality of this isoform, we employed a variety of assays that measure the myoblast/myotube fusion process as well as the membrane repair ability.

In the present study we have improved the skipping efficiency obtained in our previous work [25], by designing the new AON D targeting the splice donor site of exon 32. The skipping efficiency seems

to be quite high, given that almost all the transcripts produced seem to be skipped. This efficiency seems greater than what has been obtained in DMD using a similar AON chemistry [29]. The difference observed here can be explained by several parameters as they were previously discussed [30].

This skipped mRNA was stable enough to produce a quasi-dysferlin deleted of 26-residues, preserving the frame and located at the beginning of the C2D domain. When considering our approach, it can be observed that a discrepancy exists between the high level of exon skipping and the relatively low level of protein expression. This could possibly be attributed to a decrease in the stability between the full-length dysferlin and the quasi-dysferlin deleted of exon 32; this specific issue should be addressed in future experiments. Nevertheless, this low level of quasi-dysferlin expression is sufficient to rescue the membrane repair capacity of treated patient cells, confirming that pivotal aspects of dysferlin function are rescued upon bypassing the mutation in exon 32. Cells in affected patients are

more susceptible to membrane mechanical constraints or at least membrane disorganization. We have shown here that they are more sensitive to a localized lesion or to an increase of membrane tension induced by osmotic pressure. One could hypothesize that this is due to the abnormal recruitment of membrane vesicles at the sarcolemma in the absence of dysferlin. Vesicle recruitment involves various proteins, among them caveolin 3. However we did not detect any difference in caveolin 3 localization after AON treatment. Since we have demonstrated that AON treated patient cells were resistant to both osmotic pressure and sarcolemma lesions, we can hypothesize that this is due to the proper recruitment of membrane vesicles at the sites of injury.

It has been proposed that dysferlin could induce membrane blebbing on cells consequent to a hypo-osmotic shock; these blebs probably result from the rapid membrane surface increase and variations of membrane tension [5, 9, 31]. Absence of dysferlin could impair this mechanism. Based on these observations, we set up a test to follow and quantify the resistance of myotubes to increased membrane tension induced by hypo-osmotic shock in defined time bands. To resist the membrane tension, cells augment the surface of their sarcolemma by the recruitment of additional membrane from reservoirs. These membrane reservoirs could be either vesicles or large invaginations of sarcolemma that could be reorganized by the protein complex involving dysferlin [5, 7, 9–11, 28, 32]. Altogether, this hypothesis can explain how dysferlin-positive myotubes accommodate acute mechanical stresses and are in accordance with previously published data from other groups [4, 8, 31, 33].

Our results establish a proof of concept for exon skipping as a therapeutic perspective for dysferlinopathies. Another group has also demonstrated that a mutant dysferlin pseudoexon could be skipped [34]. Such an approach has already been successfully applied in the case of DMD. After the encouraging results obtained in two independent phase II/III clinical trials for the skipping of dystrophin exon 51 [20–22, 35], BioMarin is moving forward with market authorization for applications involving the skipping of this exon using Drisapersen (Food and Drug Administration approval has been given and European Medicines Agency approval is still under review). Meanwhile, Sarepta is currently extending a phase II/III trial (NTC02255552) using Eteplirsén. In addition, phase II clinical trials are ongoing for exons 44, 45 and 53 using 2'-*O*-methyl chemistry and for exon 53 using PMO chemistry [36].

Dysferlin exon 32 encodes the N-terminal portion of the C2D domain, therefore deletion of exon 32 would most likely lead to loss of function of the entire domain without major consequences [24, 37]. The C2D domain is composed of the exons 31, 32, 33 and 34 whose deletion would maintain the open reading frame of dysferlin mRNA. In addition to dysferlin exon 32, the skipping of exon 34 has also been reported from control cells [38]. It would therefore be feasible to attempt multiple exon skipping so as to bypass the entire C2D domain of dysferlin using the previously validated AONs. These methods of multiple exon skipping have already been used with success in DMD treatment for the simultaneous skipping of at least 6 consecutive exons [39–51]. Exon skipping could also be used to remove pseudoexons. Recently, a mutation creating a pseudoexon between exons 44 and 45 of *DYSF* has been identified [34, 46]. Exon skipping using an AON targeting this pseudoexon restored a normal mRNA and increased dysferlin expression, opening the way for such an approach in dysferlinopathies [34].

Although some improvements may be necessary to bring about more routine use of AON-based therapies, rapid advances being made for DMD will certainly apply to other rare muscle disorders, and will allow a rapid translation of proof of principle into clinical applications in the future. At least a subset of 20 patients (with 6 different truncating mutations) should thus benefit from antisense-induced exon 32 skipping.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge Danielle Depetris for technical assistance and J. Wes Ulm for proofreading. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Pierre et Marie Curie (UPMC), PPMD, MyoAge (EC 7th FP, contract 223576 to GBB) and the Jain Foundation. N.W. and F.B. have received PhD fellowship grants from the AFM and Fondation pour la Recherche Médicale respectively. YM has a fellowship grant from the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013/NEUROMICS) under grant agreement n° 2012-305121.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

MB, MK, LG and NL have a patent for dysferlin exon 32 skipping (#US20120208865).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary table and figure are available in the electronic version of this article: <http://dx.doi.org/10.3233/JND-150109>.

REFERENCES

- [1] Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, Lako M, et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet.* 1998;20(1):37-42. Epub 1998/09/10.
- [2] Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1998;20(1):31-6. Epub 1998/09/10.
- [3] Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforet P, Labelle V, et al. Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: High frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol.* 2007;64(8):1176-82. Epub 2007/08/19.
- [4] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, Williamson R, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature.* 2003;423(6936):168-72. Epub 2003/05/09.
- [5] Defour A, Van der Meulen JH, Bhat R, Bigot A, Bashir R, Nagaraju K, et al. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1306. Epub 2014/06/27.
- [6] Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courrier S, Bourg-Alibert N, et al. A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci Transl Med.* 2010;2(50):50ra69. Epub 2010/09/24.
- [7] Lek A, Evesson FJ, Lemckert FA, Redpath GM, Lueders AK, Turnbull L, et al. Calpains, cleaved mini-dysferlinC72, and L-type channels underpin calcium-dependent muscle membrane repair. *J Neurosci.* 2013;33(12):5085-94. Epub 2013/03/22.
- [8] Marg A, Schoewel V, Timmel T, Schulze A, Shah C, Daumke O, et al. Sarcolemmal repair is a slow process and includes EHD2. *Traffic.* 2012;9999(9999). Epub 2012/06/12.
- [9] McDade JR, Archambeau A, Michele DE. Rapid actin-cytoskeleton-dependent recruitment of plasma membrane-derived dysferlin at wounds is critical for muscle membrane repair. *Faseb J.* 2014;28(8):3660-70. Epub 2014/05/03.
- [10] Posey AD, Jr., Pytel P, Gardikiotes K, Demonbreun AR, Rainey M, George M, et al. Endocytic recycling proteins EHD1 and EHD2 interact with *fer-1*-like-5 (*Fer1L5*) and mediate myoblast fusion. *J Biol Chem.* 2011;286(9):7379-88. Epub 2010/12/24.
- [11] Redpath GM, Woolger N, Piper AK, Lemckert FA, Lek A, Greer PA, et al. Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair. *Mol Biol Cell.* 2014;25(19):3037-48. Epub 2014/08/22.
- [12] Roche JA, Lovering RM, Roche R, Ru LW, Reed PW, Bloch RJ. Extensive mononuclear infiltration and myogenesis characterize recovery of dysferlin-null skeletal muscle from contraction-induced injuries. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298(2):C298-312. Epub 2009/11/20.
- [13] de Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, de la Torre C, Rojas-García R, et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro". *J Biol Chem.* 2006;281(25):17092-8. Epub 2006/04/13.
- [14] Demonbreun AR, Fahrenbach JP, Deveaux K, Earley JU, Pytel P, McNally EM. Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2011;20(4):779-89. Epub 2010/12/04.
- [15] Balasubramanian A, Kawahara G, Gupta VA, Rozkalne A, Beauvais A, Kunkel LM, et al. *Fam65b* is important for formation of the HDAC6-dysferlin protein complex during myogenic cell differentiation. *Faseb J.* 2014;28(7):2955-69. Epub 2014/04/02.
- [16] Grose WE, Clark KR, Griffin D, Malik V, Shontz KM, Montgomery CL, et al. Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PLoS One.* 2012;7(6):e39233. Epub 2012/06/22.
- [17] Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, Bentaib A, Miyake K, et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet.* 2010;19(10):1897-907. Epub 2010/02/16.
- [18] Philippi S, Lorain S, Beley C, Peccate C, Precigout G, Spuler S, et al. Dysferlin rescue by spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing targeting introns harbouring weakly defined 3' splice sites. *Hum Mol Genet.* 2015. Epub 2015/04/24.
- [19] Sondergaard PC, Griffin DA, Pozsgai ER, Johnson RW, Grose WE, Heller KN, et al. AAV-Dysferlin overlap vectors restore function in dysferlinopathy animal models. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2015;2(3):256-70. Epub 2015/03/31.
- [20] Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, et al. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: An open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet.* 2011;378(9791):595-605. Epub 2011/07/26.
- [21] van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, et al. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 2007;357(26):2677-86. Epub 2007/12/28.
- [22] Voit T, Topaloglu H, Straub V, Muntoni F, Deconinck N, Campion G, et al. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): An exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol.* 2014;13(10):987-96. Epub 2014/09/12.
- [23] Flanigan KM, Voit T, Rosales XQ, Servais L, Kraus JE, Wardell C, et al. Pharmacokinetics and safety of single doses of drisapersen in non-ambulant subjects with Duchenne muscular dystrophy: Results of a double-blind randomized clinical trial. *Neuromuscul Disord.* 2014;24(1):16-24. Epub 2013/12/11.
- [24] Sinnreich M, Therrien C, Karpati G. Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology.* 2006;66(7):1114-6. Epub 2006/04/12.
- [25] Wein N, Avril A, Bartoli M, Beley C, Chaouch S, Laforet P, et al. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum Mutat.* 2010;31(2):136-42. Epub 2009/12/03.
- [26] Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3568-71. Epub 2003/06/26.
- [27] Desmet FO, Beroud C. Bioinformatics and mutations leading to exon skipping. *Methods Mol Biol.* 2012;867:17-35. Epub 2012/03/29.

- [28] Sinha B, Koster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*. 2011;144(3):402-13. Epub 2011/02/08.
- [29] Aartsma-Rus A, Kaman WE, Bremmer-Bout M, Janson AA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, et al. Comparative analysis of antisense oligonucleotide analogs for targeted DMD exon 46 skipping in muscle cells. *Gene Ther*. 2004;11(18):1391-8. Epub 2004/07/02.
- [30] Aartsma-Rus A. Overview on DMD exon skipping. *Methods Mol Biol*. 2012;867:97-116. Epub 2012/03/29.
- [31] Wang B, Yang Z, Brisson BK, Feng H, Zhang Z, Welch EM, et al. Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression. *J Appl Physiol*. 2010;109(3):901-5. Epub 2010/06/19.
- [32] Oulhen N, Onorato TM, Ramos I, Wessel GM. Dysferlin is essential for endocytosis in the sea star oocyte. *Dev Biol*. 2014;388(1):94-102. Epub 2013/12/26.
- [33] Kerr JP, Ziman AP, Mueller AL, Muriel JM, Kleinhans-Welte E, Gumerson JD, et al. Dysferlin stabilizes stress-induced Ca²⁺ signaling in the transverse tubule membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(51):20831-6. Epub 2013/12/05.
- [34] Dominov JA, Uyan O, Sapp PC, McKenna-Yasek D, Nallamilli BR, Hegde M, et al. A novel dysferlin mutant pseudoexon bypassed with antisense oligonucleotides. *Annals of clinical and translational neurology*. 2014;1(9):703-20. Epub 2014/12/11.
- [35] Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhardt PF, Heuvelmans N, et al. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*. 2011;364(16):1513-22. Epub 2011/03/25.
- [36] Arechavala-Gomez V, Anthony K, Morgan J, Muntoni F. Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for duchenne muscular dystrophy: Progress and challenges. *Curr Gene Ther*. 2012;12(3):152-60. Epub 2012/04/27.
- [37] Azakir BA, Di Fulvio S, Salomon S, Brockhoff M, Therrien C, Sinnreich M. Modular dispensability of dysferlin's C2 domains reveals rational design for mini-dysferlin molecules. *J Biol Chem*. 2012. Epub 2012/06/28.
- [38] Aartsma-Rus A, Singh KH, Fokkema IF, Ginjaar IB, van Ommen GJ, den Dunnen JT, et al. Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies? *Eur J Hum Genet*. 2010;18(8):889-94. Epub 2010/02/11.
- [39] Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, van Ommen GJ, den Dunnen JT, et al. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet*. 2004;74(1):83-92. Epub 2003/12/19.
- [40] Goyenvalle A, Wright J, Babbs A, Wilkins V, Garcia L, Davies KE. Engineering multiple U7snRNA constructs to induce single and multiexon-skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*. 2012;20(6):1212-21. Epub 2012/02/23.
- [41] Echigoya Y, Yokota T. Skipping multiple exons of dystrophin transcripts using cocktail antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2014;24(1):57-68. Epub 2014/01/02.
- [42] Adkin CF, Meloni PL, Fletcher S, Adams AM, Muntoni F, Wong B, et al. Multiple exon skipping strategies to bypass dystrophin mutations. *Neuromuscul Disord*. 2012;22(4):297-305. Epub 2011/12/21.
- [43] Beroud C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, Hamroun D, Humbertclaude V, Monnier N, et al. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat*. 2007;28(2):196-202. Epub 2006/10/17.
- [44] Aartsma-Rus A, Kaman WE, Weij R, den Dunnen JT, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Exploring the frontiers of therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy by double targeting within one or multiple exons. *Mol Ther*. 2006;14(3):401-7. Epub 2006/06/07.
- [45] Gualandi F, Trabanelli C, Rimessi P, Calzolari E, Toffolatti L, Patarnello T, et al. Multiple exon skipping and RNA circularisation contribute to the severe phenotypic expression of exon 5 dystrophin deletion. *J Med Genet*. 2003;40(8):e100. Epub 2003/08/16.
- [46] Kergourlay V, Rai G, Blandin G, Salgado D, Beroud C, Levy N, et al. Identification of splicing defects caused by mutations in the dysferlin gene. *Hum Mutat*. 2014;35(12):1532-41. Epub 2014/10/15.

Conclusion

Les variations de séquence qui se produisent dans le génome sont la base des mécanismes mis en place pour favoriser l'évolution des espèces. Cependant, certaines d'entre elles peuvent conduire à l'émergence de pathologies. Comme je l'ai montré tout au long de ma thèse, les mutations peuvent se présenter sous des formes très variées et s'exprimer de manière extrêmement différente. Cela fait bien longtemps que les idées simplistes selon lesquelles « une maladie génétique est toujours due à la mutation du même gène » ou, qu'à l'inverse, « toutes les mutations retrouvées dans un gène sont responsables de la même maladie » ont été balayées d'un revers de blouse. En effet, la complexité des maladies génétiques est telle, qu'il y en a encore beaucoup pour lesquelles les gènes responsables et/ou les mécanismes pathologiques mis en jeu n'ont pas encore été découverts ou compris.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur le cas des maladies neuromusculaires et de manière plus ciblée, sur quatre myopathies distinctes ayant pour points communs une perte de force musculaire, un confort de vie diminué et une absence de solution thérapeutique. Etudier des mécanismes pathologiques de survenue, d'impact et d'expression très différents, m'a permis d'explorer un vaste champ biologique allant de la détermination du rôle physiopathologique d'un gène dans une maladie génétiquement mal comprise, au développement d'un outil thérapeutique dans une autre, en passant par l'étude de la pathogénicité des mutations sur l'épissage des ARNs et la fonctionnalité des protéines.

La dystrophie facio-scapulo-humérale (FSHD) est un très bon exemple pour illustrer la complexité pathologique. Elle met au défi les chercheurs de comprendre quelles parts d'implication ont les mécanismes épigénétiques, les facteurs de transcription embryonnaires et les protéines responsables de la mise en place de l'architecture tissulaire, dans la survenue de la maladie. Sa compréhension nécessite aussi de prendre en compte le rôle de gènes qui viennent moduler l'effet de la maladie comme c'est le cas de *SMCHD1*. Selon le statut génétique des patients, *SMCHD1* a un impact pathogène différent. Lorsqu'il est muté chez les individus FSHD1, il participe à l'aggravation de la maladie mais n'est pas responsable de sa survenue. Il agit donc comme un gène modificateur dans cette sous-population. A l'inverse, chez les patients FSHD2, il doit nécessairement être muté et combiné à la présence d'un haplotype permissif 4q qui induit l'expression de *DUX4* pour que la maladie se développe. Dans ce cas, son statut génique est modifié, il n'agit plus comme gène modificateur sur la pathologie mais plutôt comme un gène causal d'une maladie digénique, en association avec *DUX4*.

L'émergence actuelle de toutes les techniques de séquençage nouvelle génération (NGS) facilite déjà grandement l'identification de nouvelles mutations exoniques et de nouveaux gènes chez des patients n'ayant reçu jusqu'ici, qu'un diagnostic clinique.

Néanmoins, comme nous l'avons montré dans notre étude effectuée sur une cohorte de malades souffrant de myopathies distales, l'étude des substitutions de l'ensemble des séquences codantes ne permet pas de poser un diagnostic certains dans tous les cas. Cependant, lorsque la technique est mise en place en routine, l'exploitation des données qu'elle génère peut permettre de détecter les délétions ou les répétitions de fragments de gènes, comme nous l'avons montré avec notre patiente porteuse d'une délétion de trois exons dans le gène *CAPN3* (figure 76).

En revanche, le séquençage ne dispense pas d'effectuer les tests fonctionnels qui confirment l'implication des mutations dans les pathologies étudiées. En effet, sans ces expériences, rien ne permet d'affirmer ou d'infirmer que la mutation mise en évidence lors du séquençage est causale ou s'il s'agit d'un polymorphisme. J'en veux pour preuve toutes les erreurs que l'on retrouve dans les bases de données comme dbSNP, créées dans le but de répertorier toutes les mutations pathogènes identifiées dans de nombreuses maladies. Pendant des années, il suffisait qu'une variation nucléotidique soit trouvée avec une fréquence faible dans un gène causal connu (nous recherchions l'absence de cette variation sur une centaine de chromosomes) pour la répertorier comme pathogène. Aucune preuve fonctionnelle n'était apportée pour valider son caractère morbide. Pour des raisons similaires, des mutations pathogènes pouvaient être considérées, à tort, comme des polymorphismes lorsqu'elles étaient identifiées dans un nombre trop élevé d'individus. Encore une fois, aucun test n'était effectué pour le prouver. C'est cette absence de validation fonctionnelle qui est responsable aujourd'hui du taux d'erreur élevé retrouvé dans ces répertoires de mutations et de leur manque de fiabilité, et ce même dans des bases de données curées manuellement.

Pour ces raisons, je pense que les outils permettant d'analyser les effets des mutations sur l'ARN (comme les test « minigène »), peuvent facilement trouver leur place en complément des études génétiques de nouvelle génération. Ils seraient utilisés pour confirmer des mutations détectées en NGS et supposées responsables d'un épissage aberrant, comme nous l'avons fait pour la mutation dans l'exon 3 du gène *CAPN3* retrouvée chez une patiente de notre cohorte.

Les résultats que j'ai obtenus suite à l'étude des mutation faux-sens retrouvées dans le gène *CAPN3*, viennent appuyer un peu plus l'idée que, pour améliorer le diagnostic de nombreuses maladies génétiques, il est indispensable d'étudier la pathogénicité des mutations et non la fréquence avec laquelle elles sont retrouvées. Ainsi, il faut investiguer à part égale, les étapes de maturation des ARNs et celles de traduction protéique.

Trop peu de recherches sont actuellement menées sur l'impact des mutations faux-sens sur l'épissage alors que le phénomène est fréquent. Mes travaux et ceux que d'autres chercheurs ont menés sur le sujet le démontrent bien.

La spécificité des mutations faux-sens réside dans leur capacité à modifier la protéine à différents niveaux : elles peuvent aussi bien être responsables d'aberration d'épissage que d'altération de fonctionnalité protéique. Comme je l'ai suggéré précédemment, pour définir si le défaut génétique s'exprime lors de l'épissage, l'idéal serait d'effectuer des études de « RNAseq » sur des biopsies de patients. Cependant, si un prélèvement tissulaire est fréquemment réalisé dans le cadre des myopathies, ce n'est pas toujours le cas dans d'autres pathologies. Selon les organes touchés par la maladie, il est difficile ou dangereux d'obtenir un échantillon de tissus pour réaliser ces tests. Une alternative facilement envisageable pour pallier ce problème serait de développer en routine, des tests « minigène » comme ceux que j'ai réalisés. J'ai constaté dans mes travaux que pour se placer dans des conditions d'études optimales, il est préférable que ces expériences soient réalisées dans des cellules provenant d'un tissu identique à celui lésé dans la maladie. Néanmoins, s'il s'avère que de telles cellules ne sont pas disponibles, le fait de réaliser les manipulations sur des modèles cellulaires classiquement utilisés (HEK293, HeLa) permettrait tout de même de fournir des informations précieuses quant à la pathogénicité des mutations trouvées.

Malgré l'évolution des outils et l'augmentation du nombre de techniques existantes pour étudier les mutations et mimer les mécanismes physiopathologiques qu'elles provoquent, mes recherches m'ont montrée que d'importantes difficultés demeurent encore aujourd'hui pour expliquer la survenue de la maladie. A cela s'ajoute une riche hétérogénéité mutationnelle et de grandes variabilités phénotypiques parfois observées dans une même pathologie. Cela montre bien que le nombre de paramètres entrant en jeu dans l'émergence des maladies est trop important pour qu'une étude les appréhende tous dans sa globalité.

Le cas des quatre familles porteuses de mutations dans le gène *STIM1* doit continuer à être investigué pour essayer de comprendre pourquoi tous les individus d'une même famille sont quasiment asymptomatiques. Il faudrait pouvoir synthétiser les différentes protéines dans leur intégralité pour trouver à quel niveau les mutations impactent la protéine et donner une explication à une si grande variabilité phénotypique. Elles pourraient être responsables de modifications d'affinité pour des molécules partenaires comme de la formation d'hétérodimères sauvage/muté ou d'homodimères muté/muté qui modifieraient les interactions entre *STIM1* et *ORAI1*.

En dehors des modifications protéiques, un autre phénomène pourrait expliciter la différence de phénotypes observée : le fait que les trois individus asymptomatiques marseillais soient tous militaires de carrière. Etant donné qu'ils pratiquent un entraînement physique intense les obligeant à utiliser leur réserve calcique musculaire plus fréquemment que d'autres personnes, cela pourrait prévenir le développement de la pathologie. Qu'advient-il lorsqu'ils arrêteront de pratiquer une activité physique aussi soutenue ? La maladie s'installera-t-elle à ce moment-là ?

Finalement, le problème de l'hétérogénéité des mutations et de leurs conséquences physiopathologiques touche également le domaine de la recherche thérapeutique. Parce que ces variations morbides ne s'expriment pas de la même manière selon les individus et selon les gènes qu'elles touchent, il n'y aura jamais une seule thérapie qui conviendra pour soigner tous les malades. Il semble de plus en plus probable que l'on doive se diriger vers le développement de thérapies « à la carte », propre à chaque malade.

Nous l'avons vu, de nombreux systèmes sont actuellement développés pour essayer de pallier l'évolution des maladies génétiques. Les travaux que j'ai conduits sur la mise au point de molécules thérapeutiques délivrées par *trans-splicing* ou sur le saut d'exon, laissent tout de même entrevoir des solutions pour parer l'évolution des maladies et améliorer le confort de vie des patients.

Matériels et Méthodes

I. Etude de l'implication du gène FAT1 dans la dystrophie Facio-Scapulo-Humérale

1. Principe du test minigène

Pour chaque mutation, deux plasmides ont été construits : l'un comportant l'exon d'intérêt sauvage encadré de chaque côté par 150 pb introniques, l'autre identique, à la différence que l'exon intégré est porteur de la mutation. Chaque plasmide est transfecté dans des cellules HEK puis les cellules sont récupérées, les ARNs totaux sont extraits et une RT-PCR est réalisée (figure 79).

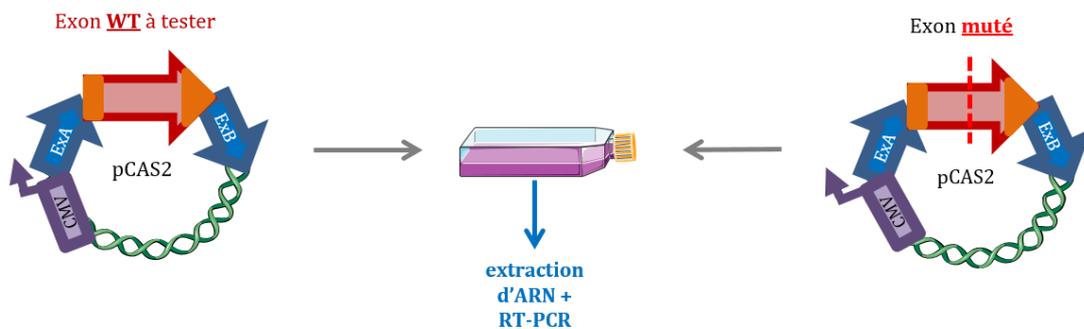


Figure 79 : principe du test minigène

L'impact des quatre mutations sur l'épissage de FAT1 a été analysé grâce à un minigène rapporteur.

Pour chaque condition, une construction pCAS2 contenant l'exon muté et une contenant l'exon sauvage a été transfecté dans des cellules HEK293. Les analyses ARN par RT-PCR ont été effectuées 24 heures après transfection.

Se reporter à la section matériels et méthodes de l'article.

II. Amélioration du diagnostic dans la LGMD2A : Etude de l'impact de mutations faux-sens sur l'épissage de CAPN3

1. Choix des mutations

Les mutations testées sont référencées dans la base de données « Leiden Open Variation Database » (http://www.dmd.nl/nmdb2/home.php?select_db=CAPN3) à l'exception de la mutation c.551C>T qui a été identifiée chez des patients de l'hôpital de la Timone à Marseille.

2. Etudes in silico

Les études de prédiction de pathogénicité des mutations sur l'épissage ont été effectuées en utilisant le logiciel Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>). La base de données « ExAC » (*Exome Aggregation Consortium*) a été utilisée pour vérifier la fréquence des mutations si elles y étaient répertoriées (<http://exac.broadinstitute.org/>).

Le transcrit utilisé pour ces prédictions est le transcrit principal ENST00000397163.7.

3. Clonage des exons de CAPN3 dans les plasmides pCAS2

La majorité des plasmides utilisés dans l'étude ont été produits par l'entreprise « Clinisciences ». Les autres ont été produits en suivant de la même manière que ceux utilisés pour les tests effectués sur le gène FAT1 (Puppo, Dionnet et al., 2015).

4. Etudes in cellulo

4.1. Cultures cellulaires

Les cellules HEK293T (*Human Embryonic Kidney*) et C2C12 (cellules murines) sont cultivées dans un milieu composé de DMEM-glutamax à 4.5g/L de glucose (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplémenté avec 10% de Sérum de veau fœtal (FBS) (Eurobio, Montpellier, France) et 1% de PSA (pénicilline, Streptomycine, Amphotéricine). Les cellules HEK et C2C12 ont été achetées auprès de la banque de cellule ATCC.

4.2. Transfections cellulaires

Les cellules HEK293T sont transfectées avec de la *promofectine* (Promokine, Heidelberg, Germany) et maintenues en culture 48h après transfection.

Les transfections dans les cellules C2C12 sont effectuées sur les cellules en suspension avec le kit de « *magnetofectamine transfection kit* » (Ozbiosciences, Marseille, France).

5. Etudes Transcriptionnelles

5.1. Extraction d'ARN et Traitement DNase

Les extractions d'ARNs sont réalisées en suivant les protocoles des kits « PureLink RNA Mini Kit » (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Après extraction, ils sont dosés au nanodrop.

5.2. RT-PCR, PCR et Séquençage

Les RT-PCR sont effectuées avec la « *SuperScript III One-step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase* » (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), suivant les indications du kit. Les amorces sens, 5' TGACGTCGCCGCCATCAC 3' et antisens 5'ATTGGTTGTTGAGTTGGTTGTC 3' utilisées pour la RT-PCR sont respectivement localisées dans les exons A et B de pCAS2.

Les amplicons de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% comportant 2% de bromure d'éthidium. L'étape additionnelle de purification sur gel est réalisée avec le kit « *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* » (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Un sous-clonage dans le « *pGEM®-T Easy Vector System I* » (Promega) est effectué quand de faibles quantités d'ADNs sont obtenues.

Finalement, le séquençage est effectué en utilisant le « *Big Dye R Terminator V1-1 Cycle Sequencing Kit* » (Life Technologies).

III. Mutations dans le gène *STIM1*, quelles conséquences sur la protéine ?

1. Production des constructions *STIM1*

Les protocoles utilisés pour produire les différentes constructions protéiques dans les bactéries, réalisées les colonnes de purification de chitine et effectuer les dialyses de protéines sont disponibles dans les annexes de ce manuscrit.

Le *design* des amorces utilisées pour amplifier la séquence d'intérêt de *STIM1* a été fait en suivant les instructions délivrées par le manuel de l'impact kit (promega).

IV. Mise au point d'un outil thérapeutique par technique de « *Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing* » (SMaRT) dans le cadre des dysferlinopathies

Les séquences des deux PTM ont été synthétisées par l'entreprise « Clinisciences ».

Les cellules C2C12 (cellules murines) sont cultivées dans un milieu composé de DMEM-glutamax à 4.5g/L de glucose (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplémenté avec 10% de Sérum de veau fœtal (FBS) (Eurobio, Montpellier, France) et 1% de PSA (pénicilline, Streptomycine, Amphotéricine). Les cellules HEK et C2C12 ont été achetées auprès de la banque de cellule ATCC.

Les transfections dans les cellules C2C12 sont effectuées sur les cellules en suspension avec le kit de « *magnetofectamine transfection kit* » (Ozbiosciences, Marseille, France).

V. Confirmation du statut pathogène de mutations CAPN3 découvertes par séquençage haut débit

Se reporter à la section matériels et méthodes de l'article.

VI. Récupération de la capacité de réparation membranaire portée par la dysferline après saut de l'exon 32

Se reporter à la section matériels et méthodes de l'article.

ANNEXE 1 : Protocole Impact Kit : production et purification de protéines

NB : Protocole à suivre une fois les mises aux points des conditions d'induction (température, concentration en IPTG...) et les tests de solubilité effectués.

I. Production des protéines dans les bactéries

1. Transformation des bactéries T7 Express lysY/Iq Competent E.coli (High efficiency) [NEB C3013I] avec les plasmides d'intérêt.

Repiquer une colonie isolée sur une boîte fraîchement étalée et mettre en **culture** dans **10 ml de LB+ampi** [$C_f=100\mu\text{g/ml}$].

Incuber O/N à 37°C sous agitation.

Placer à l'étuve 200ml de LB par construction (pour qu'il soit chaud au moment de l'utilisation le lendemain)

1.1. Induction à l'IPTG : production des protéines

Le lendemain, **centrifuger** les bactéries à **5000g 10'**, les **resuspendre** dans **200ml de LB chaud** (37°C) supplémenté extemporanément en **antibiotique** [$C_f=100\mu\text{g/ml}$].

Incuber à 37°C sous agitation en effectuant des **mesures de la DO** à intervalle régulier.

Quand **0,5 < DO < 0,6** ; **prélever un échantillon de 1,5ml de milieu**. On le conservera et utilisera comme contrôle neg « échantillon non induit ».

↳ **ALIQUOT 1**

Induire à l'**IPTG** [$C_f=1\text{mM}$] les **200ml** de bactéries.

NB : environ 240 μL d'IPTG pour 200ml de bactéries.

Incuber 2-4h à 37°C sous agitation.

Après 3h, **prélever un échantillon de 0,5ml de milieu** pour chaque culture.

↳ **ALIQUOT 2**

Distribuer les 200ml restant dans des **Falcon 50** et **centrifuger** les bactéries à **5000g, 15'** à **4°C**.

CONSERVER LES CULOTS à -80°C, jeter le surnageant.

1.2. Extraction et purification des protéines

Préparer les colonnes de chitine (30 minutes de repos nécessaire, voir proto spécifique des colonnes).

En général, pour **1L** de culture bactérienne, utiliser **10ml** de **chitin beads** (ou **20ml** de chitin beads **slurry**).

Resuspendre les culots dans le COLUMN BUFFER pré-refroidi (100ml de buffer pour 1L de culture bactérienne).

Mesurer la turbidité du milieu au spectromètre à 600nm

Lyser les bactéries **par sonication** 10 minutes au bioruptor (10 minutes, 30s ON / 30s OFF)

Nouvelle mesure de DO pour évaluer le nombre de bactéries non lysées encore présentes dans le milieu

Refaire une série de sonication et mesures de DO pour comparer la différence de turbidité et évaluer si nécessaire de soniquer plus

Centrifuger à 15000g, 30' à 4°C.

Prélever un échantillon de 0,2ml de surnageant pour chaque culture.

∨ **ALIQUOT 3**

Conserver les culots à -20°C.

Passage sur colonne

Laver chaque colonne avec **50ml** de column buffer (soit l'équivalent de 10x le volume de la colonne)

Charger le surnageant protéique sur la colonne, la vitesse d'élution ne doit pas dépasser 0,5-1 ml/min.

Prélever un échantillon de 0,2ml de « flow through » pour chaque culture. Il sera comparé à l'éluât final pour évaluer l'efficacité de liaison, sur la chitine, de la protéine de fusion via son CBD (Chitin Binding Domain). (Si des protéines de fusion sont retrouvées dans le flow through, il faudra augmenter la quantité de résine ou diminuer la vitesse de chargement de la colonne)

∨ **ALIQUOT 4**

Laver la colonne : faire passer l'équivalent de **20 volumes morts** de column buffer.

Comme le CBD de la protéine est très affin à la chitine, la vitesse d'élution peut être augmentée à 2 ml/min tout comme la stringence de la solution (0,5-1M NaCl ± détergents non ioniques).

Prélever un échantillon de 0,5ml d'éluat lors du dernier lavage.

∨ ALIQUOT 5

1.3. Induction de la coupure sur colonne

La coupure va être induite par un réactif « thiol »

Avt d'induire la coupure en ajoutant le cleavage buffer, **prélever un échantillon de 0.1ml de résine** (mélanger avec 50µl de 3X SDS sample buffer, contrôle avt coupure)

∨ ALIQUOT 6

Rincer la colonne « rapidement » avec l'équivalent de **3 volumes morts** de **CLEAVAGE BUFFER**

Attention, le pH du buffer peut jouer sur l'efficacité de coupure

Prélever un échantillon de 0,5ml d'éluat lors du dernier lavage.

∨ ALIQUOT 7

Après le rinçage rapide, **stopper le flux en bouchant la colonne** et **incuber** selon les indications du tableau ci-dessous :

Pour pTXB1 – STIM1 : **Incubation 16 – 40h à 23°C** (dernier aa : Lysine (Lys, K))

Effect of C-terminal residue of a target protein on DTT-induced cleavage with pTXB1	% cleavage after 16 hours		% cleavage after 40 hours	
	4°C	23°C	4°C	23°C
C-terminal residue of the target protein				
Tyr – Phe – Gln – Asn – Thr – Lys – Ala – His – Leu* – Met	65 – 80	80 – 95	75 – 90	85 – 95
Ile – Arg – Glu – Trp – Cys	30 – 55	60 – 85	50 – 70	70 – 95
Val	30	70	60	90
Gly	10	40	20	60
Asp*	10	20	20	30
Ser – Pro	5 – 15	5 – 15	5 – 15	5 – 20
* % of <i>in vivo</i> cleavage differs for differents temperature				

1.4. Elution des protéines purifiées

Eluer avec le column buffer par fraction égale à 1/3 du volume-mort de la colonne

↘ **ALIQUOT 8**

Après l'élution, pour vérifier l'efficacité de coupure, **prélever un échantillon de 0.1ml de résine** à mélanger avec 50µl de 3X SDS sample buffer (contrôle après coupure)

↘ **ALIQUOT 9**

Si la quantité de protéines non coupées est trop importante, ré-incuber plus longtemps

1.5. Striping de la colonne

Préparer le STRIPING BUFFER

Le charger sur la colonne à température ambiante *pour éviter la précipitation du SDS*

Cela permet l'élution des protéines non coupées et des *tag*-intein restés fixés à la chitine.

Eluer et prélever un échantillon de 0.1ml d'éluat

↘ **ALIQUOT 10**

1.6. Régénération de la colonne

Une colonne peut être régénérée et réutilisée 4 à 5 fois

Laver la colonne avec 3 volume-mort de **stripping buffer**

Laisser la résine s'**imprégner 30'**

Laver avec 7 volume-mort de **stripping buffer**

Rincer avec 20 volume-mort d'eau puis 5 volume-mort de column buffer.

CONSERVER la colonne à **4°C**

Pour conserver la résine plus longtemps, ajouter 0,02% de sodium azide au **column buffer** pour éviter le développement de bactéries.

2. Préparation des solutions :

COLUMN BUFFER

20mM Na-HEPES (or Tris-HCl), pH 8,5

500mM NaCl (or 50-1000 mM NaCl)

Non ionic detergents (0,1-0.5% Triton X-100 or 0,1-0,2% Tween 20)

Protease inhibitors [par exemple PMSF(20µl)]

1mM EDTA (optional)

CLEAVAGE BUFFER

20mM Na-HEPES (or Tris-HCl), pH 8,5

500mM NaCl (or 50-1000 mM NaCl)

50mM DTT or β-mercapto or cysteine

1mM EDTA (optional)

STRIPPING SOLUTION

Column buffer

0.3M NaOH or 1% SDS

ANNEXE 2 : Protocole Impact Kit : préparation des colonnes de chitine

I. Intégration de la résine dans la colonne

Equilibrer la colonne : dégazer 50% de résine en suspension et dégasser le **column buffer** à température ambiante

Fermer le bas de la colonne avec un bouchon et fixer la colonne sur un support

Remplir la colonne de buffer et tapoter la colonne pour enlever les bulles d'air

Placer un disque poreux dans la colonne et le faire descendre dans le fond de la colonne avec une pipette pasteur retournée

Laisser décanter pour que la colonne se vide en faisant attention qu'aucune bulle n'apparaisse entre le disque et la sortie de la colonne. Replacer la colonne sur son support et le bouchon sur la sortie de la colonne

Ajouter le volume désiré de résine de chitine dégazée

Laisser la résine fixer pendant 30 minutes

Placer un second disque poreux dans la colonne et le pousser pour le placer juste au-dessus de la résine. Laisser 1 ou 2 mm d'espace entre le disque et la résine

Laver la partie supérieure de la colonne avec du buffer pour enlever les résidus de résine présent sur les bords de la colonne

II. Conservation des colonnes

Conserver à 4°C en prenant soin d'immerger la résine sous 1 à 2mL de **column buffer**. Placer un bouchon sur le haut de la colonne.

NB : Toujours retirer le bouchon du dessus avant celui du bas pour éviter une entrée d'air dans la colonne.

Toujours utiliser des tampons dégazés

Bibliographie :

Abeti, R., Uzun, E., Renganathan, I., Honda, T., Pook, M.A., and Giunti, P. (2015). Targeting lipid peroxidation and mitochondrial imbalance in Friedreich's ataxia. *Pharmacol. Res.* 99, 344–350.

Abicht, A., Müller, J., and Lochmüller, H. (1993). Congenital Myasthenic Syndromes. In GeneReviews(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Ajrroud-Driss, S., and Siddique, T. (2015). Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 679–684.

Allamand, V., Broux, O., Bourg, N., Richard, I., Tischfield, J.A., Hodes, M.E., Conneally, P.M., Fardeau, M., Jackson, C.E., and Beckmann, J.S. (1995). Genetic heterogeneity of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a genetic isolate (Amish) and evidence for a new locus. *Hum. Mol. Genet.* 4, 459–463.

Allamand, V., Briñas, L., Richard, P., Stojkovic, T., Quijano-Roy, S., and Bonne, G. (2011). ColVI myopathies: where do we stand, where do we go? *Skelet. Muscle* 1, 30.

Al-Qusairi, L., and Laporte, J. (2011). T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet. Muscle* 1, 26.

Altamirano, F., Eltit, J.M., Robin, G., Linares, N., Ding, X., Pessah, I.N., Allen, P.D., and López, J.R. (2014). Ca²⁺ influx via the Na⁺/Ca²⁺ exchanger is enhanced in malignant hyperthermia skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 289, 19180–19190.

Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., and Zoghbi, H.Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185–188.

Ampong, B.N., Imamura, M., Matsumiya, T., Yoshida, M., and Takeda, S. 'ichi (2005). Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol. Ed. Gaetano Conte Acad. Study Striated Muscle Dis.* 24, 134–144.

Anderson, L.V., Davison, K., Moss, J.A., Young, C., Cullen, M.J., Walsh, J., Johnson, M.A., Bashir, R., Britton, S., Keers, S., et al. (1999). Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum. Mol. Genet.* 8, 855–861.

Araya, R., Eckardt, D., Maxeiner, S., Krüger, O., Theis, M., Willecke, K., and Sáez, J.C. (2005). Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin43. *J Cell Sci* 118, 27–37.

Azahir, B.A., Di Fulvio, S., Salomon, S., Brockhoff, M., Therrien, C., and Sinnreich, M. (2012). Modular dispensability of dysferlin C2 domains reveals rational design for mini-dysferlin molecules. *J. Biol. Chem.* 287, 27629–27636.

Azuma, Y., Nakata, T., Tanaka, M., Shen, X.-M., Ito, M., Iwata, S., Okuno, T., Nomura, Y., Ando, N., Ishigaki, K., et al. (2015). Congenital myasthenic syndrome in Japan: ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscul. Disord.* NMD 25, 60–69.

Badouel, C., Zander, M.A., Liscio, N., Bagherie-Lachidan, M., Sopko, R., Coyaud, E., Raught, B., Miller, F.D., and McNeill, H. (2015). Fat1 interacts with Fat4 to regulate neural tube closure, neural progenitor proliferation and apical constriction during mouse brain development. *Dev. Camb. Engl.* *142*, 2781–2791.

Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S.S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., McNeil, P.L., and Campbell, K.P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* *423*, 168–172.

Barthélémy, F., Blouin, C., Wein, N., Mouly, V., Courrier, S., Dionnet, E., Kergourlay, V., Mathieu, Y., Garcia, L., Butler-Browne, G., et al. (2015). Exon 32 Skipping of Dysferlin Rescues Membrane Repair in Patients' Cells. *J. Neuromuscul. Dis.* *2*, 281–290.

Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., et al. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat. Genet.* *20*, 37–42.

Beckmann, J.S. (1996). The Réunion paradox and the digenic model. *Am. J. Hum. Genet.* *59*, 1400–1402.

Béhin, A., Salort-Campana, E., Wahbi, K., Richard, P., Carlier, R.-Y., Carlier, P., Laforêt, P., Stojkovic, T., Maisonobe, T., Verschueren, A., et al. (2015). Myofibrillar myopathies: State of the art, present and future challenges. *Rev. Neurol. (Paris)* *171*, 715–729.

Ben Ammar, A., Petit, F., Alexandri, N., Gaudon, K., Bauché, S., Rouche, A., Gras, D., Fournier, E., Koenig, J., Stojkovic, T., et al. (2010). Phenotype genotype analysis in 15 patients presenting a congenital myasthenic syndrome due to mutations in *DOK7*. *J. Neurol.* *257*, 754–766.

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.-C., Sahel, J.-A., Hantraye, P., and Bemelmans, A.-P. (2016). mRNA trans-splicing in gene therapy for genetic diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*.

Bird, T.D. (1993a). Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 1. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, C.-T. Fong, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Bird, T.D. (1993b). Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, C.-T. Fong, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Bird, T.D. (1993c). Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Blaeser, A., Keramaris, E., Chan, Y.M., Sparks, S., Cowley, D., Xiao, X., and Lu, Q.L. (2013). Mouse models of fukutin-related protein mutations show a wide range of disease phenotypes. *Hum. Genet.* *132*, 923–934.

Boehm, J., Chevessier, F., Koch, C., Peche, G.A., Mora, M., Morandi, L., Pasanisi, B., Moroni, I., Tasca, G., Fattori, F., et al. (2014). Clinical, histological and genetic characterisation of patients with tubular aggregate myopathy caused by mutations in *STIM1*. *J. Med. Genet.* *51*, 824–833.

Böhm, J., Chevessier, F., Maues De Paula, A., Koch, C., Attarian, S., Feger, C., Hantai, D., Laforêt, P., Ghorab, K., Vallat, J.-M., et al. (2013). Constitutive activation of the calcium sensor *STIM1* causes tubular-aggregate myopathy. *Am. J. Hum. Genet.* *92*, 271–278.

- Bostick, B., Yue, Y., Lai, Y., Long, C., Li, D., and Duan, D. (2008). Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* *19*, 851–856.
- Bozorgmehr, B., Kariminejad, A., Nafissi, S., Jebelli, B., Andoni, U., Gartoux, C., Ledeuil, C., Allamand, V., Richard, P., and Kariminejad, M.-H. (2013). Ullrich Congenital Muscular Dystrophy (UCMD): Clinical and Genetic Correlations. *Iran. J. Child Neurol.* *7*, 15–22.
- Brea-Fernández, A.J., Pomares, E., Brión, M.J., Marfany, G., Blanco, M.J., Sánchez-Salorio, M., González-Duarte, R., and Carracedo, A. (2008). Novel splice donor site mutation in MERTK gene associated with retinitis pigmentosa. *Br. J. Ophthalmol.* *92*, 1419–1423.
- Brislin, R.P., and Theroux, M.C. (2013). Core myopathies and malignant hyperthermia susceptibility: a review. *Paediatr. Anaesth.* *23*, 834–841.
- Broucqsault, N., Morere, J., Gaillard, M.-C., Dumonceaux, J., Torrents, J., Salort-Campana, E., Maues De Paula, A., Bartoli, M., Fernandez, C., Chesnais, A.L., et al. (2013). Dysregulation of 4q35- and muscle-specific genes in fetuses with a short D4Z4 array linked to facio-scapulo-humeral dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4206–4214.
- Burkin, D.J., and Kaufman, S.J. (1999). The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res.* *296*, 183–190.
- Bushby, K.M.D., Collins, J., and Hicks, D. (2014). Collagen type VI myopathies. *Adv. Exp. Med. Biol.* *802*, 185–199.
- Calandra, P., Cascino, I., Lemmers, R.J.L.F., Galluzzi, G., Teveroni, E., Monforte, M., Tasca, G., Ricci, E., Moretti, F., van der Maarel, S.M., et al. (2016). Allele-specific DNA hypomethylation characterises FSHD1 and FSHD2. *J. Med. Genet.* *53*, 348–355.
- Caruso, N., Herberth, B., Bartoli, M., Puppo, F., Dumonceaux, J., Zimmermann, A., Denadai, S., Lebossé, M., Roche, S., Geng, L., et al. (2013). Deregulation of the protocadherin gene FAT1 alters muscle shapes: implications for the pathogenesis of facioscapulohumeral dystrophy. *PLoS Genet.* *9*, e1003550.
- Carvajal-Gonzalez, J.M., and Mlodzik, M. (2014). Mechanisms of planar cell polarity establishment in *Drosophila*. *F1000prime Rep.* *6*, 98.
- Caudevilla, C., Serra, D., Miliar, A., Codony, C., Asins, G., Bach, M., and Hegardt, F.G. (1998). Natural trans-splicing in carnitine octanoyltransferase pre-mRNAs in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 12185–12190.
- 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.
- Chevessier, F., Bauché-Godard, S., Leroy, J.-P., Koenig, J., Paturneau-Jouas, M., Eymard, B., Hantaï, D., and Verdière-Sahuqué, M. (2005). The origin of tubular aggregates in human myopathies. *J. Pathol.* *207*, 313–323.
- Chong, J.X., Buckingham, K.J., Jhangiani, S.N., Boehm, C., Sobreira, N., Smith, J.D., Harrell, T.M., McMillin, M.J., Wiszniewski, W., Gambin, T., et al. (2015). The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am. J. Hum. Genet.* *97*, 199–215.
- Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M.E., Bourke, J., Wells, D.J., et al. (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne

muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 378, 595–605.

Clemen, C.S., Herrmann, H., Strelkov, S.V., and Schröder, R. (2013). Desminopathies: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 47–75.

Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C.R., König, S., and Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *J. Cell Biol.* 194, 335–346.

De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M., et al. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055.

Demonbreun, A.R., Fahrenbach, J.P., Deveaux, K., Earley, J.U., Pytel, P., and McNally, E.M. (2011). Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 20, 779–789.

Demonbreun, A.R., Rossi, A.E., Alvarez, M.G., Swanson, K.E., Deveaux, H.K., Earley, J.U., Hadhazy, M., Vohra, R., Walter, G.A., Pytel, P., et al. (2014). Dysferlin and Myoferlin Regulate Transverse Tubule Formation and Glycerol Sensitivity. *Am. J. Pathol.* 184, 248–259.

Dixon, R.J., Eperon, I.C., and Samani, N.J. (2007). Complementary intron sequence motifs associated with human exon repetition: a role for intragenic, inter-transcript interactions in gene expression. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 23, 150–155.

Dubourg, O. (2012). [Developments in hereditary neuropathies]. *Rev. Neurol. (Paris)* 168, 983–985.

Echaniz-Laguna, A., Nicot, A.-S., Carré, S., Franques, J., Tranchant, C., Dondaine, N., Biancalana, V., Mandel, J.-L., and Laporte, J. (2007). Subtle central and peripheral nervous system abnormalities in a family with centronuclear myopathy and a novel dynamin 2 gene mutation. *Neuromuscul. Disord.* NMD 17, 955–959.

Endo, Y., Noguchi, S., Hara, Y., Hayashi, Y.K., Motomura, K., Miyatake, S., Murakami, N., Tanaka, S., Yamashita, S., Kizu, R., et al. (2015). Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Hum. Mol. Genet.* 24, 637–648.

Ezzat, K., Aoki, Y., Koo, T., McClorey, G., Benner, L., Coenen-Stass, A., O'Donovan, L., Lehto, T., Garcia-Guerra, A., Nordin, J., et al. (2015). Self-Assembly into Nanoparticles Is Essential for Receptor Mediated Uptake of Therapeutic Antisense Oligonucleotides. *Nano Lett.* 15, 4364–4373.

Falsaperla, R., Praticò, A.D., Ruggieri, M., Parano, E., Rizzo, R., Corsello, G., Vitaliti, G., and Pavone, P. (2016). Congenital muscular dystrophy: from muscle to brain. *Ital. J. Pediatr.* 42, 78.

Fanin, M., and Angelini, C. (2016). Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy. *Muscle Nerve* n/a-n/a.

Fanin, M., Nascimbeni, A.C., and Angelini, C. (2013). Muscle atrophy in Limb Girdle Muscular Dystrophy 2A: a morphometric and molecular study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39, 762–771.

Faulkner, G., Lanfranchi, G., and Valle, G. (2001). Telethonin and other new proteins of the Z-disc of skeletal muscle. *IUBMB Life* 51, 275–282.

Flouriot, G., Brand, H., Seraphin, B., and Gannon, F. (2002). Natural trans-spliced mRNAs are generated from the human estrogen receptor-alpha (hER alpha) gene. *J. Biol. Chem.* 277, 26244–26251.

- Frock, R.L., Kudlow, B.A., Evans, A.M., Jameson, S.A., Hauschka, S.D., and Kennedy, B.K. (2006). Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev.* 20, 486–500.
- Furling, D. (2012). [Misregulation of alternative splicing and microRNA processing in DM1 pathogenesis]. *Rinshō Shinkeigaku Clin. Neurol.* 52, 1018–1022.
- Gaillard, M.-C., Roche, S., Dion, C., Tasmadjian, A., Bouget, G., Salort-Campana, E., Vovan, C., Chaix, C., Broucqsault, N., Morere, J., et al. (2014). Differential DNA methylation of the D4Z4 repeat in patients with FSHD and asymptomatic carriers. *Neurology* 83, 733–742.
- Goemans, N.M., Tulinius, M., van den Akker, J.T., Burm, B.E., Ekhart, P.F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A.A., Platenburg, G.J., Sipkens, J.A., et al. (2011). Systemic Administration of PRO051 in Duchenne’s Muscular Dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 364, 1513–1522.
- Goodrich, L.V., and Strutt, D. (2011). Principles of planar polarity in animal development. *Development* 138, 1877–1892.
- Gorokhova, S., Cerino, M., Mathieu, Y., Courrier, S., Desvignes, J.-P., Salgado, D., Bérout, C., Krahn, M., and Bartoli, M. (2015). Comparing targeted exome and whole exome approaches for genetic diagnosis of neuromuscular disorders. *Appl. Transl. Genomics* 7, 26–31.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougères, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796–1799.
- Goyenvalle, A., Babbs, A., Wright, J., Wilkins, V., Powell, D., Garcia, L., and Davies, K.E. (2012). Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2559–2571.
- Goyenvalle, A., Griffith, G., Babbs, A., El Andaloussi, S., Ezzat, K., Avril, A., Dugovic, B., Chaussonot, R., Ferry, A., Voit, T., et al. (2015). Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* 21, 270–275.
- Gregorevic, P., Blankinship, M.J., Allen, J.M., and Chamberlain, J.S. (2008). Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 657–664.
- Grose, W.E., Clark, K.R., Griffin, D., Malik, V., Shontz, K.M., Montgomery, C.L., Lewis, S., Brown, R.H., Janssen, P.M.L., Mendell, J.R., et al. (2012). Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PLoS One* 7, e39233.
- Güven, A., Demirci, M., and Anlar, B. (2012). Recurrent COLQ mutation in congenital myasthenic syndrome. *Pediatr. Neurol.* 46, 253–256.
- Han, R., and Campbell, K.P. (2007). Dysferlin and muscle membrane repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 409–416.
- Harish, P., Malerba, A., Dickson, G., and Bachtarzi, H. (2015). Progress on Gene Therapy, Cell Therapy, and Pharmacological Strategies Toward the Treatment of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 26, 286–292.
- Harraz, O.F., and Altier, C. (2014). STIM1-mediated bidirectional regulation of Ca²⁺ entry through voltage-gated calcium channels (VGCC) and calcium-release activated channels (CRAC). *Front. Cell. Neurosci.* 8, 43.

Hayashi, Y.K., Chou, F.L., Engvall, E., Ogawa, M., Matsuda, C., Hirabayashi, S., Yokochi, K., Ziober, B.L., Kramer, R.H., Kaufman, S.J., et al. (1998). Mutations in the integrin alpha 7 gene cause congenital myopathy. *Nat. Genet.* *19*, 94–97.

Herasse, M., Ono, Y., Fougerousse, F., Kimura, E., Stockholm, D., Beley, C., Montarras, D., Pinset, C., Sorimachi, H., Suzuki, K., et al. (1999). Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 4047–4055.

Houmeida, A., Holt, J., Tskhovrebova, L., and Trinick, J. (1995). Studies of the interaction between titin and myosin. *J. Cell Biol.* *131*, 1471–1481.

Hrdlickova, B., de Almeida, R.C., Borek, Z., and Withoff, S. (2014). Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1842*, 1910–1922.

Huang, Y., Laval, S.H., van Remoortere, A., Baudier, J., Benaud, C., Anderson, L.V.B., Straub, V., Deelder, A., Frants, R.R., den Dunnen, J.T., et al. (2007). AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *21*, 732–742.

Huin, V., Vasseur, F., Schraen-Maschke, S., Dhaenens, C.-M., Devos, P., Dupont, K., Sergeant, N., Buée, L., Lacour, A., Hofmann-Radvanyi, H., et al. (2013). MBNL1 gene variants as modifiers of disease severity in myotonic dystrophy type 1. *J. Neurol.* *260*, 998–1003.

Ibrahim, M., Siedlecka, U., Buyandelger, B., Harada, M., Rao, C., Moshkov, A., Bhargava, A., Schneider, M., Yacoub, M.H., Gorelik, J., et al. (2013). A critical role for Telethonin in regulating t-tubule structure and function in the mammalian heart. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 372–383.

Iwamoto, T., Watanabe, Y., Kita, S., and Blaustein, M.P. (2007). Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitors: a new class of calcium regulators. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* *7*, 188–198.

Jaalouk, D.E., and Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 63–73.

Jearawiriyapaisarn, N., Moulton, H.M., Buckley, B., Roberts, J., Sazani, P., Fucharoen, S., Iversen, P.L., and Kole, R. (2008). Sustained dystrophin expression induced by peptide-conjugated morpholino oligomers in the muscles of mdx mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *16*, 1624–1629.

Jeong, S.-K., Kim, D.-C., Cho, Y.-G., Sunwoo, I.-N., and Kim, D.-S. (2008). A double mutation of the ryanodine receptor type 1 gene in a malignant hyperthermia family with multimicore myopathy. *J. Clin. Neurol. Seoul Korea* *4*, 123–130.

Jiang, C., Wen, Y., Kuroda, K., Hannon, K., Rudnicki, M.A., and Kuang, S. (2014). Notch signaling deficiency underlies age-dependent depletion of satellite cells in muscular dystrophy. *Dis. Model. Mech.* *7*, 997–1004.

Jones, K.J., Morgan, G., Johnston, H., Tobias, V., Ouvrier, R.A., Wilkinson, I., and North, K.N. (2001). The expanding phenotype of laminin alpha2 chain (merosin) abnormalities: case series and review. *J. Med. Genet.* *38*, 649–657.

Jones, T.I., Chen, J.C.J., Rahimov, F., Homma, S., Arashiro, P., Beermann, M.L., King, O.D., Miller, J.B., Kunkel, L.M., Emerson, C.P., et al. (2012). Facioscapulohumeral muscular dystrophy family studies of DUX4 expression: evidence for disease modifiers and a quantitative model of pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 4419–4430.

- Jungbluth, H., and Gautel, M. (2014). Pathogenic Mechanisms in Centronuclear Myopathies. *Front. Aging Neurosci.* 6.
- Kaplan, J.-C., and Hamroun, D. (2015). The 2016 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscul. Disord.* NMD 25, 991–1020.
- Katzemich, A., Kreisköther, N., Alexandrovich, A., Elliott, C., Schöck, F., Leonard, K., Sparrow, J., and Bullard, B. (2012). The function of the M-line protein obscurin in controlling the symmetry of the sarcomere in the flight muscle of *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 125, 3367–3379.
- Kergourlay, V., Raï, G., Blandin, G., Salgado, D., Bérout, C., Lévy, N., Krahn, M., and Bartoli, M. (2014). Identification of splicing defects caused by mutations in the dysferlin gene. *Hum. Mutat.* 35, 1532–1541.
- Knöll, R., Linke, W.A., Zou, P., Miodic, S., Kostin, S., Buyandelger, B., Ku, C.-H., Neef, S., Bug, M., Schäfer, K., et al. (2011). Telethonin deficiency is associated with maladaptation to biomechanical stress in the mammalian heart. *Circ. Res.* 109, 758–769.
- Kole, R., and Krieg, A.M. (2015). Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 104–107.
- Koller, U., Wally, V., Bauer, J.W., and Murauer, E.M. (2014). Considerations for a Successful RNA Trans-splicing Repair of Genetic Disorders. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3, e157.
- Kollmann-Camaïora, A., Alsina, E., Domínguez, A., Del Blanco, B., Yepes, M.J., Guerrero, J.L., and García, A. (2016). Clinical protocol for the management of malignant hyperthermia. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.*
- Kontogianni-Konstantopoulos, A., Ackermann, M.A., Bowman, A.L., Yap, S.V., and Bloch, R.J. (2009). Muscle giants: molecular scaffolds in sarcomerogenesis. *Physiol. Rev.* 89, 1217–1267.
- Krahn, M., Wein, N., Bartoli, M., Lostal, W., Courrier, S., Bourg-Alibert, N., Nguyen, K., Vial, C., Streichenberger, N., Labelle, V., et al. (2010). A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci. Transl. Med.* 2, 50ra69.
- Krüger, M., and Kötter, S. (2016). Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling. *Front. Physiol.* 7, 76.
- Lacruz, R.S., and Feske, S. (2015). Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1356, 45–79.
- Lamb, G.D. (2000). Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: Comparisons with cardiac muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 27, 216–224.
- Laure, L., Suel, L., Roudaut, C., Bourg, N., Ouali, A., Bartoli, M., Richard, I., and Danièle, N. (2009). Cardiac ankyrin repeat protein is a marker of skeletal muscle pathological remodelling. *FEBS J.* 276, 669–684.
- Laure, L., Danièle, N., Suel, L., Marchand, S., Aubert, S., Bourg, N., Roudaut, C., Duguez, S., Bartoli, M., and Richard, I. (2010). A new pathway encompassing calpain 3 and its newly identified substrate cardiac ankyrin repeat protein is involved in the regulation of the nuclear factor- κ B pathway in skeletal muscle. *FEBS J.* 277, 4322–4337.
- Le Gloan, L., Hauet, Q., David, A., Hanna, N., Arfeuille, C., Arnaud, P., Boileau, C., Romefort, B., Benbrik, N., Gournay, V., et al. (2016). Neonatal Marfan Syndrome: Report of a Case with an Inherited Splicing Mutation outside the Neonatal Domain. *Mol. Syndromol.* 6, 281–286.

Leite, C.C., Lucato, L.T., Martin, M.G.M., Ferreira, L.G., Resende, M.B.D., Carvalho, M.S., Marie, S.K.N., Jinkins, J.R., and Reed, U.C. (2005). Merosin-deficient congenital muscular dystrophy (CMD): a study of 25 Brazilian patients using MRI. *Pediatr. Radiol.* *35*, 572–579.

Lek, A., Evesson, F.J., Lemckert, F.A., Redpath, G.M.I., Lueders, A.-K., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., North, K.N., and Cooper, S.T. (2013). Calpains, cleaved mini-dysferlinC72, and L-type channels underpin calcium-dependent muscle membrane repair. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 5085–5094.

Lemmers, R.J.L.F., Tawil, R., Petek, L.M., Balog, J., Block, G.J., Santen, G.W.E., Amell, A.M., van der Vliet, P.J., Almomani, R., Straasheijm, K.R., et al. (2012). Digenic inheritance of an SMCHD1 mutation and an FSHD-permissive D4Z4 allele causes facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2. *Nat. Genet.* *44*, 1370–1374.

Li, J. (2014). Genetic factors for nerve susceptibility to injuries - lessons from PMP22 deficiency. *Neural Regen. Res.* *9*, 1661–1664.

Li, J., Parker, B., Martyn, C., Natarajan, C., and Guo, J. (2013). The PMP22 gene and its related diseases. *Mol. Neurobiol.* *47*, 673–698.

Liu, L., and Zhang, R. (2014). Intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurosci. Bull.* *30*, 999–1009.

Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizberea, J.A., Hentati, F., Hamida, M.B., et al. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* *20*, 31–36.

Liu, X., Jiang, Q., Mansfield, S.G., Puttaraju, M., Zhang, Y., Zhou, W., Cohn, J.A., Garcia-Blanco, M.A., Mitchell, L.G., and Engelhardt, J.F. (2002). Partial correction of endogenous DeltaF508 CFTR in human cystic fibrosis airway epithelia by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat. Biotechnol.* *20*, 47–52.

Lorain, S., Peccate, C., Le Hir, M., Griffith, G., Philippi, S., Précigout, G., Mamchaoui, K., Jollet, A., Voit, T., and Garcia, L. (2013). Dystrophin rescue by trans-splicing: a strategy for DMD genotypes not eligible for exon skipping approaches. *Nucleic Acids Res.* *41*, 8391–8402.

Lorenzoni, P.J., Scola, R.H., Kamoi Kay, C.S., Lochmüller, H., and Werneck, L.C. (2013). Congenital myasthenic syndrome and minicore-like myopathy with DOK7 mutation. *Muscle Nerve* *48*, 151–152.

Lostal, W., Bartoli, M., Bourg, N., Roudaut, C., Bentaïb, A., Miyake, K., Guerchet, N., Fougèrouse, F., McNeil, P., and Richard, I. (2010). Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 1897–1907.

Lostal, W., Bartoli, M., Roudaut, C., Bourg, N., Krahn, M., Pryadkina, M., Borel, P., Suel, L., Roche, J.A., Stockholm, D., et al. (2012). Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in dysferlinopathy. *PloS One* *7*, e38036.

Lostal, W., Kodippili, K., Yue, Y., and Duan, D. (2014). Full-length dystrophin reconstitution with adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* *25*, 552–562.

Luan, X., Tian, W., and Cao, L. (2016). Limb-girdle congenital myasthenic syndrome in a Chinese family with novel mutations in MUSK gene and literature review. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *150*, 41–45.

de Luna, N., Gallardo, E., Soriano, M., Dominguez-Perles, R., de la Torre, C., Rojas-García, R., García-Verdugo, J.M., and Illa, I. (2006). Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation “in vitro.” *J. Biol. Chem.* *281*, 17092–17098.

- Ma, Z., Yao, W., Chan, C.-C., Kannabiran, C., Wawrousek, E., and Hejtmancik, J.F. (2016). Human β A3/A1-crystallin splicing mutation causes cataracts by activating the unfolded protein response and inducing apoptosis in differentiating lens fiber cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 1214–1227.
- Malfatti, E., and Romero, N.B. (2016). Nemaline myopathies: State of the art. *Rev. Neurol. (Paris)*.
- Maltzahn, J. von, Euwens, C., Willecke, K., and Söhl, G. (2004). The novel mouse connexin39 gene is expressed in developing striated muscle fibers. *J. Cell Sci.* 117, 5381–5392.
- Mao, Y., Kuta, A., Crespo-Enriquez, I., Whiting, D., Martin, T., Mulvaney, J., Irvine, K.D., and Francis-West, P. (2016). Dchs1-Fat4 regulation of polarized cell behaviours during skeletal morphogenesis. *Nat. Commun.* 7, 11469.
- Markert, C.D., Meaney, M.P., Voelker, K.A., Grange, R.W., Dalley, H.W., Cann, J.K., Ahmed, M., Bishwokarma, B., Walker, S.J., Yu, S.X., et al. (2010). Functional muscle analysis of the Tcap knockout mouse. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2268–2283.
- Medrano, S., Monges, S., Gravina, L.P., Alías, L., Mozzoni, J., Aráoz, H.V., Bernal, S., Moresco, A., Chertkoff, L., and Tizzano, E. (2016). Genotype-phenotype correlation of SMN locus genes in spinal muscular atrophy children from Argentina. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJP N Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.*
- Mendell, J.R., Boué, D.R., and Martin, P.T. (2006). The Congenital Muscular Dystrophies: Recent Advances and Molecular Insights. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* 9, 427–443.
- Mendell, J.R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., Bowles, D., Gray, S., Li, C., Galloway, G., et al. (2010). Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 363, 1429–1437.
- Mercuri E, and Muntoni F (2012). The ever-expanding spectrum of congenital muscular dystrophies. *Ann. Neurol.* 72, 1, 9–17.
- Merrifield, P.A., and Laird, D.W. (2016). Connexins in skeletal muscle development and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 50, 67–73.
- Meyer, L.C., and Wright, N.T. (2013). Structure of giant muscle proteins. *Front. Physiol.* 4, 368.
- Middel, V., Zhou, L., Takamiya, M., Beil, T., Shahid, M., Roostalu, U., Grabher, C., Rastegar, S., Reischl, M., Nienhaus, G.U., et al. (2016). Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair. *Nat. Commun.* 7, 12875.
- Monjaret, F., Bourg, N., Suel, L., Roudaut, C., Le Roy, F., Richard, I., and Charton, K. (2014). Cis-splicing and translation of the pre-trans-splicing molecule combine with efficiency in spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 22, 1176–1187.
- Mould, A.W., Pang, Z., Pakusch, M., Tonks, I.D., Stark, M., Carrie, D., Mukhopadhyay, P., Seidel, A., Ellis, J.J., Deakin, J., et al. (2013). Smchd1 regulates a subset of autosomal genes subject to monoallelic expression in addition to being critical for X inactivation. *Epigenetics Chromatin* 6, 19.
- Muller, J., Abicht, A., Burke, G., Cossins, J., Richard, P., Baumeister, S., Stucka, R., Eymard, B., Hantai, D., Beeson, D., et al. (2004). The congenital myasthenic syndrome mutation RAPSN N88K derives from an ancient Indo-European founder. *J. Med. Genet.* 41, e104.
- Muntoni, F., Torelli, S., Wells, D.J., and Brown, S.C. (2011). Muscular dystrophies due to glycosylation defects: diagnosis and therapeutic strategies. *Curr. Opin. Neurol.* 24, 437–442.

Murauer, E.M., Koller, U., Hainzl, S., Wally, V., and Bauer, J.W. (2013). A reporter-based screen to identify potent 3' trans-splicing molecules for endogenous RNA repair. *Hum. Gene Ther. Methods* 24, 19–27.

Muthuswamy, S., and Agarwal, S. (2015). Friedreich Ataxia: From the Eye of a Molecular Biologist. *The Neurologist* 20, 51–55.

Nakayama, Y., Nakamura, N., Tsuji, D., Itoh, K., and Kurosak, A. (2013). Genetic Diseases Associated with Protein Glycosylation Disorders in Mammals. In *Genetic Disorders*, M. Puiu, ed. (InTech), p.

Nigro, V., and Savarese, M. (2014). Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol. Ed. Gaetano Conte Acad. Study Striated Muscle Dis.* 33, 1–12.

Nigro, G., Papa, A.A., and Politano, L. (2012). The heart and cardiac pacing in Steinert disease. *Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol. Ed. Gaetano Conte Acad. Study Striated Muscle Dis.* 31, 110–116.

Nougier, C., Roualdes, O., Fretigny, M., d'Oiron, R., Costa, C., Negrier, C., and Vinciguerra, C. (2014). Characterization of four novel molecular changes in the promoter region of the factor VIII gene. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 20, e149-156.

Oddoux, S., Brocard, J., Schweitzer, A., Szentesi, P., Giannesini, B., Brocard, J., Fauré, J., Pernet-Gallay, K., Bendahan, D., Lunardi, J., et al. (2009). Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J. Biol. Chem.* 284, 34918–34929.

Ohno, K. (2012). [Congenital myasthenic syndromes]. *Rinshō Shinkeigaku Clin. Neurol.* 52, 1159–1161.

Ojima, K., Ono, Y., Hata, S., Koyama, S., Doi, N., and Sorimachi, H. (2005). Possible functions of p94 in connectin-mediated signaling pathways in skeletal muscle cells. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 26, 409–417.

Olivé, M., Goldfarb, L.G., Shatunov, A., Fischer, D., and Ferrer, I. (2005). Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain J. Neurol.* 128, 2315–2326.

Ono, Y., and Sorimachi, H. (2012). Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 224–236.

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

van Paassen, B.W., van der Kooi, A.J., van Spaendonck-Zwarts, K.Y., Verhamme, C., Baas, F., and de Visser, M. (2014). PMP22 related neuropathies: Charcot-Marie-Tooth disease type 1A and Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 38.

Palma, L. de, Marinelli, M., Pavan, M., and Orazi, A. (2008). Ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx in human skeletal muscle atrophy. *Joint Bone Spine* 75, 53–57.

Partha, S.K., Ravulapalli, R., Allingham, J.S., Campbell, R.L., and Davies, P.L. (2014). Crystal structure of calpain-3 penta-EF-hand (PEF) domain - a homodimerized PEF family member with calcium bound at the fifth EF-hand. *FEBS J.* 281, 3138–3149.

Patel, M., Isaacs, C.J., Seyer, L., Brigatti, K., Gelbard, S., Strawser, C., Foerster, D., Shinnick, J., Schadt, K., Yiu, E.M., et al. (2016). Progression of Friedreich ataxia: quantitative characterization over 5 years. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 684–694.

- Peccate, C., Mollard, A., Le Hir, M., Julien, L., McClorey, G., Jarmin, S., Le Heron, A., Dickson, G., Benkhelifa-Ziyyat, S., Piétri-Rouxel, F., et al. (2016). Antisense pre-treatment increases gene therapy efficacy in dystrophic muscles. *Hum. Mol. Genet.*
- Périé, S., Trollet, C., Mouly, V., Vanneaux, V., Mamchaoui, K., Bouazza, B., Marolleau, J.P., Laforêt, P., Chapon, F., Eymard, B., et al. (2014). Autologous myoblast transplantation for oculopharyngeal muscular dystrophy: a phase I/IIa clinical study. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 22, 219–225.
- Philippi, S., Lorain, S., Beley, C., Peccate, C., Précigout, G., Spuler, S., and Garcia, L. (2015). Dysferlin rescue by spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing targeting introns harbouring weakly defined 3' splice sites. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4049–4060.
- Philipson, K.D., and Nicoll, D.A. (2000). Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 111–133.
- Pinotsis, N., Petoukhov, M., Lange, S., Svergun, D., Zou, P., Gautel, M., and Wilmanns, M. (2006). Evidence for a dimeric assembly of two titin/telethonin complexes induced by the telethonin C-terminus. *J. Struct. Biol.* 155, 239–250.
- Pryadkina, M., Lostal, W., Bourg, N., Charton, K., Roudaut, C., Hirsch, M.L., and Richard, I. (2015). A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2, 15009.
- Puppo, F., Dionnet, E., Gaillard, M.-C., Gaildrat, P., Castro, C., Vovan, C., Karine, B., Bernard, R., Attarian, S., Goto, K., et al. (2015). Identification of variants in the 4q35 gene FAT1 in patients with a Facioscapulohumeral dystrophy (FSHD)-like phenotype. *Hum. Mutat.*
- Puttaraju, M., DiPasquale, J., Baker, C.C., Mitchell, L.G., and Garcia-Blanco, M.A. (2001). Messenger RNA repair and restoration of protein function by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 4, 105–114.
- Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A.M., Malmersjoe, S., Park, C.Y., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2015). Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *J. Cell Biol.* 209, 653–669.
- Randazzo, D., Giacomello, E., Lorenzini, S., Rossi, D., Pierantozzi, E., Blaauw, B., Reggiani, C., Lange, S., Peter, A.K., Chen, J., et al. (2013). Obscurin is required for ankyrinB-dependent dystrophin localization and sarcolemma integrity. *J. Cell Biol.* 200, 523–536.
- Redpath, G.M.I., Woolger, N., Piper, A.K., Lemckert, F.A., Lek, A., Greer, P.A., North, K.N., and Cooper, S.T. (2014). Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair. *Mol. Biol. Cell* 25, 3037–3048.
- Reed, U.C. (2009). Congenital muscular dystrophy. Part I: a review of phenotypical and diagnostic aspects. *Arq. Neuropsiquiatr.* 67, 144–168.
- Reilich, P., Krause, S., Schramm, N., Klutzny, U., Bulst, S., Zehetmayer, B., Schneiderat, P., Walter, M.C., Schoser, B., and Lochmüller, H. (2011). A novel mutation in the myotilin gene (MYOT) causes a severe form of limb girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A). *J. Neurol.* 258, 1437–1444.
- Restivo, D.A., Marchese Ragona, R., Staffieri, A., and de Grandis, D. (2000). Successful botulinum toxin treatment of dysphagia in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Gastroenterology* 119, 1416.
- Richards, M., Coppée, F., Thomas, N., Belayew, A., and Upadhyaya, M. (2012). Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled? *Hum. Genet.* 131, 325–340.

Robinson-Hamm, J.N., and Gersbach, C.A. (2016). Gene therapies that restore dystrophin expression for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Genet.* *135*, 1029–1040.

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.

Rossor, A.M., Tomaselli, P.J., and Reilly, M.M. (2016). Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* *29*, 537–548.

Saburi, S., Hester, I., Goodrich, L., and McNeill, H. (2012). Functional interactions between Fat family cadherins in tissue morphogenesis and planar polarity. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 1806–1820.

Sadikot, T., Hammond, C.R., and Ferrari, M.B. (2010). Distinct roles for telethonin N-versus C-terminus in sarcomere assembly and maintenance. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *239*, 1124–1135.

Saito, Y., Miyashita, S., Yokoyama, A., Komaki, H., Seki, A., Maegaki, Y., and Ohno, K. (2007). Facioscapulohumeral muscular dystrophy with severe mental retardation and epilepsy. *Brain Dev.* *29*, 231–233.

Salani, S., Lucchiari, S., Fortunato, F., Crimi, M., Corti, S., Locatelli, F., Bossolasco, P., Bresolin, N., and Comi, G.P. (2004). Developmental and tissue-specific regulation of a novel dysferlin isoform. *Muscle Nerve* *30*, 366–374.

Salmikangas, P., van der Ven, P.F.M., Lalowski, M., Taivainen, A., Zhao, F., Suila, H., Schröder, R., Lappalainen, P., Fürst, D.O., and Carpen, O. (2003). Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 189–203.

Sandi, C., Sandi, M., Anjomani Virmouni, S., Al-Mahdawi, S., and Pook, M.A. (2014). Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Front. Genet.* *5*, 165.

Scalet, D., Balestra, D., Rohban, S., Bovolenta, M., Perrone, D., Bernardi, F., Campaner, S., and Pinotti, M. (2016). Exploring Splicing-Switching Molecules For Seckel Syndrome Therapy. *Biochim. Biophys. Acta.*

Schara, U., Christen, H.-J., Durmus, H., Hietala, M., Krabetz, K., Rodolico, C., Schreiber, G., Topaloglu, H., Talim, B., Voss, W., et al. (2010). Long-term follow-up in patients with congenital myasthenic syndrome due to CHAT mutations. *Eur. J. Paediatr. Neurol. EJPN Off. J. Eur. Paediatr. Neurol. Soc.* *14*, 326–333.

Scionti, I., Greco, F., Ricci, G., Govi, M., Arashiro, P., Vercelli, L., Berardinelli, A., Angelini, C., Antonini, G., Cao, M., et al. (2012). Large-scale population analysis challenges the current criteria for the molecular diagnosis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 628–635.

Sevy, A., Cerino, M., Gorokhova, S., Dionnet, E., Mathieu, Y., Verschueren, A., Franques, J., Maues de Paula, A., Figarella-Branger, D., Lagarde, A., et al. (2015). Improving molecular diagnosis of distal myopathies by targeted next-generation sequencing. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*

Sharma, P., and McNeill, H. (2013). Fat and Dachsous cadherins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *116*, 215–235.

Sienknecht, U.J. (2015). Current concepts of hair cell differentiation and planar cell polarity in inner ear sensory organs. *Cell Tissue Res.* *361*, 25–32.

Sinnreich, M., Therrien, C., and Karpati, G. (2006). Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* *66*, 1114–1116.

- Soboloff, J., Rothberg, B.S., Madesh, M., and Gill, D.L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 549–565.
- Sondergaard, P.C., Griffin, D.A., Pozsgai, E.R., Johnson, R.W., Grose, W.E., Heller, K.N., Shontz, K.M., Montgomery, C.L., Liu, J., Clark, K.R., et al. (2015). AAV-Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* *2*, 256–270.
- Spencer, M.J., Guyon, J.R., Sorimachi, H., Potts, A., Richard, I., Herasse, M., Chamberlain, J., Dalkilic, I., Kunkel, L.M., and Beckmann, J.S. (2002). Stable expression of calpain 3 from a muscle transgene in vivo: immature muscle in transgenic mice suggests a role for calpain 3 in muscle maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 8874–8879.
- Stathopoulos, P.B., Li, G.-Y., Plevin, M.J., Ames, J.B., and Ikura, M. (2006). Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J. Biol. Chem.* *281*, 35855–35862.
- Sugiyama, Y., Shelley, E.J., Badouel, C., McNeill, H., and McAvoy, J.W. (2015). Atypical Cadherin Fat1 Is Required for Lens Epithelial Cell Polarity and Proliferation but Not for Fiber Differentiation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *56*, 4099–4107.
- Sutton, R.E., and Boothroyd, J.C. (1986). Evidence for trans splicing in trypanosomes. *Cell* *47*, 527–535.
- Tal-Goldberg, T., Lorain, S., and Mitrani-Rosenbaum, S. (2014). Correction of the Middle Eastern M712T mutation causing GNE myopathy by trans-splicing. *Neuromolecular Med.* *16*, 322–331.
- Taniguchi-Ikeda, M., Morioka, I., Iijima, K., and Toda, T. (2016). Mechanistic aspects of the formation of α -dystroglycan and therapeutic research for the treatment of α -dystroglycanopathy: A review. *Mol. Aspects Med.* *51*, 115–124.
- Tintignac, L.A., Brenner, H.-R., and Rüegg, M.A. (2015). Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol. Rev.* *95*, 809–852.
- Tockner, B., Kocher, T., Hainzl, S., Reichelt, J., Bauer, J.W., Koller, U., and Muraier, E.M. (2016). Construction and validation of an RNA trans-splicing molecule suitable to repair a large number of COL7A1 mutations. *Gene Ther.*
- Todeschini, A., Gualandi, F., Trabanelli, C., Armaroli, A., Ravani, A., Fanin, M., Rota, S., Bello, L., Ferlini, A., Pegoraro, E., et al. (2016). Becker muscular dystrophy due to an intronic splicing mutation inducing a dual dystrophin transcript. *Neuromuscul. Disord. NMD.*
- Trollet, C., Gidaro, T., Klein, P., Périé, S., Butler-Browne, G., and Lacau St Guily, J. (1993). Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, C.-T. Fong, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Tskhovrebova, L., and Trinick, J. (2003). Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 679–689.
- Turner, C., Mein, R., Sharpe, C., and Love, D.R. (2015). Merosin-deficient congenital muscular dystrophy: A novel homozygous mutation in the laminin-2 gene. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* *22*, 1983–1985.
- Vajsar, J., and Schachter, H. (2006). Walker-Warburg syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* *1*, 29.

Várnai, P., Hunyady, L., and Balla, T. (2009). STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 118–128.

de Vooght, K.M.K., van Wijk, R., and van Solinge, W.W. (2009). Management of gene promoter mutations in molecular diagnostics. *Clin. Chem.* 55, 698–708.

Watila, M.M., and Balarabe, S.A. (2015). Molecular and clinical features of inherited neuropathies due to PMP22 duplication. *J. Neurol. Sci.* 355, 18–24.

Wein, N., Avril, A., Bartoli, M., Beley, C., Chaouch, S., Laforêt, P., Behin, A., Butler-Browne, G., Mouly, V., Krahn, M., et al. (2010). Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum. Mutat.* 31, 136–142.

Wohlgemuth, M., van der Kooi, E.L., van Kesteren, R.G., van der Maarel, S.M., and Padberg, G.W. (2004). Ventilatory support in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Neurology* 63, 176–178.

Zinn, E., and Vandenberghe, L.H. (2014). Adeno-associated virus: fit to serve. *Curr. Opin. Virol.* 8, 90–97.

Zou, P., Pinotsis, N., Lange, S., Song, Y.-H., Popov, A., Mavridis, I., Mayans, O.M., Gautel, M., and Wilmanns, M. (2006). Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* 439, 229–233.

Zulian, A., Tagliavini, F., Rizzo, E., Pellegrini, C., Sardone, F., Zini, N., Maraldi, N.M., Santi, S., Faldini, C., Merlini, L., et al. (2014). Melanocytes from Patients Affected by Ullrich Congenital Muscular Dystrophy and Bethlem Myopathy have Dysfunctional Mitochondria That Can be Rescued with Cyclophilin Inhibitors. *Front. Aging Neurosci.* 6, 324.

Orphanet: Sclérose latérale amyotrophique.

Aujourd'hui encore, le diagnostic des maladies génétiques et la compréhension des mécanismes physiopathologiques qui en découlent demeurent difficile. Une connaissance solide de ces différents paramètres est cependant impérative si l'on espère développer des thérapies efficaces. Concernant les myopathies, on dénombre actuellement plus de deux cents formes différentes, majoritairement d'origine génétique, dont les gènes responsables ne sont pas toujours identifiés. Dans les cas où le gène causal est clairement déterminé, il n'est pourtant pas rare de faire face à des problèmes de diagnostic. Cette absence d'information génétique peut non seulement nuire à la prise en charge des malades et à leur inclusion dans d'éventuels essais thérapeutiques mais également au développement de nouveaux outils thérapeutiques. A travers l'étude de quatre myopathies distinctes, ma thèse s'est axée sur ces différentes problématiques :

- La mise en évidence d'une dérégulation d'épissage du gène FAT1 chez des patients atteints de dystrophie facio-scapulo-humérale (FSHD) ;
- L'optimisation du diagnostic de calpaïnopathie en étudiant l'impact de mutations faux-sens sur l'épissage de CAPN3 à l'aide d'un outil d'analyse fonctionnelle ;
- L'amélioration de la compréhension des interactions protéiques et ioniques mises en place par la protéine STIM1, à la membrane du réticulum sarcoplasmique, lors de son activation ;
- Le développement d'outils thérapeutiques dans le cadre des dysferlinopathies.

Tout d'abord, mes travaux se sont concentrés sur l'étude de mutations retrouvées dans le gène FAT1 de patients japonais cliniquement diagnostiqués comme atteints de dystrophie Facio-Scapulo-Humérale. En effet, ce gène venait d'être identifié comme impliqué dans le développement embryonnaire des muscles squelettiques chez la souris. Ainsi, j'ai démontré pour la première fois que ces mutations provoquaient un épissage aberrant de l'ARN messager de FAT1 et qu'elles impactaient aussi la structure de la protéine au niveau de ses domaines cadhérines.

Fort de ce résultat et dans un but d'amélioration diagnostique, je me suis focalisée sur l'impact que peuvent avoir des mutations faux-sens sur la maturation des ARN messagers de CAPN3. Ainsi, j'ai été la première à mettre en évidence qu'une mutation faux-sens sur trois altère l'ARNm et rend la protéine calpaïne 3 non fonctionnelle. Cette observation a permis de montrer que, pour parfaire le diagnostic, il faut étudier de manière systématique l'effet des mutations exoniques sur l'épissage de l'ARN.

Au-delà des conséquences transcriptionnelles, la majorité des mutations faux-sens ont un effet sur la protéine elle-même. Afin d'étudier leur incidence, je me suis concentrée sur l'étude de la protéine STIM1 responsable de myopathie à agrégats tubulaires (TAM). En collaboration avec une équipe spécialisée dans la microcalorimétrie, mes recherches ont ciblé la mise en évidence d'éventuels changements d'interactions protéiques entre versions sauvage et mutées, mais également des modifications d'affinité de ces protéines pour le calcium. Cette dernière étude a déjà donné lieu à la caractérisation de nouvelles interactions ioniques majeures jusqu'ici inconnues.

Parallèlement à ce projet, j'ai mis à profit mes connaissances acquises sur l'épissage pour développer la technique de « *Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing (SMaRT)* » dans le cadre de la dysferlinopathie (LGMD2B). Le développement d'une telle thérapie a notamment l'avantage d'exprimer la protéine dans des concentrations physiologiques normale et ce, uniquement dans les cellules où elle est naturellement produite.

En conclusion, mon travail de thèse basé sur l'étude de plusieurs myopathies a permis d'identifier de nouveaux mécanismes pathologiques et d'initier des approches thérapeutiques novatrices pour certaines d'entre elles.

Nowadays, diagnosis and pathomechanisms of genetic disorders remain difficult to explore. However, a solid understanding of these parameters is essential for effective therapies. There are actually more than two hundred forms of myopathies, mostly genetics, even if the culprit gene is not always identified. Nevertheless, even when the causative gene is known, diagnostic issues remain because of clinical and genetic heterogeneity and wide mutational spectrum. The lack of genetic information may affect patients cares and impairs the development of new therapeutic tools.

Through four distinct myopathies studies, my thesis was conducted to comprehend some of these elements:

- I showed that a new gene may be involved in facio-scapulo-humeral dystrophy;
- I improved calpainopathies diagnosis by studying the impact of missense mutations on CAPN3 splicing RNA with a functional analysis tool
- I analyzed how proteins contributed to calcium entry in the cell
- I contributed with a new therapeutic tool for dysferlinopathies.

Firstly, my work focused on FAT1 gene by studying mutations found in Japanese patients clinically diagnosed with a form of facio-scapulo-humeral dystrophy (FSHD). This gene had been involved in the embryonic development of skeletal muscle in mice. During my thesis, I demonstrated for the first time that these mutations caused aberrant splicing and also impact the protein structure in its cadherin domains.

With this result, and to improve diagnosis, I focused on the potential impact of missense mutations on CAPN3 RNA maturation. I had the possibility to demonstrate for the first time that a third of missense mutations alter calpain-3 RNA splicing and abolish the protein function. This observation has shown that exon splicing effect of mutations must be studied systematically for complete diagnosis.

Beyond the transcriptional consequences, large proportion of missense mutations have an effect on the protein itself. To study their impact, I focused on studying the STIM1 protein which is responsible for tubular aggregate myopathy (TAM). In collaboration with a team specialized in micro-calorimetry, my research has concentrated on modifications that impact STIM1 at the protein level. I have look for altered protein interaction and calcium binding between wild-type and mutant STIM1. This study has already led to the identification of new major unknown ionic interactions.

Finally, I used my knowledge on splicing to develop spliceosome Mediated RNA Trans-splicing (SMaRT) technique for dysferlinopathies (LGMD2B). Such therapy has the particular advantage of expressing the protein in physiological controlled environment. a

In conclusion, my thesis based on the study of several myopathies helped identify new disease mechanisms and initiate innovative therapeutic approaches for one of them.