

ECOLE DOCTORALE : DES GENOMES AUX ORGANISMES
UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE
Boulevard François Mitterrand
91025 EVRY cedex

GENETHON - CNRS UMR8587 LAMBE
Laboratoire Dystrophies Musculaires Progressives
1 bis rue de l'Internationale
91000 Evry

2010EVRY0026

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

UNIVERSITE D'EVRY-VAL D'ESSONNE

Ecole doctorale GAO

Mention Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée par

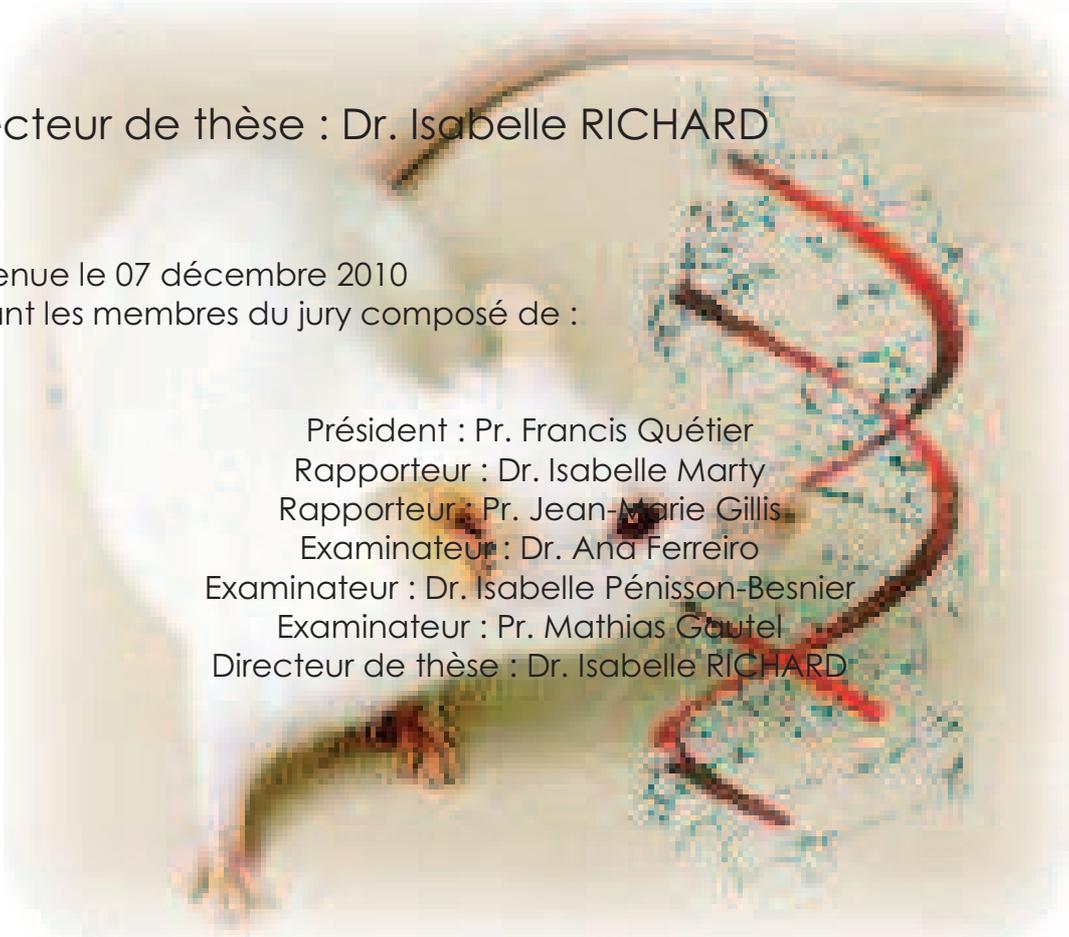
Karine CHARTON

Etude de la physiopathologie de la dystrophie musculaire tibiale et de la dystrophie des ceintures 2J et stratégies thérapeutiques

Directeur de thèse : Dr. Isabelle RICHARD

Soutenue le 07 décembre 2010
devant les membres du jury composé de :

Président : Pr. Francis Quétier
Rapporteur : Dr. Isabelle Marty
Rapporteur : Pr. Jean-Marie Gillis
Examineur : Dr. Ana Ferreiro
Examineur : Dr. Isabelle Pénisson-Besnier
Examineur : Pr. Mathias Gautel
Directeur de thèse : Dr. Isabelle RICHARD



« La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science. »

François Jacob



Je tiens à remercier de tout mon cœur toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail de thèse, et qui m'ont permis de passer 4 années exceptionnelles, mais aussi de conclure cette thèse et d'avancer dans ce travail et les actuels projets.

Pour commencer, je souhaite remercier le Docteur Isabelle Richard pour m'avoir accueillie au sein de son équipe à Généthon, de m'avoir permis de réaliser cette thèse et d'avoir cru en moi dès le départ. Isabelle m'a toujours soutenue en me laissant porter mes projets et m'a permis de réaliser de l'encadrement comme je le souhaitais. Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a témoignée, ses nombreux conseils mais aussi la grande autonomie d'expression et d'action qu'elle m'a laissée.

Je remercie également les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de prendre part à ce travail. Mes sincères remerciements vont à Francis Quétier pour en avoir accepté la présidence, aux Docteurs Gillis et Marty pour l'intérêt qu'ils ont portés à ce travail de thèse et pour avoir accepté si promptement de participer au jury en qualité de rapporteurs. Je remercie également le Professeur Gautel et les Docteurs Pénisson-Besnier et Ferreiro d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux à tous les membres de l'équipe «Dystrophies des Ceintures» qui ont tous contribué à l'aboutissement de ce travail et qui m'ont permis d'évoluer dans une ambiance conviviale. Un merci des plus sincères à Lydie Laure, Evelyne Gicquel, Jérôme Poupiot, Nathalie Bourg-Alibert, Carinne Roudaut, Sylvie Marchand et Laurence Suel-Pétat qui m'ont tout appris en termes de technique. Un merci à Nathalie Danièle pour m'avoir encadrée dans mes débuts. Merci aussi à Marina Pryadkina, Marie André, Luu Nguyen, Florence LeRoy et Raphaël De Cid Ibeas, sans oublier François Monjaret, Shabahang-Soheili Tayebbeh, alias « Shabi » pour lesquels j'ai hâte d'assister à leur thèse !

Un merci tout particulier à William Lostal, mon binôme de thèse, ou frangin de thèse ! Ensemble nous avons pu partager nos périodes de doutes, de craintes, de joies, de râleries et 3 ans de soutiens mutuel et d'aide. William a toujours été présent et disponible quel que soit le problème et devenu un ami !

Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu le plaisir d'encadrer : Jennifer, Marie, Delphine et Hélène, ainsi que François, pour leur aide et pour m'avoir appris sur moi même et mes capacités à « manager ».

Merci aux équipes plates formes et je pense notamment à Séverine qui a réalisé beaucoup de manips pour moi mais surtout qui a du tenter des exploits !!!! Et bien sûr merci à Laetitia, Angélique et Béatrice, dans l'équipe d'évaluation fonctionnelle : Nicolas, Guillaume, Françoise, et Muriel. Je remercie l'équipe de séquençage et clonage, de production AAV. Merci à toutes les services support que sont la laverie, les achats, et j'en oublie... sans qui nous ne pourrions pas travailler dans de bonnes conditions. Merci aux familles de malades, aux malades et à l'AFM pour ces nombreux Téléthon et journées des familles qui sont riches de connaissances et d'enseignement.

Grand merci pour toutes ses pauses qui me permettaient de souffler à Thibaut, Sandra, Stéphanie, Jean-Baptiste. Je voudrais remercier également ceux qui ne sont plus dans l'équipe à ce jour: Laëtitia Barrault, Astrid Milic, Azeddine Bentaib, Jean-Baptiste Boucheteil, Fanny Noulet, Stéphanie Duguez, Delphine Bonnin, Martin Krahn, Gaëlle Blandin, Jennifer Beutler et Lorraine Heyman.

Je tiens particulièrement à remercier ma famille qui m'a toujours soutenue quels que soit mes choix et sans qui toute cette aventure n'aurait pas été possible : mes parents pour leur immense soutiens et leurs conseils , mes grands-parents, Cyril et Charline, et une pensée pour ceux qui ne sont plus là aujourd'hui. Enfin je souhaite remercier celui qui m'accompagne dans les bons et les mauvais moments, qui m'a supporté tous les jours et pendant toute l'écriture...tout en faisant les travaux !: Xavier. Et un grand Merci à Romuald de nous avoir aidés dans cette épreuve.

Un grand merci à tous mes amis qui ont toujours cru en moi et avec qui on a toujours gardé le contact même pendant les périodes difficiles : Yann et Marie, Lisa, Fanny et teul, Solenne et Francky, Fab et Fafette, Djul, Marie et Pierre, Faf et Roccio, Dudul et Anne-Fred, Boussic, bien sûr merci à tous les Bressans : Aurélie et Micka, Virginie et Jérôme, Florian et Virginie, François.... Merci à ma belle-famille pour ces nombreuses soirées de fêtes qui m'ont permis de se changer les idées. Enfin, Merci à ma chère Nelly qui m'a beaucoup manqué lors de ses longs voyages, mais à qui j'ai pensé beaucoup pendant toute cette écriture.

Je dédie ce mémoire à mon petit garçon Bastien né pendant cette dernière année de thèse, qui lui aussi a du supporter mes nombreuses heures assises devant l'ordinateur quelquefois un peu compressé et pour tous ses sourires qu'il me fait le soir à mon retour !

Résumé

La titine est une protéine géante exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaque. Un certain nombre de mutations pathogéniques ont été identifiées dans son dernier exon codant. La mutation la plus fréquente, FINmaj, conduit au remplacement de 4 acides aminés et est retrouvée chez de nombreux patients en Finlande. Cette mutation cause une dystrophie musculaire tibiale (TMD) à l'état hétérozygote et une dystrophie des ceintures de type 2J (LGMD2J) à l'état homozygote.

Pour obtenir un modèle d'étude de la physiopathologie de ces maladies et évaluer des stratégies thérapeutiques, nous avons introduit la mutation FINmaj dans le génome murin par une stratégie de Knock-In par recombinaison homologe. Ce modèle a été caractérisé et a permis de montrer qu'il reproduit en grande partie les symptômes de la TMD et de la LGMD2J aux niveaux histologique et moléculaire. L'étude de ce modèle murin a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces deux maladies et nous a amené à étudier plus attentivement les interactions de la titine en C-ter avec ses partenaires afin de mieux comprendre l'implication de la ligne M dans la vie du sarcomère.

L'étude de la physiopathologie de la TMD et de la LGMD2J a permis de montrer que la calpaïne 3 (une protéase à l'origine d'une autre dystrophie des ceintures), jouait un rôle majeur dans la TMD. Cette constatation nous a permis d'envisager une approche thérapeutique pour cette dernière visant à diminuer les symptômes en régulant négativement la calpaïne 3. Une approche de thérapie génique a aussi été testée dans le but de traiter ces deux pathologies: le trans-épissage des derniers exons de la titine. En effet, étant donné la grande taille de l'ADNc de la titine (~100 kb), des stratégies classiques de transfert de gène n'étaient pas envisageables. Pour s'affranchir de ce problème, nous avons testé une approche de trans-épissage de l'ARN pour remplacer le ou les derniers exons du messager de la titine. Nous avons pu ainsi démontrer la faisabilité de la correction de la titine *in vitro*.

Abstract

Titin is a giant protein expressed in both skeletal muscles and heart. Several pathogenic mutations were identified in its last coding exon. The most frequent mutation commonly referred to as FINmaj, results in the replacement of 4 amino acids and affects a subset of patients in Finland. The mutation causes a Tibial Muscular Dystrophy (TMD) when present on one allele and a Limb Girdle Muscular Dystrophy phenotype 2J (LGMD2J) when present on both alleles.

To obtain a model for studying the physiopathology of these diseases and evaluating therapeutic strategies, we introduced the FINmaj mutation in the murine genome by a knock-in strategy by homologous recombination. This model was characterized and showed that it reproduces mainly the symptoms of both the human TMD and LGMD2J at histological and molecular levels.

The study of this mouse model has allowed a better understanding of the pathophysiology of these two diseases and we have to study more carefully the interactions beyond titin C-ter with its partners to better understand the involvement of the M line in life of the sarcomere. The study of the pathophysiology of TMD and LGMD2J showed that calpain 3 (a protease that link to another limb-girdle muscular dystrophy), played a major role in TMD. This finding allowed us to consider a treatment approach for TMD to reduce symptoms by regulating negatively calpain 3. A gene therapy approach was also tested: the trans-splicing of the last exon of titin. Indeed, given the large size of the cDNA of titin (~ 100 kb), conventional strategies of gene transfer were not envisaged. To overcome this problem, we tested an approach to exchange the last exon or the last exons of the titin messenger. We were able to demonstrate the correction of titin *in vitro*.

SOMMAIRE

Remerciements

Résumé	5
Abstract	6
SOMMAIRE	7
Table des figures	11
Liste des tableaux	13
Liste des abréviations	15
PREFACE	17
INTRODUCTION	19
I Les muscles striés	21
1. Le muscle strié squelettique.....	21
1.1. Composition du muscle squelettique.....	21
1.2. La fibre musculaire squelettique.....	24
2. Le muscle cardiaque.....	26
2.1. Composition du muscle cardiaque.....	26
2.2. Les cardiomyocytes.....	26
3. Les sarcomères, unités contractiles des muscles squelettiques et cardiaques.....	28
3.1. Composition des sarcomères.....	28
3.2. La contraction musculaire.....	30
II La titine	32
1. Généralités sur cette protéine hors du commun.....	32
2. La titine au cours du développement.....	32
3. La titine dans le muscle squelettique et cardiaque adulte.....	33
3.1. Structure singulière de la titine.....	33
3.2. La titine dans le disque Z.....	34
3.2.1. Structure de la titine en Z.....	34
3.2.2. Partenaires de la titine en Z (Tableau 1).....	35
3.2.3. Fonction de la titine en Z.....	38
3.3. La titine dans la bande I.....	40
3.3.1. Structure de la titine en I.....	40
3.3.2. Partenaires de la titine en I (Tableau 1).....	41
3.3.3. Fonction de la titine en I.....	43
3.4. La titine dans la bande A.....	44
3.4.1. Structure de la titine en A.....	44
3.4.2. Partenaires de la titine en A (Tableau 1).....	45
3.4.3. Fonction de la titine dans la bande A.....	46
3.5. La titine dans la ligne M.....	46
3.5.1. Structure de la titine en M.....	46
3.5.2. Partenaires de la titine en M (Tableau 1).....	48
3.5.3. Fonction de la titine en M.....	50
4. Focus sur un partenaire d'intérêt : la calpaïne 3 (p94).....	51
4.1. Caractéristiques structurales et biochimiques de la calpaïne 3.....	51
4.2. Localisation et fonction de la calpaïne 3.....	53
4.3. Les substrats de la calpaïne 3.....	55
4.4. Mutations de la calpaïne 3 et LGMD2A.....	56
III Les pathologies liées à la titine et les modèles animaux associés	58
1. Phénotypes cardiaques.....	58
1.1. Cardiomyopathie dilatée (CMD1G, MIM:604145).....	58
1.2. Cardiomyopathie hypertrophique (CMH9, MIM:188840).....	59

2.	<i>Phénotype mixte</i>	59
3.	<i>Phénotypes musculaires</i>	60
3.1.	<i>Myopathie héréditaire avec déficience respiratoire précoce (HMERF, MIM:603689)....</i>	60
3.2.	<i>La Dystrophie Musculaire Tibiale et la Dystrophie Des Ceintures 2J (TMD:MIM:600334, LGMD2J: MIM:608807)</i>	60
3.2.1.	<i>Atteinte phénotypique</i>	61
3.2.2.	<i>Atteinte histologique des TMD et LGMD2J</i>	62
3.2.3.	<i>Mutations à l'origine de la TMD et la LGMD2J</i>	63
3.2.4.	<i>Conséquences des mutations à l'origine des TMD/LGMD2J au niveau moléculaire</i>	64
4.	<i>Modèles animaux d'étude de la titine et des pathologies associées</i>	65
4.1.	<i>La drosophile</i>	65
4.2.	<i>Le poisson</i>	66
4.3.	<i>Les modèles murins</i>	66
4.4.	<i>Le modèle rat</i>	68
IV	<i>Thérapie génique des pathologies liées au gène de la titine</i>	70
1.	<i>Stratégies de thérapies géniques appliquées aux dystrophies musculaires</i>	70
2.	<i>Manipuler les ARNs en thérapie génique : la chirurgie des ARNs</i>	71
2.1.	<i>L'épissage</i>	71
2.1.1.	<i>Les ARN pré-messagers et le spliceosome</i>	71
2.1.2.	<i>Processus d'épissage et séquences régulatrices</i>	72
a)	<i>Processus</i>	72
b)	<i>Sites donneur/accepteur et de branchement</i>	72
c)	<i>Autres séquences de régulations de l'épissage</i>	73
2.1.3.	<i>Epissages alternatifs</i>	75
2.1.4.	<i>Mutations perturbant l'épissage</i>	75
2.2.	<i>La chirurgie des ARNm</i>	76
2.3.	<i>Le trans-épissage</i>	78
2.3.1.	<i>Le trans-épissage à l'état naturel</i>	78
2.3.2.	<i>Le trans-épissage utilisé comme approche de thérapie génique</i>	79
2.3.3.	<i>Preuves de principe du trans-épissage en thérapie génique par les SMARTs</i>	81
d)	<i>Le trans-épissage pour les maladies non neuromusculaires</i>	81
e)	<i>Le trans-épissage pour les maladies neuromusculaires</i>	83
	RESULTATS	89
	PARTIE I Etude du modèle KI TTN FINmaj	91
1.	<i>Construction de la souris KI TTN FINmaj</i>	93
2.	<i>Distorsion de ratio des naissances chez les souris KI TTN FINmaj</i>	95
3.	<i>Les souris KI TTN FINmaj présentent un phénotype fonctionnel normal</i>	97
4.	<i>Atteinte histologique des muscles de souris KI TTN FINmaj</i>	98
5.	<i>L'intégrité des sarcomères n'est pas affectée mais des vacuoles et des anomalies mitochondriales sont visibles chez les souris HE et HO</i>	104
6.	<i>La force du Soléaire est affectée dans le cas des souris homozygotes pour la mutation FINmaj</i>	105
7.	<i>Dysfonctionnement systolique chez les souris homozygotes pour la mutation FINmaj</i>	107
	PARTIE II Etude de la physiopathologie de la TMD et de la LGMD2J	111
1.	<i>Conséquences des mutations conduisant à une TMD et LGMD2J sur la titine</i>	114
1.1.	<i>La présence de la mutation FINmaj entraîne la perte de la partie C-terminale de la titine dans les muscles squelettique et cardiaque</i>	114
1.2.	<i>La perte de la partie C-terminale de la titine n'est pas due à un épissage aberrant</i>	118
1.3.	<i>Une coupure pathologique de la titine mutée par la calpaïne 3 ?</i>	120
1.3.1.	<i>La calpaïne 3 coupe la titine en présence de la mutation FINmaj in vitro</i>	120
1.3.2.	<i>La calpaïne 3 n'est pas à l'origine de la perte des domaines C-terminaux de la titine mutée dans le muscle</i>	121
1.3.3.	<i>Les calpaïnes ubiquitaires peuvent couper la titine WT ou mutée in vitro</i>	122
2.	<i>Les conséquences des mutations FINmaj sur la calpaïne 3</i>	124

2.1.	<i>L'interaction de la calpaïne 3 avec la titine en is7 n'est pas perturbée par la présence de la mutation in vitro</i>	124
2.2.	<i>Diminution du niveau protéique de calpaïne 3 chez les KI TTN FINmaj</i>	125
2.3.	<i>Déstabilisation protéique de la calpaïne 3 chez les KI TTN FINmaj</i>	126
3.	<i>Les conséquences de la mutation FINmaj sur l'obscurine et l'obscurine like 1</i>	127
3.1.	<i>L'expression de l'obscurine dans les KI TTN FINmaj n'est pas modifiée</i>	127
3.2.	<i>La localisation de l'obscurine est perturbée chez les souris KI TTN FINmaj HO</i>	128
3.3.	<i>L'expression de l'obs11 n'est pas modifiée dans les souris KI TTN</i>	130
PARTIE III Etude de la relation entre les protéines de la ligne M et la calpaïne 3		133
CONTEXTE.....		135
1.	<i>Etude des fragments de la titine générés par l'activité de la calpaïne 3 in vitro et in vivo</i> ...	135
1.1.	<i>Prédictions des sites de coupure de la partie C-terminale de la titine par la calpaïne 3</i>	135
1.2.	<i>Fonction et localisation du fragment p45</i>	137
1.2.1.	<i>Construction de la souris Tg p45</i>	137
1.2.2.	<i>Localisation du fragment p45</i>	138
1.2.3.	<i>Agrégation du p45 dans les fibres des souris Tg p45</i>	139
1.2.4.	<i>Ubiquitination du fragment p45 chez les souris Tg p45</i>	141
2.	<i>Relation entre myospryne et la calpaïne 3 in vitro</i>	142
PARTIE IV Approches thérapeutiques pour la TMD et la LGMD2J		145
1.	<i>Modulation de l'expression de la calpaïne 3 dans le modèle murin KI TTN FINmaj</i>	147
1.1.	<i>L'injection de calpaïne 3 aggrave l'atteinte histologique des souris HE et HO pour la mutation FINmaj</i>	147
1.2.	<i>Croisement des souris KI TTN FINmaj avec des souris Knock Out pour la calpaïne 3</i> .	150
1.3.	<i>La diminution de la quantité de calpaïne 3 améliore le phénotype musculaire des souris hétérozygotes pour la mutation FINmaj</i>	151
1.4.	<i>La diminution de la quantité de calpaïne 3 n'améliore pas le phénotype des souris HO pour la mutation FINmaj</i>	156
2.	<i>Approche thérapeutique par trans-épissage de la partie C-terminale de la titine</i>	157
2.1.	<i>Trans-épissage de l'exon Mex6 de la titine</i>	157
2.1.1.	<i>Stratégie utilisée</i>	157
2.1.2.	<i>Correction du minigène Mex2-6FINmaj in vitro en ARN</i>	160
2.1.1.	<i>Correction de la miniprotéine titine</i>	161
2.1.1.	<i>Ajout de séquences pour l'amélioration du trans-épissage</i>	162
2.2.	<i>Trans-épissage des exons Mex4 à Mex6 de la titine</i>	163
2.2.1.	<i>Stratégie</i>	164
2.2.2.	<i>Correction du minigène Mex2-6FINmaj</i>	164
DISCUSSION		167
I Un modèle Knock-In murin FINmaj adapté à l'étude des physiopathologies TMD et LGMD2J et aux tests d'approches thérapeutiques		170
1.	<i>Létalité embryonnaire des souris KI TTN FINmaj : implication d'un autre facteur génétique que la titine</i>	170
2.	<i>Comparaison des atteintes des souris KI TTN FINmaj et humaines</i>	172
2.1.	<i>Etat des lieux</i>	172
2.2.	<i>Souris KI TTN FINmaj HE/TMD (Tableau 9)</i>	172
2.3.	<i>Souris KI TTN FINmaj HO/LGMD2J (Tableau 9)</i>	173
II Conséquences moléculaires des mutations à l'origine des TMD/LGMD2J		176
1.	<i>La perte des domaines C-terminaux de la titine</i>	176
1.1.	<i>Localisation et provenance de la perte de la partie C-terminale de la titine</i>	177
1.2.	<i>Relation entre sélectivité d'atteinte et perte des domaines C-terminaux de la titine</i>	178
1.3.	<i>Devenir de la partie C-terminale de la titine</i>	179
2.	<i>Dérégulation de la calpaïne 3</i>	179
2.1.	<i>Lien entre la perte des domaines C-terminaux de la titine et la diminution de la quantité de calpaïne 3</i>	179
2.2.	<i>Implication de la calpaïne 3 dans la TMD et la LGMD2J</i>	181

2.2.1. Chez les HE	181
2.2.2. Chez les HO.....	181
3. Implication de l'obscurine et de l'obscurine like 1 dans les TMD/LGMD2J	182
4. Un modèle pour la TMD et la LGMD2J ?	183
III Approches thérapeutiques pour la TMD et la LGMD2J.....	187
1. Diminuer la quantité de calpaïne 3 chez les patients TMD	187
1.1. Etat des lieux	187
1.2. Les approches envisageables	187
1.3. Les limites.....	188
2. Trans-épissage de la partie C-terminale de la titine.....	188
2.1. Etat des lieux	188
2.2. Amélioration du trans-épissage.....	189
2.3. Une thérapie par trans-épissage : envisageable et adaptée pour les TMD et LGMD2J? 190	
3. Perspectives et autres approches thérapeutiques pour les TMD/LGMD2J.....	191
CONCLUSION.....	193
MATERIELS ET METHODES.....	195
Fiche technique 1 : Construction des souris KI TITIN, Tg p45 et KO conditionnel ligne M, croisements et génotypages de ces lignées murines.....	197
Fiche technique 2 : Expérimentation animale	200
Fiche technique 3 : Extraction d'ARN à partir de cellules et de muscles	201
Fiche technique 4 : PCR et PCR quantitative en temps réel	203
Fiche technique 5 : Immunohistochimie et marquages histologiques	206
Fiche technique 6: Coupes Semi-fines et Microscopie Electronique.....	209
Fiche technique 7: Analyse fonctionnelle des muscles de souris.....	210
Fiche technique 8 : Extraction des protéines et analyses	213
Fiche technique 9: Les constructions plasmidiques.....	216
Fiche technique 10: Les cultures et transfections de cellules 911	218
Fiche technique 11 : Imagerie et Logiciels d'analyses.....	219
Fiche technique 12 : Analyses statistiques.....	220
PUBLICATIONS.....	221
Présentations et Posters.....	229
BIBLIOGRAPHIE	230
NOUVEAU CHAPITRE DE LA THESE.....	230

Table des figures

Figure 1: Anatomie du muscle squelettique et structure de la fibre musculaire.....	22
Figure 2: Représentation schématique de la plaque motrice.....	23
Figure 3 : Structure d'une triade.....	25
Figure 4 : Structure de la cellule musculaire cardiaque.....	27
Figure 5 : Organisation d'un sarcomère.....	28
Figure 6 : Constitution protéique schématique d'un sarcomère.....	30
Figure 7 : Mécanisme de glissement des myofilaments lors de la contraction musculaire dans deux sarcomères adjacents.....	31
Figure 8 : Organisation générale de la titine et récapitulatif de ses propriétés connues.....	34
Figure 9 : Organisation du disque Z.....	39
Figure 10 : Différentes isoformes musculaire et cardiaque de la titine au niveau de la bande I, dans le muscle squelettique (N2A) et dans le cœur (N2B et N2BA) identifiées chez l'Homme.....	40
Figure 11: Partenaires et organisation de la titine dans la bande I.....	43
Figure 12 : Structure de la titine et zones de la bande A.....	44
Figure 13 : Partenaires et organisation de la titine dans la bande A.....	46
Figure 14 : Exons et domaines de la titine dans la ligne M.....	47
Figure 15: Organisation de la titine dans la ligne M et interactions protéiques connues.....	48
Figure 16 : Interaction de la titine, l'obscurine et la myoméline 1 dans la ligne M.....	50
Figure 17 : Structures schématique et cristallographique de la calpaïne 3.....	53
Figure 18 : Localisation de la calpaïne 3 en trois points de la titine.....	54
Figure 19 : Localisation des différentes mutations connues sur le gène de la titine.....	58
Figure 20 : Atteinte musculaire des patients TMD et LGMD2J.....	62
Figure 21 : Histologie et microscopie électronique de biopsies musculaires de patients TMD et LGMD2J.....	62
Figure 22 : Conséquences moléculaires de la mutation FINmaj sur la calpaïne 3 et la titine.....	65
Figure 23 : L'épissage des ARNm, séquences et protéines nécessaires à l'épissage.....	73
Figure 24 : Trans-épissages naturels.....	78
Figure 25 : Méthodes utilisées pour le trans-épissage.....	80
Figure 26 : Modes de trans-épissage envisageables par SMaRT pour l'échange d'exon(s) dans l'ARN pré-messager.....	81
Figure 27 : Construction et génotypage de la souris KI TTN FINmaj.....	94
Figure 28: Effet de la mutation FINmaj sur la titine chez les souris KI TTN FINmaj.....	95
Figure 29: Histologie des muscles des souris KI TITIN FINmaj HE.....	99
Figure 30 : Histologie du muscle soléaire des souris KI TTN FINmaj HO à 1 mois.....	99
Figure 31 : Histologie des muscles TA, GA, PSO, GLU, QUAD, BF des souris HO à 6 mois.....	100
Figure 32 : Histologie des muscles des souris KI TITIN FINmaj HO à 9 mois.....	101
Figure 33 : Histologie des muscles EDL à 1 mois chez les souris KI TTN FINmaj HE et HO.....	102
Figure 34 : Marquage cd11b sur coupe de muscle soléaire sur les souris WT, HE et HO KI TTN FINmaj.....	102
Figure 35 : Marquage de la myosine développementale (MHCd) dans le SOL et le TA des souris WT, HE et HO.....	103
Figure 36: Marquage TUNEL sur muscles de souris KI TTN FINmaj.....	104
Figure 37 : Analyse ultrastructurale des TA et SOL des souris WT, HE et HO à 9 mois (a à m).....	105
Figure 38 : Force des soléaires isolés de souris KI TTN FINmaj WT, HE, HO.....	106
Figure 39 : Histologie et quantification de la fibrose sur les coupes de cœur des souris KI TITIN... ..	108
Figure 40 : Echocardiographies réalisées sur souris WT et HO.....	109
Figure 41 : Conséquences moléculaires de la mutation FINmaj dans le muscle squelettique.....	116
Figure 42 : Marquage immunohistochimique de la titine dans la ligne M chez les souris KI TTN FINmaj.....	117

Figure 43 : Conséquences moléculaires de la mutation <i>FINmaj</i> dans le cœur.....	118
Figure 44 : Epissage de la titine en C-terminal chez les souris WT, HE et HO.	119
Figure 45 : Coupure de la ligne M de la titine par la calpaïne 3 en présence des différentes mutations connues de la titine.....	121
Figure 46 : Marquage des fragments de titine obtenus par fractionnement subcellulaire dans la fraction cytosquelettique avec un anticorps dirigé contre le domaine M10 de la titine sur des souris HO; <i>capn3^{-/-}</i> , HO, WT et <i>capn3^{-/-}</i>	122
Figure 47 : Coupure de la titine par les calpaïnes ubiquitaires <i>capn1</i> (C1) et <i>capn2</i> (C2).	123
Figure 48 : La présence des mutations Lille (I3406N), Belge (L34315P) et <i>FINmaj</i> n'empêchent pas l'interaction du domaine is7 avec la calpaïne 3.	124
Figure 49 : Conséquences de la mutation <i>FINmaj</i> sur la calpaïne 3.....	125
Figure 50 : Quantité d'ARNm calpaïne 3 dans les muscles des souris KI TITIN <i>FINmaj</i> à 4 mois. ...	126
Figure 51 : Expression de l'obscurine dans les muscles des souris KI TTN <i>FINmaj</i>	127
Figure 52 : Conséquence de la mutation <i>FINmaj</i> sur la localisation de l'obscurine.	129
Figure 53 : Expression de l' <i>obs11</i> dans les muscles des souris KI TITIN.....	130
Figure 54 : Localisation des zones de coupure prédictives de la calpaïne 3 sur les séquences de la partie C-terminale de la titine humaine et murine.	136
Figure 55 : Construction de la souris transgénique p45.....	138
Figure 56 : Localisation des fragments C-terminaux de la titine après fractionnement subcellulaire chez les souris Tg p45.	139
Figure 57 : Histologie des souris Tg p45.....	140
Figure 58 : Ubiquitination du fragment p45 dans les souris Tg p45.	141
Figure 59 : Myospryne substrat et inhibiteur de la calpaïne 3.	143
Figure 60 : Effet de l'injection de calpaïne 3 chez les souris KI TITIN <i>FINmaj</i>	149
Figure 61 : Histologie des muscles des souris HE et WT, <i>capn3^{+/-}</i> et HE/ <i>capn3^{+/-}</i> à 9 mois après marquage HPS et quantification de la centronucléation.	153
Figure 62 : Régénération des fibres chez les HE; <i>capn3^{+/-}</i>	154
Figure 63 : Histologie des muscles des souris HE et WT, <i>capn3^{+/-}</i> et HE/ <i>capn3^{+/-}</i> à 12 mois après marquage HPS et quantification de la centronucléation.	155
Figure 64 : Histologie après marquage HPS des soléaires des souris WT, HO, <i>capn3^{+/-}</i> et HO ; <i>capn3^{+/-}</i> à 9 mois.....	157
Figure 65 : Plasmide PTM-Mex6.....	158
Figure 66 : Réalisation d'un minigène codant la partie C-terminale de la titine.	158
Figure 67 : Stratégie de trans-épissage pour remplacer l'exon Mex6 muté de la titine.	159
Figure 68 : Preuve de principe du trans-épissage de l'ARNm de la titine <i>in vitro</i>	160
Figure 69 : Séquençage du produit de PCR Mex5+ après trans-épissage.	161
Figure 70 : Trans-épissage de la protéine titine en C-terminal.....	161
Figure 71 : Séquences consensus ISE déterminées dans différents organes.....	162
Figure 72 : Comparaison des PTMs simple, avec 3'UTR ou ISE pour le trans-épissage du minigène Mex2-6.....	163
Figure 73 : Stratégie de trans-épissage pour remplacer les exons Mex4 à 6 de la titine.	164
Figure 74 : Mise en évidence du trans-épissage du minigène titine avec le PTM apportant les 3 derniers exons de la titine.	165
Figure 75 : Comparaison du PTM avec ou sans ISE.....	165
Figure 76 : Modèle proposé pour expliquer la diminution de la quantité de la calpaïne 3 dans les muscles des souris HO et des patients LGMD2J.....	180
Figure 77 : Localisation des hélices α et feuillettes β des derniers domaines de la titine selon la présence de la mutation WT, <i>FINmaj</i> , Lille et Belge.	184
Figure 78 : Modèle proposé pour des mécanismes induit par la présence des mutations à l'origine de la TMD et de la LGMD2J.....	185
Figure 79 : Echocardiographie transthoracique sur souris.	212

Liste des tableaux

Tableau 1: Interactions protéiques connues de la titine dans le muscle squelettique.	37
Tableau 2 : Substrats connus de la calpaine 3 in vitro.....	55
Tableau 3 : Preuves de principe réalisées grâce au trans-épissage.	85
Tableau 4 : Répartition corrigée des 198 génotypes des souris issues de croisement HExHE KI TTN FINmaj.	96
Tableau 5 : Répartition des génotypes des embryons à e12 issus d'accouplements de souris hétérozygotes pour la mutation FINmaj.	97
Tableau 6 : Analyse des propriétés mécaniques des muscles soléaires et EDL des souris WT, HE et HO à 9 mois.....	106
Tableau 7 : Mesures obtenues par échocardiographie transthoracique des souris à 11 mois WT, HE et HO.	110
Tableau 8 : Répartition des naissances des souris KI TTN croisées avec les souris capn3 ^{-/-}	151
Tableau 9 : Comparaison des conséquences phénotypiques de la mutation FINmaj chez l'Homme et la souris à l'état hétéro- et homozygote.	175
Tableau 10 : Comparaison de l'atteinte histologique des souris capn3 ^{-/-} et KI TTN FINmaj N3.	182
Tableau 11 : Comparaison des conséquences moléculaires connues par les mutation FINmaj, Lille et Belge.	183
Tableau 12 : Comparaison des conséquences moléculaires de la mutation FINmaj chez l'Homme et la souris à l'état hétéro- et homozygote.	186

Liste des abréviations

AAV : <u>A</u> denu- <u>A</u> ssociated <u>V</u> irus	DMPK: <u>D</u> ystrophy <u>M</u> yotonica- <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
ACAT1 :	EDL: <u>E</u> xtensorum <u>D</u> igitorum <u>L</u> ongus
ADN : <u>A</u> cide <u>D</u> éoxyribo <u>N</u> ucléique	EOMFC: <u>E</u> arly <u>O</u> nset <u>M</u> yopathy with <u>F</u> atal
ADNc : <u>A</u> cide <u>D</u> esoxyribo <u>N</u> ucléique <u>c</u> omplémentaire	<u>C</u> ardiomyopathy
Ankrd2 : <u>A</u> nkyrin <u>r</u> epeat protein <u>d</u> omain <u>2</u>	EOPS: <u>E</u> xempte d' <u>O</u> rganismes <u>P</u> athogènes <u>S</u> pécifiques
AON : <u>A</u> ntisens <u>O</u> ligo <u>N</u> ucleotide	ESE : Exonic Splicing Enhancer
ARN : <u>A</u> cide <u>R</u> ibo <u>N</u> ucléique	ESS: Exonic Splicing Silencer
ARNm : <u>A</u> cide <u>R</u> ibo <u>N</u> ucléique <u>m</u> essenger	Fn : <u>F</u> ibronectine
ARNpm : <u>A</u> cide <u>R</u> ibo <u>N</u> ucléique <u>p</u> remessenger	FHL1: <u>F</u> our and a <u>H</u> alf <u>L</u> im domain protein <u>1</u>
ATG : <u>A</u> dénine <u>T</u> hymine <u>G</u> uanine	FHL2: <u>F</u> our and a <u>H</u> alf <u>L</u> im domain protein <u>2</u>
ATP : <u>A</u> dénosine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate	FINmaj : <u>M</u> ajoritaire en <u>F</u> INLANDE
AU / UA : <u>U</u> nités <u>A</u> rbitraires	GA : <u>G</u> astrocnemius
BD: <u>B</u> inding <u>D</u> omain	GLU : <u>G</u> lutéus
BF: <u>B</u> iceps <u>F</u> emoris	HE : <u>H</u> étérozygote
BP: <u>B</u> ranching <u>P</u> oint	hnRNP: <u>h</u> eterogeneous <u>n</u> uclear <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleo <u>P</u> rotein
C1 ou μ CL : <u>C</u> alpaïne <u>1</u> ou <u>m</u> icro <u>C</u> a <u>L</u> païne	HMERF: <u>H</u> ereditary <u>M</u> yopathy with <u>E</u> arly <u>R</u> espiratory
C2 ou mCL : <u>C</u> alpaïne <u>2</u> ou <u>m</u> illi <u>C</u> a <u>L</u> païne	<u>F</u> ailure
C3: <u>C</u> alpaïne <u>3</u>	HO : <u>H</u> omozygote
Ca ²⁺ : Calcium	HPS : <u>H</u> ématoxyline - <u>P</u> hloxine - <u>S</u> afran
CARP: <u>C</u> ardiac <u>A</u> nkyrin <u>R</u> epeat <u>P</u> rotein	Ig : <u>I</u> mmunoglobuline
CERFE : <u>C</u> entre d' <u>E</u> xploration et de <u>R</u> echerche	IM : <u>I</u> ntra- <u>M</u> usculaire
<u>F</u> onctionnelle <u>E</u> xpérimentale	IRM : <u>I</u> magerie à <u>R</u> ésonance <u>M</u> agnétique)
CFTR: <u>C</u> ystic <u>F</u> ibrosis <u>T</u> ransmembrane conductance	IS: <u>I</u> nsertion <u>S</u> equance
<u>R</u> egulator	ISE: <u>I</u> ntronic <u>S</u> plicing <u>E</u> nhancer
CMD1G: <u>C</u> ardiomyopathie <u>D</u> ilatée <u>1G</u>	ISS: <u>I</u> ntronic <u>S</u> plicing <u>S</u> ilencer
COAA: <u>C</u> O <u>A</u> ctivator <u>A</u> ctivator	ITR: <u>I</u> nverted <u>T</u> erminal <u>R</u> epat
COL17A1:	IV: <u>I</u> ntra- <u>V</u> eineux
C ter: <u>C</u> arboxy <u>t</u> erminal ou <u>C</u> OOH- <u>t</u> erminal	KI: <u>K</u> nock- <u>I</u> n
Cys: <u>C</u> ystéine	KO: <u>K</u> nock- <u>O</u> t
Da, kDa, Mda: <u>D</u> alton, <u>k</u> ilo <u>D</u> alton, <u>M</u> ega <u>D</u> alton	LGMD: <u>L</u> imb <u>G</u> irdle <u>M</u> uscular <u>D</u> ystrophy
DARP: <u>D</u> iabetes related <u>A</u> nkyrin <u>R</u> epat <u>P</u> rotein	LMM: <u>S</u> 2- <u>L</u> ight <u>M</u> ero <u>M</u> ysin
DCM: <u>D</u> ilated <u>C</u> ardio <u>M</u> yopathy	MARP: <u>M</u> uscle <u>A</u> nkyrin <u>R</u> epat <u>P</u> rotein
DEL: <u>D</u> eltoïde	<u>M</u> DM: <u>M</u> uscular <u>D</u> ystrophy <u>M</u> yositis
DIA: <u>D</u> iaphragme	Mdx: <u>X</u> -linked <u>m</u> uscular <u>d</u> ystrophy
DM1: <u>D</u> ystrophie <u>M</u> yotonique de type <u>1</u>	ME : <u>M</u> icroscopie <u>E</u> lectronique
DMD : <u>D</u> ystrophie <u>M</u> usculaire de <u>D</u> uchenne	Mex : Ligne <u>M</u> <u>e</u> xon

MLC: <u>M</u> ysin <u>L</u> ight <u>C</u> hain	SMN: <u>S</u> urvival <u>M</u> otor <u>N</u> euron
MHCd: <u>M</u> ysin <u>H</u> eavy <u>C</u> hain <u>d</u> evelopmental	snRNA: <u>s</u> mall <u>n</u> uclear <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleoprotein <u>A</u> cid
MYBP-C: <u>M</u> Yosin <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>C</u>	SOL: <u>S</u> oleus
MYOM2: <u>M</u> YOMesin <u>2</u>	SRF: <u>S</u> erum <u>R</u> esponse <u>F</u> actor
MuRF: <u>M</u> uscle <u>R</u> ing <u>F</u> inger protein	TA: <u>T</u> ibialis <u>A</u> nterior
Nbr1: <u>N</u> eighbor of <u>B</u> RCA1 gene <u>1</u>	Tcap: <u>T</u> elethonin <u>c</u> ap
NLS: <u>N</u> uclear <u>L</u> ocalisation <u>S</u> ignal	TK: <u>T</u> hréonine <u>K</u> inase
NMD: <u>N</u> onsense- <u>M</u> ediated mRNA <u>D</u> ecay	TMD: <u>T</u> ibial <u>M</u> uscular <u>D</u> ystrophy
NRAP: <u>N</u> ebulin- <u>R</u> elated <u>A</u> nchoring <u>P</u> rotein	TnI : <u>T</u> roponin- <u>I</u>
NS: <u>N</u> terminal <u>S</u> equence	TnT : <u>T</u> roponin- <u>T</u>
nt: <u>n</u> ucleotide	TTN: <u>T</u> i <u>T</u> i <u>N</u> e
N ter: <u>N</u> H2- <u>t</u> ermin <u>a</u> l	TUNEL: <u>T</u> erminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated d <u>U</u> TP-biotin <u>N</u> ick <u>E</u> nd <u>L</u> abeling
PO : Acide ribophosphoprotéique	UsnRNPs: <u>U</u> ridine-rich small nuclear <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleoprotein
pb, kb : paire de bases, kilopaire de bases	<u>P</u> articules
PCR : Polymerase chain reaction	UT: <u>U</u> n <u>T</u> ranslated <u>R</u> egion
PEVK : Proline (<u>P</u>) Acide glutamique (<u>E</u>) Valine (<u>V</u>) Lysine (<u>K</u>)	VEGF: <u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
PLA: <u>P</u> lantaire	VLCAD: acyl- <u>C</u> oenzyme <u>A</u> <u>D</u> ehydrogenase, <u>V</u> ery <u>L</u> ong chain
PLEC1: <u>P</u> lectine <u>1</u>	WT : <u>W</u> ild- <u>T</u> ype
PPT: <u>P</u> oly <u>P</u> rimidine <u>T</u> ract	
PSO: <u>P</u> soas	
PTM: <u>P</u> re- <u>T</u> rans-splicing <u>M</u> olecule	
QUA: <u>Q</u> uadriceps	
RBM4: <u>R</u> NA <u>B</u> inding <u>M</u> otif protein <u>4</u>	
RISC: <u>R</u> NA- <u>I</u> nduced <u>S</u> ilencing <u>C</u> omplex	
RNAi : <u>R</u> NA <u>I</u> nterference	
RT-PCR : <u>R</u> everse <u>T</u> ranscription <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction	
SA : <u>S</u> ite <u>A</u> cepteur	
sAnk1: <u>s</u> mall <u>A</u> nkyrine <u>1</u>	
SD: <u>S</u> ite <u>D</u> onneur	
shRNA: <u>s</u> mall <u>h</u> airpin <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid	
siRNA: <u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleic <u>A</u> cid	
SL: <u>S</u> plicing <u>L</u> eader	
SMA: <u>S</u> pinal <u>M</u> uscular <u>A</u> trophy	
SMaRT: <u>S</u> plicing <u>M</u> ediated <u>R</u> NA <u>T</u> rans-splicing	

PRÉFACE

Le laboratoire Dystrophies Des Ceintures à Généthon travaille sur la mise en place de stratégies thérapeutiques pour les Dystrophies Des Ceintures. Les projets de l'équipe portent actuellement sur l'étude de plusieurs Dystrophies Des Ceintures (LGMD). Ces maladies constituent un groupe de dystrophies musculaires, qui sont des maladies génétiques caractérisées par une dégénérescence musculaire conduisant à une altération et à une perte des fonctions locomotrices. Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement pour ces pathologies. Plusieurs axes de recherche sont actuellement développés par l'équipe afin d'améliorer le diagnostic et d'identifier des cibles d'intérêt pour établir des traitements :

1. La détermination des mutations à l'origine des ces pathologies et l'étude moléculaire de ces maladies afin de comprendre leur physiopathologie
2. L'étude du réseau protéique musculaire et des interactions entre les protéines en cause dans les dystrophies des ceintures
3. La recherche de solutions thérapeutiques innovantes pour corriger le défaut génétique incriminé dans ces maladies

Il existe 10 dystrophies des ceintures déterminées à ce jour. Dans ce cadre, la dystrophie des ceintures de type 2J s'inscrit dans les objectifs de l'équipe.

Le projet fait suite à l'identification par le groupe en 2000, en collaboration avec l'équipe de Bjarne Udd en Finlande, de la mutation principale dans le gène de la titine TTN, causant la dystrophie musculaire tibiale à l'état hétérozygote ainsi que la dystrophie des ceintures de type 2J à l'état homozygote.

Les travaux décrits dans ce mémoire, présentent comment, pour déterminer des possibilités de thérapies pour la dystrophie musculaire tibiale et la LGMD2J, nous nous sommes proposés de reproduire et étudier un modèle murin exprimant la mutation la plus répandue chez l'Homme et envisager et tester des thérapies adaptées à ces formes de dystrophies.

INTRODUCTION

I Les muscles striés

Il existe 3 types de muscles: les **muscles lisses**, le **muscle cardiaque** et les **muscles squelettiques**. Les muscles lisses et le muscle cardiaque ont la caractéristique d'être soumis à un contrôle involontaire exercé par le système nerveux végétatif et dans le cas particulier du cœur, un système électrique autonome, alors que les muscles squelettiques sont sous le contrôle du système nerveux volontaire. Les muscles lisses tapissent certains organes internes tel que les intestins, le colon, les gros vaisseaux sanguins et permettent des contractions longues et soutenues nécessaires aux fonctions végétatives: la musculature lisse assure par exemple les mouvements de l'intestin, des vaisseaux ou de l'utérus. Le muscle cardiaque est capable de contractions rythmées et continues qui permettent un pompage régulier du sang. Les muscles squelettiques sont, pour leur part, capables de générer des forces sur les structures osseuses avec comme exception le muscle de la langue. Ils constituent 40 à 50% de la masse totale du corps et vont jouer un rôle central dans la fonction de locomotion, des mouvements et de la posture.

1. Le muscle strié squelettique

1.1. Composition du muscle squelettique

Les composants des muscles squelettiques sont entourés et protégés par plusieurs couches de tissu conjonctif. L'**endomysium** sépare chaque fibre musculaire, le **périmysium** englobe 10 à 100 fibres musculaires en faisceaux et l'**épimysium**, la couche extérieure, enveloppe tout le muscle. Ces membranes fournissent des fibres de collagène aux tissus conjonctifs qui attachent le muscle à d'autres structures, tels que les tendons et les os (*Figure 1*).

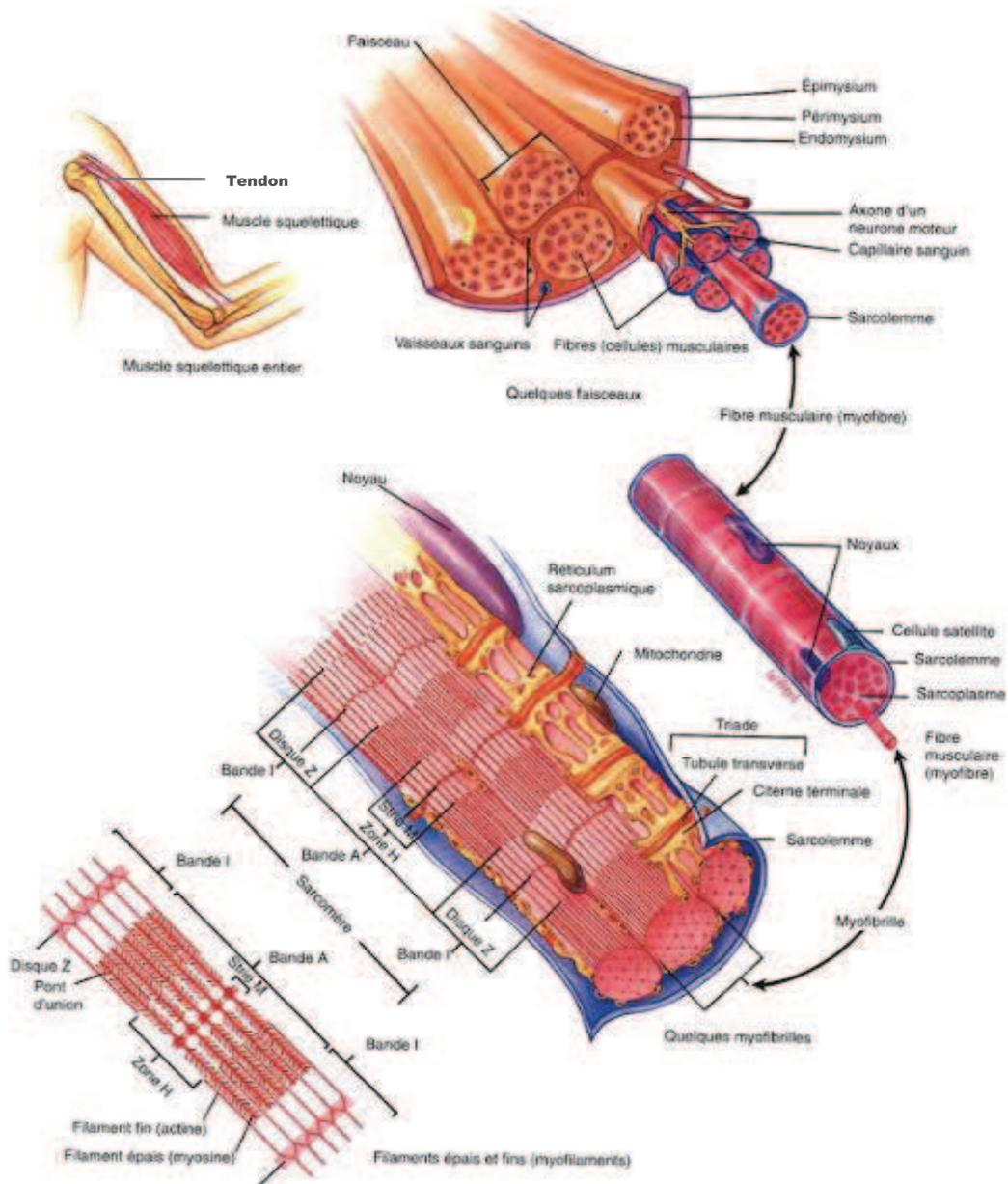


Figure 1: Anatomie du muscle squelettique et structure de la fibre musculaire. D'après Tortora et. al, 1994, principes d'anatomie et de physiologie.

Les muscles squelettiques sont parcourus par un réseau de **nerfs** et de **vaisseaux sanguins**. En général, une artère et une ou deux veines accompagnent chaque nerf qui pénètre à l'intérieur d'un muscle squelettique. Elles permettent d'apporter au muscle l'**oxygène** nécessaire à la génération d'énergie et d'évacuer les résidus issus du travail musculaire.

Les neurones qui provoquent la contraction des muscles squelettiques sont les neurones moteurs (ou **motoneurones**) somatiques. Ils sont sollicités lors du contrôle de la posture, mais également dans les mouvements volontaires. Le motoneurone possède un axone qui se divise en plusieurs branches au voisinage des fibres musculaires et entre en contact avec la membrane cellulaire au niveau d'une synapse appelée **plaque motrice** terminale ou jonction neuromusculaire (*Figure 2*). Bien que chaque fibre ne soit innervée que par une seule terminaison nerveuse, le nombre de fibres musculaires branchées sur un motoneurone varie en fonction du type musculaire. Une unité motrice est constituée par l'ensemble fonctionnel comprenant un motoneurone et les fibres qu'il innerve. D'une façon générale, toutes les fibres d'une unité motrice sont du même type métabolique et fonctionnent simultanément (Burke *et al.*, 1971; Wakeling *et al.*, 2002).

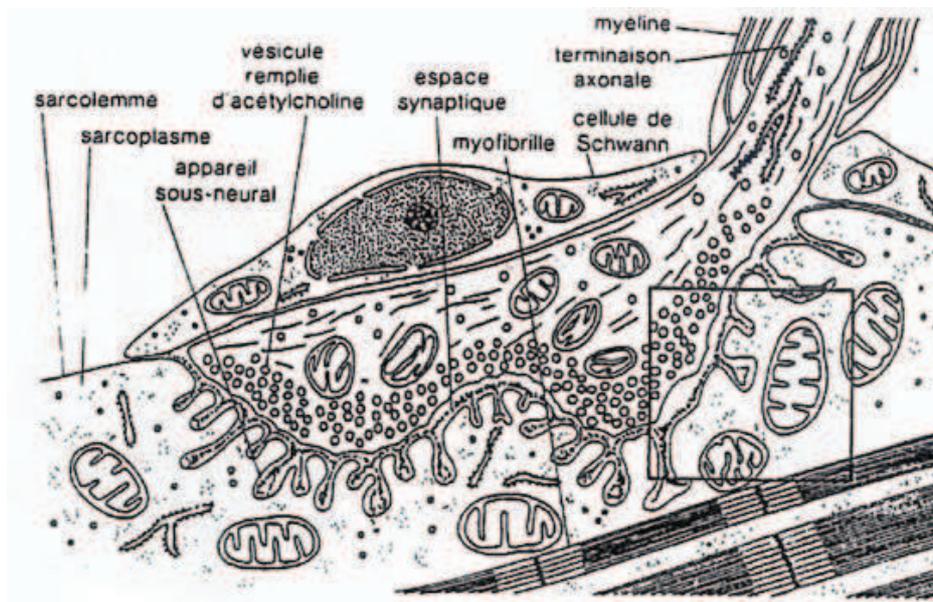


Figure 2: Représentation schématique de la plaque motrice.

Les **fibres musculaires**, principal type cellulaire représenté dans le tissu musculaire squelettique, s'apparentent à de longs cylindres disposés parallèlement (Tortora et al. 1994). Chez l'Homme, les fibres matures ont un diamètre de 10 à 100 µm et peuvent mesurer jusqu'à 30 cm de long. Chaque fibre est un syncytium formée par la fusion au cours du développement de plusieurs centaines de cellules appelées **myoblastes**. Leur fusion génère des **myotubes** polynucléés dont les noyaux migrent en périphérie sous la membrane plasmique au cours de la maturation, elles sont donc polynucléées.

Un certain nombre de myoblastes vont demeurer dans le muscle mature à l'état de cellules mononucléées quiescentes, les **cellules satellites**. Ces cellules satellites sont présentes spécifiquement et exclusivement dans le muscle squelettique. De petite taille et de forme aplatie, ces cellules sont situées entre la lame basale et la membrane plasmique, à la périphérie des fibres musculaires (*Figure 1*). Les cellules satellites assurent la croissance des fibres musculaires en maintenant le rapport entre les unités de transcription (noyaux ajoutés au fur à mesure de la croissance des fibres multinucléées) et le volume des fibres. Enfin, elles sont responsables de la régénération des fibres musculaires après une lésion, que celle-ci soit d'origine traumatique ou pathologique comme dans le cas des dystrophies musculaires.

Enfin, des cellules non-spécifiques, telles que neurones, adipocytes, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules du système immunitaire, participent à l'organisation du tissu musculaire.

1.2. La fibre musculaire squelettique

La membrane de la fibre musculaire est connue sous le nom de **sarcolemme**, et est doublée d'une lame basale (*Figure 1*).

La fibre musculaire contient tous les organites et inclusions cellulaires classiques des cellules dans le sarcoplasme, tels que l'appareil de Golgi, les noyaux, les vésicules, les nombreuses **mitochondries**, le réticulum endoplasmique lisse (encore appelé réticulum sarcoplasmique) et le réticulum endoplasmique rugueux. Elle contient en outre des molécules assurant le stockage du glucose (glycogène) et de l'oxygène intracellulaire (myoglobine) (*Figure 1*).

Le **réticulum sarcoplasmique**, compartiment spécialisé dans le stockage et la libération du calcium lors de la contraction et de la relaxation du muscle est constituée de deux parties distinctes : les citernes terminales, gros renflements du réticulum, impliqués dans la libération du calcium (Ca^{2+})

et le réticulum sarcoplasmique longitudinal, fin réseau membranaire reliant les citernes et assurant la recapture ou repompage des ions Ca^{2+} . L'association de deux citernes terminales adjacentes du réticulum sarcoplasmique avec un tubule T (invagination du sarcolemme, également appelée tubule transverse) forme une structure caractéristique appelée **triade**. Chaque fibre musculaire possède des milliers de triades (*Figure 1*).

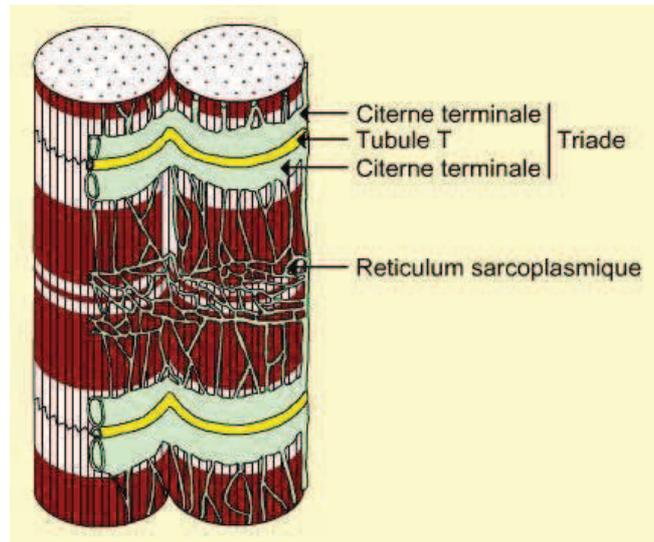


Figure 3 : Structure d'une triade.

Le tubule-T est associé à deux citernes terminales adjacentes du réticulum sarcoplasmique. Les citernes sont reliées entre elles par du réticulum sarcoplasmique longitudinal.

A l'intérieur du sarcoplasme, le réticulum sarcoplasmique entoure les unités de base de la contraction musculaire, les **myofibrilles** (*Figure 1*). D'une longueur identique à celle de la fibre, les myofibrilles ont un diamètre de 1 à 3 μm et occupent la quasi-totalité du volume interne de la fibre. Elles sont reliées à la membrane plasmique des fibres par les filaments intermédiaires qui permettent également à la cellule musculaire de se contracter et de se relaxer sans se rompre. Leur organisation répétée caractéristique est à l'origine de l'appellation générique « muscle strié » donnée au tissu qu'elles composent. En effet, leur apparence en microscopie électronique révèle une striation transversale périodique due à l'alternance de bandes claires (ou I pour isotropes) et sombres (ou A pour anisotropes) (*Figure 1*). Les bandes I et A présentent, en leur milieu respectif, le disque Z et la ligne M.

Les muscles squelettiques sont dotés de fibres de deux types (la proportion étant variable suivant les muscles):

- les fibres dites « **lentes** » (type I), plus efficaces en métabolisme aérobie, particulièrement riches en mitochondries qui apportent l'énergie nécessaire à la contraction sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate). Elles sont également riches en myoglobine, molécule capable de fixer l'oxygène, et qui leur donne une couleur rouge caractéristique. Ce sont les fibres de l'endurance.
- les fibres dites « **rapides** » (type II), plus efficaces en métabolisme anaérobie. Elles sont plus pauvres en mitochondries et en myoglobine. Elles sont par contre beaucoup plus riches en glycogène et en enzymes glycolytiques d'où une couleur blanche. Produisant plus de puissance pendant de courtes impulsions, elles sont plus sensibles à la fatigue.

2. Le muscle cardiaque

2.1. Composition du muscle cardiaque

Le muscle cardiaque est un muscle creux à **contraction involontaire**. Il est très dépendant du métabolisme oxydatif et est continuellement actif. Par conséquent, le flux sanguin nécessaire au fonctionnement de celui-ci est important. En conséquence, un grand nombre de capillaires l'irriguent.

L'**innervation** du muscle cardiaque est de deux types: l'innervation intrinsèque et l'innervation extrinsèque. La première est essentielle au contrôle et à la régulation de la contraction du myocarde et est responsable de l'automatisme cardiaque. L'innervation extrinsèque, quant à elle, peut moduler le rythme cardiaque.

Le muscle strié cardiaque est un muscle constitué de **cardiomyocytes** qui forment un réseau tridimensionnel dans le myocarde. Une cellule cardiaque est une cellule qui ne possède qu'un noyau au contraire de la fibre musculaire. Comme le muscle squelettique, le muscle cardiaque est constitué de nombreux autres types cellulaires tels que les neurones, adipocytes, fibroblastes, cellules endothéliales et cellules du système immunitaire. Le muscle cardiaque ne possède pas de cellules comparables aux **cellules satellites** du muscle squelettique, les fibres cardiaques endommagées ne sont donc pas remplacées.

2.2. Les cardiomyocytes

Les cardiomyocytes ont une forme de cylindre. Leur taille est sans commune mesure avec celle de leurs homologues squelettiques car nettement plus petites. Ils possèdent chacun un **noyau**

central allongé dans le sens du grand axe de la cellule. Les striations observées dans le sarcoplasme des cardiomyocytes sont semblables à celles observées dans le muscle squelettique. Les extrémités des fibres adjacentes sont accolées l'une à l'autre au niveau d'une structure appelée **disque intercalaire** (points de jonction entre les fibres musculaires qui ralentissent l'impulsion électrique et permettent de maintenir une importante cohésion de cellule à cellule) riches en **desmosomes** (jonctions assurant la solidité mécanique par liaison aux filaments intermédiaires de la fibre) (*Figure 4*). Par ailleurs, les cytoplasmes des cellules cardiaques sont en communication directe *via* de nombreuses jonctions communicantes. Ces jonctions fournissent des ponts de faible résistance pour la propagation de l'excitation d'une fibre à l'autre. Elles permettent au muscle cardiaque de fonctionner comme un syncytium.

Dans les cellules cardiaques, le réticulum sarcoplasmique est considérablement moins développé que dans les cellules musculaires squelettiques. Il présente une structure similaire, non pas en triade, mais en **diade**, créée par l'association d'un tubule-T et d'une seule citerne de réticulum. Ces diades sont localisées au niveau du **disque Z** plutôt qu'au niveau de la jonction bande A-bande I comme cela est le cas dans le muscle strié squelettique. Enfin, les mitochondries et les grains de glycogène sont plus abondants que dans les fibres musculaires striées squelettiques.

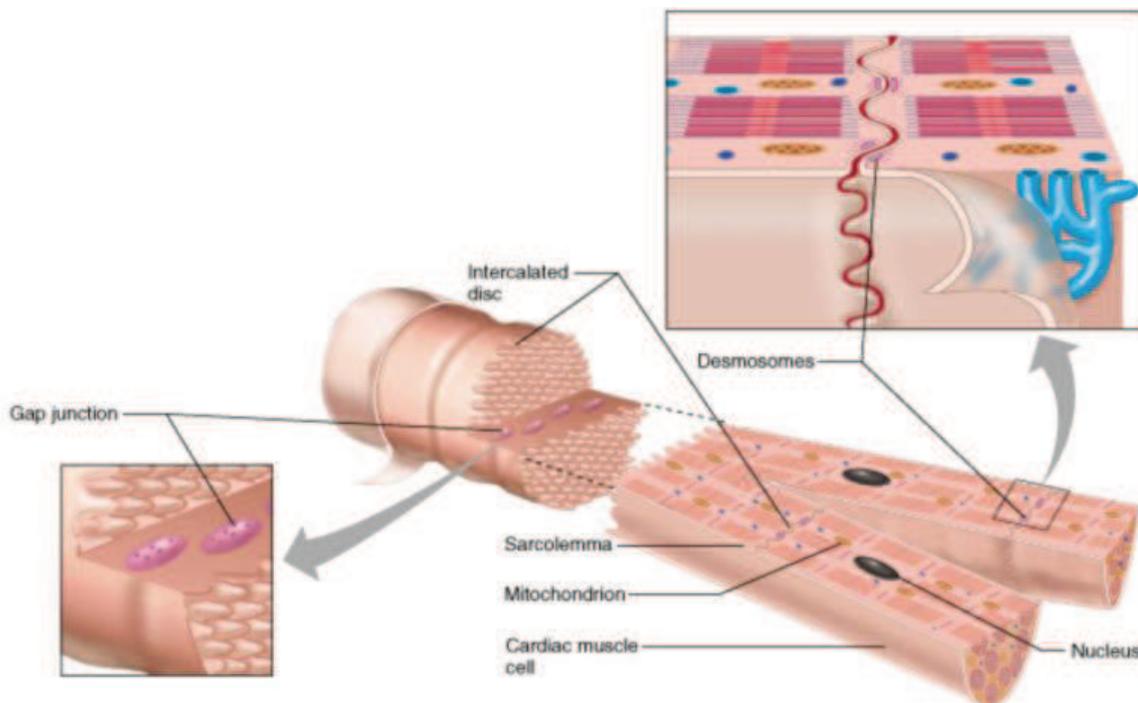


Figure 4 : Structure de la cellule musculaire cardiaque.
D'après B. Cummings, 2001.

3. Les sarcomères, unités contractiles des muscles squelettiques et cardiaques

3.1. Composition des sarcomères

Le **sarcomère**, délimité par deux disques Z adjacents, constitue l'unité de base de la contraction musculaire que ce soit dans le muscle squelettique ou cardiaque (Huxley, 1969). De façon remarquable, les sarcomères des différentes myofibrilles sont alignés selon leur axe longitudinal.

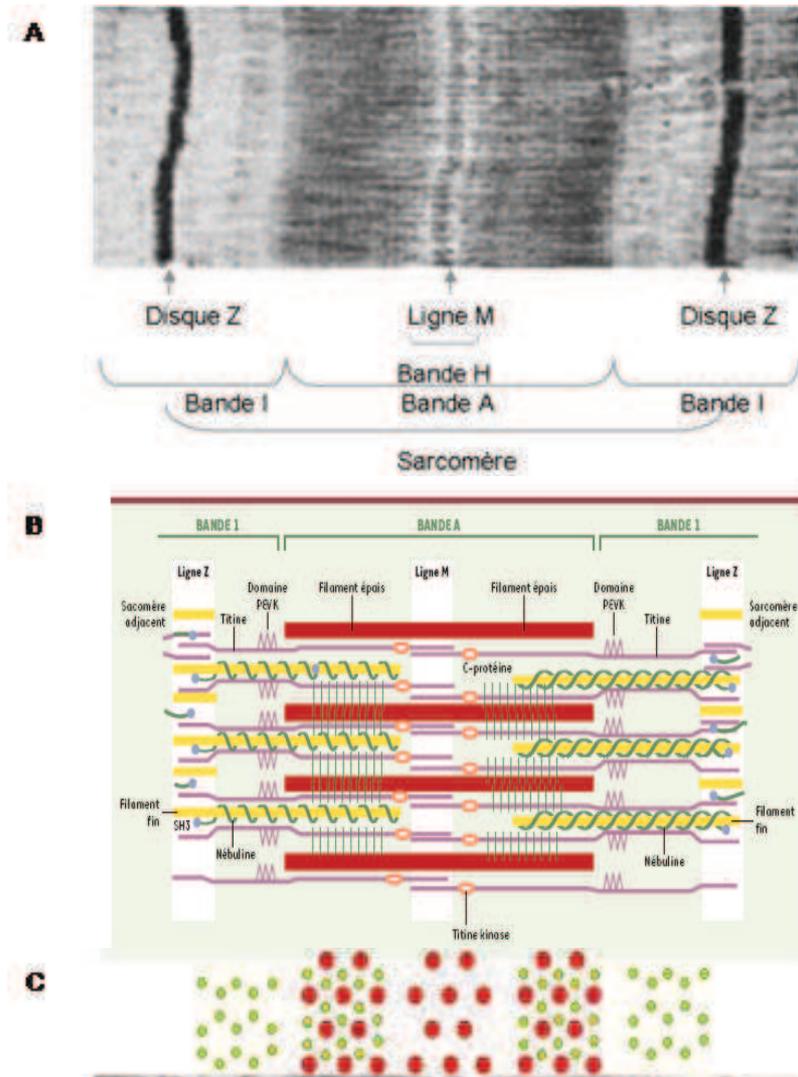


Figure 5 : Organisation d'un sarcomère.

A/ Photographie d'un sarcomère obtenue par microscopie électronique. B/ Représentation schématique d'un sarcomère. C/ Représentation transversale de l'organisation des myofilaments fins et épais en myofibrilles à différents niveaux du sarcomère.

Les sarcomères sont des agencements de nombreuses protéines contractiles, régulatrices et structurales et sont composés de quatre systèmes différents de filaments : les **filaments épais**

de **myosine**, les **filaments fins d'actine**, les **filaments de titine** et de **nébuline**. Les filaments épais (myosine) sont disposés au milieu du sarcomère, au niveau de la bande A. Dans la bande plus claire H, ils sont seuls présents. La ligne M interrompt la bande H en son milieu et correspond au renflement médian dû à la liaison des filaments de myosine entre eux (*Figure 5*). En revanche, de part et d'autre de la bande A, les filaments fins (composés de monomères d'actine) et épais se chevauchent, les filaments fins étant disposés entre les filaments épais selon un mode hexagonal régulier (*Figure 5B*). Au niveau de la bande I, les filaments fins sont seuls présents. Le disque Z est marqué par l'interpénétration sur une faible distance des extrémités des filaments fins de deux sarcomères contigus (*Figure 5B*). La répartition des deux populations de myofilaments (filaments fins d'actine et filaments épais de myosine) détermine, du fait de leurs densités respectives, les régions du sarcomère sombres et claires (*Figure 5C*). Le troisième système de filaments est composé d'une protéine géante, la **titine** (aussi appelée connectine). Cette protéine fixe les extrémités des myofilament épais aux disques Z et aux lignes M. Il s'agit d'une protéine élastique possédant de nombreux sites de liaison à d'autres protéines du cytosquelette (*Figure 6*). Enfin, il existe un quatrième système de filaments constitué de **nébuline** (*Figure 6*) qui servirait non seulement de matrice pour la mise en place de la bande I mais qui serait aussi impliqué dans la transduction de signaux, la régulation de la contraction et la transmission de la force (*Figure 6*) (McElhinny *et al.*, 2003). L'extrémité C-terminale de la nébuline se fixe au niveau du disque Z et la molécule de nébuline s'étend jusqu'à l'extrémité des filaments d'actine (Millevoi *et al.*, 1998).

Ces filaments sont associés à un grand nombre d'autres protéines. Les filaments fins sont notamment associés à des molécules de **tropomyosine** (qui agit dans la régulation de la contraction musculaire) (Wegner, 1979) et de **troponine** (qui fixe le calcium lors de la contraction musculaire) (*Figure 6*) (Ebashi and Kodama, 1966). Parmi les nombreuses autres molécules associées aux filaments d'actine, la **tropomoduline**, protéine chaperonne de l'actine, coiffe et stabilise l'extrémité libre des filaments fins (*Figure 6*) (Babcock and Fowler, 1994). L' **α -actinine** est essentielle à l'organisation du sarcomère, puisqu'elle permet de relier l'extrémité des filaments fins de chaque sarcomère entre eux et aux filaments fins du sarcomère adjacent (Puszkin *et al.*, 1977).

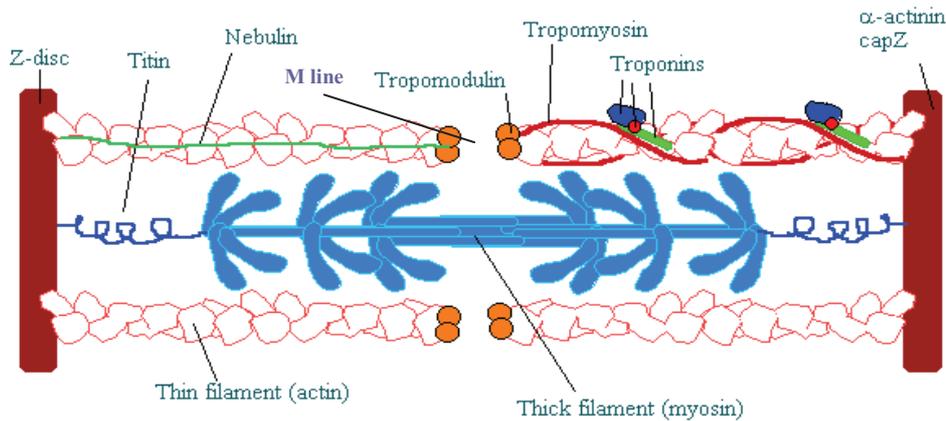


Figure 6 : Constitution protéique schématique d'un sarcomère.

D'après Maciver and al.

Site internet (<http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Myosin%20II.htm>).

3.2. La contraction musculaire

La contraction musculaire correspond à un **raccourcissement** des sarcomères dû au glissement relatif des filaments d'actine et de myosine: les deux disques Z délimitant un sarcomère se rapprochent l'un de l'autre. Ce phénomène se produisant simultanément pour tous les sarcomères de la cellule, il en résulte un raccourcissement global de la cellule musculaire selon l'axe longitudinal (*Figure 7*).

Dans les muscles striés, la contraction musculaire est provoquée suite à une augmentation en calcium consécutive à la dépolarisation électrique de la membrane plasmique et s'interrompt suite au repompage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. Le lien fonctionnel entre la stimulation électrique de la fibre musculaire et sa contraction est appelé **couplage excitation-contraction** (EC) (Melzer *et al.*, 1995; Bers, 2002). Ce couplage se produit au niveau des triades. L'entrée de Ca^{2+} qui provoquera la contraction vient principalement du milieu extracellulaire dans les cellules du muscle cardiaque alors que dans le cas du muscle squelettique celui-ci sort principalement du réticulum sarcoplasmique. Ce Ca^{2+} vient se fixer sur la troponine provoquant un changement de conformation de cette dernière et libérant le domaine d'interaction de la myosine. La tropomyosine est constituée de deux chaînes protéiques enroulées autour du filament d'actine et peut masquer ou démasquer le site de liaison actine/myosine. En absence de calcium la tropomyosine empêche la tête de myosine d'interagir avec les filaments d'actine et en présence de calcium, et sous influence de la troponine, la tropomyosine se déplace légèrement, permettant ainsi l'interaction entre actine et myosine. Au terme de cette étape, la myosine est fixée à l'actine permettant l'activation de la fonction ATPasique de la myosine. L'hydrolyse de l'ATP génère une rotation de la tête de myosine et un **déplacement** des molécules d'actine par rapport

aux molécules de myosine. Les têtes de myosine se déplacent alors le long du myofilament d'actine. Celui-ci est alors entraîné vers la ligne M, provoquant le rapprochement des disques Z. Ce mécanisme est à l'origine du raccourcissement du sarcomère, et à plus grande échelle, de l'ensemble de la fibre musculaire donc de la **contraction musculaire** (Figure 7). C'est ainsi que des milliers de têtes de myosine réalisant ce cycle parviennent à raccourcir la taille du sarcomère de $3,4 \mu\text{m}$ (forme étirée) à $2,4 \mu\text{m}$ (forme contractée).

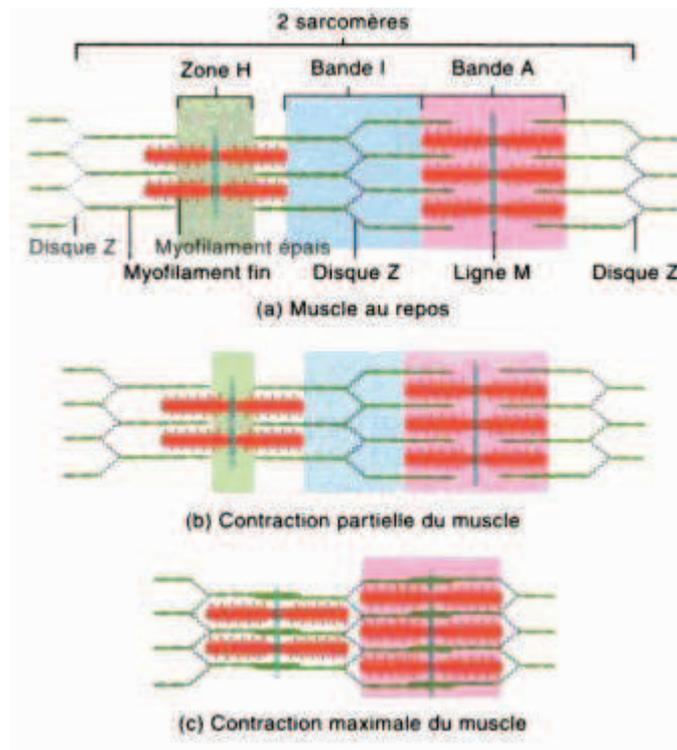


Figure 7 : Mécanisme de glissement des myofilaments lors de la contraction musculaire dans deux sarcomères adjacents.

SYNTHESE : Les muscles striés

Les muscles striés comprennent les **muscles squelettiques** et **cardiaque**. La base contractile de ces muscles est le **sarcomère**. Un sarcomère est défini comme étant le segment entre deux lignes Z voisines. Ces sarcomères qui sont à l'origine de la contraction des muscles, sont des agencements de plusieurs protéines et sont notamment composés de quatre systèmes différents de filaments : le système de **filaments épais** est constitué de **myosine**, le système de **filaments fins** est constitué de monomères d'**actine**. L'interaction de la myosine et de l'actine en réponse à une élévation de la contraction de calcium intracellulaire permet le raccourcissement des sarcomères et de fait la contraction du muscle. Enfin, le système élastique de filaments est composé de **titine**, et le quatrième système de filament est constitué de **nébuline**.

II La titine

1. Généralités sur cette protéine hors du commun

La **titine** (OMIM#18840), appelée également connectine, est une protéine géante codée par un gène d'une taille approximative de 294 kb situé sur le chromosome 2, région **2q31** et composé de 363 exons codant pour 34350 acides aminés. La masse moléculaire de la titine est de 3000 à 3700 kDa, ce qui en fait la protéine la plus grande connue dans le monde du vivant (Bang *et al.*, 2001) et sa formule chimique laisse rêveur : $C_{169723}H_{270464}N_{45688}O_{52243}S_{912}$. Elle est particulièrement abondante dans le muscle squelettique et cardiaque sous forme de diverses isoformes issues d'épissages alternatifs mais est aussi présente dans un certain nombre de systèmes non contractiles tels que la moelle épinière, les testicules ou la thyroïde. Elle a aussi été mise en évidence associée à la cytomatrice des zygotes d'oursins (Pudles *et al.*, 1990), aux membranes des érythrocytes (Maruyama *et al.*, 1977), aux fibres de stress (Pizon *et al.*, 2002; Cavnar *et al.*, 2007), aux membranes nucléaires où elle interagirait avec la lamine (protéine constituant la lamina nucléaire, réseau filamenteux juxtaposé à l'enveloppe nucléaire) *in vivo* mais aussi avec les histones et contribuerait à l'organisation du noyau durant l'anaphase (Zastrow *et al.*, 2006) (King and Jhou, 2010). Elle a été mise en évidence dans les fuseaux d'anaphase permettant la séparation des chromatides dans les spermatocytes d'insecte (Fabian *et al.*, 2007) où elle semble nécessaire à la structure et l'élasticité des chromosomes et du fuseau mitotique. Enfin, la titine s'exprime au niveau des chromosomes (Machado *et al.*, 1998; Houchmandzadeh and Dimitrov, 1999; Machado and Andrew, 2000a, 2000b), où elle permettrait leur condensation lors de la mitose. Cette dernière varierait dans sa partie N-terminale avec la titine musculaire.

2. La titine au cours du développement

Au cours du développement, la titine s'exprime relativement tôt dans le système musculaire et cardiaque et semble permettre notamment la mise en place des sarcomères. L'analyse d'**embryons de souris** a permis d'étudier la mise en place de la titine dans le temps et l'espace. Dans le cœur, la titine est mise en évidence de façon ponctuelle très tôt : à e8,25, puis le profil strié de la titine est détectée à e9 (Schaart *et al.*, 1989; Kolmerer *et al.*, 1996). Dans le muscle squelettique, la titine apparaît dans les **somites** antérieurs à e10-e11,5 puis progressivement dans les somites postérieurs et enfin dans les somites de la queue. Au stade e11 et 12, la présence de la titine dans le disque Z est mise en évidence dans les myoblastes non fusionnés. Une fois ces derniers

fusionnés, celle-ci est alors présente au niveau de la bande A et au niveau de la jonction A-I des sarcomères. A e13 et e14, la titine est visible dans la totalité du sarcomère (Furst *et al.*, 1989).

Chez l'**embryon humain**, les mêmes observations ont été réalisées. En effet, la titine se met en place très tôt dans le cœur : au milieu de la troisième semaine embryonnaire. Entre la dixième et la douzième semaine de vie de l'embryon, la titine est mise en évidence dans les muscles squelettiques mais beaucoup moins intensément que dans le cœur (Fougerousse *et al.*, 1998; Fougerousse *et al.*, 2000).

3. La titine dans le muscle squelettique et cardiaque adulte

La titine s'étend du **disque Z** à la **ligne M** du sarcomère (Wang *et al.*, 1979; Furst *et al.*, 1988) (*Figure 5*), ce qui correspond à un demi-sarcomère. Elle représente quelque 10% de la masse myofibrillaire et constitue 4% du poids total d'un Homme adulte.

Il existe de très nombreuses **isoformes** de la titine. Les exons soumis à un épissage différentiel sont situés dans la strie Z, dans la bande I et dans la ligne M, alors que ceux présents dans la bande A sont très conservés dans tous les types musculaires. Les plus grandes différences d'épissage sont situées au niveau de la bande I et expliquent les différentes tailles observées pour la titine dans les muscles squelettiques (3350-3700 kDa) et le cœur (2970-3300 kDa) (Freiburg *et al.*, 2000). L'expression des isoformes majeures de la titine est associée à ses différents rôles physiologiques dans les fibres musculaires striées squelettiques et cardiaques (Labeit and Kolmerer, 1995b; Gautel *et al.*, 1996a; Kolmerer *et al.*, 1996; Bang *et al.*, 2001; Labeit *et al.*, 2006).

3.1. Structure singulière de la titine

La titine est une protéine modulaire composée à 90% de répétitions. Ces répétitions, dites de classe I ou II partagent des homologies avec les motifs fibronectine de type III (Fn-3 ou classe I) ou immunoglobuline C2 (Ig, ou classe II), respectivement (Benian *et al.*, 1989). Ces deux types de domaines ont une structure globulaire composée d'environ 100 acides aminés repliés en feuillets β de 7 ou 8 brins antiparallèles (Politou *et al.*, 1995; Goll *et al.*, 1998; Improta *et al.*, 1998). Les motifs de **classe II**, sont présents tout le long de la titine. Ils sont associés aux motifs de **classe I** exclusivement dans la bande A en deux types de structures répétées de sept ou onze domaines formant des « super-repeats » (Labeit *et al.*, 1992).

Les domaines uniques particuliers (10% de la titine) ne montrent pas d'homologie à des protéines ou domaines protéiques connus à l'exception du domaine sérine/thréonine kinase en région C-terminal (*Figure 8*) (Labeit and Kolmerer, 1995) (Bang *et al.*, 2001). Ce domaine est homologue aux motifs KSP (lysine-sérine-proline) qui sont des sites de phosphorylation potentiels (Gautel *et al.*, 1993).

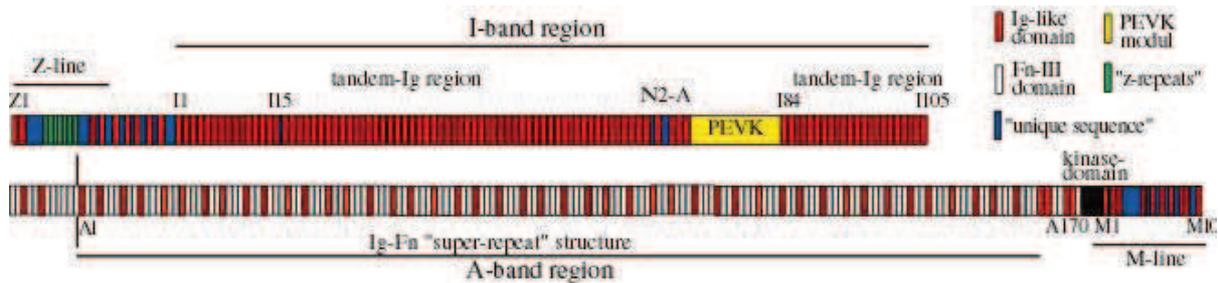


Figure 8 : Organisation générale de la titine et récapitulatif de ses propriétés connues. D'après Granzier et Labeit (Granzier and Labeit, 2005).

3.2. La titine dans le disque Z

3.2.1. Structure de la titine en Z

Les exons 1 à 27 de la titine codent pour la **région Z** de la titine. Cette région est composée de sept domaines Ig (dénommés **Z1** à **Z7**), deux domaines d'insertion **Zis** qui sont des domaines uniques de la titine et d'un nombre variable de copies (de 4 à 7) d'un motif protéique de 45 résidus : les répétitions **Zr** (Gautel *et al.*, 1996b). Ces répétitions sont situées entre Z3 et Z4 et n'ont aucune homologie avec des protéines connues à ce jour (*Figure 9*) (Gautel *et al.*, 1996a; Gregorio *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1998; Young and Gautel, 2000). Certaines répétitions Zr (Zr1, Zr2, Zr3 et Zr7) sont constitutives à toutes les isoformes, les autres sont épissées de façon différentielle (Gautel *et al.*, 1996b; Sorimachi *et al.*, 1997a). Le nombre de ces répétitions est en corrélation avec l'épaisseur des stries Z des types de fibres musculaires : six ou sept copies pour le cœur, quatre à six pour les muscles lents, deux à quatre pour les muscles rapides, mais aussi du stade de développement du muscle et des espèces (Ohtsuka *et al.*, 1997b; Peckham *et al.*, 1997; Sorimachi *et al.*, 1997a; Atkinson *et al.*, 2000; Luther and Squire, 2002; Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2009).

3.2.2. Partenaires de la titine en Z (Tableau 1)

Les parties N-terminales de deux molécules de titine appartenant à deux sarcomères adjacents sont ancrées dans la strie Z où elles se chevauchent de manière antiparallèle (Gregorio *et al.*, 1998). L'interaction entre les deux molécules de titine ne seraient pas directe mais médiée par la liaison aux motifs Z1 et Z2 de deux molécules de **téléthonine** (Figure 9) (Gregorio *et al.*, 1998; Mues *et al.*, 1998; Pinotsis *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2006). Protéine de 19 kDa appelée également Tcap pour son rôle de coiffe de la titine, elle est spécifiquement exprimée dans le cœur et le muscle squelettique. L'interaction titine-téléthonine a été suggéré comme indispensable à la formation du sarcomère *in vitro* (Gregorio *et al.*, 1998). Cependant, chez des patients souffrant de dystrophie des ceintures de type 2G, porteurs d'une mutation homozygote de la téléthonine conduisant à une absence de la protéine dans le muscle, aucune anomalie des sarcomères et des protéines de la strie Z n'a été observée en microscopie optique (Vainzof *et al.*, 2002).

La partie N-terminale de la titine interagit aussi spécifiquement et directement par les domaines Z1 et Z2 avec la **petite ankyrine 1** (sAnk1 pour small Ankyrine protein 1), protéine du réticulum sarcoplasmique (Figure 9) (Zhou *et al.*, 1997; Kontrogianni-Konstantopoulos and Bloch, 2003). La téléthonine et sAnk1 peuvent interagir simultanément avec les domaines Z1 et Z2 (Kontrogianni-Konstantopoulos and Bloch, 2003) suggérant la formation d'un complexe tripartite à la périphérie du disque Z.

La titine interagit avec l' **α -actinine** (Figure 9), un composant et un acteur majeur de l'organisation structurale du disque Z. L' α -actinine a été montrée interagissant avec les domaines répétés Zr ainsi qu'avec une séquence unique (Zq) adjacente aux répétitions Zr (Young *et al.*, 1998). L' α -actinine assure l'ancrage des filaments d'actine dans la strie Z en liant les molécules de titine d'un sarcomère aux filaments d'actine du sarcomère adjacent (Luther, 2000).

La **filamine C** et la **nébuline**, deux protéines se liant à l'actine, interagissent avec les domaines Z2 et Zis1 (Figure 9) (Labeit *et al.*, 2006). Comme la titine, la filamine C est exprimée dans les étapes précoces de l'assemblage des myofibrilles et est présente au niveau du disque Z et du sarcolemme (van der Ven and Furst, 1997). La titine et la filamine C doivent s'assembler tôt dans le processus de myogenèse et leur interaction semble permettre la connexion membrane-myofibrille. La nébuline est une protéine géante (600-800 kDa) qui contribuerait à l'architecture du disque Z (Bang *et al.*, 2006; Witt *et al.*, 2006). Cette liaison nébuline-titine pourrait avoir un rôle dans la myofibrillogenèse en permettant le recrutement de la nébuline à la strie Z

(Gutierrez-Cruz *et al.*, 2001; Ma and Wang, 2002). Elle déterminerait la longueur des filaments fins des muscles squelettiques et régulerait les interactions actine-myosine (Kruger *et al.*, 1991; Labeit *et al.*, 1991; Labeit and Kolmerer, 1995a). Des mutations récessives dans le gène codant pour la nébuline causent une myopathie distale (Wallgren-Pettersson *et al.*, 2007).

Enfin, l'**obscurine** est un partenaire de la jonction Z/I de la titine (domaines Z9 et Z10) transitoirement lors du développement embryonnaire (Young *et al.*, 1998; Bang *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2001) (*Figure 11*). A la fin de l'embryogenèse, l'obscurine est transférée vers la ligne M (voir partenaires dans la ligne M). Cette protéine est une protéine myofibrillaire géante de 800 kDa qui possède une structure modulaire similaire à la titine et qui contient des domaines homologues aux protéines d'adhésion et de signalisation (Young *et al.*, 2001). L'obscurine contient deux domaines kinase, un motif de liaison à la calmoduline et un domaine Rho guanine exchange factor (rhoGEF), suggérant qu'elle pourrait avoir un rôle dans la voie de signalisation du calcium et la voie de transduction couplée aux protéines G (Young *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2002).

Protéine	Région d'interaction	Région d'interaction sur la titine
Titine dans le disque Z		
Téléthonine		Z1-Z2
Petite ankyrine 1	Résidus 61-89	Z1-Z2
Filamine C	FLINIG23-FLINIG24	Z1-Z2
α -actinine	10 kDa partie C-ter	Zr1-Zr7
	Domaine ROD (sIr2-sIr3)	Zq
	70 kDa partie C-ter	Z1
Nébuline	Domaine SH3	Z1
Titine dans la bande I		
Actine		domaines Ig en I
Tropomyosine		PEVK
		Jonction Z/I
PKA		PEVK
PKG		N2B
Ca ²⁺		N2B et N2A
S100A1		PEVK
Nébuline	Domaine SH3	PEVK
Obscurine	Ig48-49	Z9-Z10
α -Bcrystalline		N2B
DRAL/FHL2		N2B
FHL1		N2B
Calpaïne 1		Z8-Ig5 (I)
		PEVK
Calpaïne 3	IS2	Ig83 ou N2A
MARPs	Deuxième répétition ankyrine	Entre Ig80 et Ig81
Titine dans la bande A		
Myosine	LMM	FN-III et bande A
	S1	
MyBP-C	IgC8-IgC10	Super répétition 2
MURF1	144 acides aminés centraux	IgA168-169
MURF2		IgA168-169
Titine dans la ligne M		
Calmoduline		TK
Nbr1/p62	Motif PB1	TK
DRAL/FHL2		N2B central
		Is2
Myoméline 1	FN-III4-FN-III6	M4
Calpaïne 3		M9-Is7
Obscurine	Ig1	M10
Protéine M		

Tableau 1: Interactions protéiques connues de la titine dans le muscle squelettique.

3.2.3. Fonction de la titine en Z

L'importance de la région Z de la titine dans l'assemblage, la stabilisation, le maintien des myofibrilles et l'association aux membrane intracellulaires a été démontrée dans de nombreux laboratoires (Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2009).

Le domaine N-terminal de la titine joue un rôle important dans la myofibrillogenèse en servant de coordinateur pour l'organisation des protéines dans le disque Z. La surexpression de différentes parties de la région Z de la titine entraîne un désassemblage des sarcomères accompagné de la désorganisation du **disque Z** et de la **bande A** ainsi que la perte de l'activité contractile (Peckham *et al.*, 1997; Turnacioglu *et al.*, 1997; Gregorio *et al.*, 1998).

L'interaction de la téléthonine en Z avec la titine contribuerait à l'intégrité structurale et le maintien du disque Z après sa formation (Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2009). De plus, plusieurs études ont proposé que le nombre variable de répétitions Zr modifie la force d'interaction de la titine avec l' α -actinine. Cette modulation pourrait influencer les propriétés structurales du disque Z dans les différents types musculaires, permettant au disque Z de répondre au stress mécanique et de transmettre les différents niveaux de tensions de la fibre (Gautel *et al.*, 1996a; Ohtsuka *et al.*, 1997a; Sorimachi *et al.*, 1997a; Luther, 2000; Luther *et al.*, 2003). Enfin, l'interaction **titine/nébuline** pourrait permettre de spécifier la largeur du disque Z. La titine et ses nombreux partenaires (*Figure 9*) font donc du disque Z un acteur central dans la réponse au stretch (Zhang *et al.*, 2009) ainsi que du contrôle de l'intégrité des myofibrilles lors de sollicitations mécaniques.

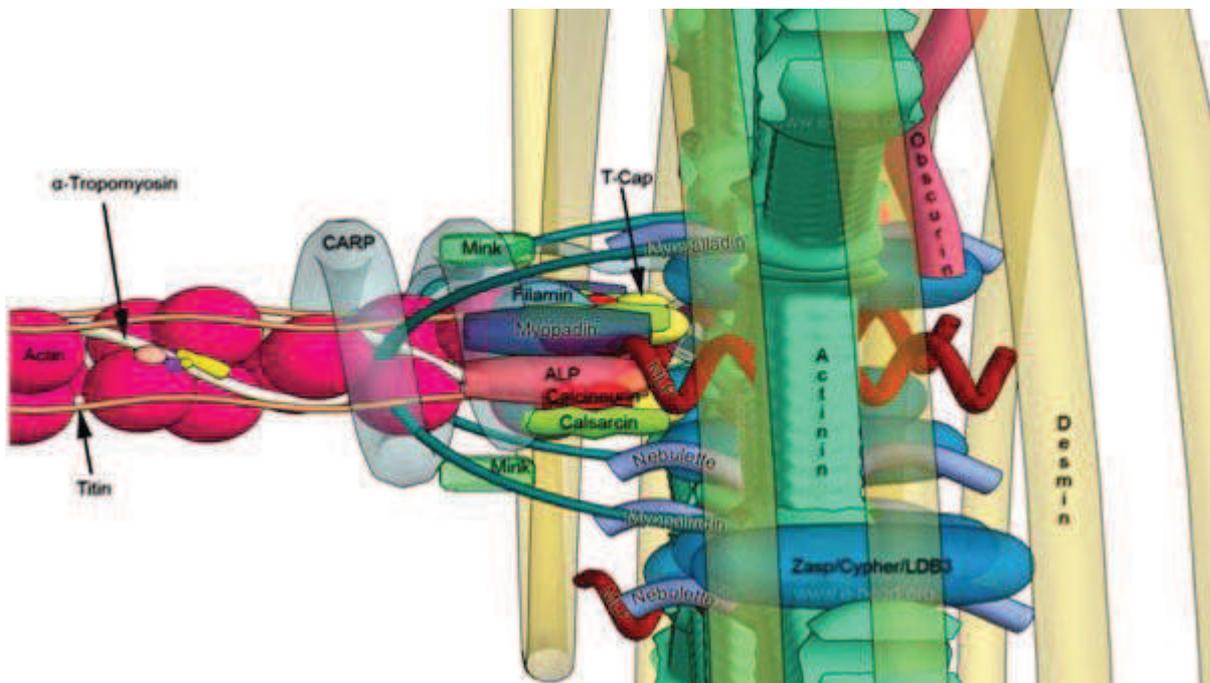
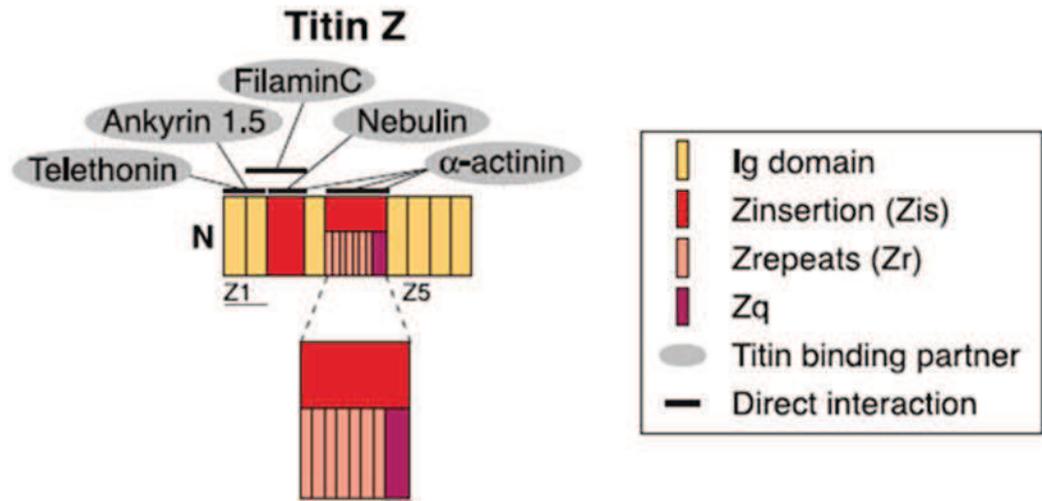


Figure 9 : Organisation du disque Z.

A/ Organisation du disque Z et localisation de ses partenaires. Adapté d'après Kontrogianni 2009 (Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009). B/ Représentation 3D de la localisation des différents acteurs du disque Z, d'après www.e-heart.org.

3.3. La titine dans la bande I

3.3.1. Structure de la titine en I

Dans la **bande I**, la titine présente une structure originale constituée de 90 domaines immunoglobulines regroupés, pour la plupart des isoformes de titine, en trois domaines : proximal, central et distal. Elle contient un domaine **PEVK** riche en proline (**P**), glutamate (**E**), valine (**V**) et lysine (**K**) et un domaine particulier, exprimé de façon variable selon les isoformes: la région **N2** (N2A présente dans les isoformes du muscle squelettique et cardiaque et N2B présente dans les isoformes cardiaques uniquement).

La région PEVK est variable selon le type musculaire. Elle est codée par 116 exons (Labeit and Kolmerer, 1995b). La plupart des exons codent une séquence répétée très conservée (26-28 acides aminés) nommée PPAK (qui se réfère aux quatre acides aminés débutant toujours cette séquence). Dix de ces exons codent pour une structure plus complexe (motif E-rich) composée à 45% d'acide glutamique (Freiburg *et al.*, 2000; Bang *et al.*, 2001; Greaser, 2001; Ma and Wang, 2003) (*Figure 10*). La région PEVK est enrichie en sites de liaison aux domaines SH3. Ce type de domaine composé de 60 acides aminés permet des interactions protéine-protéine.

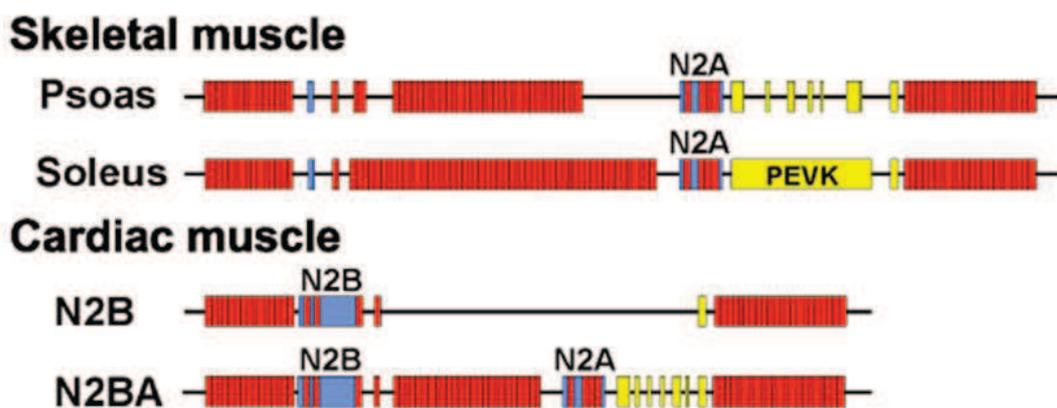


Figure 10 : Différentes isoformes musculaires et cardiaque de la titine au niveau de la bande I, dans les muscles squelettiques (N2A) et dans le cœur (N2B et N2BA) identifiées chez l'Homme. D'après Kruger 2009 (Kruger *et al.*, 2009).

Toutes les isoformes musculaires squelettiques expriment le domaine **N2A**, une région PEVK et un nombre de domaine Ig variables. Les tailles du domaine central et du domaine PEVK sont variables selon le type musculaire (*Figure 10*). En effet, les muscles à prédominance de fibres

lentes, contiennent le nombre le plus important de domaines Ig dans la partie centrale et le plus long domaine PEVK. Le *Psoas* (muscle rapide) est constitué de moins de domaines Ig et un plus petit domaine PEVK.

Dans le cœur, l'élément N2B est spécifiquement exprimé. La plus petite isoforme, de 2790 kDa, est l'isoforme N2B. Elle contient 3 motifs Ig et une séquence unique de 572 résidus. Les isoformes N2BA regroupent les isoformes cardiaques les plus longues (3200 à 3400 kDa). Elles contiennent l'élément N2B mais également le domaine N2A (4 domaines Ig et une séquence unique de 106 résidus), un domaine PEVK (600 à 800 résidus) et 12 à 25 motifs Ig dans le domaine central. Le myocarde des petits mammifères (rat, souris, lapin) et des espèces aviaires exprime majoritairement l'isoforme N2B. Chez les grands mammifères, les isoformes N2BA et N2B sont co-exprimés (Cazorla *et al.*, 2000).

Il existe une forme fœtale N2BA cardiaque qui exprime 22 exons additionnels codant des éléments situés dans les régions PEVK et Ig en tandem (Lahmers *et al.*, 2004). Elle est majoritairement exprimée dans le myocarde fœtal et néonatal et progressivement remplacée pendant le développement postnatal par les isoformes N2A et N2BA.

3.3.2. Partenaires de la titine en I (Tableau 1)

La titine dans la bande I a de nombreux partenaires qui sont de nature contractile ou enzymatique. L'**actine** et la **tropomyosine** se lient toutes deux à deux sites de la titine dans cette région (*Figure 11*). En effet, elles se lient à la jonction des domaines Z et I et le domaine PEVK avec pour ce dernier une affinité de l'actine augmentant avec le nombre de domaines E-rich (Linke *et al.*, 2002; Raynaud *et al.*, 2004a; Nagy *et al.*, 2005; Bianco *et al.*, 2007).

La **nébuline**, en plus de la liaison au niveau du disque Z, se lie grâce à un domaine SH3 dans sa partie C-terminale aux domaines de type SH3 du domaine PEVK (composé de 60 acides aminés) (*Figure 11*).

L' **α B-crystalline** est une protéine chaperonne qui appartient à la famille des protéines de choc thermique (Heat Shock Protein, HSP). Pendant les processus ischémiques, l' α B-crystalline est transloquée du cytosol vers les myofibrilles, où elle se lie fortement à la titine dans le domaine N2B (*Figure 11*) (Golenhofen *et al.*, 2002; Bullard *et al.*, 2004). Elle se lie au domaine N2B et Ig26-27 de la titine afin de stabiliser la titine lorsque la longueur du sarcomère est normale,

puis, afin de protéger ces zones de la dénaturation lorsque la longueur du sarcomère devient plus importante (Golenhofen et al., 2002; Bullard et al., 2004).

N2B est également un des deux sites de liaison de la titine pour Four and Half Lim protein 2 (DRAL/FHL2) et Four and Half Lim protein 1 (FHL1) (*Figure 11*). Ces protéines recrutent les enzymes métaboliques permettant de fournir de l'ATP nécessaire à la contraction musculaire (Lange et al., 2002). Il est intéressant de noter qu'une mutation faux-sens fut mise en évidence pour **DRAL/FHL2** dans une famille de patients présentant des cardiomyopathies dilatées (Arimura et al., 2007) et que des mutations dans FHL1 sont associées à des myopathies avec contractures et hypertrophie cardiaque et dans le syndrome d'Emery Dreifuss.

La région N2A s'associe avec un complexe multiprotéique comprenant la **calpaïne 3** (Miller et al., 2003) (cette interaction sera décrite en détail par la suite), la **myopalladine** (protéine de 145 kDa connue pour interagir avec la nébuline, la nébulette et l' α -actinine et qui semble avoir un rôle dans l'assemblage du disque Z) (Bang et al., 2001) et trois protéines de la famille des **MARPs** (Muscle Ankyrin Repeat Proteins) : la Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP), l' Ankyrin repeat protein domain 2 (Ankrd2) et la Diabetes related Ankyrin Repeat Protein (DARP) (*Figure 11*) (Bang et al., 2001; Miller et al., 2003). CARP est essentiellement exprimé dans le tissu cardiaque, DARP est exprimé dans le muscle squelettique alors qu'Ankrd2 est exprimé à des niveaux comparables dans les deux tissus (Miller et al., 2003). Les MARPs sont transloquées de la bande I vers le noyau pour CARP ou le disque intercalaire pour DARP en présence de tension mécanique (Miller et al., 2003). CARP est surexprimé ou sous-exprimé selon les cas d'atrophie/hypertrophie respectivement dans le cœur et les muscles et est surexprimé dans de nombreux cas de dystrophies musculaires (Laure et al., 2009). Ce complexe multiprotéique, situé à proximité du segment élastique de la titine, pourrait être impliqué dans la perception de signaux mécaniques tels que l'étirement des fibres (Miller et al., 2003).

Une autre calpaïne, la **calpaïne 1** est fortement liée à la titine via ses interactions calcium dépendantes à la jonction du disque Z et de la bande I (Delgado et al., 2001) et dans le domaine PEVK (Raynaud et al., 2005) (*Figure 11*). Il a été suggéré que la calpaïne 1 peut cliver la titine de façon post-mortem afin de permettre le désassemblage du sarcomère (Astier et al., 1991; Huff-Lonergan et al., 1996; Raynaud et al., 2005).

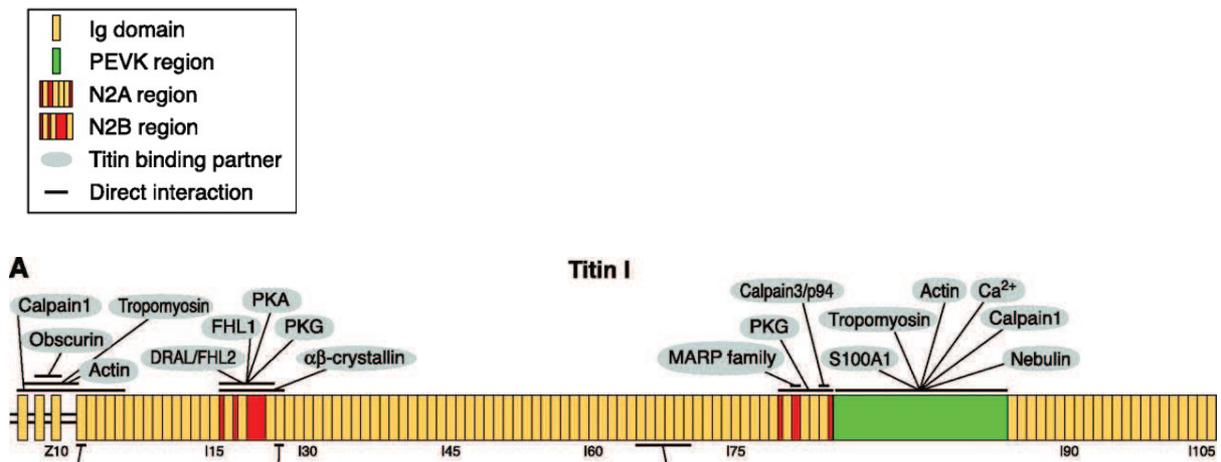


Figure 11: Partenaires et organisation de la titine dans la bande I.
Adapté de Kontrogianni *et al.* (Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2009).

3.3.3. Fonction de la titine en I

La bande I confère la propriété élastique aux fibres musculaires. En l'absence de force extérieure, la région située dans la bande I de la titine est hautement repliée. Pendant l'étirement, elle s'étend graduellement développant une tension passive. En condition d'étirement léger, l'élasticité des sarcomères serait générée par l'extension des motifs Ig. En condition d'étirement plus important, le segment PEVK est à son tour recruté et s'étend tel un ressort (Linke *et al.*, 1998). Dans le cœur, lorsque la tension augmente, la région N2B se détend ensuite (Helmes *et al.*, 1999; Linke *et al.*, 1999; Trombitas *et al.*, 1999). Enfin, lors de tensions extrêmes, les domaines Ig peuvent se déplier totalement (Kellermayer *et al.*, 1997; Rief *et al.*, 1997; Tskhovrebova *et al.*, 1997). Finalement, lorsque l'étirement du muscle cesse, la structure reprend sa conformation initiale, d'où sa qualification de région « élastique ». La contribution de la titine à la tension passive du sarcomère est estimée à 90% chez les gros animaux (vache, cochon, Homme) et à 50% chez les petits animaux (souris, rat) (Fukuda *et al.*, 2008).

Selon les muscles, les propriétés mécaniques de la bande I sont différentes, ce qui peut être expliqué par la quantité et la nature des différents variants d'épissage de la bande I qui sont exprimés (Cazorla *et al.*, 2000; Freiburg *et al.*, 2000). Dans le cœur, plus les isoformes N2BA sont nombreuses, moins la tension passive générée est importante (Cazorla, Freiburg *et al.* 2000). Au sein d'un même sarcomère, il est suggéré que plusieurs isoformes puissent être exprimées ce qui augmenterait la possible modulation de l'élasticité (Bang *et al.*, 2001; Liversage *et al.*, 2001; Trombitas *et al.*, 2001).

De plus, la titine participe à une tension active du muscle (Cazorla *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2003). Lorsque la longueur du sarcomère augmente, les mailles sarcomériques se rapprochent conduisant à une augmentation de la sensibilité au calcium et à une plus grande probabilité d'interaction actine-myosine en modifiant l'espace entre les filaments ce qui va permettre de moduler le glissement des sarcomères.

Toutes ces constatations sur la région de la titine située dans la bande I indique que ce domaine participe à la génération des tensions passive et active. Elle contient de nombreux domaines d'interactions pour des protéines nécessaires dans différents processus cellulaires qui permettent d'associer l'activité mécanique et contractile ainsi que les mécanismes de régulation et de contrôle du métabolisme et de l'expression des gènes.

3.4. La titine dans la bande A

3.4.1. Structure de la titine en A

Dans la **bande A**, la titine contient principalement deux structures (super-repeats), chacune composée de motifs de classe I et II ordonnés de façon particulière dans les **zones D et C** (Labeit and Kolmerer, 1995b). En partie N-terminale (zone D), cinq motifs de classe I et deux de classe II s'arrangent en une structure répétée six fois (super repeat à 6 domaines). Dans la portion centrale du filament épais (ou zone C), sept motifs de classe I et quatre de classe II forment un super-repeat à 11 domaines. A l'extrémité C-terminale de la zone C, une séquence unique est présente et constitue la **zone P** adjacente à la ligne M (*Figure 12*).

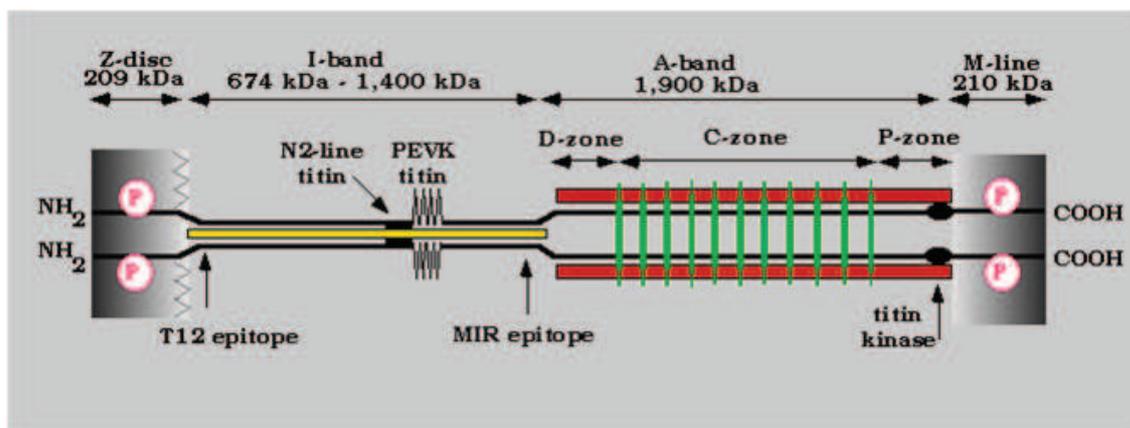


Figure 12 : Structure de la titine et zones de la bande A.

D'après Soteriou *et al.*, (Soteriou *et al.*, 1993, Houmeida *et al.*, 1995).

3.4.2. Partenaires de la titine en A (Tableau 1)

La partie interne de la titine dans la bande A est appelée zone C car la titine interagit à ce niveau avec la protéine C (ou Myosin Binding Protein C, MyBP-C) (*Figure 13*). Les molécules de **MyBP-C** sont alignées régulièrement le long de la titine et se lient aussi à la **myosine** (Isaacs *et al.*, 1992; Labeit *et al.*, 1992). Ainsi, la titine pourrait contrôler le nombre de molécules de myosine (*Figure 13*) et de MyBP-C qui doivent être incorporées dans le filament épais (Gregorio *et al.*, 1999).

La titine se lie avec les trois protéines de la famille des protéines Muscle specific Ring Finger protein (**MURFs**) impliquées dans les voies de signalisation, d'ubiquitination et de transcription. **MURF-1** peut s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec les protéines MURF-2 et MURF-3 (Centner *et al.*, 2001). MURF-1 se lie au domaine A168-169 de la titine qui est adjacent au domaine kinase (*Figure 13*) (Centner *et al.*, 2001; McElhinny *et al.*, 2002). Il a été suggéré que MURF-1 pouvait réguler l'activation de ce domaine kinase (Centner *et al.*, 2001). MURF-1 possède une activité ubiquitine-ligase et est régulée lors de l'atrophie musculaire. Cette ubiquitine-ligase E3 est notamment impliquée dans la dégradation de la titine, la nébuline, la téléthonine et la tropomyosine (Witt *et al.*, 2005) et joue un rôle dans la régulation de l'expression génique ainsi que de l'activité contractile (Kedar *et al.*, 2004). **MURF-2** quant à elle s'associe de façon séquentielle aux microtubules, la myosine et la titine aux domaines A164-169 pendant la myofibrillogenèse (*Figure 13*). Elle est localisée dans la ligne M et les noyaux. **MURF-3** interagit avec MURF-1 et 2 et est elle aussi associée aux microtubules, et à la titine dans la ligne M et le disque Z (Spencer *et al.*, 2000; Gregorio *et al.*, 2005). Les protéines MURFs constitueraient une voie de régulation des protéines sarcomériques (Pizon *et al.*, 2002).

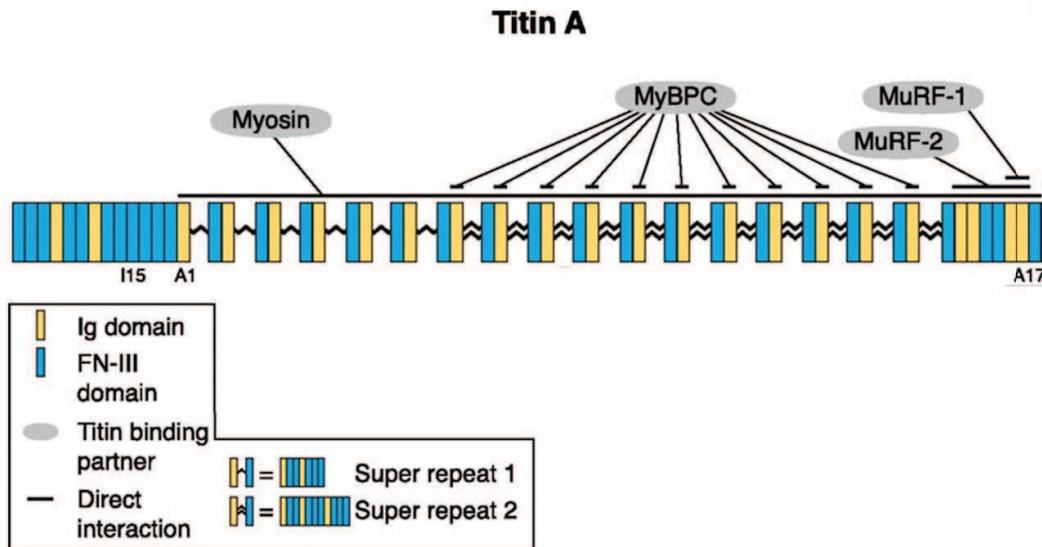


Figure 13 : Partenaires et organisation de la titine dans la bande A
Adapté de Kontrogianni (Kontrogianni-Konstantopoulos et al., 2009).

3.4.3. Fonction de la titine dans la bande A

La titine dans la bande A permet principalement l'assemblage des filaments de myosine au sein du sarcomère (Trinick, 1994) après la mise en place des protéines myoméline (voir ligne M) et MyBP-C. Elle joue un rôle important dans la régulation de la longueur et de la structure des filaments épais, sa composition et ses interactions rendent cette région inextensible. Enfin, en l'absence de titine, il a été montré que les filaments épais ne se mettaient pas en place (Person et al., 2000; van der Ven et al., 2000).

3.5. La titine dans la ligne M

3.5.1. Structure de la titine en M

Au niveau du gène de la titine, la partie présente dans la **ligne M** est codée par 6 exons, Mex1 à Mex6 (Mex : exon de la ligne M). Dans cette partie, la titine contient un domaine kinase, un site potentiel de phosphorylation, des répétitions d'Ig (M1-M10) et sept séquences uniques (insertion sequence, is) (is1-is7) (Figure 14).



Figure 14 : Exons et domaines de la titine dans la ligne M.

Le domaine actif de type **sérine/Thréonine Kinase (TK)** est replié sur lui-même avec un petit lobe en feuillet β et un grand lobe constitué d'une hélice α (Labeit and Kolmerer, 1995b; Mayans *et al.*, 1998) (*Figure 14*). L'activité kinase est auto-inhibée par l'extrémité C-terminale régulatrice du domaine TK (queue) (Kobe *et al.*, 1996). Cette queue régulatrice se lie au site de liaison à l'ATP et interagit spécifiquement avec les résidus impliqués dans la catalyse. L'activation du domaine TK nécessite la sortie de la queue inhibitrice du site actif, ce qui est réalisé par la phosphorylation d'une tyrosine et la liaison de la queue régulatrice à la **calmoduline** (Labeit *et al.*, 1992; Mayans *et al.*, 1998; Means, 1998). Le démasquage du site actif par le déplacement de la queue inhibitrice se produit lors de l'étirement de la protéine (Grater *et al.*, 2005).

Deux isoformes de titine existent dans cette région en fonction de l'épissage différentiel de l'avant dernier exon **Mex5** de la titine (364°) qui permet la présence ou non de la séquence unique d'insertion **is7** (*Figure 14*) (Kolmerer *et al.*, 1996). Chez le lapin, le cœur exprime seulement l'isoforme **Mex5+**, les muscles rapides expriment majoritairement **Mex5-** et les muscles de type lent expriment les deux isoformes (Kolmerer *et al.*, 1996). L'étude de cette zone en microscopie électronique a permis de mettre en évidence que, dans les muscles squelettiques, la ligne M montre une série de lignes transverses appelées ponts M, leur présence dépend du tissu et du stade de développement (Carlsson and Thornell, 1987). **Les ponts M** sont particulièrement visibles dans le cœur (Pask *et al.*, 1994) et avec différentes intensités dans les muscles squelettiques (Thornell *et al.*, 1987). De façon intéressante, l'intensité des ponts M est différente selon les espèces : les animaux avec une plus grande fréquence cardiaque montre moins de ponts M (Pask *et al.*, 1994). Ces différences visibles de quantité de ponts M selon les tissus et les espèces corrélerent avec l'épissage alternatif de l'exon **Mex5**, présence : **Mex5+**, absence : **Mex5-**. De plus, le domaine **is7** (codé par **Mex5**) forme une boucle perpendiculaire à l'axe du filament de titine (Gautel *et al.*, 1993). La structure de ce domaine et les nombreuses interactions protéiques à ce niveau peut expliquer la présence de ces ponts M1 en microscopie électronique (Kolmerer *et al.*, 1996).

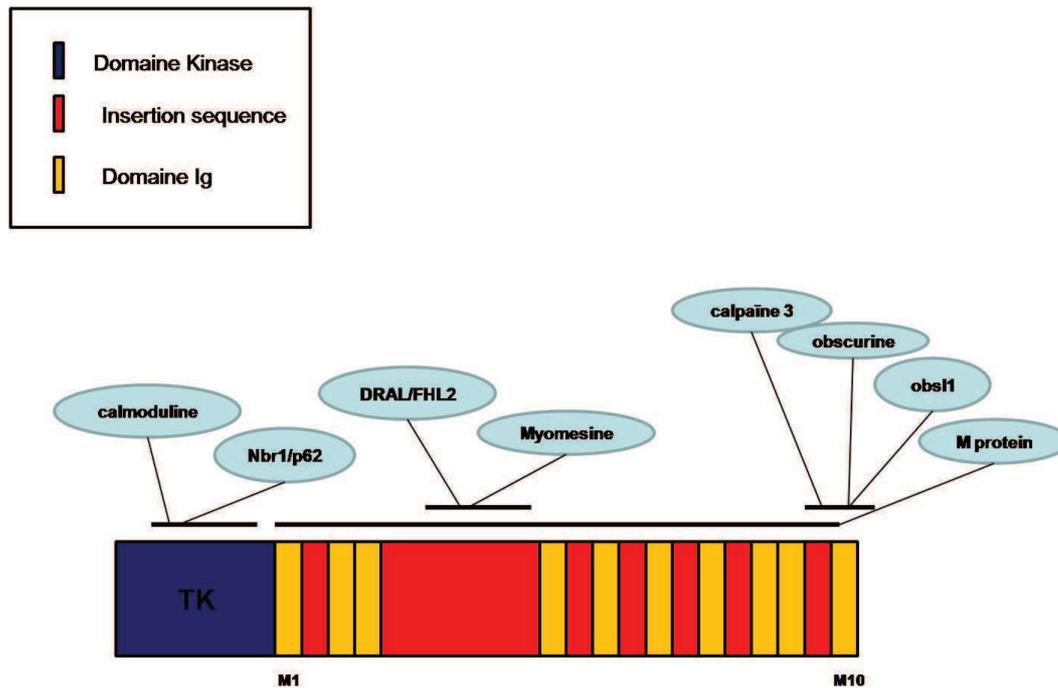


Figure 15: Organisation de la titine dans la ligne M et interactions protéiques connues.

3.5.2. Partenaires de la titine en M (Tableau 1)

La **calmoduline** est une enzyme calcium dépendante ubiquitaire et allostérique localisée dans le cytoplasme qui active un certain nombre d'enzymes en réponse à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Finn *et al.*, 1995; Finn and Forsen, 1995; Vogel and Zhang, 1995). Elle interagit avec le domaine TK de la titine de façon calcium dépendante. Ce domaine semble jouer le rôle de régulateur de cette enzyme (Gautel *et al.*, 1995; Amodeo *et al.*, 2001).

Nbr1/p62 sont des protéines en doigt de zinc identifiées comme des ligands du domaine TK de la titine (Figure 15). Lorsque la voie de signalisation est activée par le démasquage du domaine TK, nbr1 interagit avec le site actif du domaine TK et p62, sa protéine associée, est amenée jusqu'aux sarcomères. A son tour, p62 interagit avec **MURF2** qui est un ligand du Facteur de transcription de Réponse au Sérum (**SRF**). En l'absence d'action mécanique, p62/MURF2 sont transloquées dans le cytoplasme causant la rétention du facteur SRF dans le cytoplasme et la répression de l'activation de la transcription induite par celui-ci (Lange *et al.*, 2005).

Dans la ligne M, la titine interagit de nouveau avec **DRAL/FHL2** dans le domaine is2, entre M3 et M4 (*Figure 15*) (Lange *et al.*, 2002).

La **protéine M** (ou **myoméline 2**) et la **myoméline 1** respectivement de 165 et 190 kDa interagissent avec la titine dans la ligne M (*Figure 15*) (Nave *et al.*, 1989). Les séquences de ces protéines sont homologues à 50% et ont, comme la titine, une structure modulaire avec des motifs de classe I et II (Noguchi *et al.*, 1992; Vinkemeier *et al.*, 1993). Elles diffèrent toutes par leur extrémité N-terminale et sont toutes deux capables de se dimériser. Alors que la myoméline 1 est exprimée dans toutes les fibres musculaires, la myoméline 2 est seulement présente dans les fibres de type II et dans le cœur (Grove *et al.*, 1984; Grove *et al.*, 1985; Grove *et al.*, 1987). L'interaction myoméline 1-titine serait régulée par la phosphorylation de la myoméline 1 (Obermann *et al.*, 1997). D'après ces résultats, la myoméline 1 et la titine assureraient le maintien de la ligne M lors des contraintes mécaniques. La myoméline 2 quant à elle assurerait le pontage direct entre deux filaments de myosine transversalement (Obermann *et al.*, 1996).

L'**obscurine** est détectée majoritairement au niveau de la ligne M dans les fibres matures (*Figure 15*) (Young *et al.*, 2001; Borisov *et al.*, 2004; Borisov *et al.*, 2006; Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2006a). Les trois premiers domaines N-terminaux de l'obscurine se fixent à la ligne M de la titine (domaine M10), et aux myomélines (1, 2 et 3) (Fukuzawa *et al.*, 2008). Il a été montré que la diminution de l'expression des myomélines entraîne la non-intégration de l'obscurine dans la ligne M des cardiomyocytes (Fukuzawa *et al.*, 2008) (*Figure 16*).

La protéine **obscurine like 1** (obs1), est un homologue de l'obscurine. Elle est exprimée dans les disques intercalaires, la région périnucléaire et est présente dans le disque Z et la ligne M des myocytes. Elle a aussi été montrée interagissant avec le domaine terminal M10 de la titine *via* son premier domaine immunoglobuline Ig1 (Fukuzawa *et al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2010). La principale fonction de cette protéine semble être structurale. Elle semble présente dans le sarcomère en plusieurs autres points de celui-ci : le disque Z, les disques intercalaires et la lamine nucléaire (Geisler *et al.*, 2007).

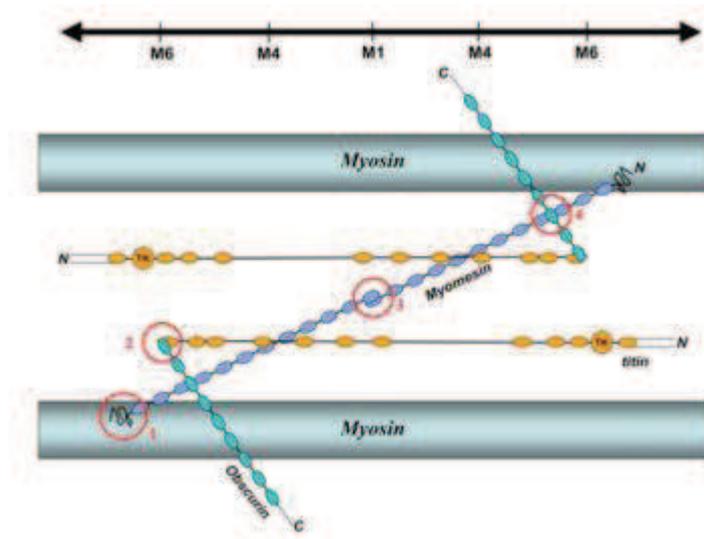


Figure 16 : Interaction de la titine, l'obscurine et la myomésine 1 dans la ligne M. D'après Fukuzawa (Fukuzawa et al., 2008; Sauer et al., 2010)).

La **calpaïne 3** comme nous l'avons vu précédemment, interagit avec la titine dans la bande I et possède un autre site de liaison à la titine dans la ligne M (*Figure 15*). Le site minimum de liaison de la calpaïne 3 avec la ligne M est le domaine codé par l'exon alternatif Mex5. Cette protéase et les interactions titine/calpaïne 3 sont décrites plus en détail dans le chapitre 3.2.

3.5.3. Fonction de la titine en M

La particularité de la ligne M réside en la présence du domaine TK qui possède une activité catalytique, pour lequel plusieurs substrats ont déjà identifiés. De plus, MURF1 interagit avec la titine au niveau d'un site proche du domaine TK ; fonctionnellement, le domaine TK et l'association avec MURF1 implique la ligne M dans le maintien de l'intégrité du sarcomère *via* la stabilisation des filaments épais et des composants de la ligne M (Miller et al., 2004). TK serait notamment responsable de la phosphorylation de la myosine nécessaire à la régulation de la contraction musculaire, ainsi que de la téléthonine (Mayans et al., 1998). De plus, comme nous l'avons vu, l'inhibition du domaine kinase de la titine par son partenaire nbr1 permet la modulation de la cascade de signalisation SRF (Lange et al., 2005).

La région C-terminale de la titine située au niveau de la ligne M participe à la structure du sarcomère. Dans cette zone, deux molécules de titine de sarcomères adjacents se superposent (Obermann et al., 1997; Furst et al., 1999). Cette ligne M est le point d'ancrage des filaments

épais au milieu du sarcomère. De plus, la titine dans la ligne M va permettre l'alignement correct du domaine M4 avec les myomésines, stabilisant le sarcomère lors des contractions musculaires (Obermann et al., 1997). La fonction de la ligne M comme lien mécanique passe particulièrement par le complexe des cinq protéines que sont la titine (*via* le domaine M10), l'obscurine, l'obscurine like 1 et la myomésine elle-même interagissant avec la myosine (Pabon and Amzel, 2006). La titine dans la ligne M joue aussi un rôle important dans les mécanismes d'excitation et de contraction du sarcomère qui passerait par l'interaction du domaine M10 avec l'obscurine elle-même liée au réticulum sarcoplasmique situé autour de la myofibrille (Bagnato *et al.*, 2003; Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.*, 2006b; Lange *et al.*, 2009a). Cette implication passe aussi par les enzymes interagissant avec le domaine M4 de la titine comme DRAL et FHL2 qui participent à la production d'ATP (Lange et al., 2002).

La ligne M, grâce aux domaines spécifiques de la titine et aux protéines qui lui sont associées (*Figure 15*), contribuerait ainsi, elle aussi, à la transduction des signaux mécaniques de remodelage perçus par la fibre.

De part sa taille et ses nombreuses interactions protéiques, la titine joue un rôle important dans l'assemblage des sarcomères, le maintien des éléments contractiles pendant la contraction, l'intégration des filaments épais dans le sarcomère, le contrôle de l'intégrité et la stabilité mécanique du sarcomère.

4. Focus sur un partenaire d'intérêt : la calpaïne 3 (p94)

4.1. Caractéristiques structurales et biochimiques de la calpaïne 3

La **calpaïne 3** (également appelée p94) appartient à la famille des calpaïnes qui sont des protéases à cystéines dépendante du calcium (Dear *et al.*, 1999). Cette famille comprend entre-autres deux protéines ubiquitaires : les **calpaïnes 1 et 2** (ou μ - et m-calpaïnes). Bien que les fonctions physiologiques des calpaïnes restent encore imprécises, ces protéases ont été impliquées dans une variété de processus incluant l'apoptose (Sorimachi *et al.*, 1997b; Baghdiguian *et al.*, 1999; Chua *et al.*, 2000), la différenciation myogénique (Kwak *et al.*, 1993; Moraczewski *et al.*, 1996; Stockholm *et al.*, 1999; Moyen *et al.*, 2004; Kramerova *et al.*, 2006), la division et la fusion cellulaire (Schollmeyer, 1988; Barnoy *et al.*, 1998; Santella *et al.*, 1998; Raynaud *et al.*, 2004b), la régulation de l'expression génique (Hirai *et al.*, 1991), et bien d'autres encore.

La calpaïne 3 a longtemps été décrite comme une isoforme spécifique du muscle squelettique (Sorimachi *et al.*, 1989). Toutefois, il a été montré qu'elle pouvait être exprimée dans le muscle cardiaque au cours de l'embryogenèse (Fougerousse *et al.*, 1998). De même, différentes isoformes résultant d'un épissage alternatif ont été identifiées dans le cristallin (Ma *et al.*, 1998) et le cerveau de rats (Konig *et al.*, 2003).

La calpaïne 3, de poids moléculaire 94 kDa, est codée par un gène constitué de 24 exons répartis sur une région de 35 kb du chromosome 15. La protéine comporte 821 acides aminés et est composée de quatre domaines (*Figure 17*): (i) le domaine I ne présente aucune homologie avec des séquences connues. Sa fonction n'est pas encore clairement définie ; (ii) le domaine II présente de fortes homologies avec les autres protéases à cystéines. Constitué de deux régions, qui comportent la cystéine (Cys), l'histidine (His) et l'asparagine (Asn) de la triade catalytique, il comporte le sillon catalytique nécessaire à l'activité protéolytique ; (iii) le domaine III, de type C2, est potentiellement impliqué dans des interactions protéines-protéines. Ce domaine possède également une **boucle EF-Hand** capable de lier le calcium. Il pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'activité de la calpaïne 3 ; et (iv) le domaine IV comprend cinq séquences de type EF-Hand.

La calpaïne 3 se différencie des autres calpaïnes par l'existence de trois régions qui lui sont strictement spécifiques (*Figure 17*) (Sorimachi *et al.*, 1989): en N terminal, se trouve le domaine **NS** (Séquence N terminale) dont la fonction est inconnue; dans le domaine II, se trouve le domaine **IS1** (Séquence d' Insertion 1) qui comprend des sites d'autolyse de la calpaïne 3 ; enfin, à la jonction des domaines III et IV, se trouve le domaine **IS2** (Séquence d' Insertion 2) qui permet la liaison à la titine et qui comporte un Signal de Localisation Nucléaire (NLS).

Les premières caractérisations biochimiques de la calpaïne 3 ont montré que cette enzyme s'autolysait sous la forme de deux fragments principaux (Sorimachi *et al.*, 1993). Cette **autolyse**, qui a lieu dans le domaine IS1, constitue le mécanisme d'activation de la protéase et est décrite comme séquentielle (Taveau *et al.*, 2003). Trois sites d'autolyse (S1, S2 et S3) ont été mis en évidence dans IS1, conduisant à la formation d'un fragment N-ter court de 34 kDa et de fragments C-ter plus longs compris entre 55 et 60 kDa (Kinbara *et al.*, 1998). Lorsque la protéine est entière, une hélice α codée par la séquence IS1, ferme le sillon catalytique, empêchant les substrats et les inhibiteurs d'y pénétrer (Diaz *et al.*, 2004). Lorsque celle-ci s'autolyse, elle libère le fragment IS1 (coupure intramoléculaire) qui libère alors le sillon catalytique. La protéine

devenue active peut alors cliver ses substrats mais également d'autres molécules de calpaïne 3 (coupure intermoléculaire).

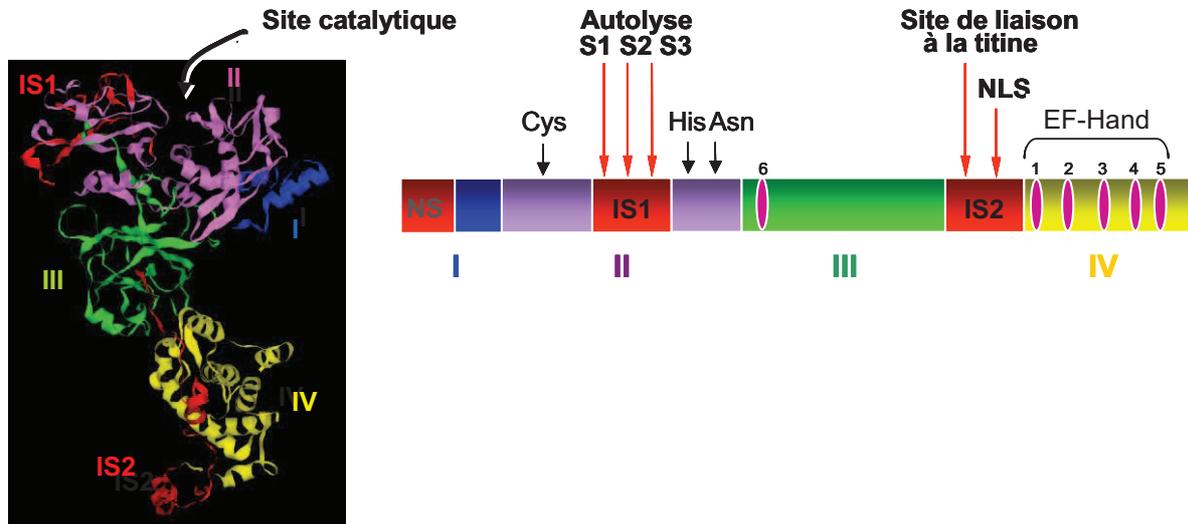


Figure 17 : Structures schématique et cristallographique de la calpaïne 3.

Dans le muscle squelettique, la calpaïne 3 est majoritairement présente sous forme **non-autolysée** (94kDa) (Sorimachi *et al.*, 1990; Kinbara *et al.*, 1998) suggérant qu'elle s'y trouve principalement sous une forme inactive. Au contraire, lorsqu'elle est exprimée de manière ectopique dans un système non musculaire, elle s'active spontanément et est retrouvée sous forme autolysée (Taveau *et al.*, 2003). Ces observations suggèrent qu'il existe un inhibiteur de la calpaïne 3, spécifique au muscle, capable de maintenir la protéase sous forme inactive. Une protéine fortement candidate pour jouer ce rôle est la **titine** (Duguez *et al.*, 2006). En effet, la calpaïne 3 se fixe en 3 points au moins de la titine : N2A, disque Z et ligne M (*Figure 18*) et cette dernière possède des régions homologues à la calpastatine, l'inhibiteur endogène des calpaïnes ubiquitaires.

4.2. Localisation et fonction de la calpaïne 3

La calpaïne 3 est principalement localisée dans le muscle squelettique associée au sarcomère mais a également été mise en évidence dans le compartiment **nucléaire** de cellules en culture (Sorimachi *et al.*, 1993) et de muscle humain (Baghdiguian *et al.*, 1999), suggérant qu'elle pourrait participer à des voies de signalisation. D'autre part, elle a également été observée au niveau des

costamères et dans les jonctions myotendineuses (Taveau *et al.*, 2003), sites impliqués dans la transmission de la force.

Des expériences de double hybride et d'immunofluorescence du muscle squelettique ont permis de montrer que la **calpaïne 3** possède trois sites de liaison à la titine : dans le **disque Z** (Figure 18), I (Sorimachi *et al.*, 1995; Keira *et al.*, 2003; Taveau *et al.*, 2003). Dans la **bande I**, la calpaïne 3 se fixe au niveau du domaine immunoglobuline Ig83 de la titine qui est localisée dans la région N2A (Figure 18). La région minimale d'interaction de la calpaïne 3 avec le domaine N2A (résidus 570-639) nécessite la présence du domaine IS2 de la calpaïne 3 (Sorimachi *et al.*, 1995). Le fragment N2A de la titine qui se lie à la calpaïne 3 protège la calpaïne 3 de la protéolyse *in vitro* (Ono *et al.*, 2006). Dans la **ligne M**, de façon très intéressante, la calpaïne 3 se lie à la région unique codée par Mex5 (is7) (Figure 18) (Kinbara *et al.*, 1997). Aucun domaine minimal d'interaction de la calpaïne 3 n'a pu être mis en évidence (Kinbara *et al.*, 1997), mais le remplacement de l'exon 1 par un exon 1 alternatif spécifique du cristallin annule cette interaction, alors que l'absence des domaines IS1 et IS2 de la calpaïne 3 semblent augmenter l'interaction (Herasse *et al.*, 1999).

La fonction précise de la calpaïne 3 dans le muscle squelettique n'est pas connue, mais son absence ou son inactivité étant responsable de la LGMD2A (voir plus loin), indique qu'elle est nécessaire à l'intégrité du tissu musculaire.

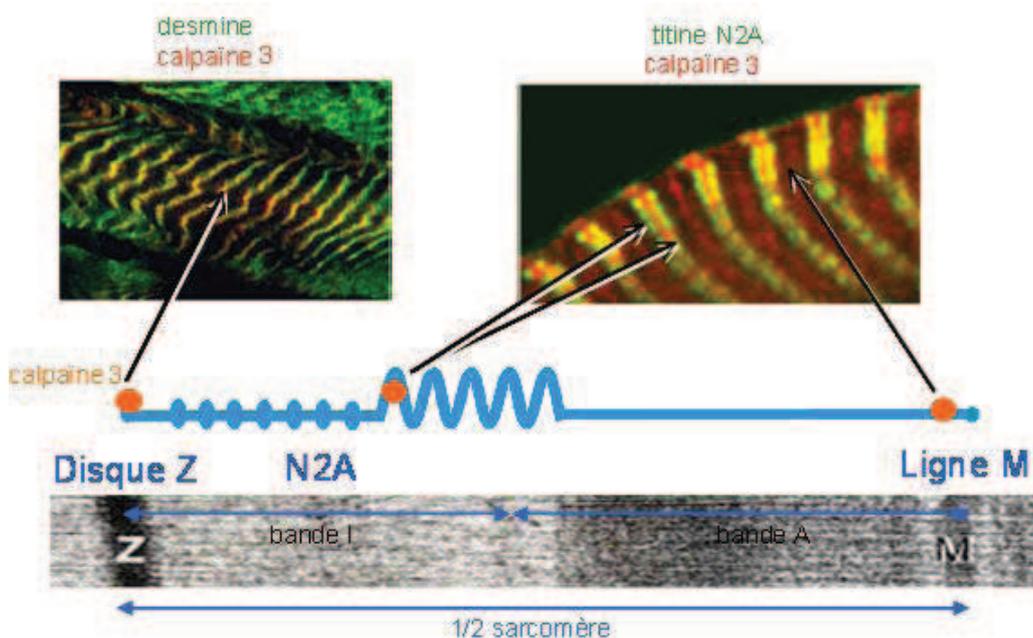


Figure 18 : Localisation de la calpaïne 3 en trois points de la titine.

4.3. Les substrats de la calpaïne 3

Des expériences d'expression ectopique de la **calpaïne 3** dans différents types cellulaires non musculaires, ont permis de mettre en évidence une altération du cytosquelette cellulaire, conduisant à une perte de la morphologie et de l'adhésion cellulaire (Taveau *et al.*, 2003). Dans ce contexte, plusieurs **substrats** de la calpaïne 3 ont pu être identifiés tels que la taline, la vinexine α et l'eitrine, qui sont des protéines des adhésions focales, ainsi que les filamines A et C, la titine, et CARP qui sont toutes des protéines du cytosquelette musculaire (*Tableau 2*) (Guyon *et al.*, 2003; Taveau *et al.*, 2003; Kramerova *et al.*, 2004; Laure *et al.*, 2009). Plus récemment, une diminution de l'expression de la protéine Myosin Light Chain 1 (MLC1) a été observée *in vitro* en présence de calpaïne 3 ainsi que dans les muscles des souris transgéniques surexprimant cette protéase, suggérant que MLC1 est aussi un substrat de la calpaïne 3 (Cohen *et al.*, 2006). De plus, les protéines M-cadherine et beta-caténine ont été identifiées comme étant des substrats de la protéase (Kramerova *et al.*, 2006). La calpaïne 3 a été montrée comme associée aux triades. En cet endroit, il est possible qu'elle intervienne dans la production d'énergie par la cellule par clivage de l'aldolase A et de l'enzyme acyl-Coenzyme A Dehydrogenase, Very Long chain (VLCAD) (Kramerova *et al.*, 2008; Kramerova *et al.*, 2009). AHNAK, un partenaire de la dysferline, est aussi un substrat potentiel de la calpaïne 3 (Huang *et al.*, 2008) (*Tableau 2*).

<i>Substrats de la C3</i>	<i>Bibliographie</i>
Aldolase A	Kramerova <i>et al.</i> , 2009)
AHNAK	(Huang <i>et al.</i> , 2008)
CARP/Ankrd2	(Laure <i>et al.</i> , 2009)
β -caténine	(Saenz <i>et al.</i> , 2008)
Eitrine	(Taveau <i>et al.</i> , 2003)
Filamine A et C	(Guyon <i>et al.</i> , Taveau <i>et al.</i> , 2003)
Ikb	(Taveau <i>et al.</i> , 2003)
M-cadhérine	(Kramerova <i>et al.</i> , 2006)
MLC1	(Cohen <i>et al.</i> , 2006)
PDLIM	(Bertipaglia <i>et al.</i> , 2009)
Titine	(Taveau <i>et al.</i> , 2003; Kramerova <i>et al.</i> , 2004)
Vinexine A	(Taveau <i>et al.</i> , 2003)
VLCAD	(Kramerova <i>et al.</i> , 2008; Kramerova <i>et al.</i> , 2009))
Taline	(Taveau <i>et al.</i> , 2003)

Tableau 2 : Substrats connus de la calpaïne 3 in vitro.

De façon très intéressante, la calpaïne 3 clive la titine en différents points. Elle est capable de cliver la titine en Z, en N2A, dans le domaine PEVK et en deux points de la ligne M (Taveau *et al.*, 2003; Kramerova *et al.*, 2004). Plus particulièrement, dans la ligne M, la calpaïne 3 est capable de cliver la **titine** *in vitro* (Taveau *et al.*, 2003; Kramerova *et al.*, 2004). Cette coupure pourrait abolir des interactions entre la titine et ses partenaires ou modifier la conformation de la titine, entraînant un remaniement du cytosquelette.

En conclusion, il semblerait que la calpaïne 3 puisse, en réponse à un signal, passer d'un état inactif à un état actif, orchestrant ainsi un remodelage du cytosquelette en clivant un ensemble de substrats. La calpaïne 3 participerait d'ailleurs également à ce remodelage en intervenant en amont du système ubiquitine-protéasome (Kramerova *et al.*, 2005) à la régulation du calcium dans les fibres et à l'intégrité des mitochondries (Kramerova *et al.*, 2008; Kramerova *et al.*, 2009).

4.4. Mutations de la calpaïne 3 et LGMD2A

Des mutations récessives dans le gène de la calpaïne 3, sont à l'origine de la Dystrophie Des Ceintures de type 2A (Limb Girdle Muscular Dystrophy 2A, **LGMD2A**) (Richard *et al.*, 1995) qui est une des formes les plus répandues de dystrophies des ceintures (elle représente 30 à 40 % de celles-ci). Cette maladie est observée partout dans le monde avec une fréquence particulièrement élevée au sein de la communauté Amish, sur l'Ile de la Réunion, au pays Basque ainsi qu'en Croatie et Slovénie (Allamand *et al.*, 1995; Canki-Klain *et al.*, 2004). À ce jour, plus de 280 mutations, réparties sur l'ensemble de la séquence du gène de la calpaïne 3, ont été identifiées. Le début des symptômes pour la dystrophie des ceintures 2A survient généralement vers l'âge de 10-15 ans. La maladie évolue ensuite progressivement conduisant à la perte de la marche en 10 à 20 ans (Richard *et al.*, 1999). L'atteinte se caractérise par une atrophie préférentielle des muscles proximaux des ceintures et du tronc (Fardeau *et al.*, 1996). La faiblesse musculaire touche d'abord une des deux ceintures, puis s'étend à la seconde. Ces symptômes ne s'accompagnent généralement pas d'atteinte cardiaque, faciale ou mentale. Sur le plan histologique, des profils de nécrose-régénération avec centronucléation et infiltrations macrophagiques, caractéristiques de la dégénérescence musculaire, sont observables.

D'autre part, il a été décrit que l'absence de calpaïne 3 est associée à une perturbation de la voie NF- κ B, aussi bien chez les patients atteints de calpaïnopathie que dans le modèle de souris déficient en calpaïne 3 (Baghdiguian *et al.*, 1999; Richard *et al.*, 2000). Ces situations pathologiques aboutissent à une augmentation de l'apoptose musculaire, suggérant que la calpaïne

3 pourrait participer à une régulation positive de cette voie et favoriser la survie de fibres musculaires en conditions de stress.

Plusieurs modèles Knock-Out (KO) pour la calpaïne 3 ont été construits et montrent une atrophie des muscles, ainsi que présence des foyers de nécrose (Richard *et al.*, 2000; Kramerova *et al.*, 2004). Dans le KO, les cellules myogéniques fusionnent normalement mais les sarcomères montrent une mauvaise organisation ainsi qu'un mauvais alignement des bandes A en microscopie électronique suggérant une participation de la calpaïne 3 dans la myofibrillogenèse et le remodelage du sarcomère.

SYNTHESE : La titine

La **titine**, protéine très longue et très complexe, s'étend du disque Z à la ligne M du sarcomère. Elle a des fonctions différentes selon les domaines présents à chaque niveau du sarcomère. De part sa longueur, ses caractéristiques, le rôle de ses différents domaines et ses partenaires, la titine se révèle être une protéine dont les rôles au sein du sarcomère sont **multiples**. Dans la multitude de ses partenaires, une enzyme particulièrement intéressante est présente : la **calpaïne 3** qui s'associe en 3 points au moins de celle-ci. Cette enzyme, active, coupe la titine et serait en partie régulée négativement par celle-ci.

III Les pathologies liées à la titine et les modèles animaux associés

Les mutations actuellement décrites de la titine entraînent des pathologies restreintes au cœur ou aux muscles squelettiques ou touchant les deux tissus. La plupart des mutations sont situées dans les extrémités N- et C-terminales de la protéine (*Figure 19*).

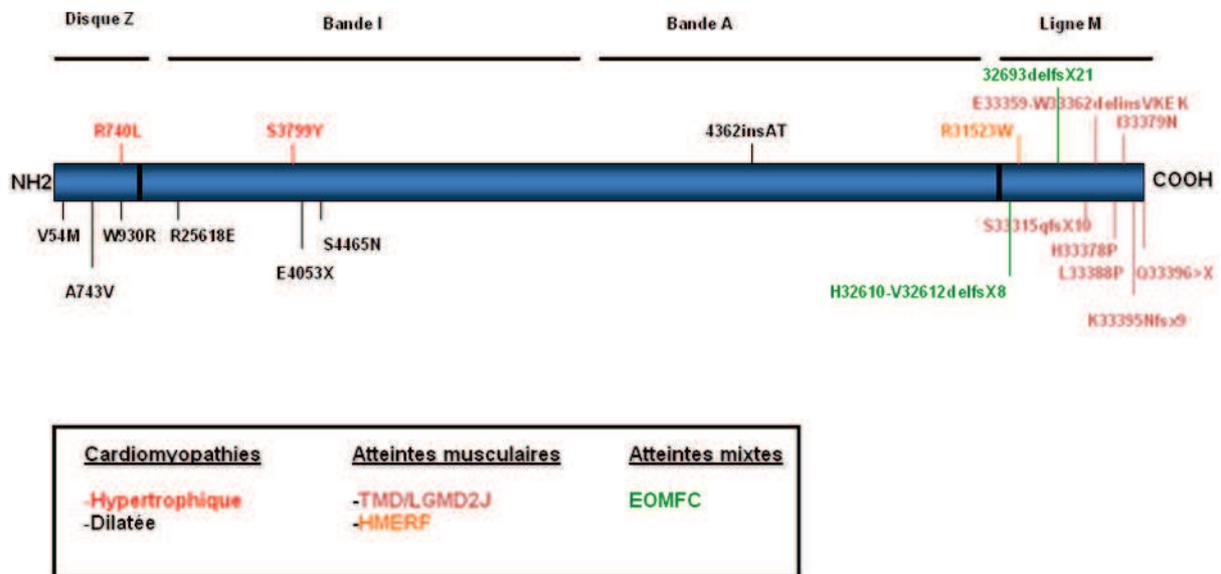


Figure 19 : Localisation des différentes mutations connues sur le gène de la titine.

1. Phénotypes cardiaques

Les **cardiomyopathies** sont des maladies cardiaques qui sont l'une des causes majeures de mort subite et d'insuffisance cardiaque chez l'Homme. Ces cardiomyopathies peuvent être la conséquence de facteurs externes comme l'ischémie, la consommation d'alcool, l'hypertension, des maladies métaboliques ou à des facteurs internes (souvent des anomalies génétiques) détériorant la fonction cardiaque. Approximativement 40% des formes sont familiales. Certaines cardiomyopathies dilatées et hypertrophiques sont les conséquences de mutations dans le gène de la titine.

1.1. Cardiomyopathie dilatée (CMD1G, MIM:604145)

Des mutations hétérozygotes de la **titine** entraînant une titine tronquée sont responsables de cardiomyopathies dilatées 1G (CMD1G) touchant les patients à des âges assez hétérogènes et souvent tardifs. Cette cardiomyopathie montre des cavités cardiaques (principalement le ventricule gauche) dilatées et des anomalies fonctionnelles pendant la systole (Richardson, 1996).

Dans les mutations décrites, trois se situent dans un domaine spécifique du muscle cardiaque N2B et les dix autres se trouvent principalement dans la partie N-terminale de la titine (*Figure 15*). Parmi elles, une insertion hétérozygote AT a été détectée dans la partie de l'ARNm codant pour la bande A de la titine dans une famille allemande présentant une cardiomyopathie dilatée (*Figure 19*). Cette mutation induit un décalage du cadre de lecture entraînant la synthèse d'une protéine tronquée de 1,14 MDa (Gerull *et al.*, 2002). Dans une autre famille, une mutation faux-sens hétérozygote causant la substitution d'un acide aminé tryptophane en arginine dans la zone de transition très conservée entre la strie Z et la bande I a été décrite (Gerull *et al.*, 2002) (*Figure 19*). Deux autres mutations dans le disque Z de la titine abolissent la capacité de liaison de la titine à la téléthonine et l' α -actinine (Itoh-Satoh *et al.*, 2002) (*Figure 19*). Deux mutations dans l'exon spécifique du muscle cardiaque N2B ont été également mises en évidence. L'une est une mutation non-sens (Itoh-Satoh *et al.*, 2002) et l'autre une mutation dans le domaine is2 de la titine qui abolirait potentiellement l'interaction titine/FHL-2 (Matsumoto *et al.*, 2005) (*Figure 19*). La plupart des mutations entraînant une cardiomyopathie dilatée sont donc présentes principalement dans les domaines N-terminaux de la titine.

1.2. Cardiomyopathie hypertrophique (CMH9, MIM:188840)

Deux mutations hétérozygotes de la titine induisant une cardiomyopathie hypertrophique (CMH9) ont été décrites. La première provoque la substitution Arg740Leu à la fin de la répétition Zr7 et augmenterait l'affinité de la titine à l' α -actinine (Satoh *et al.*, 1999). La seconde mutation Ser3799Tyr, dans le domaine N2B de la bande I, augmenterait l'affinité de la titine pour la protéine FHL-2 (Itoh-Satoh *et al.*, 2002) (*Figure 19*). De même que pour les myopathies entraînant des cardiomyopathies dilatées, les mutations à l'origine des cardiomyopathies hypertrophiques sont localisées dans la partie N-terminale de la titine.

2. Phénotype mixte

Myopathie précoce avec cardiomyopathie fatale (EOMFC, MIM:611705)

Une famille a été identifiée avec une mutation (délétion homozygote) à l'origine d'un décalage du cadre de lecture aboutissant à un codon STOP dans un des domaines de la titine codé par Mex3 (*Figure 19*). Les patients portant cette mutation ont présentés un retard moteur, ainsi qu'une faiblesse musculaire liée à une atteinte spécifique des muscles proximaux et distaux des membres inférieurs. Parallèlement, ces enfants ont développé une **cardiomyopathie** dilatée

progressive associée à des troubles du rythme entre 5 et 12 ans. Cette atteinte a entraîné la mort subite des patients entre 8 et 17 ans (Carmignac *et al.*, 2007). L'étude d'une seconde famille avec un phénotype proche de la première a permis de mettre en évidence une délétion homozygote de 8 paires de bases dans l'exon **Mex1** entraînant un codon STOP prématuré en aval de la mutation (Carmignac *et al.*, 2007) (*Figure 19*). Cette pathologie appelée Myopathie précoce avec cardiomyopathie fatale (Early Onset Myopathy with Fatal Cardiomyopathy, EOMFC) est aussi appelée dystrophie musculaire congénitale de Salih (Salih *et al.*, 1998; Subahi, 2001). Dans les deux cas, ces pathologies sont accompagnées d'une diminution secondaire de calpaine 3.

3. Phénotypes musculaires

3.1. Myopathie héréditaire avec déficience respiratoire précoce (HMERF, MIM:603689)

Une substitution dominante (Arg-Try) dans la séquence **Mex1** (codant pour la queue régulatrice du domaine kinase de la titine) abolie la voie de transduction **SRF** et est responsable d'une myopathie sévère : la myopathie héréditaire avec déficience respiratoire précoce (Hereditary Myopathy with Early Respiratory Failure, HMERF) caractérisée par une atteinte des muscles squelettiques aussi bien que des muscles respiratoires (Lange *et al.*, 2005) (*Figure 19*). Les patients atteints de cette pathologie présentent une faiblesse musculaire proximale des membres inférieurs et supérieurs avec une atteinte préférentielle des muscles du cou et respiratoire (Nicolao *et al.*, 1999). Une insuffisance respiratoire cause fréquemment la mort des patients (Edstrom *et al.*, 1990). Au niveau des sarcomères, les muscles présentent des stries Z anormales, des agrégats d'actine, de fréquentes cassures des stries Z, bandes I et ligne M des sarcomères. Au niveau moléculaire, la voie de transduction de la ligne M est abolie car la protéine nbr-1 ne peut pas se fixer sur la titine. **Nbr-1** et **MURF-2** sont alors anormalement localisées (Lange *et al.*, 2005; Tskhovrebova and Trinick, 2005) et SRF ne peut pas activer la transcription des gènes normalement régulés en réponse à un stress mécanique.

3.2. La Dystrophie Musculaire Tibiale et la Dystrophie Des Ceintures 2J (TMD:MIM:600334, LGMD2J: MIM:608807)

La dystrophie musculaire tibiale (TMD, Tibial Muscular Dystrophy, TMD) ainsi que la dystrophie des ceintures de type 2J (Limb Girdle Muscular Dystrophy 2J, LGMD2J), ont été mises en

évidence pour la première fois dans des familles finlandaises consanguines (*Figure 19*) (Udd *et al.*, 1993).

3.2.1. Atteintes phénotypiques

La TMD est caractérisée par une atrophie et une faiblesse musculaire en général confinée au niveau du compartiment antérieur des membres inférieurs, principalement le *Tibialis Antérieur* (TA). Le mollet des patients montre une hypertrophie ventrale. Les premiers symptômes cliniques apparaissent vers l'âge de 35 ans (Udd *et al.*, 1993) et se déclarent souvent de façon asymétrique, tendant avec le temps à devenir bilatéraux (Udd *et al.*, 1998). La maladie progresse lentement et chez la majorité des patients la marche est préservée avec toutefois l'impossibilité de poser le talon pendant la marche. Dans les cas les plus sévères, les patients nécessitent une aide à la marche. Aucune atteinte faciale n'a été observée chez ces patients à ce jour. Le taux de Créatine Kinase (CK) reste normal ou modérément élevé (Udd *et al.*, 1998). L'Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) réalisée sur différents patients montre un remplacement du muscle par du tissu conjonctif et adipeux dans le TA et selon l'atteinte dans le *Quadriceps* et le *Soléaire* (*Figure 20A*). Une hétérogénéité a été aussi mise en évidence chez un certain nombre de patient TMD (constituant près de 9% des TMD totales). Les atteintes peuvent en particulier toucher d'autres muscles tels que le *Quadriceps* et le *Soléaire*, ou encore les muscles des bras (Udd *et al.*, 2005).

Au sein de certaines familles avec des patients TMD, des formes nettement plus sévères ont été détectées. Pour ces patients, les premiers signes cliniques se déclarent pendant l'enfance avec une atteinte et une faiblesse musculaire précoce touchant principalement les muscles proximaux et qui entraîne une perte de la marche avant vingt ans et un taux de créatine kinase élevé (2-3000 ; max normal : 200) tôt dans l'évolution de la maladie. En IRM, à un stade avancé de la pathologie, il a été constaté une perte quasi totale des muscles laissant place à du tissu adipeux (*Figure 20B*). Aucune atteinte faciale n'a été mise en évidence à ce jour. Ces patients présentent une atteinte de type dystrophie des ceintures appelée **LGMD2J**. Comme pour toutes les dystrophies des ceintures, les patients développent une atrophie et une faiblesse progressive des muscles proximaux des ceintures pelvienne et scapulaire et une élévation du taux sérique de créatine kinase.

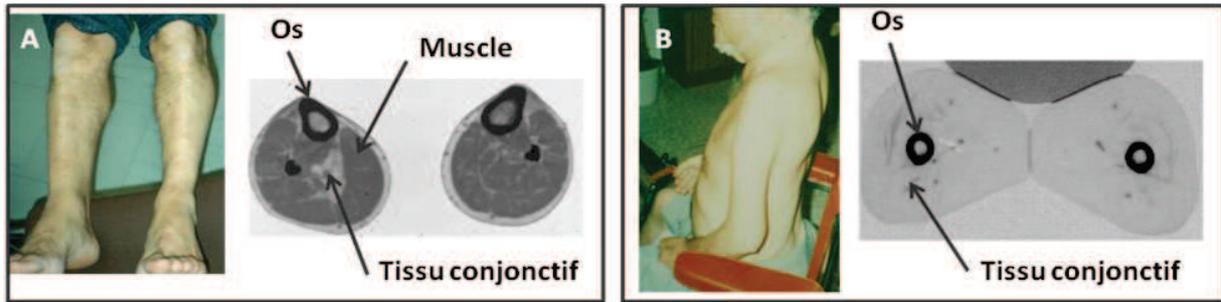


Figure 20 : Atteinte musculaire des patients TMD et LGMD2J.

A/ Gauche : Patient atteint d'une dystrophie musculaire tibiale. **Droite :** IRM sur un patient TMD montrant l'apparition de tissu conjonctif dans la zone du TA gauche. **B/ Gauche :** patient atteint de LGMD2J. **Droite :** IRM au niveau des cuisses de ce patient montrant la perte totale du tissu musculaire.

Les biopsies musculaires des patients TMD et LGMD2J montrent des changements myopathiques-dystrophiques de sévérité variable incluant une modification de la taille des fibres musculaires (souvent la présence de fibres plus grosses), des noyaux internalisés et quelques fibres positives aux basophiles ou nécrosées (*Figure 21A*) (Udd *et al.*, 1992; Partanen *et al.*, 1994). De plus, des noyaux en apoptose ont pu être mis en évidence sur les biopsies de *Tibialis* des patients TMD et de façon encore plus importante chez les patients LGMD2J (Haravuori *et al.*, 2001). Les biopsies visualisées en microscopie électronique montrent de façon variable, selon les patients, la présence de quelques vacuoles (notamment dans le cas des patients TMD) contenant des débris cellulaires. Dans les deux cas, la structure du sarcomère est normale (Udd *et al.*, 1993) (*Figure 21B*).

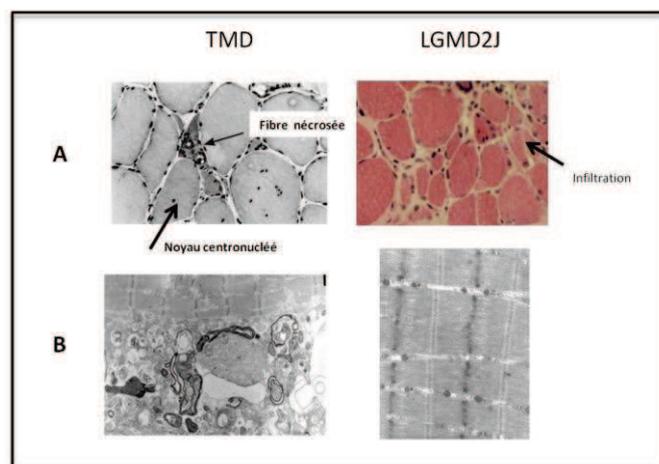


Figure 21 : Histologie et microscopie électronique de biopsies musculaires de patients TMD et LGMD2J.

A/ Biopsie musculaire de patients TMD et LGMD2J montrant la présence de fibres centronucléées, nécrosées ou d'infiltration cellulaire. **B/ Microscopie électronique sur biopsie musculaire de patients TMD** (* présence de vacuoles bordées) et LGMD2J (sarcomère normaux), d'après Udd (Udd *et al.*, 1998).

3.2.3. Mutations à l'origine de la TMD et la LGMD2J

La mutation à l'origine de la TMD et la LGMD2J a été localisée sur le chromosome 2, en 2q31 (de Seze *et al.*, 1999). Une mutation détectée sur des patients finlandais, majeure en FINLANDE (**FINmaj**), a été identifiée dans le dernier exon de la titine (Hackman *et al.*, 2002). Cette mutation à l'état hétérozygote entraîne la TMD et à l'état homozygote la dystrophie des ceintures de type 2J. La mutation **FINmaj** est la conséquence d'une insertion/délétion de 11 pb (AAGTAACATGG -> TGAAAGAAAAA) entraînant la modification de 4 acides aminés acides en 4 acides aminés basiques E33359_W33362delinsVKEK (EVTW->VKEK) dans une zone hydrophobe très conservée du domaine M10 (*Figure 19*) (Hackman *et al.*, 2002). Cette mutation semble être le fruit d'une recombinaison de l'ADN avec une même séquence présente dans un intron situé dans la bande A de la titine entre les exons 246 (Fn3) et 247 (Ig) du gène sain, 87 204 pb en amont de Mex6. Dans cette mutation, le tryptophane est muté en une lysine chargée, or ce résidu tryptophane est généralement très conservé dans toutes les répétitions Ig de la titine et est connu pour être d'une importance cruciale dans la stabilisation du noyau hydrophobe de la structure tridimensionnelle du domaine Ig-like (Improta *et al.*, 1998). La prédiction de la structure 3D du domaine M10 en présence de la mutation FINmaj indique une sévère modification conformationnelle de ce domaine (Pernigo *et al.*, 2010).

Cette mutation a été mise en évidence chez un grand nombre de patients finlandais atteints de TMD avec une prévalence supérieure à 10 cas pour 100 000 (Hackman *et al.*, 2002). Six autres mutations faux-sens ou non-sens ont été mises en évidence dans les deux derniers exons de la titine chez des patients belges, français, italiens et espagnols (*Figure 19*) (Hackman *et al.*, 2002; Van den Bergh *et al.*, 2003; Hackman *et al.*, 2008; Pollazzon *et al.*, 2009) entraînant le même phénotype TMD que la mutation FINmaj. Seules les mutations Finlandaises (Haravuori *et al.*, 2001) et une mutation détectée en France (mutation p.Q33396X) (Penisson-Besnier *et al.*) ont été mises en évidence à l'état homozygote entraînant une dystrophie des ceintures de type 2J. De façon intéressante, il y aurait une corrélation génotype-phénotype. En effet, une atteinte beaucoup plus sévère chez les patients TMD ayant une mutation entraînant la production d'une protéine tronquée (dû à une mutation faux-sens ou à un décalage du cadre de lecture introduisant un stop prématuré) a été mise en évidence (Hackman *et al.*, 2008).

3.2.4. Conséquences des mutations à l'origine des TMD/LGMD2J au niveau moléculaire

L'étude des biopsies de patients TMD/LGMD2J a permis de mettre en évidence que la protéine calpaïne 3 qui interagit avec la **titine**, notamment avec le domaine is7 de la ligne M, est fortement diminuée chez les patients atteints de LGMD2J et que sa présence était variable chez les patients atteints de TMD (*Figure 22*) (Haravuori *et al.*, 2001). La quantité de protéine **téléthonine** est inchangée. De plus, la présence et la localisation de la dystrophine et des sarcoglycanes n'est pas modifiée. Enfin, récemment, la perte de l'interaction de la protéine **obscurine** avec la titine dans la ligne M en présence de la mutation FINmaj *in vitro* et *in vivo* sur des biopsies de patients LGMD2J ainsi que de patients atteints de la myopathie de Salih a été démontrée (Fukuzawa *et al.*, 2008).

Il a été mis en évidence que les épitopes de la partie C-terminale de la titine sont absents. En effet, l'utilisation d'anticorps spécifique des domaines en aval des domaines **M8/M9** de la titine codés par les exons Mex3/4 sur les biopsies de patients LGMD2J ne sont pas marqués. Par contre, le marquage du domaine **M8/M9** de la titine est visible sur les biopsies de patients TMD. Le marquage des domaines **A169/170** est présent sur toutes les biopsies ainsi que le marquage de la myoméline qui se lie à la titine au niveau de son domaine M4 (Hackman *et al.*, 2002) (*Figure 22*). Enfin, il a été montré que les mutations en **M10** (Mex6) empêchent *in vitro* l'interaction de l'obscurine et l'obscurine like 1 avec la titine (Udd *et al.*, 2005; Fukuzawa *et al.*, 2008).

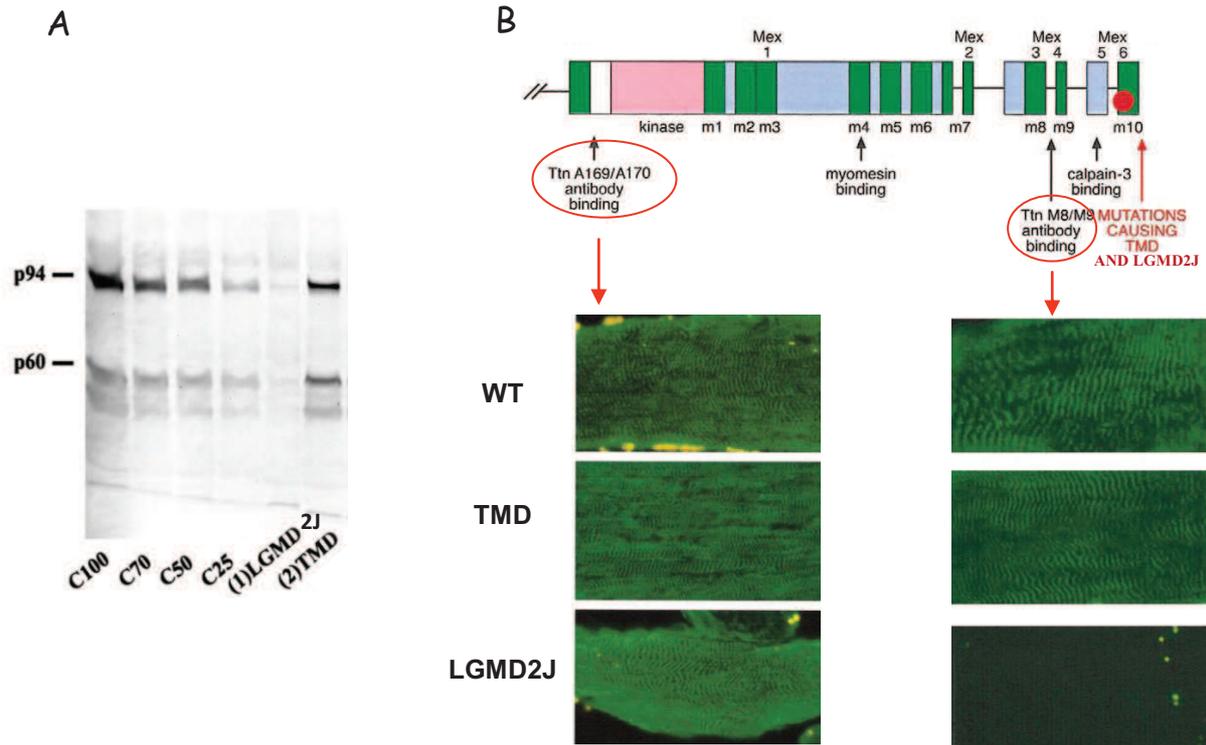


Figure 22 : Conséquences moléculaires de la mutation *FINmaj* sur la calpaïne 3 et la titine. *A/* Western blot réalisé sur extraits de biopsies de muscles de patients TMD et LGMD2J et hybridés avec un anticorps spécifique de la calpaïne 3 montrant la diminution de la quantité de calpaïne 3 dans la biopsie de muscle de patient LGMD2J (C100 à C25 dilution d'une biopsie témoin), d'après Haravuori, (Haravuori et al., 2001). *B/* Marquages de la titine avec les anticorps A169/170 et M8/M9 montrant la perte d'interactivité avec la partie C-terminale de la titine sur biopsies de muscles longitudinaux de patients TMD et LGMD2J, d'après Hackman (Hackman et al., 2002).

4. Modèles animaux d'étude de la titine et des pathologies associées

Toutes les pathologies précédemment citées ont été liées à des mutations différentes sur le gène de la titine humaine. Afin de mieux comprendre la physiopathologie de celles-ci, un certain nombre de modèles animaux naturels ou génétiquement modifiés sont étudiés à l'heure actuelle.

4.1. La drosophile

Chez la **drosophile**, une titine de 2 MDa a été mise en évidence dans les noyaux. Cette D-titine montre une forte homologie de sa partie N-terminale avec la titine des vertébrés (Machado *et al.*, 1998). Des mutations dans ce gène dû à l'insertion d'un transposon dans l'exon codant une partie du domaine PEVK et induisant la synthèse d'une protéine tronquée, entraîne une hypocondensation des chromosomes, des cassures dans les chromosomes, la perte de la diploïdie et la séparation prématurée des chromatides sœurs, ainsi que des anomalies dans la fusion des

myoblastes et l'organisation musculaire (Machado and Andrew, 2000a). Ce modèle est particulièrement adapté pour l'étude du rôle de la titine dans les chromosomes.

4.2. Le poisson

Une mutation récessive létale appelée *pik* a été découverte suite à un screening génétique à grande échelle chez le poisson zèbre. La mutation *pik* modifie un codon leucine en codon STOP dans un exon alternatif de la titine spécifique du cœur (en N2B, séquence unique IS3) (Xu *et al.*, 2002). Le cœur des poissons *pik* se développe normalement mais montre une défaillance au niveau de la contraction dès le premier battement et la présence d'un œdème cardiaque inévitable qui est dû au mauvais fonctionnement du cœur. Les myofibrilles des mutants *pik* se forment, mais les filaments fins et épais s'assemblent en patchs et les sarcomères sont anormaux.

Un autre poisson a été étudié (*runzel*), il présente une mutation appelée *ruz* à l'état homozygote identifiée sur le gène de la titine (Steffen *et al.*, 2007). Cette mutation a été associée par étude de liaison au gène de la titine mais pas définie exactement. Elle entraîne une dystrophie musculaire létale. Une diminution de la quantité de titine accompagnée d'une augmentation de la quantité de calpaïne 3 a été mise en évidence. Enfin, une diminution de la mobilité des poissons, ainsi qu'une mauvaise organisation des sarcomères (bien que la sarcogénèse se fasse normalement) a été constatée.

Ces deux poissons sont utilisés notamment dans l'étude de l'assemblage des sarcomères.

4.3. Les modèles murins

Les modèles murins sont les modèles animaux les plus étudiés. Il existe à ce jour 5 modèles murins naturels ou générés atteints de titinopathies.

La souris *mdm*: Une insertion LINE spontanée dans la bande I au niveau du domaine N2A, entraîne un épissage aberrant qui conduit à une délétion récessive de 83 acides aminés dans la bande N2A de la titine (domaine de fixation de la calpaïne 3) et conduit à une Dystrophie Musculaire dite Myositis (*mdm*) chez la souris (Garvey *et al.*, 2002) (pour revue (Granzier and Labeit, 2004)). Cette mutation cause une dystrophie sévère et progressive qui touche les muscles proximaux et surtout distaux tel que le *TA*. Ces souris présentent une atteinte respiratoire associée à une dysfonction du diaphragme et leur durée de vie n'excède pas deux mois (Lopez *et al.*, 2005). La quantité de calpaïne 3 est réduite de l'ordre de 50 à 60% (Garvey *et al.*, 2002). De

plus, les souris double mutantes, issues du croisement de souris *mdm* et KO C3, ne montrent aucune modification dans la progression et la sévérité de la pathologie, indiquant que l'activité de la calpaïne 3 n'est pas le mécanisme primaire de cette pathologie. Les souris issues de croisement *mdm*, souris transgéniques (surexprimant la calpaïne 3) montrent une forte dégradation de l'état du modèle avec une mort prématurée. De plus, il a été mis en évidence des problèmes de locomotion chez les souris hétérozygotes pour la mutation *mdm* ; la surexpression de la calpaïne 3 dans le cas de ces souris hétérozygote montre une amélioration des paramètres de locomotion de celles-ci. Le domaine N2A de la titine dans le muscle dynamique en contraction nécessiterait donc la présence et l'activité de la calpaïne 3 (Garvey et al., 2002).

La souris Knock-Out N2B : Des souris KO pour l'exon 49 de la titine ont été créées afin de déléter la région N2B de la titine tout en maintenant le cadre de lecture de la titine entière. Les souris vivent et sont fertiles. Leurs cœurs sont atrophiés mais les volumes d'éjection sont normaux car compensés par une augmentation de la fraction d'éjection. Ces souris montrent une forte réduction de la quantité de la protéine FHL2, et les sarcomères des cardiomyocytes sont moins longs et déploient une tension passive plus importante (Radke et al., 2007).

La souris reproduisant la mutation en cause dans la CMD1G: Une souris Knock-In (KI) a été construite avec la mutation AT dans la bande A de la titine (c.43628insAT) mise en évidence chez des patients atteints de **CMD1G** (Figure 19). Les souris homozygotes pour cette mutation développent des malformations des sarcomères et meurent avant le stade embryonnaire e9,5. Les souris hétérozygotes pour cette mutation sont viables et ont un cœur normal morphologiquement, fonctionnellement et mécaniquement dans des conditions de repos. Néanmoins, la quantité d'ARN de la titine WT (Wild Type) est très élevée suggérant qu'elle compense le déficit en ARN de titine muté qui est instable. Afin de tester la performance cardiaque pendant un stress chronique, les souris ont été traitées régulièrement à l'angiotensine II. Ces souris développent alors une dilatation du ventricule gauche qui ressemble au phénotype des patients atteints de cardiomyopathie dilatée (Gramlich et al., 2009). Ce modèle permet l'étude plus approfondie de la pathologie CMD1G dans des conditions de stress du modèle.

La souris Knock-Out des deux premiers exons de la ligne M: Une souris KO pour les **exons 358 et 359** de la titine, incluant le domaine TK, spécifiquement dans le cœur et les muscles squelettiques, montre une létalité embryonnaire lors de l'embryogenèse précoce à l'état homozygote. L'étude de ce modèle a montré que la myofibrillogenèse se passait normalement dans les cardiomyocytes mais que les sarcomères ne maturaient pas et se désassemblaient à

certaines endroits entraînant la létalité embryonnaire observée (Weinert *et al.*, 2006). Un Knock-Out conditionnel a alors été construit. Lorsque cette délétion est induite après la naissance de la souris, elle entraîne une faiblesse musculaire et une rupture des sarcomères puis la mort des souris peu de temps après (Gotthardt *et al.*, 2003). Au niveau musculaire, cette délétion induit la perte de l'interaction de la titine avec MURF1 et la myoméline 1, ainsi que des modifications de structure du sarcomère dans la ligne M et le disque Z, et aboutit finalement au désassemblage du disque Z. Les muscles montrent un profil dystrophique (Peng *et al.*, 2005), l'*EDL* est un muscle épargné, et les tests de force sur le *Soléaire* montrent une nette diminution probablement dû à une diminution de sensibilité des myofilaments au calcium (Ottenheijm *et al.*, 2009).

Souris *shru* : Une mutation récessive **shrunken-head** (*shru*) a été localisée dans une partie très vaste de 177 Kb dans la partie 3' du gène de la titine chez des souris (May *et al.*, 2004). Cette mutation à l'état homozygote est létale au stade embryonnaire e11, 5. L'expression de la titine est inchangée mais cette mutation conduit à la dégradation de la titine. Il a été mis en évidence chez ces embryons, une augmentation du facteur de croissance vasculaire endothélial (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) et une régulation spatiale anormale de l'angiogenèse ainsi que d'une morphogenèse vasculaire importante couplée à une augmentation de la mort des cellules mésenchymateuses. Les embryons montrent un dysfonctionnement cardiaque sévère. Ce modèle permet d'étudier *in vivo* le rôle de la titine dans la morphogenèse vasculaire.

4.4. Le modèle rat

Une mutation autosomique dominante qui altère l'expression des différentes isoformes de la titine, notamment les isoformes N2B, N2A et N2BA dans le cœur, a été mise en évidence chez des rats (Greaser *et al.*, 2008). La mesure de la tension passive sur des cardiomyocytes isolés des rats homozygotes pour la mutation, montre que les sarcomères sont plus extensibles et peuvent être étirés jusqu'à deux fois plus que les sarcomères sauvages et ceci sans rupture. Ces résultats permettent de constater que la titine normale a comme fonction notamment de prévenir les étirements trop importants des sarcomères.

Ces différents modèles permettent d'étudier à la fois la fonctionnalité de la titine et la physiopathologie de certaines maladies liées à cette protéine. Ils sont aussi indispensables pour tester de nouvelles approches thérapeutiques dans le cadre de ces pathologies liées à la titine.

SYNTHÈSE : Les pathologies associées à la titine et les modèles animaux associés

Un certain nombre de **mutations** ont été mis en évidence dans le gène de la **titine**. Toutes entraînent des **pathologies musculaires et/ou cardiaques**. Certaines de ces mutations ont la particularité d'entraîner une TMD à l'état hétérozygote et une LGMD2J à l'état homozygote. Les patients atteints de TMD ont une atteinte des muscles distaux relativement modérée et tardive, alors que les patients atteints de LGMD2J montrent une atteinte précoce des muscles des ceintures. Ces pathologies s'accompagnent d'une expression diminuée de la **calpaïne 3** et de la perte des **domaines C-terminaux** de la titine.

Un certain nombre de modèles animaux ont été mis en évidence ou construit afin de mieux comprendre l'implication de la titine et de ces mutations dans la vie du muscle.

IV Thérapie génique des pathologies liées au gène de la titine

A l'heure actuelle, aucune thérapie n'a été envisagée pour les patients atteints des maladies dues à des mutations dans le gène de la titine (titinopathies). Il peut seulement être proposé aux patients un suivi personnalisé de l'évolution de la maladie ainsi que des soins afin de soulager les troubles musculaires. Dans les cas les plus avancés, des soins respiratoires sont apportés et des interventions chirurgicales en cas de complications orthopédiques peuvent être réalisées.

Dans le traitement des dystrophies musculaires, les stratégies thérapeutiques peuvent être réparties essentiellement en trois groupes : l'approche pharmacologique, la thérapie cellulaire et la thérapie génique. Nous aborderons ici les différentes approches par **transfert de gène** qui est une stratégie thérapeutique consistant à remplacer ou à modifier, dans le cas des maladies génétiques, le gène muté par le gène intact. Elle a montré son efficacité dans le cas de nombreuses pathologies notamment neuromusculaires.

1. Stratégies de thérapies géniques appliquées aux dystrophies musculaires

De façon habituelle, et dans le cadre des maladies neuromusculaires, la thérapie génique est utilisée pour apporter le gène sain à l'aide de vecteurs viraux en raison de leur capacité à entrer dans les cellules de façon naturelle. Les virus adéno-associés (AAV, Adenovirus Associated Virus) sont les plus adaptés à transduire des cellules musculaires. Cependant, la limite technique de l'utilisation de ces vecteur **rAAVs** est leur capacité d'encapsidation qui est limitée à 4,7 Kb (Dong et al., 1996). Des études de transfert de gène médié par AAV ont été réalisées dans plusieurs dystrophies musculaires, en particulier les LGMD2A, C, E et F. La restauration de la protéine ainsi qu'une amélioration histologique et fonctionnelle ont été obtenus dans les modèle murins correspondants (Cordier *et al.*, 2000; Cordier *et al.*, 2001; Dressman *et al.*, 2002; Bartoli *et al.*, 2006; Fougerousse *et al.*, 2007; Pacak *et al.*, 2007). Pour la LGMD2C et la LGMD2D, des rAAV codant la γ -sarcoglycane et l' α -sarcoglycane, respectivement, sont utilisés et font d'ailleurs l'objet de deux essais cliniques..

Dans le cadre des mutations déterminées sur la titine, l'approche de thérapie génique par apport de gène simple est inenvisageable. En effet, délivrer une copie saine de la titine dans les fibres musculaires déficientes se heurte à l'obstacle majeur de la taille du messenger de la titine (environ 100 kb) qui excède les capacités d'encapsidation de tout vecteur viral.

De même, la concatémérisation d'AAV qui a été élaborée pour contourner le problème lié à la limitation de clonage dans les vecteurs AAVs, permet d'augmenter la taille des ADNc pouvant être incorporés. La concatémérisation utilise la capacité naturelle de recombinaison homologe entre deux régions portées par deux vecteurs indépendants (Lai *et al.*, 2005). Cette approche a été utilisée dans le cas de la dystrophie des ceintures de type 2B (dysferlinopathie) (Lostal *et al.*, 2010). Cependant, cette stratégie des vecteurs chevauchants, dans le cas de l'ADNc de la titine, est inenvisageable. Cette approche ne nécessiterait pas moins de 20 AAVs pour reconstruire la protéine entière.

D'autres approches testées pour certaines pathologies génétiques, telles que la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), due à des mutations dans le gène de la dystrophine, montre que le transfert d'une mini-dystrophine par vecteur AAV permet une restauration à long terme de la protéine, associée à une amélioration phénotypique et une augmentation de force musculaire aussi bien dans des souris nouveau-nés qu'adultes (Wang *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2002; Watchko *et al.*, 2002; Yoshimura *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005a). Cette approche ne semble pas possible pour les titinopathies du fait de la connaissance limitée de la fonction des différents domaines de la titine. De plus, il n'existe aucune étude indiquant qu'une forme réduite de la titine permettrait de maintenir son activité fonctionnelle.

D'autres approches de thérapies géniques sont maintenant largement testées et approuvées et plus particulièrement les approches ciblant les ARN pré-messagers (ARNpm) et messagers (ARNm) qui permettent de les modifier et de reconstruire une protéine saine. Ces approches sont développées par la suite et pourraient être des approches envisageables dans le cadre d'une approche thérapeutique adaptée à la titine.

2. Manipuler les ARNs en thérapie génique : la chirurgie des ARNs

La compréhension des phénomènes d'épissages dans la cellule a permis de d'envisager des approches de thérapies géniques ciblant directement les ARNpm ou les ARNm.

2.1. L'épissage

2.1.1. Les ARN pré-messagers et le spliceosome

Dans la plupart des gènes eucaryotes, la séquence codante se répartit sur les exons qui sont séparés par des introns non codants. Ces introns doivent être éliminés des ARN pré-messagers et

les exons joints les uns aux autres pour donner naissance à l'ARN messenger mature. Cette étape d'épissage est réalisée par le complexe splicéosome.

Le complexe catalytique que l'on nomme **splicéosome** permettant la maturation des pré-ARNm se compose d'un ensemble de 5 petites protéines nucléaires, appelées UsnRNPs (pour Uridine-rich small nuclear RiboNucleoprotein Particules, U1, U2, U4, U5 et U6snRNP) et de plus de 100 facteurs d'épissage. Chaque snRNP est composé de petits ARN nucléaires nommés snRNA, complémentaires de 5 cibles différentes sur l'ARN prémessager et de protéines capables de se lier aux autres snRNP et facteurs d'épissage. Le splicéosome agit donc à travers de multiples interactions ARN-ARN, ARN-protéine et protéine-protéine pour éliminer chaque intron et joindre les exons dans le bon ordre. Ces différents facteurs du splicéosome reconnaissent les séquences consensus d'épissage qui sont le **Site Donneur** (SD) ou site 5' d'épissage (5'ss), le **Point de Branchement** (BP) et le **Site Accepteur** (SA) ou site 3' d'épissage (3'ss).

2.1.2. Processus d'épissage et séquences régulatrices

a) Processus

La première étape du processus est la liaison du snRNP U1 au niveau du site donneur d'épissage 5'. Le snRNP U2 est ensuite recruté au niveau du résidu A du point de branchement (BP) par la sous-unité 65k du facteur auxiliaire U2 (U2AF) qui se lie pour sa part au niveau du site 3' d'épissage (*Figure 23*). Le complexe des trois snRNP, U4-U5-U6, remplace alors U1 au niveau du site 5' et quand U4 se détache du complexe, U6 snRNP se retrouve disponible pour se lier au snRNP U2 et créer le splicéosome actif du point de vue catalytique. Le lasso qui contient l'intron associé aux snRNPs est alors excisé et les exons sont joints pour former l'ARN messenger mature (*Figure 23*) (Stojdl and Bell, 1999).

b) Sites donneur/accepteur et de branchement

Le déroulement correct de ce processus d'épissage nécessite donc une reconnaissance des sites donneurs, accepteur et du point de branchement par le splicéosome. Toutefois, chez les organismes eucaryotes les plus complexes, les séquences consensus de ces sites sont assez faiblement définies (Cartegni *et al.*, 2002). Les seuls nucléotides qui sont pratiquement invariablement retrouvés dans tous les introns sont les GT au début de l'intron, les AG à la fin de celui-ci et le A du point de branchement au centre de l'intron (excepté pour les petites sous classes d'introns dits AT-AC et GC-AG (Senapathy *et al.*, 1990; Tarn and Steitz, 1996)). Les sites

donneurs 5' sont en général déterminés par la séquence AG / **G**TRAGt (où les bases en caractère gras sont invariablement retrouvées, celles en lettre capitale sont présentes dans environ 50% des sites analysés et celles en minuscule dans environ 33%, R est une purine (G ou A) et / représente la jonction exon-intron). Les sites accepteurs 3' contiennent quant à eux une séquence intronique riche en pyrimidines, pouvant varier en longueur de 2 à 32 nt. Leur séquence consensus est Y(2-32) NCAG / GN (où Y est une pyrimidine et / représente la jonction exon/intron) (Zhang and Chasin, 2004). La séquence du point de branchement est encore plus ambiguë: NNCTVAY (où V représente un A, C ou G, et où **A** est le point de branchement à proprement parler).

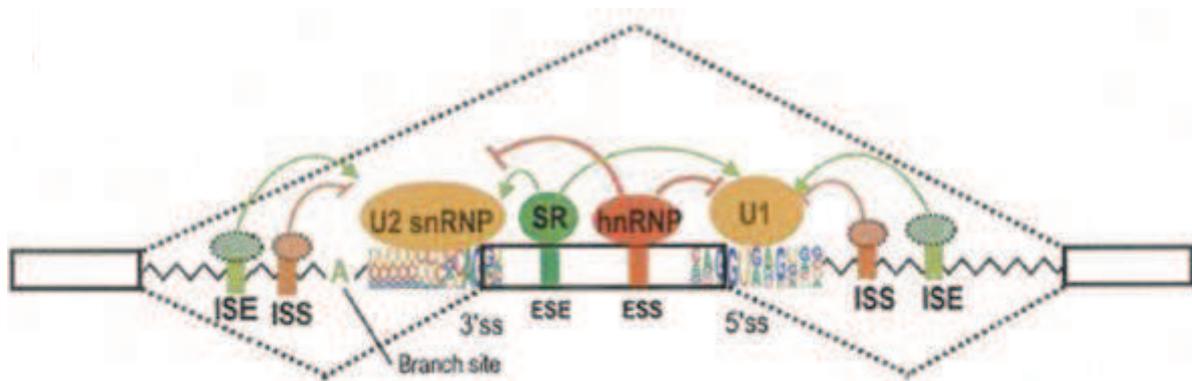


Figure 23 : L'épissage des ARNm, séquences et protéines nécessaires à l'épissage. D'après Wang (Wang and Burge, 2008).

c) Autres séquences de régulations de l'épissage

Pour faire face à la multiplicité des sites d'épissages et à leur faible conservation, la machinerie du spliceosome doit être dotée d'une grande flexibilité et savoir déchiffrer un véritable «code de l'épissage». En effet, outre les sites «classiques» d'épissage cités précédemment, d'autres séquences régulatrices activatrices ou inhibitrices jouent un rôle déterminant dans le mécanisme d'épissage.

Ces séquences localisées dans les exons ou dans les introns sont séparées en quatre catégories : **ESE** et **ESS** d'une part (pour Exonic Splicing Enhancer et Exonic Splicing Silencer) et **ISE** et **ISS** d'autre part (pour Intronic Splicing Enhancer et Intronic Splicing Silencer) (*Figure 23*). Parmi ces différentes séquences régulatrices, les ESE sont actuellement les plus étudiées et les mieux

caractérisées. Il est aujourd'hui bien établi que la plupart des exons contiennent des séquences ESE auxquelles peuvent se lier les protéines SR, un sous groupe de facteurs d'épissage (Liu *et al.*, 1998; Graveley, 2000). Initialement, les ESE des mammifères ont été identifiées comme des séquences riches en purine mais les séquences actuellement connues montrent une grande diversité. Les protéines SR sont caractérisées par des motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM) et un domaine C-terminal enrichi en dipeptides arginine/sérine (RS domaine) impliqué dans les interactions protéine/protéine (Cartegni *et al.*, 2002).

Neuf protéines SR différentes sont décrites (SF2/ASF, SC35, 8G9, SRp75, SRp55, SRp40, SRp20, SRp30c et p54). Elles ont des fonctions redondantes et peuvent reconnaître une large variété de séquences. Les ESE reconnus par les protéines SR sont des séquences de 5-7 nucléotides et la variation de leur composition est probablement un déterminant majeur qui permet la coordination et la régulation de l'épissage. La liaison des protéines SR aux séquences ESE permettrait l'épissage en facilitant le recrutement du facteur auxiliaire U2AF par l'intermédiaire de sa sous-unité de 35 kDa (U2AF-35kDa) au niveau du site 3' d'épissage (Wu and Maniatis, 1993). La sous-unité de 65kD (U2AF65) située au niveau de la région riche en pyrimidine (polypyrimidine tract) permet alors la liaison de U2 snRNP au niveau du point de branchement.

Comme nous l'avons évoqué, il existe également des séquences exoniques ou introniques dites « silencers » d'épissage ESS ou ISS (*Figure 23*). Le mécanisme suppresseur de ces séquences « silencer » n'est pas totalement connu et les ESS et ISS sont beaucoup moins bien caractérisés que les ESE. Néanmoins, ces ESS et ISS semblent fonctionner par interaction avec des régulateurs négatifs de la famille des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes appelées hnRNP qui possèdent, tout comme les protéines SR, une structure modulaire avec un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN associé(s) à un domaine d'interaction protéine-protéine. Plusieurs modèles de suppression sont proposés (*Figure 23*) (Cartegni *et al.*, 2002). Le modèle de suppression par compétition directe suggère que la liaison d'une protéine hnRNP au niveau d'un site ESS empêche la liaison des protéines sur le site ESE si ces deux motifs sont proches ou chevauchants. Un autre modèle impliquant des séquences ISS propose la formation d'une boucle induite par la dimérisation de protéines hnRNP fixées sur leur site ISS de part et d'autre de l'exon, rendant alors celui-ci inaccessible pour l'épissage.

2.1.3. Epissages alternatifs

Depuis la découverte de l'épissage de l'ARN (Berget *et al.*, 1977) aux récentes études sur les nombreuses séquences régulatrices de ce phénomène, un grand nombre d'évidences suggère que l'épissage alternatif a un rôle important dans la régulation des gènes et dans les fonctions biologiques et pathologiques (Sanford and Caceres, 2004). Dans le génome humain, près de 20 000 gènes codant des protéines existent et plus de 90% sont des gènes multi-exoniques épissés alternativement (Wang *et al.*, 2008; Wang and Burge, 2008). L'épissage alternatif de ces ARN pré-messager contribue à la diversité du protéome sans augmenter le nombre de gènes. L'épissage alternatif peut être tissu ou cellule spécifique.

L'ensemble des mécanismes de régulation (activateur ou suppresseur) cités plus haut, contrôle le processus d'épissage mais permet également de moduler l'utilisation de certains exons: l'épissage alternatif. Ainsi le transcrit primaire peut être épissé de différentes façons et donner plusieurs protéines différentes à partir d'un seul gène. Plusieurs types d'épissages différentiels sont possibles comme l'inclusion ou l'exclusion d'exon(s), l'épissage partiel d'un exon.

2.1.4. Mutations perturbant l'épissage

Certaines mutations présentes sur les séquences de régulation de l'épissage peuvent perturber celui-ci et entraînent des épissages aberrants. Ainsi la perturbation du site 5' provoque souvent l'inactivation du site 3' d'épissage et induit le **saut de l'exon** concerné entièrement (Robberson *et al.*, 1990). Une mutation au niveau du point de branchement quant à elle résulte généralement en la rétention de l'intron alors qu'une mutation au niveau du site 3' peut avoir des conséquences plus variées. Dans la plupart des cas, elle induit l'exclusion de l'exon concerné, mais l'élimination de plusieurs autres exons consécutifs a également été rapportée. Certaines mutations intra-introniques ou intra-exoniques peuvent activer des sites cryptiques d'épissage déjà présents, pouvant alors induire une inclusion d'une partie de l'intron ou au contraire l'exclusion d'une partie de l'exon muté. Enfin, des mutations exoniques, silencieuses d'un point de vue traductionnelles peuvent avoir des conséquences bien plus importantes si elles perturbent une séquence ESE, provoquant alors l'exclusion de l'exon concerné. L'identification de ces modifications d'épissage a permis de développer différentes approches pour tenter de contourner de façon expérimentale l'effet de ces mutations afin de restaurer un niveau d'épissage suffisant pour une compensation fonctionnelle efficace.

L'étude de l'ensemble de ces mécanismes d'épissage et de synthèse des ARNm au sein de la cellule a permis de mieux définir et mieux comprendre ces processus et de les utiliser dans le cadre de la thérapie génique afin de modifier les épissages sauvages ou l'expression de certains ARNm dans le but de rétablir la synthèse d'un ARNm sain ou de substitution. Cette meilleure compréhension a permis de développer un certain nombre d'approches de modulation de l'ARNm.

2.2. La chirurgie des ARNm

Un certain nombre d'approches par thérapie génique ont déjà fait leur preuve sur la modulation des ARNm et ARNm pour de nombreuses pathologies notamment dans le muscle squelettique. La chirurgie de l'ARN peut consister à dégrader les ARN mutés ou inversement empêcher leur dégradation, mais aussi exclure ou inclure des exons ou encore de les échanger.

Dans le cas d'une mutation dominante-négative, il peut être intéressant de dégrader spécifiquement l'ARNm muté. Les outils utilisés pour ce faire comprennent les **ribozymes**, les **OligoNucléotides Antisens (AON)** ou les **small interfering RNA (siRNA)** (Wood *et al.*, 2007) et pour revue (Le Roy *et al.*, 2009). Dans le muscle, ces approches ont été appliquées à la **Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1)**, due à des mutations dominantes négatives dans le gène **Dystrophy Myotonica-Protein Kinase (DMPK)**, évitant ainsi l'accumulation dans le noyau de l'ARNm muté DMPK (Langlois *et al.*, 2003; Mulders *et al.*, 2009).

Les ARN mutés présentant un codon **STOP prématuré** dû à une mutation non-sens ou un décalage du cadre de lecture sont dégradés par le système **Non Mediated RNA Decay (NMD)**. Cette **dégradation** peut être **évitée** en inhibant cette machinerie de dégradation des ARNs grâce à l'utilisation de drogues spécifiques. Dans le cas de certaines pathologies, cette approche pourrait être envisagée pour permettre de diminuer les symptômes en augmentant la quantité de la protéine mutée. Cette approche a été notamment utilisée dans la maladie d'Ullrich où une mutation entraînant le décalage du cadre de lecture dans le gène codant pour le collagène VI α 2 (**COL6A2**) entraîne un NMD. La preuve de principe a été réalisée dans des cellules de patients à la fois avec l'inhibition du NMD et l'utilisation de siRNA, pour revue (Le Roy *et al.*, 2009).

Les approches de chirurgie de l'ARN messenger peuvent aussi consister à **exclure** ou **inclure** des exons dans l'ARNm. L'exclusion d'un exon (ou saut d'exon) peut être réalisée grâce à l'utilisation d'AON qui permettent de bloquer les facteurs nécessaires à l'intégration de l'exon muté lors de l'épissage. La **Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)** a été l'une des premières pathologies à

en bénéficiant. L'exclusion des exons mutés a été démontrée chez la souris et le chien (Trollet *et al.*, 2009) et plus récemment chez l'Homme. Depuis, deux essais cliniques de phase I/II (NCT00159250 en Angleterre, et un PRO51/GSK2402968 aux Pays-Bas) ont été menés. Ils ont tous deux montré qu'après injection de ces séquences oligonucléotidiques en intramusculaire, aucun effet secondaire n'était observé et qu'une augmentation de l'expression de dystrophine était détectée dans les muscles injectés (Kinali *et al.*, 2009). Dans cette étude, l'AON cible l'exon 51. Un autre essai, en cours, mené sur 24 jeunes garçons, vise à évaluer la dose efficace et la toxicité liée à une injection systémique de ces AON (NCT00844597). Les premiers résultats montrent que l'expression de la dystrophine est restaurée à hauteur de 21% du niveau normal, sans aucun effet secondaire associé au traitement. L'ensemble des résultats devrait être publié d'ici la fin de l'année.

A l'inverse de cette stratégie, un exon exclu peut être réinclus au sein de l'ARNm. En effet, certaines mutations présentes au niveau des séquences régulatrices induisent, lors de l'épissage, l'exclusion d'un exon. Ce dernier peut être réintroduit dans l'ARNm grâce à l'utilisation d'oligonucléotides antisens qui vont permettre de bloquer des séquences ISE ou ISS qui inhibent normalement la rétention de cet exon dans l'ARNm. Cette approche a notamment été testée pour l'Amyotrophie Spinale (Spinal Muscular Atrophy, SMA) dans des modèles murins et des fibroblastes de patients (Skordis *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2006; Marquis *et al.*, 2007; Dickson *et al.*, 2008; Baughan *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2009).

Il existe une dernière approche envisageable en termes de chirurgie de l'ARN qui consiste en l'échange d'exon(s). Cette approche consiste à échanger le ou les exons mutés par leur(s) homologue(s) sain(s) lors de l'épissage grâce à une molécule apportant une séquence de reconnaissance de l'intron ciblé suivie d'une séquence intronique et enfin les exons sains. Cette approche se nomme le trans-épissage et est développé dans le chapitre suivant.

Dans le cas de la TMD et de la LGMD2J, les mutations en cause sont situées à la fin du gène de la titine. Ni le saut d'exon ni les autres stratégies citées plus haut ne sont envisageables dans ces cas de figure puisque les derniers exons de la titine codent pour une séquence protéique unique présente dans la ligne M. Le trans-épissage reste une des seules stratégies pour permettre la réparation de l'ARNm muté de la titine.

2.3. Le trans-épissage

2.3.1. Le trans-épissage à l'état naturel

En plus du cis-épissage, le splicéosome est capable d'épisser les ARNs en **trans**. Le trans-épissage consiste à joindre deux molécules d'ARNs indépendantes pour créer une molécule d'ARN chimérique. C'est une autre voie utilisée par les cellules, avec celle de l'épissage alternatif, pour augmenter le nombre de protéines synthétisées sans augmenter le nombre de gène du patrimoine.

Deux formes distinctes de trans-épissage permettent d'épisser et relier deux ARNs indépendants de façon naturelle: (i) le trans-épissage d'un ARN guide (ou **Splicing Leader, SL**). Chez le trypanosome, un ARN guide unique de 140 nt est produit en abondance, un fragment de 39 nt de cet ARN guide appelé mini exon se soude à l'extrémité 5' des exons traductibles de transcrits primaires dépourvus d'introns internes par trans-épissage. Ce mini exon 5' présent dans tous les ARNm des trypanosomes contribuerait à amorcer la traduction (*Figure 24A*). Ce phénomène est fréquemment décrit chez les trypanosomes et la drosophile (Horiuchi and Aigaki, 2006) et (ii) le **trans-épissage intergénique** est un trans-épissage d'ARN pré-messagers indépendants. Dans ce cas, le site donneur d'un ARN pré-messager est joint au site accepteur d'un autre ARN pré-messager (*Figure 24B*).

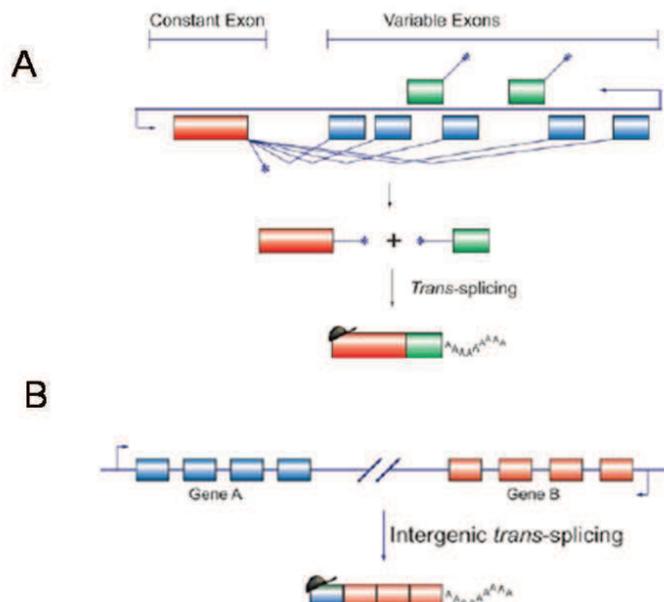


Figure 24 : Trans-épissages naturels

A/ Trans-épissage par ajout d'une séquence guide d'épissage, « Splicing leader ». *B/* Trans-épissage intergénique.

Le trans-épissage a été mis en évidence la première fois sur les trypanosomes (protistes parasites invertébrés) (Parsons *et al.*, 1984; Krause and Hirsh, 1987) puis dans une variété d'organismes plus complexes, notamment *Caenorhabditis elegans* (Krause and Hirsh, 1987), les euglénoïdes (Tessier *et al.*, 1991), les platelminthes (Rajkovic *et al.*, 1990), les drosophiles (Dorn *et al.*, 2001), et les mammifères (Eul *et al.*, 1995; Dorn *et al.*, 2001).

Chez les eucaryotes supérieurs, ces deux phénomènes seraient rares mais pourraient être fortement sous-estimés. En effet, l'analyse de différentes bases de données a révélé un grand nombre de transcrits chimériques dans toutes espèces confondues (Romani *et al.*, 2003; Gingeras, 2009). Deux cents ARNs chimériques ont été mis en évidence (Akiva *et al.*, 2006) et 1% de tous les transcrits chimériques pourraient être le résultat de trans-épissage (Romani *et al.*, 2003)

Chez l'Homme, il a été mis en évidence quelques ARNs issus du trans-épissage naturel, notamment entre deux copies du même gène du récepteur à l'œstrogène humain (Flouriot *et al.*, 2002). Le trans-épissage est rapporté aussi entre différents transcrits de l'ARNm de la cytochrome oxydase (Finta and Zaphiropoulos, 2002). De plus, l'ARNm AcyloAcholesterol AcyloTransferase (ACAT1) est formé par des exons dérivés de deux différents ARNs issus de deux gènes localisés sur différents chromosomes (Li *et al.*, 2009). Enfin, le trans-épissage entre les ARNm de COActivator Activator (COAA) et RNA Binding Motif protein 4 (RBM4) situés à 10 kb de distance entraîne la formation d'un ARNm unique (Brooks *et al.*, 2009).

La connaissance du mécanisme de trans-épissage naturel a permis d'envisager la possibilité de modifier une partie d'un gène muté grâce à cette capacité que la machinerie du splicéosome a de pouvoir épisser deux molécules indépendantes d'ARNpm.

2.3.2. Le trans-épissage utilisé comme approche de thérapie génique

Les équipes ayant utilisé le trans-épissage dans le but de réaliser un ARN chimérique pour modifier les ARNm mutés endogènes, ont proposé plusieurs techniques: utiliser le trans-épissage associé aux **ribozymes de groupe I** capables de s'auto-épisser sans l'aide du splicéosome ou le Spliceosome Mediated RNA Trans-splicing (**SMaRT**), approche se basant sur l'activité du splicéosome et qui est la plus répandue en termes de trans-épissage.

La première approche consiste à cibler l'ARNpm muté au niveau d'une séquence spécifique de celui-ci grâce à l'utilisation d'une séquence « guide » en amont d'un ribozyme permettant la ligation des exons sains apportés en aval (*Figure 25A*).

La deuxième approche appelée SMaRT consiste à utiliser la capacité du splicéosome à épisser en trans deux ARNpm distincts afin d'échanger un ou plusieurs exons d'un ARN messager muté endogène en apportant un ARN pré-messager thérapeutique dans le noyau. Cet ARN thérapeutique contient i) une **séquence spécifique** (Binding Domain, BD) qui va reconnaître l'intron en amont ou en aval de l'exon à modifier bloquant ainsi l'épissage endogène, ii) une **séquence intronique** qui va permettre l'épissage en trans entre les deux ARNs indépendants et le remplacement des exons mutés par les exons sains, iii) une **séquence codante** apportée par l'ARN thérapeutique (*Figure 25B*). Cette molécule s'appelle une molécule de pré-trans-épissage (Pre-Trans-splicing Molécule, PTM) et contient en aval du BD toutes les séquences nécessaires à l'épissage par le splicéosome : l'intron contenant le site donneur ou accepteur selon si le trans-épissage a lieu en 5' ou en 3' de l'ARNpm muté et un point de branchement et les exons à modifier. Il est possible de réaliser le trans-épissage à la fois en 5' ou en 3' de l'ARNpm muté mais il est aussi possible de réaliser le double trans-épissage dans le but d'échanger un exon interne dans l'ARNpm (*Figure 26*).

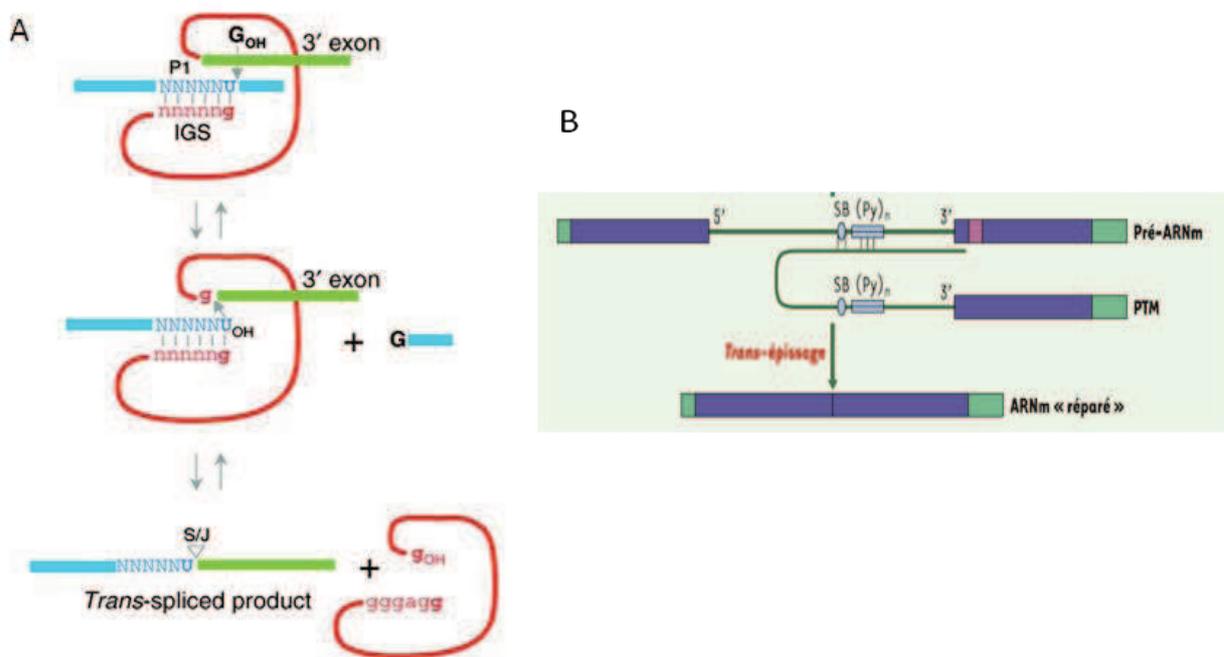


Figure 25 : Méthodes utilisées pour le trans-épissage.

A/ Trans-épissage associé aux ribozymes de groupe I. *B/* Trans-épissage avec SMaRT.

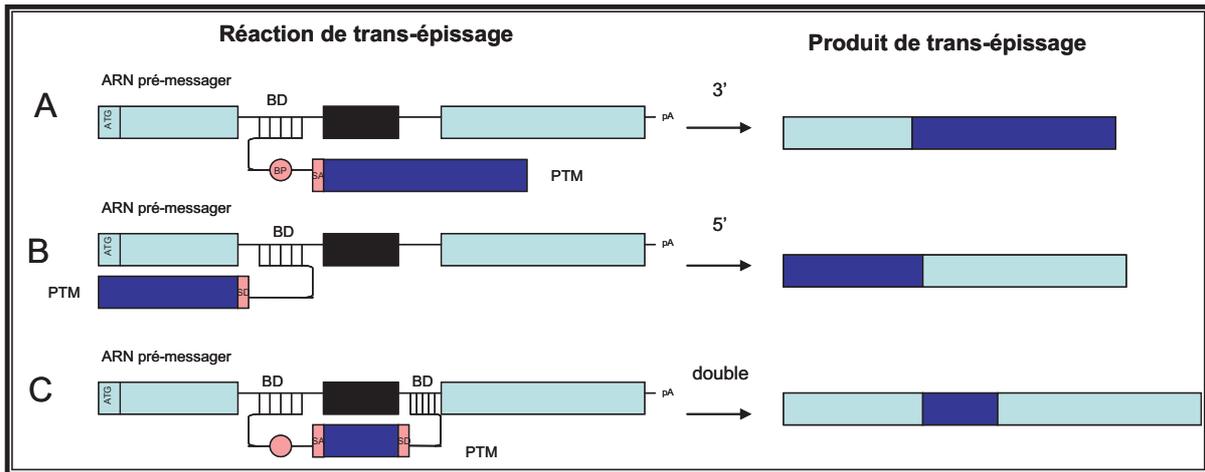


Figure 26 : Modes de trans-épissage envisageables par SMaRT pour l'échange d'exon(s) dans l'ARN prémessager.

A/ Trans-épissage en 3'. B/ Trans-épissage en 5'. C/ Double trans-épissage.

2.3.3. Preuves de principe du trans-épissage en thérapie génique par les SMaRTs

La première preuve de principe utilisant le SMaRT a été réalisée en 1999 (Puttaraju *et al.*, 1999). Le rétablissement de l'activité β -galactosidase a été mis en évidence *in vitro* après utilisation d'un PTM permettant la correction du transcrite de la β -globine non fonctionnel et l'inhibition du cis-splicing de l'ARNpm muté. A la suite de cette démonstration, d'autres preuves de principes de trans-épissage dans le but de proposer des traitements par thérapie génique ont vu le jour pendant cette dernière décennie (*Tableau 3*). Plusieurs équipes ont pu montrer la réparation de transcrits sur lesquels des mutations aboutissent à des pathologies diverses.

d) Le trans-épissage pour les maladies non neuromusculaires

Plusieurs publications font référence au gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) qui code un ARN de 6,5 Kb et entraîne la synthèse protéique d'un canal chlore qui, muté, entraîne la mucoviscidose, maladie autosomique récessive touchant en particulier les capacités respiratoire et digestive. L'approche de trans-épissage pour le gène CFTR a consisté à apporter les 14 derniers exons sains de l'ARNm CFTR (Mansfield *et al.*, 2000) ou les 10 premiers exons de celui-ci (Mansfield *et al.*, 2003). En parallèle, une correction de 16% de l'activité du canal chlore formé par la protéine CFTR a été obtenue grâce à l'utilisation d'un PTM codé par un

adénovirus recombinant dans des cellules épithéliales bronchiques humaines. Ces mêmes cellules ont été greffées dans un modèle murin reproduisant la mutation la plus répandue dans le gène CFTR et a permis de montrer une restauration partielle (22%) de la perméabilité du canal chlore codé par le gène CFTR (Liu et al., 2002). Cette approche a été poursuivie en utilisant un vecteur AAV recombinant codant un PTM apportant les 14 derniers exons sains de l'ARNm CFTR. De la même façon, les cellules épithéliales humaines ont été infectées avec les AAV 2 et 5 codant le PTM et a permis de montrer une restauration d'environ 13% de la conductance épithéliale (Liu et al., 2005b) (*Tableau 3*).

D'autres ARNs responsables de pathologies distinctes ont été partiellement restaurés grâce au SMaRT, notamment l'ARNm codant pour le **facteur VIII** (FVIII) entraînant l'**hémophilie de type A**. Cette approche utilisée sur des souris KO pour le gène F8 a permis de produire suffisamment de facteur VIII pour corriger le phénotype hémophilique des souris traitées (Chao et al., 2003) (*Tableau 3*).

L'ARNpm du **collagène 17A1** (**COL17A1**) impliqué dans une forme d'épidermolyse bulleuse, a été ciblé par SMaRT en utilisant un système de minigène/rapporteur *in vitro*. Le remplacement de la partie 3' terminale de l'ARNm COL17A1 a été constatée (Dallinger et al., 2000; Dallinger et al., 2003) (*Tableau 3*).

Des mutations dans le gène CD40L entraînent une maladie caractérisée par une immunodéficience liée à l'X avec excès d'IgM. L'injection d'un lentivirus apportant un PTM constitué des exons 2 à 5 de l'ARNm cd40 chez une souris déficiente, a permis de restaurer l'ARNm CD40L. Il a été constaté une atténuation de la pneumonie des souris sur 1 an (Tahara et al., 2004) (*Tableau 3*).

L'ARNpm issu de l'expression du gène **tau** est particulièrement étudié comme cible du trans-épissage. Des mutations à l'origine d'un défaut d'épissage dans l'exon 10 de ce dernier entraîne une maladie de type Parkinson. Le trans-épissage d'un minigène tau *in vitro* montre une efficacité de 33% de correction de l'ARNm par trans-épissage en 3' grâce à un SMaRT (Rodriguez-Martin et al., 2005; Rodriguez-Martin et al., 2009) (*Tableau 3*).

L'équipe de Sullenger a montré la réparation *in vitro* en 5' de l'ARNm de la **β -globine** responsable notamment de la **β -thalassémie** (Kierlin-Duncan and Sullenger, 2007) (*Tableau 3*).

Peu de temps après, Wally a montré la faisabilité de l'utilisation du trans-épissage en 5' grâce au SMaRT sur l'ARNm de la protéine **plectine 1** (**PLEC1**) dont une mutation dans l'exon 9 entraîne

l'agrégation de celle-ci et entraîne une maladie rare de la peau : l'**épidermolyse bulleuse**. Cette démonstration a été réalisée sur des fibroblastes de patients avec une mutation hétérozygote du gène **PLEC1** et a permis de mettre en évidence une restauration de l'expression et de la localisation de la plectine (Wally *et al.*, 2008) (*Tableau 3*).

Afin de produire de grandes quantités de protéine trans-épissée, l'équipe de Puttaraju a utilisé l'ARNpm cible codant pour l'**albumine humaine** (apolipoprotéine A-I ou apoA-I) qui se trouve en très grande quantité dans le sang. Ils ont montré la faisabilité du trans-épissage (synthèse ARN et protéine) de l'apolipoprotéine A-I par injection intraveineuse d'un plasmide codant pour un PTM ciblant l'exon 1 de l'albumine. Ils ont ensuite produit des transcrits chimériques grâce au trans-épissage de l'apoA-I pour produire un anticorps contre le papillomavirus type-16 E7 dans des souris *C57BL/6* et un facteur VIII fonctionnel dans des souris hémophiles (Wang *et al.*, 2009) (*Tableau 3*).

e) Le trans-épissage pour les maladies neuromusculaires

Il est à noter que, dans le muscle, à ce jour, le trans-épissage a été utilisé dans trois cas de pathologies musculaires : la SMA, la DM1 et la DMD. Dans le premier cas, le but était d'échanger l'exon muté, dans le deuxième cas, d'échanger le dernier exon ainsi que le 3'UTR qui porte la mutation et enfin, dans le troisième cas, d'échanger un exon au sein de l'ARNm de la dystrophine (*Tableau 3*).

Le SMaRT a été utilisé dans la **SMA** pour remplacer l'exon 7 non fonctionnel de l'ARNm SMN2 par l'exon 7 fonctionnel de l'ARNm SMN1 via une réaction de trans-épissage (Coady *et al.*, 2007). Le PTM a été exprimé grâce à un vecteur AAV2 et a montré la synthèse d'un ARNm SMN2 et présent dans le noyau. Cette technique a été améliorée grâce à l'utilisation d'un oligonucléotide antisens empêchant l'épissage entre l'exon 7 et 8 et ainsi « forçant » la machinerie d'épissage à introduire la nouvelle séquence codante de l'exon 7 apportée par le PTM. L'injection dans les ventricules cérébraux des souris modèles SMA a montré une augmentation significative de la protéine SMN dans la moelle épinière (Coady *et al.*, 2007; Coady *et al.*, 2008; Coady and Lorson, 2010).

Pour **DM1**, Chen et ses collègues ont construit un PTM ciblant l'intron 14 de l'ARNpm DMPK afin de remplacer le dernier exon et le 3'UTR qui contient des répétitions CUG. Ils observent 7% de trans-épissage de l'ARNpm **DMPK** dans les cellules humaines de myosarcomes (Chen *et al.*, 2009).

Pour la pathologie **DMD**, l'ARNm de la dystrophine contient une mutation dans l'exon 23 des souris *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy) qui entraîne un codon STOP. Pour la première fois, la démonstration faisabilité du double trans-épissage a été réalisée en échangeant l'exon 23 muté par l'exon 24 *in vitro* par la molécule nommée ExChange (Lorain *et al.*, 2010).

Le trans-épissage semble être une approche particulièrement intéressante notamment dans le cadre de la chirurgie des ARNm trop grand pour pouvoir bénéficier d'une autre approche de thérapie génique classique.

SYNTHESE : Thérapie génique des pathologies associées au gène de la titine

Dans le cas des pathologies TMD et LGMD2J, l'ARNm de la titine est beaucoup trop grand pour envisager une approche de thérapie génique classique par **transfert de gène**. De plus, aucune donnée ne permet d'envisager des approches de saut d'exon ou de compensation de la titine par une miniprotéine dans ces pathologies. C'est pourquoi l'approche de **trans-épissage** de l'ARNpm semble appropriée à ces pathologies. Quelques études montrent la faisabilité de cette technique.

Pathologie ou utilisation	Système de test	Résultats	Bibliographie
Facteur VIII / Hémophilie A	Souris KO facteur VIII par injection IV	ARN Séquence Augmentation 20% activité Facteur VIII physiologique	(Chao et al., 2003; Wang et al., 2009);
CFTR / mucoviscidose	Cellules épithéliales humaines Xéno greffe de rongeurs Souris transgénique LacZ	ARN Séquence Western Blot Réparation fonctionnelle des cellules (16%) Xéno greffe fonctionnelle (22% réparation)	(Mansfield et al., 2000; Liu et al., 2002; Mansfield et al., 2003; Liu et al., 2005b)
Alipoprotéine A1	Modèle cellulaire	ARN Séquence	(Wang et al., 2009)
SMN2 / SMA	Modèle cellulaire SMN SMA fibroblastes	ARN Séquence Expression SMN Assemblage des snRNP	(Coady et al., 2007; Coady et al., 2008; Coady and Lorson, 2010)
DNA protein kinase avec transposon sleeping beauty	Cellules Système de résistance à la radiation	ARN Protéine Correction en cellules souris SCID multipotentes	(Zayed et al., 2007)
collagène 17A1/ épidermolyse bulleuse	Modèle cellulaire	ARN Immunoblot	(Dallinger et al., 2000; Dallinger et al., 2003)
PLEC1/ épidermolyse bulleuse	Modèle cellulaire	ARN Séquence 50% trans-épissage	(Wally et al., 2008)
cd40 ligand	Lignée cellulaire	ARN Immunologie	(Tahara et al., 2004)
TAU / Maladie neurodégénérative	Modèle cellulaire	ARN Séquence	(Rodriguez-Martin et al., 2005; Rodriguez-Martin et al., 2009)
β -globine / β -thalassémie	Modèle cellulaire	ARN Séquence	(Kierlin-Duncan and Sullenger, 2007)
DMPK/DM1	Modèle cellulaire	ARN Séquence	(Chen et al., 2009)
Imagerie	Souris	Imagerie	(Bhaumik et al., 2004) (Walls et al., 2008)
Anticorps Chaine simple monoclonale contre l'HPV	Cellules de lymphomes	ARN Immunoblot Production d'anticorps en souris	(Iwasaki et al., 2009)
Dystrophine/DMD	Minigène dystrophine	ARN double trans-épissage	(Lorain et al., 2010)

Légende :

ARN: efficacité du trans-épissage confirmé par la présence de l'ARN réparé par RT-PCR.

Séquence: Séquence confirme le trans-épissage entre les deux ARNs indépendants.

Western Blot: Analyse des protéines par Western Blot montre la présence de la protéine trans-épissée.

Destruction des cellules: le trans-épissage entraîne la production d'une protéine qui induit la mort de certaines cellules.

Restauration de la fonction: la correction de la protéine CFTR entraîne l'activité du pore chlore.

Tableau 3 : Preuves de principe réalisées grâce au trans-épissage.

Adapté et complété d'après intronn, www.intronn.com

Objectifs et présentation de l'étude

Cette étude s'inscrit dans le cadre des projets de l'équipe « Dystrophies Des Ceintures » de Généthon dont l'objectif est de développer des solutions thérapeutiques pour les dystrophies des ceintures. Cette thèse a porté sur l'étude d'un modèle murin reproduisant les pathologies musculaires TMD et LGMD2J et la détermination d'approches thérapeutiques pour ces pathologies.

Avant de tester le potentiel thérapeutique d'une stratégie, il est nécessaire de disposer d'un modèle animal adéquat. C'est dans cette optique qu'a été construit au sein du laboratoire un modèle portant la mutation la plus répandue en Finlande responsable de la TMD et de la LGMD2J. La caractérisation de ce modèle est essentielle pour déterminer si celui-ci reproduit correctement les pathologies humaines. Une publication scientifique disponible en annexe présente les résultats issus de la caractérisation histologique et moléculaire de ce dernier. Cette caractérisation nous a amené à nous poser un certain nombre de questions, notamment pourquoi les domaines C-terminaux de la titine sont absents lorsque la mutation est présente, pourquoi une diminution secondaire de calpaïne 3 est observée chez les homozygotes, pourquoi la TMD et la LGMD2J montrent une sélectivité d'atteinte si différente. Cette étude nous a permis de répondre totalement ou en partie à ces questionnements et nous a amené à étudier et mieux comprendre les fonctions de la titine et de ses partenaires dans la ligne M du sarcomère.

La meilleure compréhension de la physiopathologie par l'étude du modèle murin nous a mis sur la piste d'une approche envisageable qui implique la régulation de la calpaïne 3 dans cette pathologie. Une seconde approche thérapeutique par thérapie génique a été envisagée tout en tenant compte du fait que la titine ne permet pas une approche classique de transfert de gène. L'approche de trans-épissage a alors été pensée et le but de ces travaux a été de démontrer que l'échange des derniers exons de la titine est possible.

RESULTATS

PARTIE I

Etude du modèle K1 TIN FINmaj

CONTEXTE

La mutation FINmaj (identifiée sur le dernier exon de la titine) a la particularité d'entraîner deux pathologies : la TMD lorsqu'elle est présente sur un allèle et la dystrophie des ceintures de type 2J lorsqu'elle est présente sur deux allèles. Afin d'étudier la physiopathologie de la TMD et de la LGMD2J ainsi que la particularité de la mutation en cause à donner deux phénotypes distincts chez l'Homme (TMD et LGMD2J), un modèle murin reproduisant la mutation la plus répandue en Finlande (FINmaj), présente dans le dernier exon de la titine (*Mex6*), a été créé au sein du laboratoire. Ce modèle murin a été caractérisé au niveau histologique et fonctionnel, ce qui a permis de déterminer qu'il reproduit en grande partie les pathologies humaines décrites. Il se révèle donc être un bon modèle pour aborder l'étude de la physiopathologie de la TMD et de la LGMD2J ainsi que pour tester, à terme, des approches thérapeutiques. Toutes les observations faites sont vraies chez les souris mâles et femelles.

L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication scientifique disponible en annexe.

1. Construction de la souris KI TTN FINmaj

Un Knock-In (KI) murin de la mutation FINmaj (souris KI TTN FINmaj) a été créé à la Clinique de la Souris (ICS, France) par recombinaison homologe. Un fragment de 2,2 kb englobant les exons *Mex2* à *Mex6* de la titine a été amplifié par PCR sur de l'ADN génomique de souris *129S2/SvPas* avec des amorces modifiées afin d'introduire la mutation *GAAATAACATGG* → *GTGAAAGAAAAA* (mutation FINmaj humaine) dans l'exon 6 (*Figure 27A*). Le fragment muté a été sous-cloné dans un vecteur contenant une cassette de résistance lox-néomycine. Après électroporation de cette construction et l'introduction des clones résistants ES G418 dans les blastocytes, les animaux chimériques obtenus ont été croisés avec des souris transgéniques pour le gène *Cre* afin d'exciser la cassette de résistance néomycine (*Fiche technique 1*). Ces souris ont été croisées sur un fond C57BL/6 et les souris hétérozygotes de la génération N3 [fond mixte *129SVPASicO* (25 %) et C57BL/6 (75 %)] ont été croisées entre elles afin d'obtenir des souris Wild-Type (WT) ou WT/WT), Hétérozygotes (HE ou WT/FINmaj) et Homozygotes (HO ou FINmaj/FINmaj) pour la mutation FINmaj. L'insertion de la mutation dans le gène de la titine a été vérifiée par génotypage puis séquençage (*Figure 27B*) (*Fiche technique 1*).

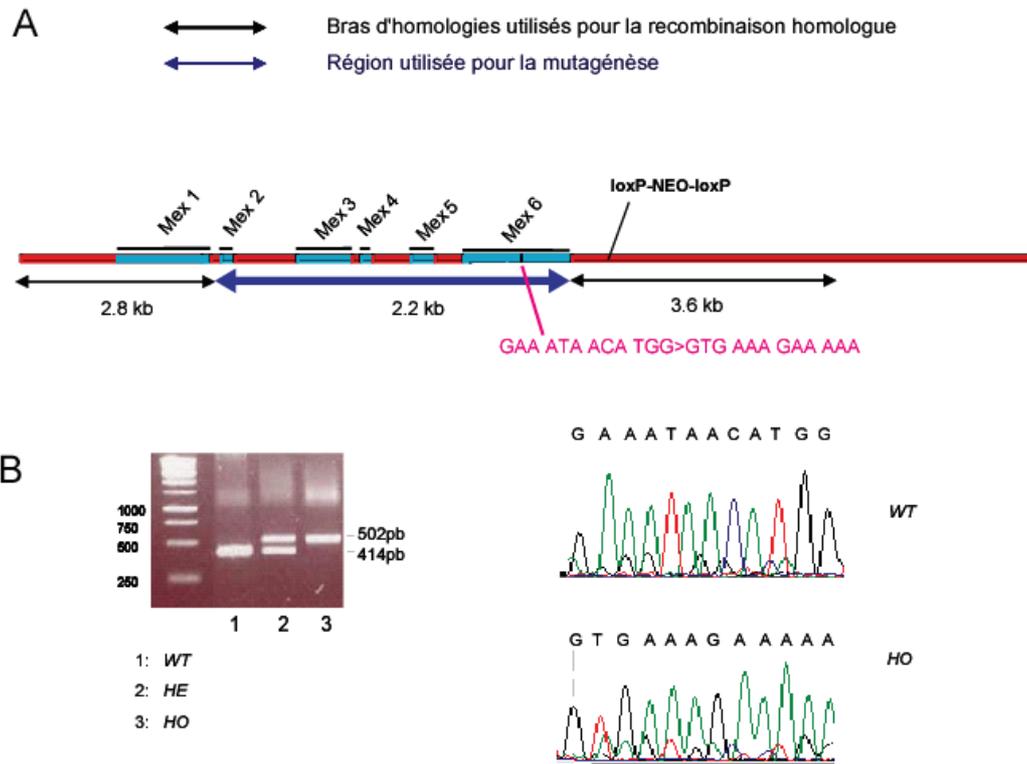


Figure 27 : Construction et génotypage de la souris KI TTN FINmaj.

A/ Schéma de la construction de la souris KI TTN FINmaj permettant l'insertion par recombinaison homologue de la mutation FINmaj humaine. *B/ Gauche :* PCR de génotypage permettant de distinguer les souris WT, HE et HO. *Droite :* Diagramme après séquençage de la mutation chez les souris WT et HO.

Une extraction des ARNm suivie d'une RT-PCRq spécifique de la jonction des exons Mex2 et Mex3 de la titine a été réalisée sur les *Tibialis Anterieur (TA)* et cœurs des souris WT, HE et HO à 4 mois (*Fiche technique 3*) (*Fiche technique 4*). Les résultats ont permis de constater que l'expression de l'ARN messager titine reste inchangée après l'insertion de la mutation FINmaj chez les HE et les HO en comparaison aux WT (*Figure 28A, gauche*). De plus, l'expression de chaque allèle de la titine (muté ou non) a été quantifiée en utilisant des oligonucléotides dirigés spécifiquement contre l'allèle sain ou l'allèle muté (FINmaj) et rapporté à la quantité de titine totale (oligonucléotides et sondes en Mex2) (*Fiche technique 3*) (*Fiche technique 4*). L'expression des deux allèles est normalement répartie selon un pourcentage de 100% de transcrit sain chez les souris WT, 100% de transcrit muté chez les souris HO et 50% de chaque transcrit chez les souris HE, indiquant que l'allèle muté est bien exprimé et n'est pas instable dans le *TA* comme dans le cœur (*Figure 28A, droite*).

La vérification de l'expression de la titine n'a pas été vérifiée par Western Blot étant donné sa taille (3 MDa environ) qui rend difficile cette expérience. Par contre, un marquage immunohistochimique de la titine, réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre sa région N2A sur des coupes de TA a permis de vérifier que l'expression, la localisation et l'intégration de la titine dans les sarcomères n'ont pas été perturbées par l'insertion de la mutation FINmaj (*Figure 28B*) (*Fiche technique 5*).

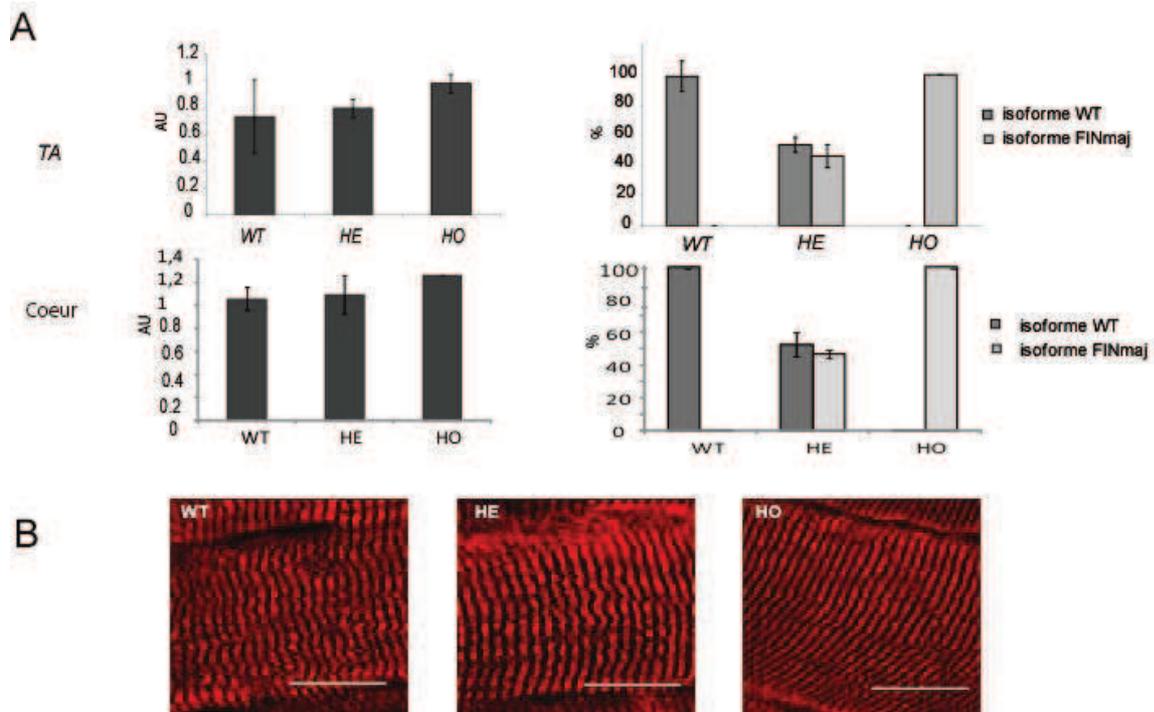


Figure 28: Effet de la mutation FINmaj sur la titine chez les souris KI TTN FINmaj. *A/ Gauche* : RT-PCR quantitative spécifique de Mex2 sur les ARNm de TA et cœur des souris WT, HE et HO rapporté à PO à 4 mois (AU : Unités Arbitraires). L'expression de la titine n'est pas modifiée en présence de la mutation FINMaj. *Droite* : RT-PCR quantitative sur les allèles sain et muté de la titine rapportée à la quantité totale de titine endogène à 4 mois (unités arbitraires). Chaque allèle est exprimé en proportion normale chez les HE et HO. *B/* Marquage immunohistochimique sur coupe de TA de souris WT, HE et HO grâce à un anticorps dirigé contre la partie N2A de la titine à 4 mois montrant la localisation correcte de la titine dans le sarcomère. Barre d'échelle = 25 µm.

2. Distorsion de ratio des naissances chez les souris KI TTN FINmaj

Le comptage des différents génotypes des souris KI TTN FINmaj issues d'accouplements de souris hétérozygotes entre elles, montre que sur 198 souris nées et génotypées, 93 souris sont WT, 93 sont HE et seulement 12 souris sont homozygotes pour la mutation FINmaj (*Fiche technique 1*) (*Tableau 4*). En partant du principe que la quantité des souris WT obtenue

correspond au nombre attendu de souris de ce génotype selon une transmission Mendélienne (soit 25%), la quantité totale de souris qui aurait du être obtenue est en fait de 372, par conséquent il n'a été obtenu que 25% de HE et 3% de HO (*Tableau 4*). Cette répartition des naissances ne suit donc pas une répartition Mendélienne (χ^2 , $p<0,01$) (*Tableau 4*).

Les accouplements des souris homozygotes entre elles n'ont donné aucun petit. Par contre, les accouplements de souris hétérozygotes avec des souris homozygotes ont donné naissance à des portées de souriceaux de faible nombre. Le ratio obtenu s'écarte du ratio attendu Mendélien (50% de HE et 50% de HO) puisque le nombre de souriceaux HE obtenu est de 63% et celui des HO est de 37%. Cependant, il peut être conclut que les souris homozygotes sont fertiles.

Il n'a pas été constaté de morts de souriceaux à la naissance ou au sevrage, indiquant que l'origine de cette distorsion est antérieure à la naissance.

	WT	HE	HO	Total
Observé	93 (25%)	93 (25%)	12 (3,2%)	198
Attendu	93 (25%)	186 (50%)	93 (25%)	372
χ^2	0	46,5* ($p<0,01$)	70* ($p<0,01$)	117* ($p<0,01$)

Tableau 4 : Répartition corrigée des 198 génotypes des souris issues de croisement HExHE KI TTN FINmaj.

Une distorsion du ratio de naissance en défaveur des souris HE et HO est constatée. Test de probabilité χ^2 .

Afin de déterminer si une mortalité embryonnaire est la cause de cette distorsion de ratio de naissance des souris KI TTN FINmaj, le génotypage des embryons issus d'accouplements de souris hétérozygotes a été réalisé sur des embryons de 12 jours (*Fiche technique 2*). Sur les 16 embryons issus de 2 accouplements génotypés, 4 étaient WT, 7 HE et 5 HO (*Tableau 5*) (*Fiche technique 1*). Cette répartition respecte la répartition attendue par les lois Mendéliennes (test χ^2 , $p>0,9$) et diffère significativement des ratios des KI TTN FINmaj obtenus à la naissance (χ^2 , $p<0,01$). Ces résultats indiquent que la mort des embryons a lieu après ce stade embryonnaire de e12. Nous avons pu constater la présence d'embryons en état de nécrose dans la trompe utérine après ce stade. En effet, sur 10 embryons présents à e14, 3 étaient en état de nécrose. Le génotypage des embryons vivants à ce stade et à des stades ultérieurs montre la même distorsion de ratio qu'observé à la naissance. Ces analyses permettent de conclure à une mort embryonnaire des souris KI TTN FINmaj comprise entre e12 et e14.

	WT	HE	HO	Total	χ^2
Observé	4	7	5	16	
Attendu MENDELIAN	4	8	4	16	0,09, (p>0,9)
Attendu KI TTN FINmaj	4	4	0.5	16	33,5 (p<0,01)

Tableau 5 : Répartition des génotypes des embryons à e12 issus d'accouplements de souris hétérozygotes pour la mutation FINmaj.

Aucune distorsion de ratio n'est constatée avant le stade e12 . Test de probabilité χ^2 corrigé par Yates.

Dans l'idée de diminuer cette distorsion de ratio, le fond génétique de ces souris a été modifié en réalisant des croisements en retour jusqu'à la génération N9 avec des souris de fond pur C57Bl/6. Ces souris ont été croisées ensuite entre elles afin d'obtenir des souris HE, HO et WT sur fond pur C57Bl/6 (99,6%). Le génotypage des souriceaux a été réalisé comme précédemment. Sur 44 naissances, il a été obtenu 8 souris WT (18%), 28 souris HE (64%) et 8 souris HO (18%) (*Fiche technique 1*). Le ratio de naissance est donc Mendélien pour ces souris portant la mutation FINmaj sur fond C57Bl/6. Ces résultats préliminaires indiquent qu'il existe un facteur exprimé à l'état embryonnaire dans le génome des souris *129SVPASicO* qui est délétère pour les embryons portant la mutation FINmaj. Cependant, en raison du délai nécessaire pour générer la souche KI TTN FINmaj sur fond pur C57Bl/6, la caractérisation du modèle KI TTN FINmaj a été réalisée sur la génération N3 sur fond mixte *129SVPASicO* (25 %) et C57Bl/6 (75 %).

Malgré la distorsion de ratio observée à la naissance pour la génération N3 étudiée, les souris HE et HO nées, vivent plus de 18 mois sans augmentation de mort spontanée. Les souris HE et HO ont un poids, une apparence et une activité semblables aux souris WT.

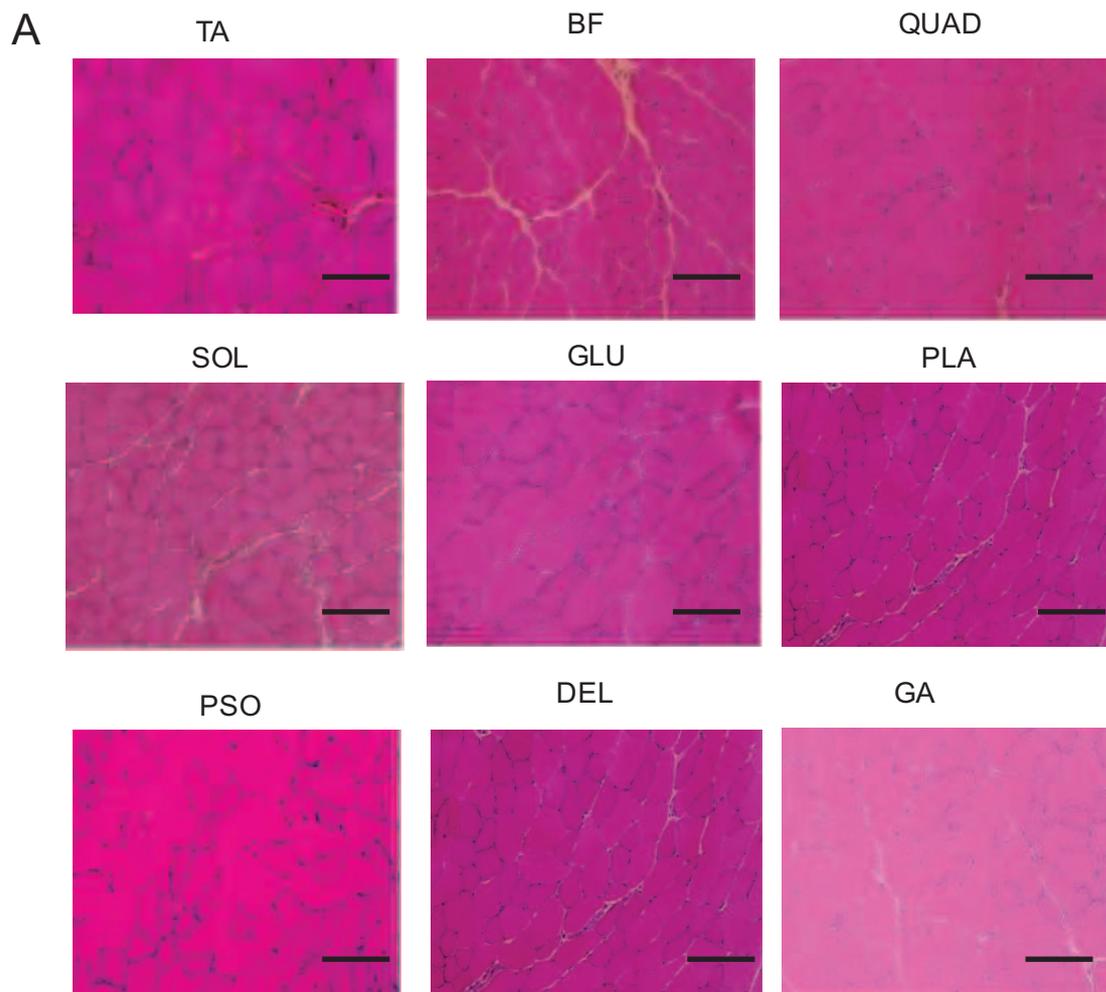
3. Les souris KI TTN FINmaj présentent un phénotype fonctionnel normal

Différents tests d'activité globale ont été réalisés sur les souris HE et HO. Le test d'étude des foulées consistant à mesurer la distance entre les pattes avant et arrière lors de la marche de la souris après avoir encre les pattes, n'a révélé aucune anomalie quel que soit l'âge des souris (4, 6 et 9 mois). Le test d'échappement n'a montré aucune différence entre chaque phénotype. La

mesure de l'activité locomotrice des souris sur une nuit grâce à l'actimètre n'a elle non plus montré aucune différence. De plus, les souris, quel que soit leur phénotype, courent 30 minutes sur un tapis sans problème à l'âge de 9 mois. Tous ces tests n'ont mis en évidence aucune atteinte globale des souris qu'elles soient hétérozygotes ou homozygotes (*Fiche technique 7*).

4. Atteinte histologique des muscles de souris KI TTN FINmaj

L'étude histologique des différents muscles des souris mutantes, montre que les souris HE présentent une atteinte musculaire tardive et localisée. En effet, l'histologie des muscles *TA*, *Quadriceps (QUAD)* et *Biceps Femoris (BF)*, après coupe transversale et marquage histologique HPS, montrent un profil important de centronucléation sans infiltration cellulaire à partir de l'âge de 9 mois. Les autres muscles montrent très peu d'atteinte au même âge (*Figure 29A et B*) (*Fiche technique 5*).



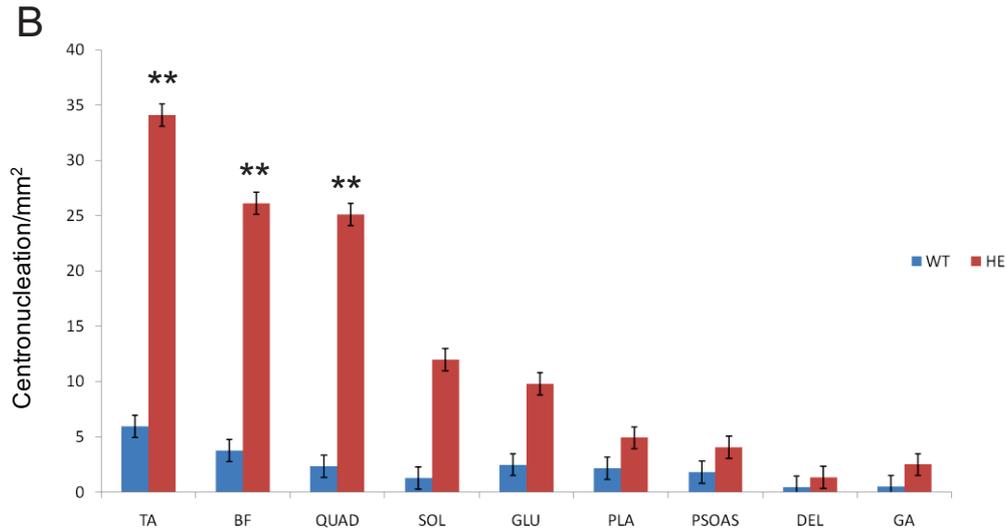


Figure 29: Histologie des muscles des souris KI TITIN FINmaj HE à 9 mois.

*A/ Atteinte histologique des muscles des souris KI TTN FINmaj HE après marquage HPS à 9 mois (barre d'échelle = 50 μ m). B/ Quantification du nombre des centronucléations/mm² des différents muscles à 9 mois (centronucléations/mm²), (**, $p < 0,01$). Les TA, QUA et BF montrent une atteinte dystrophique à 9 mois.*

Dans le cas des souris HO, l'atteinte est beaucoup plus précoce. En effet, l'atteinte musculaire dystrophique est visible au niveau du muscle soléaire dès l'âge de 1 mois avec un profil de centronucléation important ainsi que la présence d'infiltration cellulaire (*Figure 30*).

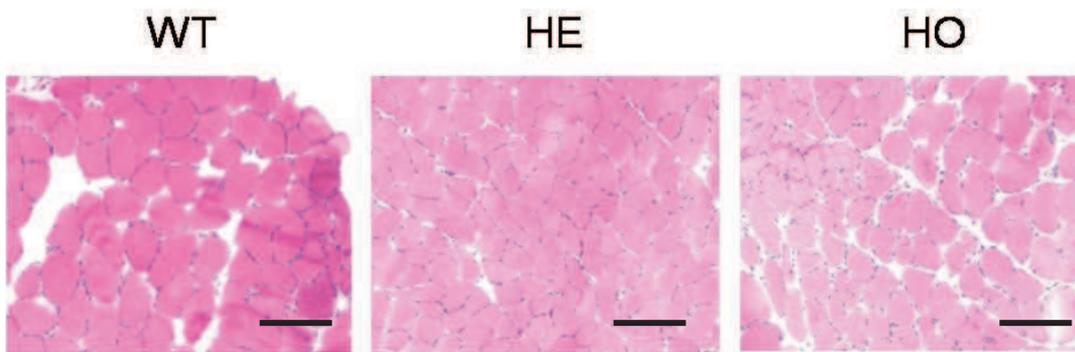


Figure 30 : Histologie du muscle soléaire des souris KI TTN FINmaj HO à 1 mois.

Le soléaire montre une atteinte dystrophique chez les souris HO de 1 mois. Photos prises à 1 mois (X10) après marquage HPS (barre d'échelle = 50 μ m).

A l'âge de 6 mois, la plupart des muscles prélevés sur les souris HO (TA, PSO, QUAD, GA, GLU, BF) ont un profil histologique dystrophique avec de nombreuses fibres centronucléées et présence d'infiltration cellulaire selon les muscles (*Figure 31*).

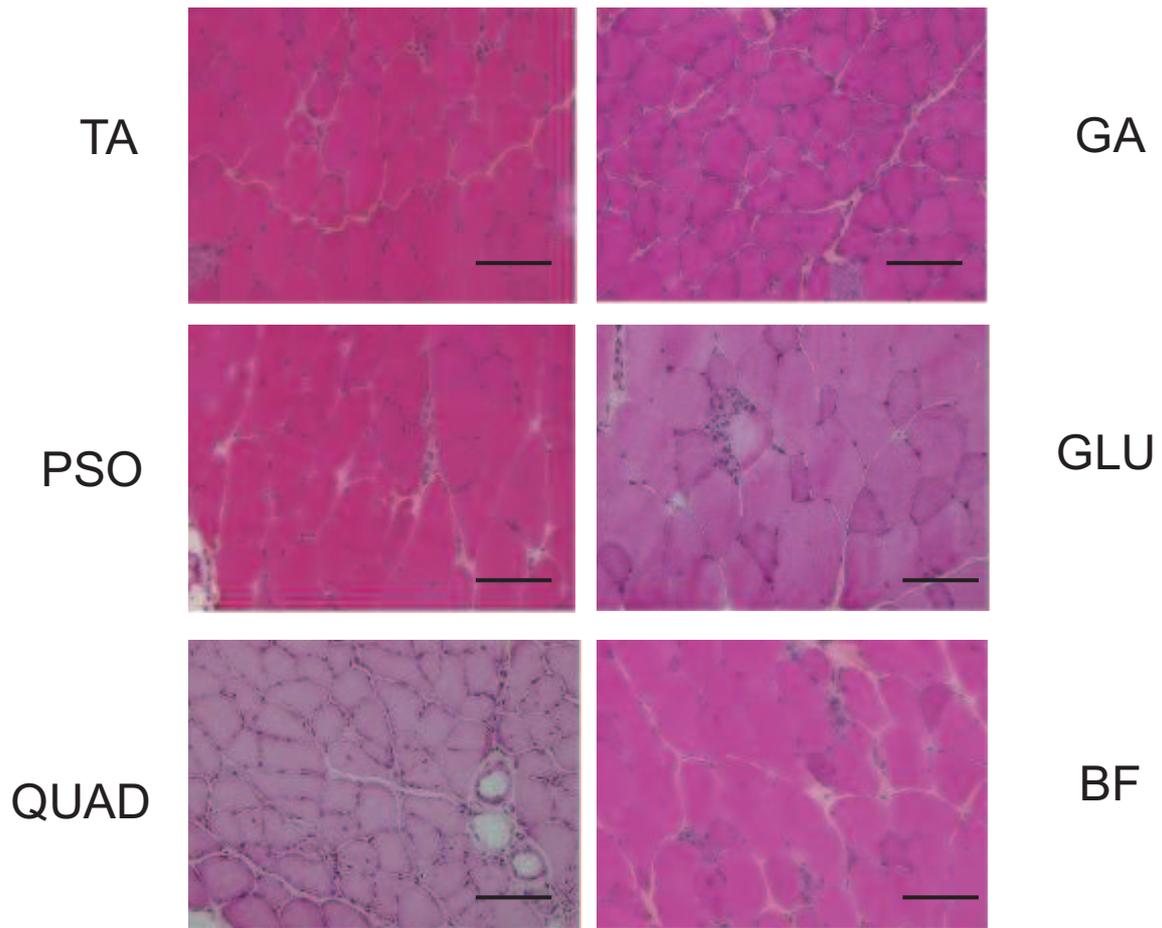


Figure 31 : Histologie des muscles TA, GA, PSO, GLU, QUAD, BF des souris HO à 6 mois. Tous ces muscles montrent une atteinte dystrophique à 6 mois. Marquage HPS. Barre d'échelle = 50 μ m.

A 9 mois, chez les souris HO, le phénotype dystrophique des muscles déjà atteints à 6 mois est aggravé (*Figure 32A*). La plupart des muscles antérieurs et postérieurs montrent un taux de centronucléation important (*Figure 32B*). Le SOL reste le muscle le plus touché et montre toujours les mêmes signes d'atteinte dystrophique (infiltration et centronucléation importante) que ceux visibles à 1 mois (*Figure 32A et B*).

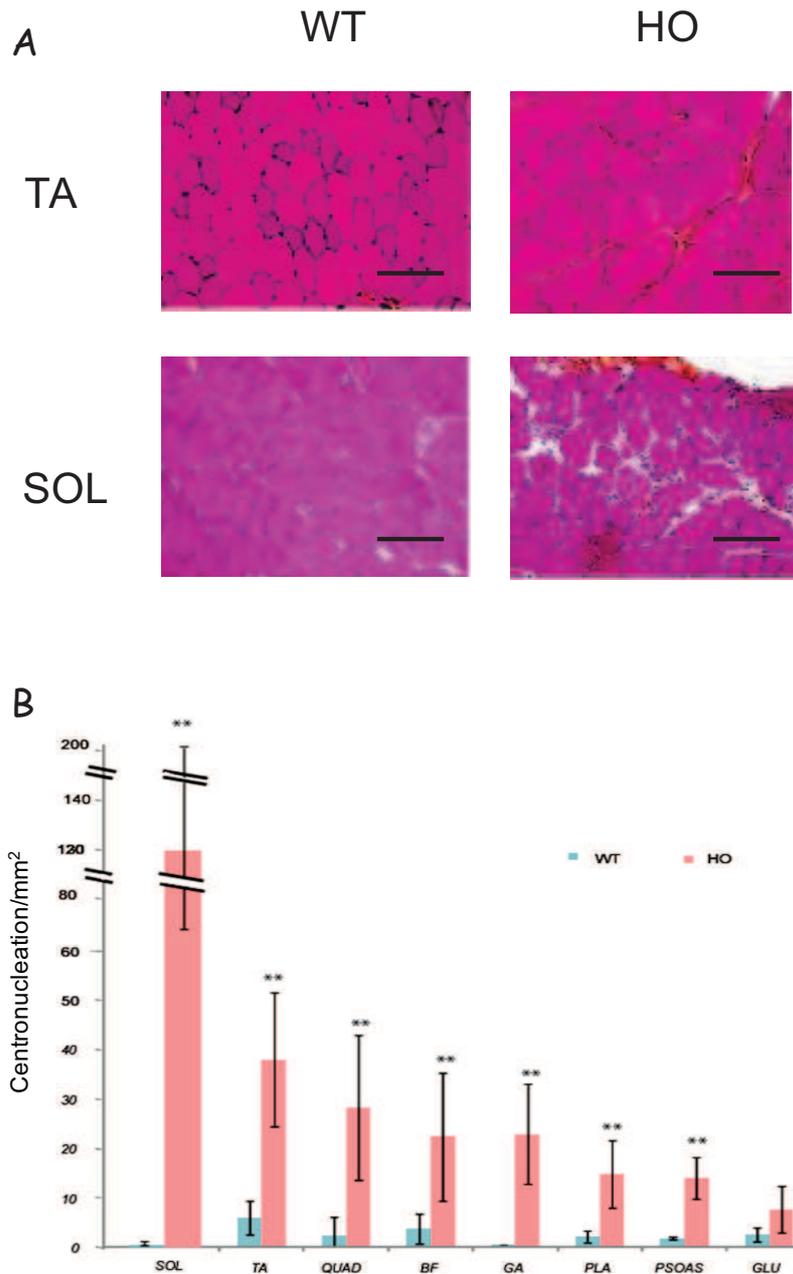


Figure 32 : Histologie des muscles des souris KI TITIN FINmaj HO à 9 mois.

A/ Histologie du TA et du SOL des souris WT et HO à 9 mois après marquage HPS. Barre d'échelle = 50 μ m. Les TA et SOL des souris HO montre une atteinte dystrophique alors que seul le TA est atteinte chez les HE. **B/** Quantification de la centronucléation de différents muscles à 9 mois chez les souris HO (centronucléation/mm²) (**, $p < 0,01$).

De façon intéressante, certains muscles comme l'EDL ne montre aucune atteinte histologique quels que soit l'âge et le génotype des souris (Figure 33). Il est à noter que l'atteinte musculaire observée est indépendante du sexe des souris : les femelles et mâles HE et HO caractérisés

montrent le même type d'atteinte musculaire. Cette observation a été aussi faite chez les patients TMD (Udd *et al.*, 1998).

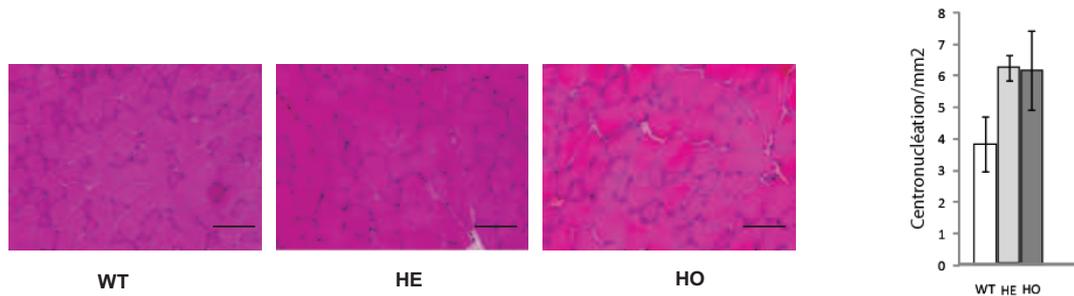


Figure 33 : Histologie des muscles EDL à 1 mois chez les souris KI TTN FINmaj HE et HO. L'EDL n'est jamais atteint quelque soit le génotype. Barre d'échelle = 50 μ m.

Des marquages histologiques ont été réalisés avec des anticorps spécifiques des macrophages (marqueur cd11b) (*Fiche technique 5*). Ils ont permis de montrer la présence de macrophages uniquement dans le SOL chez souris HO et ce à tous les âges testés (1, 4, 6 et 9 mois) (*Figure 34*).

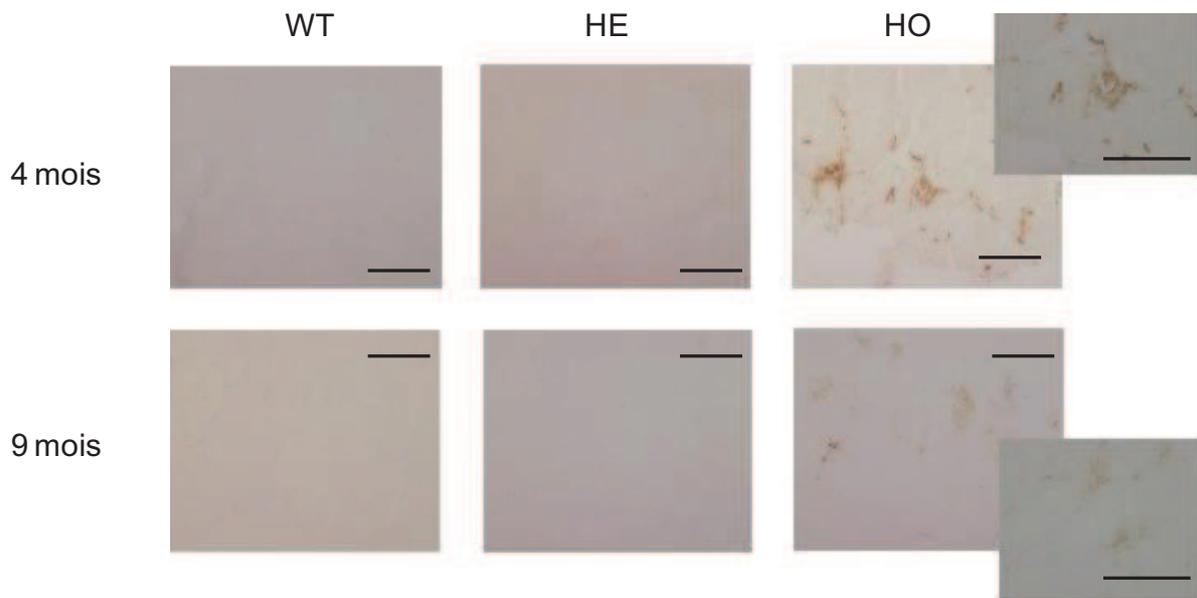


Figure 34 : Marquage cd11b sur coupe de muscle soléaire sur les souris WT, HE et HO KI TTN FINmaj.

Des macrophages sont présentes dans le soléaire des souris HO à 4 et 9 mois. Barre d'échelle = 50 μ m.

Quelques fibres en régénération ont pu être mises en évidence grâce à un anticorps spécifique dirigé contre la chaîne lourde de la myosine développementale (dMHC ; developmental Mynosin Heavy Chain) (*Fiche technique 5*) uniquement dans le SOL chez les souris HO à tous les âges

testés (1, 4 6 et 9 mois) (*Figure 35*). Le typage des fibres lentes et rapides ne montre pas de différence du nombre de fibres lentes ou rapides quel que soit le génotype ou le muscle étudié à 9 mois (*Fiche technique 5*).

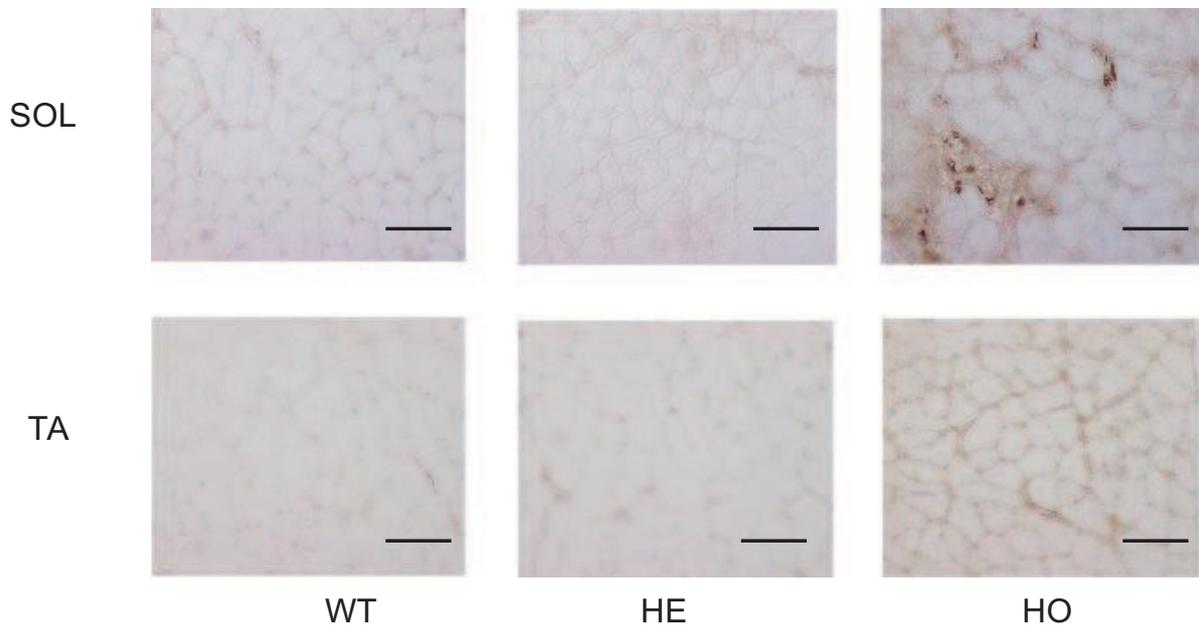


Figure 35 : Marquage de la myosine développementale (MHCd) dans le SOL et le TA des souris WT, HE et HO. Le marquage des MHCd est présent seulement dans le TA des souris HO. Barre d'échelle = 50 μm .

Dans un certain nombre de pathologies dystrophiques, les fibres musculaires sont sensibles aux contraintes mécaniques associées à la contraction. Dans ce cas, les fibres musculaires peuvent être lésées et se nécroser, ce qui entraîne une perméabilité membranaire qui peut être suivie par un marquage au Bleu Evans. Afin de déterminer si les membranes des fibres sont perméabilisées après un effort, les souris ont été soumises à un exercice durant 30 minutes (*Fiche technique 7*) et tous les muscles préalablement cités ont été caractérisés après un marquage des fibres au Bleu Evans. Aucune perméabilisation des fibres quelque soit le muscle, n'a pu être mise en évidence chez les souris HE ou HO.

En raison de la mise en évidence de noyaux en apoptose sur des biopsies des patients TMD et LGMD2J (Haravuori *et al.*, 2001), un marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin Nick End Labeling) a été réalisé sur les SOL et les TA des souris WT, HE et HO âgées de 9 mois (*Figure 36*) (*Fiche technique 5*). La présence de quelques noyaux en apoptose a été mise en évidence dans les TA des souris HE et de façon plus importante sur les

coupes des TA des souris HO. Ces noyaux marqués sont toujours présents à l'extérieur des fibres, indiquant que cette apoptose ne touche pas les fibres musculaires (*Figure 36*).

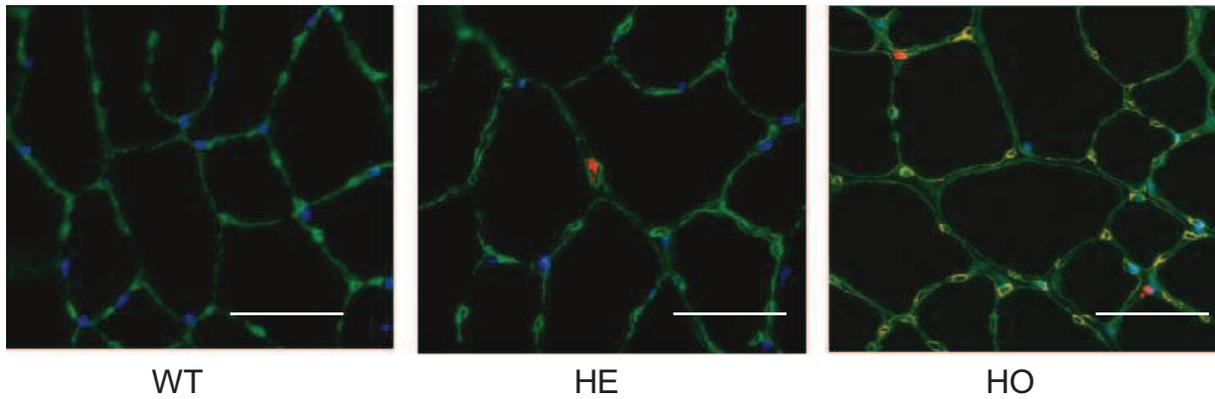


Figure 36: Marquage TUNEL sur muscles de souris KI TTN FINmaj. Marquage TUNEL réalisé sur le TA des souris WT, HE et HO à 9 mois. Marquage laminine en vert, marquage des noyaux (DAPI) en bleu et marquage des noyaux en apoptose (rouge). Des noyaux en apoptose sont présents dans le TA des souris HE et en plus grande quantité dans les TA des souris HO à 9 mois. Barre d'échelle = 50 μ m.

5. L'intégrité des sarcomères n'est pas affectée mais des vacuoles et des anomalies mitochondriales sont visibles chez les souris HE et HO

Une analyse des muscles TA et SOL des souris KI TTN FINmaj WT, HE et HO à 9 mois a été réalisée en Microscopie Electronique (ME) (*Fiche technique 6*). Comme chez l'Homme, aucune anomalie de structure des sarcomères n'a été mise en évidence que ce soit chez les souris HE ou HO dans les TA et SOL (*Figure 37*). Néanmoins, chez les souris HE, la désintégration de quelques myofibrilles dans le TA est visible, mais pas dans le SOL (*Figure 37b, e, i et l*). Chez les souris HO, le TA présente des mitochondries anormales, déformées et grosses présentant des membranes interrompues (*Figure 37c, et f*) et le SOL présente des agrégations au niveau des tubules T (*Figure 37j et m*).

Il a été mis en évidence en ME la présence de vacuoles bordées dans les biopsies humaines de patients atteints de TMD. Aucune vacuole n'a été détectée dans les muscles des souris HE contrairement à ce qui a été constaté chez l'Homme (*Figure 37 b, e, i and l*). Dans les HO, quelques vacuoles présentes dans la bande I et jonction I/A sont visibles. Ces vacuoles semblent contenir une accumulation de corps denses (*Figure 37 g*).

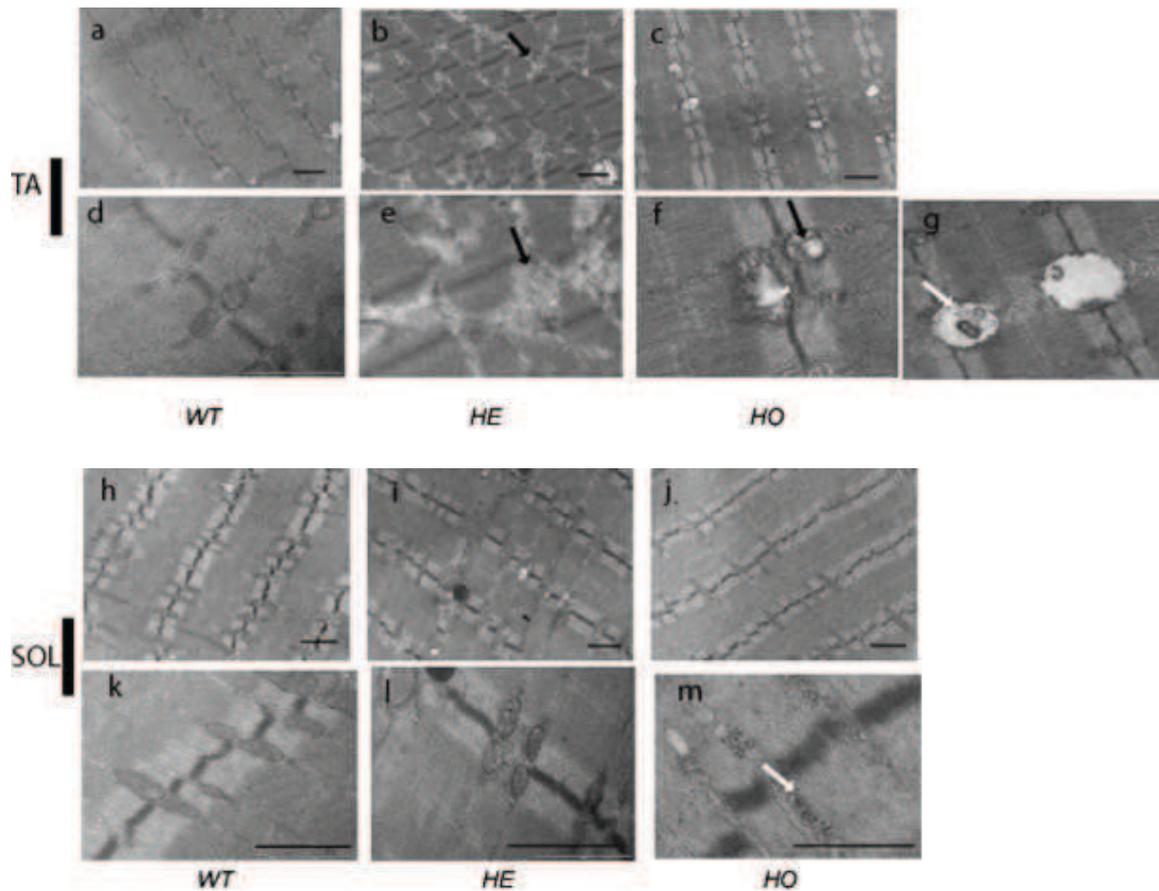


Figure 37 : Analyse ultrastructurale des TA et SOL des souris WT, HE et HO à 9 mois (a à m). Les flèches noires représentent les myofibrilles désintégrées (b, e), les mitochondries désorganisées (c, f) et les flèches blanches les vacuoles (c, g) ou les agrégations au niveau des tubules transverses (j, m). Barre d'échelle = 1 μ m.

6. La force du Soléaire est affectée dans le cas des souris homozygotes pour la mutation FINmaj

Du fait de l'atteinte histologique mise en évidence chez les souris portant la mutation FINmaj (HE ou HO), l'analyse de la force globale des muscles EDL et SOL a été réalisée *in vitro* (Fiche technique 7). La mesure de la force générée après une stimulation téτανique des EDL des souris HE et HO à 4, 6 et 9 mois n'a permis de mettre en évidence aucune modification de la force, en corrélation avec le fait que ce muscle ne montre aucune atteinte histologique. Par contre, les SOL des souris HO montrent une nette diminution de la force du muscle isolé avec une perte de force nette de 32% à 4 mois et 40% à 9 mois par rapport aux souris saines (Figure 38). La mesure de la force des TA isolés n'a pas pu être réalisée pour des raisons techniques. Le temps de demi-relaxation obtenu sur les muscles soléaires et EDL après une contraction téτανique isométrique est normal dans les HE et HO (Tableau 6). Le rôle de la titine étant connu dans l'élasticité du muscle et la tension passive qu'elle génère, nous avons réalisé une expérience pour

évaluer le profil de rigidité des muscles EDL et SOL. Les muscles isolés ont été soumis à un protocole d'étirement passif où le muscle subit 3 extensions. Les pics de rigidité des muscles sont normaux comparés aux WT (*Tableau 6*).

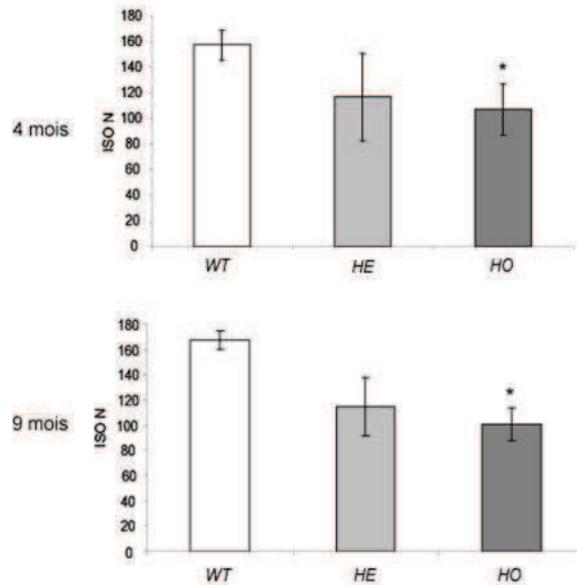


Figure 38 : Force des soléaires isolés de souris KI TTN FINmaj WT, HE, HO. Le soléaire des souris HO montre une perte de force quelque soit l'âge (4 et 9 mois). Force mesurée après une stimulation tétanique du soléaire 4 et 9 mois sur les souris WT, HE et HO (n=4), (*, p<0.05).

Soléaire	WT	HE	HO
Temps de demi-relaxation ms	79,50 (±6,61)	84,67 (±30,66) p=0,753	83,00 (±6,78) p=0,443
Rigidité progressive N/m	71,13 (±3,15)	64,09 (±18,64) p=0,48	122,80 (±43,65) p=0,053
Rigidité progressive stabilisée N/m ²	1494,79 (±230,80)	1888,51 (±511,17) p=0,20	2064,57 (±729,01) p=0,181

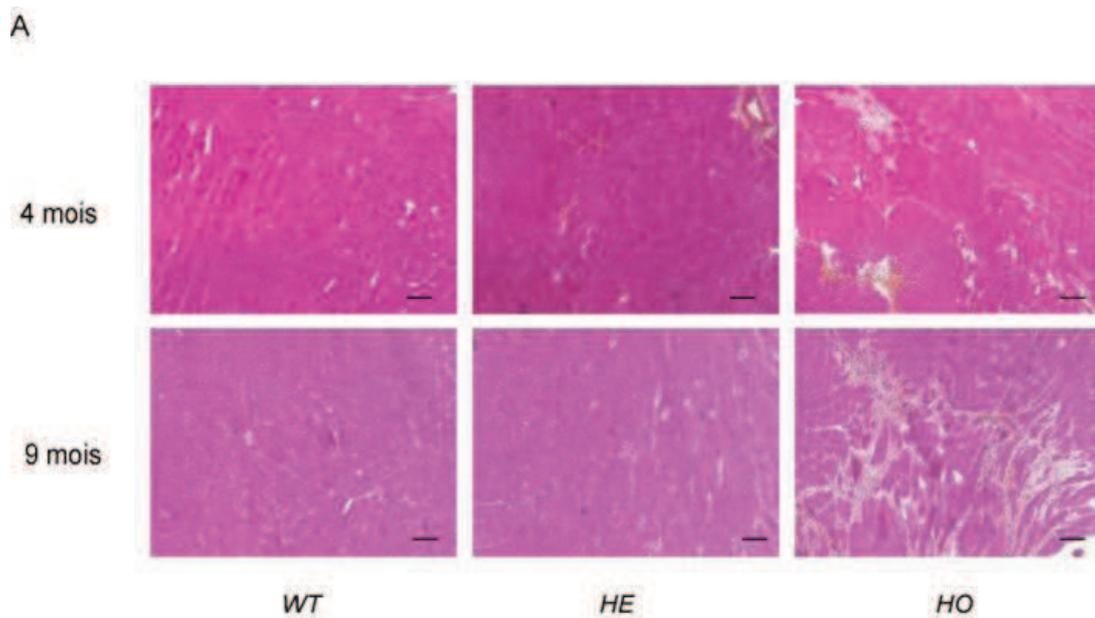
EDL	WT	HE	HO
Temps de demi-relaxation ms	38,67 (±1,15)	35,00 (±4,24) p=0,22	36,50 (±6,61) p= 0,61
Rigidité progressive stabilisée N/m	110,31 (±2,71)	75,15 (±28,44) p=0,09	95,31 (±20,03) p=0,29
Rigidité progressive stabilisée N/m ²	1049,36 (±107,77)	1100,97 (±126,91) p= 0,60	948,37 (±193,84) p= 0,46

Tableau 6 : Analyse des propriétés mécaniques des muscles soléaires et EDL des souris WT, HE et HO à 9 mois.

Aucune modification des propriétés mécaniques des soléaires et EDL n'a été constatée.

7. Dysfonctionnement systolique chez les souris homozygotes pour la mutation FINmaj

De façon inattendue, l'examen des coupes de cœur des souris portant la mutation FINmaj à l'état homozygote, a permis de mettre en évidence une atteinte cardiaque qui est visible dès l'âge de 4 mois chez les souris HO. En effet, le tissu cardiaque présente de nombreuses zones de destruction. Cette fibrose s'aggrave avec l'âge des souris et à 9 mois celles-ci sont très étendues (*Figure 39A*) (*Fiche technique 5*). Le marquage du collagène grâce au colorant rouge Sirius a permis de visualiser plus finement la fibrose (*Figure 39B*) (*Fiche technique 5*). La quantification de celle-ci à 4 et 9 mois permet de corroborer les résultats obtenus après marquage HPS des cœurs et de montrer que l'atteinte histologique cardiaque augmente fortement avec l'âge des souris (*Figure 39C*). A l'inverse des souris HO, aucune fibrose n'a été détectée dans les cœurs des souris HE.



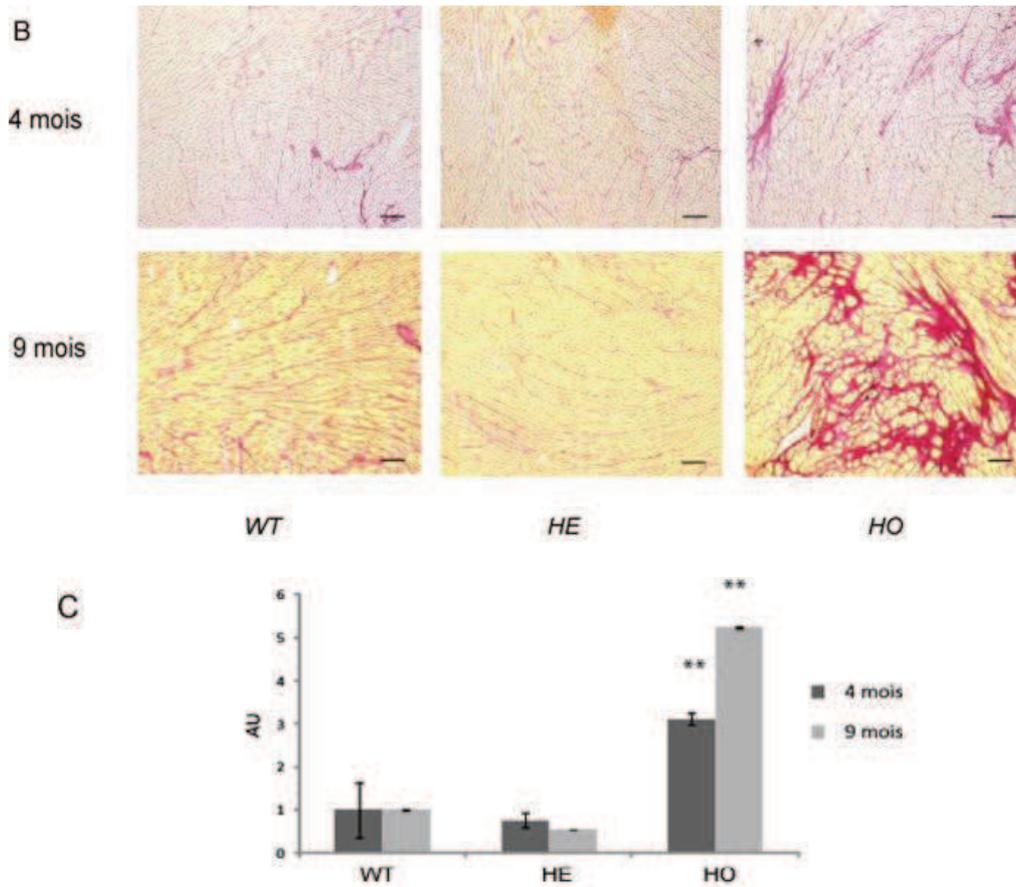


Figure 39 : Histologie et quantification de la fibrose sur les coupes de cœur des souris KI TITIN

A/ Histologie des coupes de cœur des souris WT, HE et HO à 4 et 9 mois après marquage HPS. barre d'échelle = 100 μ m. *B/* Marquage au rouge Sirius des coupes de cœur à 4 et 9 mois des souris WT, HE et HO, barre d'échelle = 100 μ m. *C/* Quantification du rouge Sirius sur la surface totale du muscle cardiaque des souris WT, HE et HO à 4 et 9 mois, (**, $p < 0.01$). Les cœurs des souris HO montrent de larges zones de collagènes à 4 et 9 mois.

Sur ces constatations, des échocardiographies transthoraciques ont été réalisées sur ce modèle (*Fiche technique 7*). Aucune atteinte cardiaque n'a pu être mise en évidence chez les souris HE aux âges de 9 à 12 mois. Cette observation concorde donc avec l'absence d'atteinte histologique cardiaque. Par contre, les souris HO montrent tardivement (à partir de l'âge de 11 mois) une atteinte structurelle et fonctionnelle du cœur (*Tableau 7*). En effet, les souris HO présentent une dilatation du ventricule gauche indiquée par les dimensions calculées en systole et en diastole (LV), (LV vol d: $71,3 \pm 3,7 \mu$ l contre $60,4 \pm 4,7 \mu$ l et LV vol s: $37,7 \pm 3,6 \mu$ l contre $28,1 \pm 2,6 \mu$ l, $p < 0,05$, LVEDD: $4,03 \text{ mm} \pm 0,09$ contre $3,75 \text{ mm} \pm 0,13$ et LVEDS: $3,09 \text{ mm} \pm 0,12$, contre $2,69 \text{ mm} \pm 0,15$; $p < 0,05$, $n=3$). Par contre, aucune modification de la taille du septum et du mur postérieur n'a été constatée. Les fractions d'éjection et de raccourcissement sont

significativement diminuées dans le cas des souris HO ($0,23 \pm 0,01$ et $0,47 \pm 0$ contre $0,39 \pm 0,02$ and $0,55 \pm 0$, respectivement; $n=3$, $p<0,05$). Ces résultats indiquent un dysfonctionnement du ventricule gauche lors de la systole chez les souris HO. Il est important de noter que bien que de tels résultats soient rapportés en histologie et en échocardiographie, il n'a été constaté aucune mort subite chez les souris HO même tardivement.

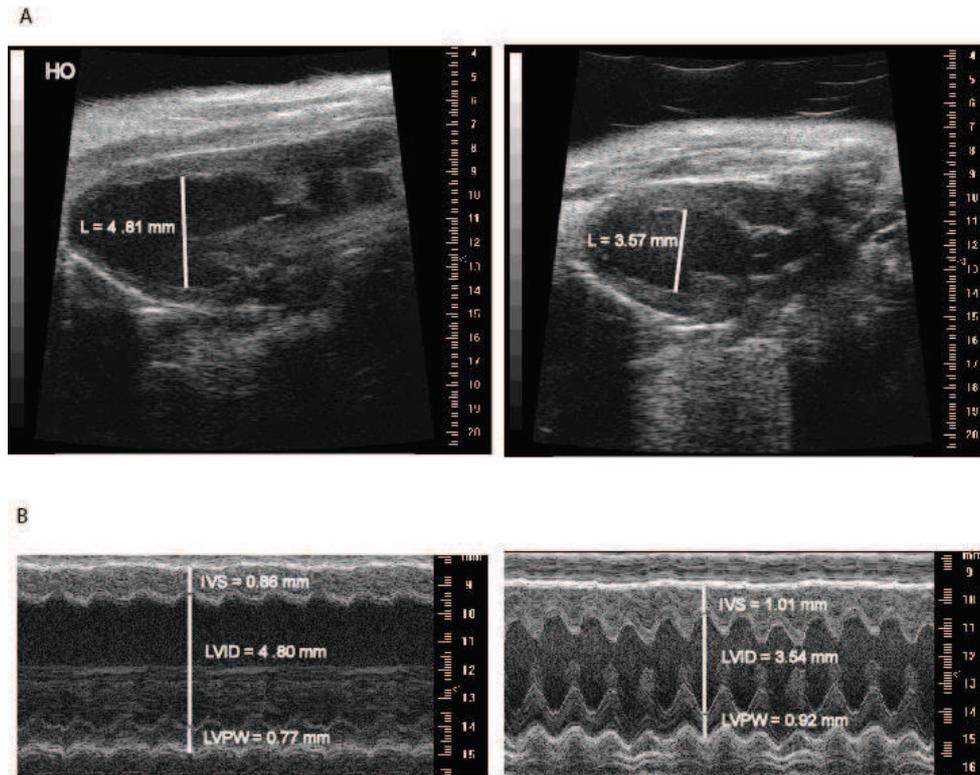


Figure 40 : Echocardiographies réalisées sur souris WT et HO.

A/ Echocardiographie mode-B des HO (gauche) et des WT (droite). L'épaisseur du ventricule gauche est indiquée sur la figure. B/ Echocardiographie mode-M des HO (gauche) et des WT (droite). Les dimensions de l'IVS, LVID et LVPW en diastole sont indiqués sur la figure. Taille du mur septal inter-ventriculaire (IVS) et postérieur (LV PW), diamètre du ventricule gauche en diastole LVID.

	WT	HE	HO
LVIDD	3,75 ± 0,13	3,72 ± 0,02	4,03 ± 0,09
LVISD	2,69 ± 0,15	2,34 ± 0,31	3,09 ± 0,12 *
IVS d	0,83 ± 0,11	0,93 ± 0,05	0,93 ± 0,12
IVS s	1,09 ± 0,21	1,28 ± 0,07	1,19 ± 0,1
LV PW d	0,78 ± 0,06	0,96 ± 0,11	0,82 ± 0,04
LV PW s	1,03 ± 0,1	1,36 ± 0,13	1,04 ± 0,13
LV vol d	60,4 ± 4,7	59,3 ± 1,01	71,3 ± 3,7 *
LV vol s	28,1 ± 2,6	20,05 ± 5,61	37,7 ± 3,6 *
LV m/w	4,1 ± 0,3	4,68 ± 0,78	5,1 ± 0,6 *
EF %	0,55 ± 0	0,67 ± 0,11	0,47 ± 0 *
FS %	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,09	0,23 ± 0,01 *
PW Th (%)	0,32 ± 0,04	0,42 ± 0,02	0,27 ± 0,15
CO (ml/min)	16,3 ± 1,7	19,15 ± 0,15	19,3 ± 2
Vel PW;d (mm/s)	26,16 ± 1,15	33,97 ± 8,37	36,13 ± 0,7 *
Vel PW;s (mm/s)	21,47 ± 2,17	25,73 ± 10,77	24,03 ± 0,69

Tableau 7 : Mesures obtenues par échocardiographie transthoracique des souris à 11 mois WT, HE et HO.

Diamètre du ventricule gauche en fin de diastole (LVIDD, mm), Diamètre du ventricule gauche en fin de systole (LVISD, mm), taille du mur septal inter-ventriculaire (IVS) et postérieur (LV PW), volume du ventricule gauche (LV vol, µl), poids du ventricule gauche normalisé par le poids total de la souris (LV m/w). Fraction de raccourcissement du ventricule gauche (FS, %), Fraction d'éjection du ventricule gauche (EF, %), taille du mur postérieur (PW Th, %), production cardiaque (CO, ml/min), et vélocité du mur postérieur (Vel PW, mm/s). ont été définis (* p<0,05).

CONCLUSION : Etude du modèle KI TTN FINmaj

L'étude de la souris KI TTN FINmaj a permis de montrer que ces souris, qui portent la mutation humaine FINmaj, présentent un phénotype dystrophique à la fois à l'état **hétérozygote** (avec une atteinte tardive et localisée) et à l'état **homozygote** (atteinte précoce, touchant un grand nombre de muscles). Une atteinte **cardiaque** accompagnée d'une dysfonction du cœur en systole est constatée chez les souris homozygotes.

Ce modèle murin semble reproduire en grande partie la spécificité d'atteinte dans le temps et l'espace qu'entraîne la mutation FINmaj chez l'Homme.

PARTIE II

*Etude de la physiopathologie de la
TMD et de la LGMD2J*

CONTEXTE

Comme vu dans la partie précédente, le modèle murin KI TTN FINmaj reproduit de façon assez proche les pathologies humaines TMD et LGMD2J. Ce modèle semble donc adapté à l'étude approfondie de la physiopathologie de ces deux dystrophies et la caractéristique surprenante et rare pour une même mutation de donner chez l'Homme une dystrophie distale à l'état hétérozygote et une dystrophie des ceintures à l'état homozygote.

Des analyses ayant été réalisées précédemment sur des échantillons de muscle issus de patients TMD et LGMD2J ont permis de mettre en évidence deux conséquences moléculaires : (1) la perte de la région C-terminale de la titine et (2) la diminution de la quantité de calpaïne 3. Nous avons cherché à déterminer si ces événements étaient retrouvés chez la souris modèle et à en comprendre les causes par l'étude plus approfondie de la physiopathologie de la TMD et la LGDMD.

La disparition de la région C-ter de la titine a pu être mise en évidence dans les souris KI TTN FINmaj. Nous avons alors cherché à localiser les domaines manquant de la titine et identifier l'origine de cette perte. Nous pouvons exclure que cette dernière soit due à une non-reconnaissance des épitopes sur la titine par les anticorps utilisés en raison de la présence de la mutation puisque ceux-ci sont des anticorps polyclonaux non-conformationnels générés à partir de séquences peptidiques. Nous avons pu exclure également que cette disparition des derniers domaines soit due à un épissage aberrant. La dernière hypothèse étudiée a alors concerné la potentielle coupure protéolytique de la titine en présence de la mutation FINmaj par une enzyme. Une enzyme est connue pour couper la titine dans la ligne M: la calpaïne 3. Cependant, la perte des domaines C-terminaux de la titine n'a pas été reliée à l'action de cette dernière.

Dans un deuxième temps, les partenaires se fixant normalement à la titine au niveau des deux derniers domaines de la titine dans cette région, et qui sont au nombre de 4 actuellement (calpaïne 3 pour le domaine is7 et obscurine, obscurine-like 1, myospryne pour le domaine M10) ont été étudiés afin d'examiner de possibles perturbations d'expression ou de localisation de ceux-ci en présence de la mutation FINmaj. L'étude du modèle murin a montré que, comme chez l'Homme, le niveau protéique de la calpaïne 3 est diminué. La participation de cet événement dans la physiopathologie des titinopathies et la possibilité de mécanismes communs avec les calpaïnopathies méritent d'être étudiées. La protéine obscurine et son homologue obscurine like 1 ont été montrées comme perdant leur interaction avec la titine dans le cas de certaines

mutations entraînant les TMD/LGMD2J. De plus, l'obscurine est déstabilisée dans les biopsies de patients LGMD2J. Nous avons vérifié cette conséquence de la mutation FINmaj sur les muscles de souris KI TTN FINmaj HO.

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'une publication scientifique disponible en annexe.

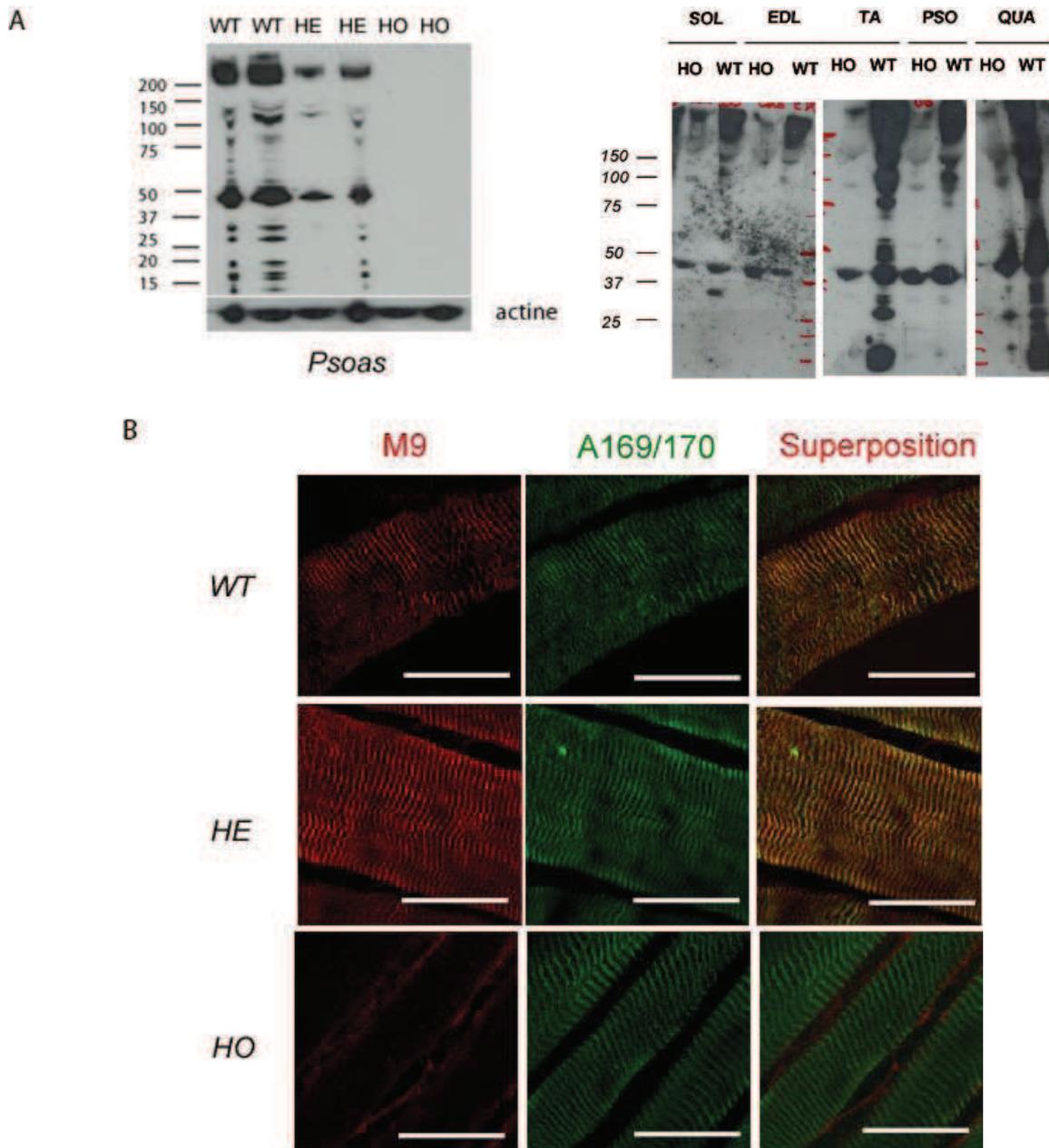
1. Conséquences des mutations conduisant à une TMD et LGMD2J sur la titine.

1.1. La présence de la mutation FINmaj entraîne la perte de la partie C-terminale de la titine dans les muscles squelettique et cardiaque

Il a précédemment été montré chez l'Homme atteint de TMD ou de LGMD2J que l'expression de la titine est normale mais que la région en aval du domaine M4 de celle-ci n'est plus présente chez les patients LGMD2J. Cette mise en évidence a été réalisée grâce à différents anticorps spécifiques des domaines M8/9 de la titine et de la myoméline (interagissant avec le domaine M4 de la titine) sur biopsie de patients (Hackman *et al.*, 2002, Hackman, 2003 #507). Afin de vérifier la perte de la région C-terminale de la titine chez les souris portant la mutation FINmaj, l'étude de la titine a été réalisée par Western Blot sur le *Psoas* des souris WT, HE et HO après fractionnement subcellulaire des muscles (*Fiche technique 8*). Cette séparation en fractions cellulaires (cytoplasme, membrane, noyau et cytosquelette) permet une analyse de la titine. En effet des fragments de clivages reproductibles de la titine sont obtenus dans la fraction cytosquelettique (*Fiche technique 8*). Le marquage des protéines de la fraction cytosquelettique sur Western Blot avec un anticorps dirigé contre le domaine M10 a été réalisé. Il a permis de mettre en évidence la perte du marquage des fragments de clivage de la titine chez les HO à 100% et à 50% chez les HE (*Figure 41A*). La perte du marquage des fragments de clivage de la titine est visible sur tous les muscles testés des souris HO: *TA, PSOAS, SOL, EDL, QUA* (*Figure 41A*).

La perte des domaines C-terminaux de la titine dans le cas des souris HE et HO a été recherchée par marquage immunohistochimique. Pour cela, des marquages des muscles *Psoas* longitudinaux ont été réalisés avec différents anticorps dirigés contre la ligne M pour chacun des géotypes murins (*Fiche technique 5*). Un comarquage immunohistochimique avec les anticorps polyclonaux non conformationnels dirigés contre les domaines A169/170 et M9 de la titine ne montre aucun marquage du domaine M9 dans le cas des muscles HO, alors que les domaines A169/170 sont

visibles. Nous n'avons néanmoins pas pu mettre en évidence de perte de quantité de marquage chez les souris HE, celui-ci semblant identique au marquage obtenu sur les coupes de muscles de souris WT. Un marquage de la myoméline (*Fiche technique 5*), permet de montrer, comme obtenu chez l'Homme, un marquage sarcomérique et une localisation correcte de celle-ci quel que soit le génotype des souris. Il semble donc que la région d'interaction entre la myoméline et la titine soit intacte même en présence de la mutation FINmaj et que la déstabilisation de la ligne M a lieu en aval de ce domaine M4 (*Figure 41B*).



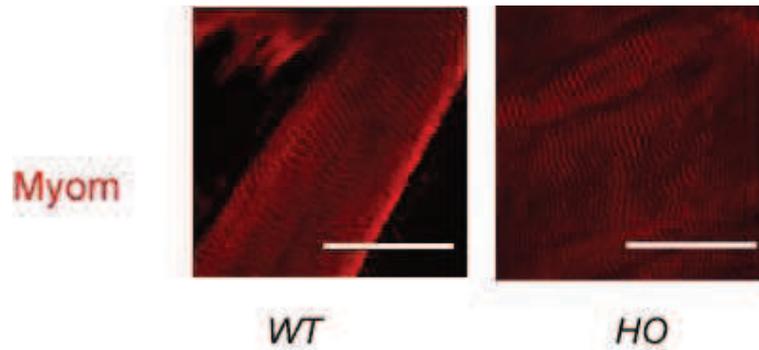


Figure 41 : Conséquences moléculaires de la mutation *FINmaj* dans le muscle squelettique.

A/ Gauche : Western blots réalisés après dépôt de 50 μ g de la fraction cytosquelettique du *Psoas*. Les protéines ont été transférées sur membrane PVDF et hybridées avec l'anticorps M10-1 dirigé contre le domaine M10 de la titine et l'actine. Les bandes de dégradation de la titine sont ainsi visibles. **Droite** : la même technique a été utilisée pour mettre en évidence les bandes de dégradation de la titine sur les muscles TA, SOL, EDL, PSO et QUA de souris WT et HO. **B/** Immunomarquage sur coupe longitudinale de *Psoas* des souris WT, HE et HO avec les anticorps dirigés contre les domaines A169/170, M9, et la myoméline. Barre d'échelle = 50 μ m. Ces expériences montrent la perte des domaines C-terminaux de la titine chez les HE (50%) et chez les HO (100%).

Afin de mieux encadrer la localisation de la perte des domaines C-ter de la titine, un marquage avec un anticorps dirigé contre le domaine is6 entier de la titine a été réalisé sur des coupes longitudinales de *Psoas* de souris WT, HE et HO en combinaison avec un marquage du domaine N2A de la titine (*Fiche technique 5*). Ce marquage permet de constater chez les WT et HE un marquage parfait de la ligne M (en vert) entre les domaines N2A (en rouge) (*Figure 42*). Le domaine is6 n'est pas présent dans la ligne M chez les HO comme précédemment vu avec le marquage du domaine M9 de la titine dans le *Psoas* (*Figure 42*). Il semble même que le marquage colocalise plutôt avec le domaine N2A de la titine pour les muscles des souris HO. Il semblerait donc que la perte des domaines C-terminaux de la titine aurait lieu entre le domaine M4 et le domaine is6 de la titine.

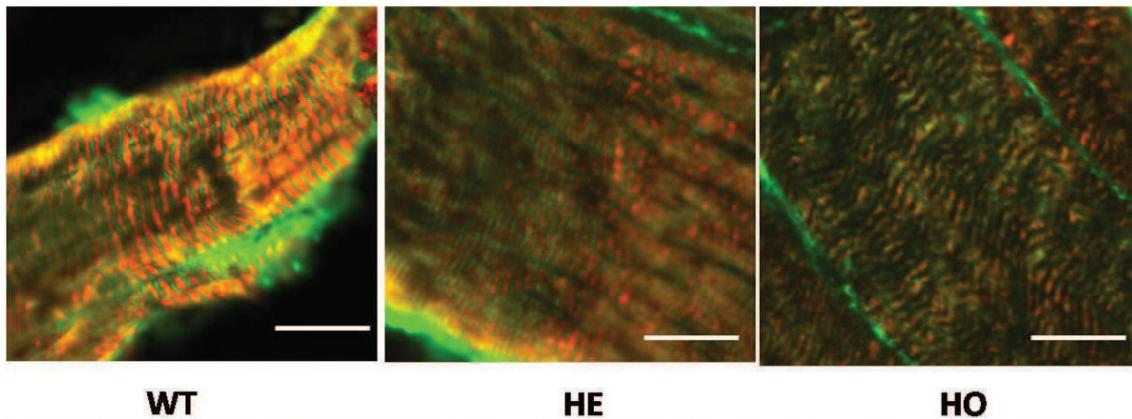


Figure 42 : Marquage immunohistochimique de la titine dans la ligne M chez les souris KI TTN *FINmaj*.

Coimmunomarquage de la titine en N2A (rouge) et *is6* (vert) sur PSOAS de souris WT, HE et HO. Barre d'échelle = 50 μ m. Le marquage du domaine *is6* n'est pas visible chez les souris HO.

Nous avons recherché si cette partie C-terminale de la titine était présente ou non dans le cœur. Dans un premier temps, le dépôt des fractions cytosquelettiques des cœurs sur Western Blot a été réalisé. L'hybridation par l'anticorps dirigé contre le domaine M10 donne les mêmes résultats que précédemment observé dans le *Psoas* c'est-à-dire une perte de marquage des fragments contenant le domaine M10 chez les HE d'environ 50% et totale pour les HO. Le marquage du domaine M10 et de la myoméline a été réalisé sur des coupes de cœurs de souris WT et HO (*Fiche technique 5*). Comme dans le muscle, le marquage du domaine M10 dans le cœur n'est pas visible, alors que la localisation et l'expression de la myoméline reste inchangée (*Figure 43C*). De plus, le marquage du domaine *is6* montre une diminution de la fluorescence dans le cœur des souris HE et une perte totale de marquage dans le cœur des souris HO. Cette mise en évidence n'a pas été réalisée sur le cœur des patients TMD et LGMD2J. Il apparaît, d'après les résultats obtenus sur la souris, que les domaines C-terminaux de la titine sont aussi absents dans le cœur en présence de la mutation *FINmaj*.

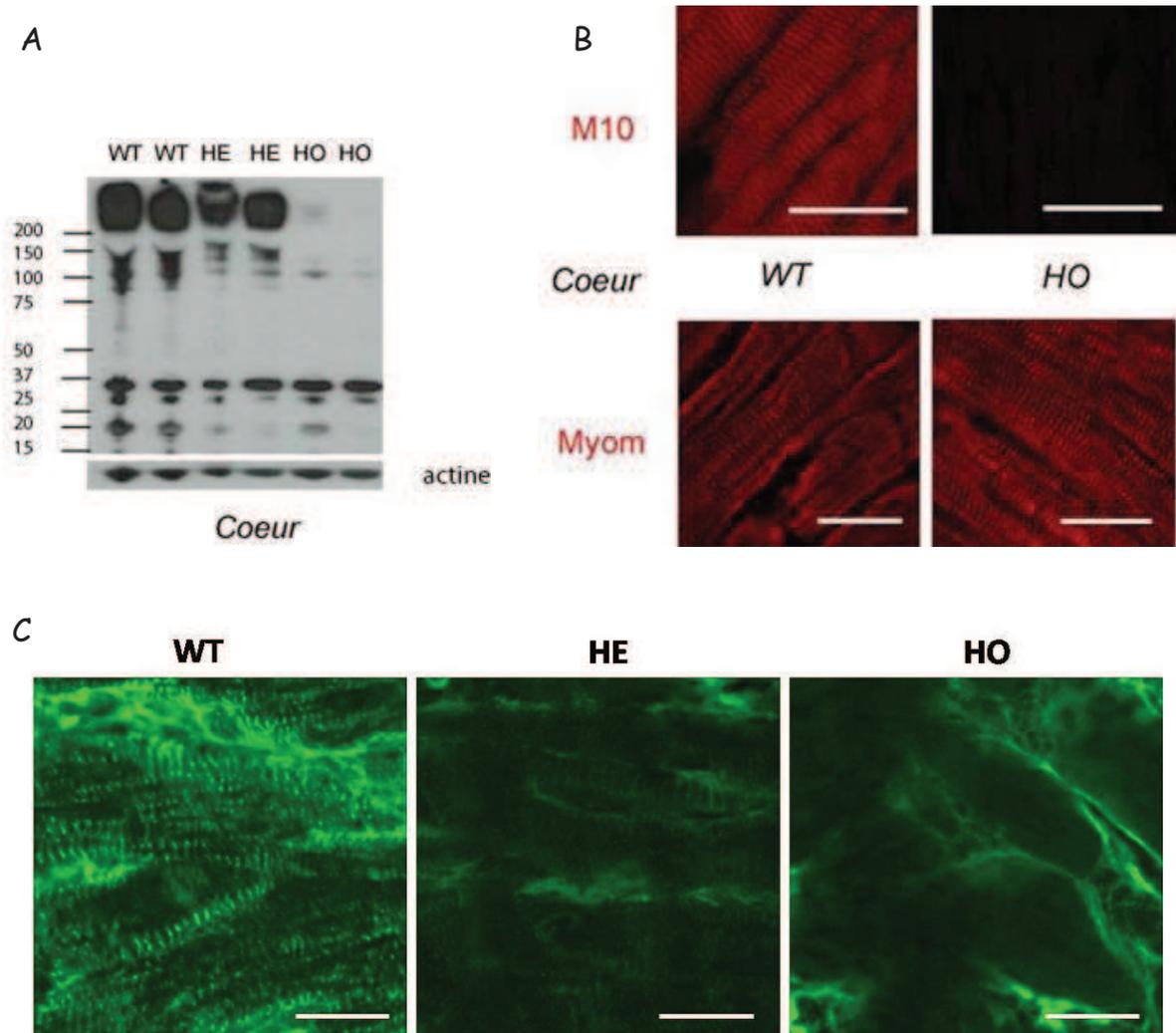


Figure 43 : Conséquences moléculaires de la mutation FINmaj dans le cœur.

A/ Western blots réalisés après dépôt de 50 µg de la fraction cytosquelettique du cœur. Les protéines ont été transférées sur membrane PVDF et hybridées avec l'anticorps M10-1 dirigé contre le domaine M10 de la titine et l'actine. Les bandes de dégradation de la titine sont ainsi visibles. Une bande présente à 35 kDa environ est visible dans tous les cas dans le cœur. B/ Immunomarquage sur coupe de cœur chez les souris WT et HO avec les anticorps dirigés contre le domaine M10 et la myoméline. Barre d'échelle = 50 µm. C/ Immunomarquage de la titine en is6 (vert) sur cœur de souris WT, HE et HO. Barre d'échelle = 50 µm. Comme dans les muscles, les domaines C-terminaux de la titine ne sont pas présents chez les souris HE et HO en amont du domaine is6.

1.2. La perte de la partie C-terminale de la titine n'est pas due à un épissage aberrant

Chez l'Homme et la souris, la présence de la mutation FINmaj entraîne donc la perte des domaines C-terminaux de la titine en aval de son domaine M4 dans tous les muscles squelettiques testés présentant ou non une atteinte histologique en présence de la mutation FINmaj. En effet,

les travaux présentés ci-dessus montrent que les domaines is6, m8 et m9 de la titine sont absents dans les muscle et le cœur des souris KI TTN FINmaj. Il paraît donc très important de comprendre le ou les mécanismes entraînant la perte de ces domaines C-terminaux de la titine en présence de la mutation FINmaj dans le muscle comme dans le cœur afin de mieux comprendre les physiopathologies de la TMD et de la LGMD2J.

L'hypothèse d'un épissage aberrant de l'ARN pré-messager de la titine dans cette région qui pourrait être due à la présence de la mutation FINmaj a été écartée chez l'Homme (Hackman *et al.*, 2002). De la même façon, des expériences de RT-PCR des ARN extraits de muscles de souris KI TTN (*Fiche technique 3*) (*Fiche technique 4*) permet de constater que cette mutation n'entraîne pas de problème d'épissage entre les exons Mex4 et Mex 6. En effet, les bandes correspondant aux isoformes Mex5+ et Mex5- sont présentes dans le cas des souris WT, HE et HO à des quantités similaires (*Figure 44*). Il est à noter que la présence d'une troisième bande non attendue est visible en dessous de celle correspondant à l'isoforme Mex5+ et quel que soit le génotype. Cette isoforme potentielle n'a pas été séquencée mais l'analyse des sites d'épissages des exons Mex4 à Mex6 par bioinformatique indique la présence d'un site accepteur avec un fort score au début de l'exon Mex6 qui pourrait expliquer la présence de cette isoforme. Ce nouvel isoforme induirait la synthèse d'une titine avec un domaine M10 tronqué dans sa partie N-terminale, mais dont le cadre de lecture est respecté.



Figure 44 : Epissage de la titine en C-terminal chez les souris WT, HE et HO.

Amplification par RT-PCR de l'ARN messager de la titine entre Mex4 et 6 sur extrait de TA de souris KI TTN WT, HE et HO. 2 isoformes sont attendus : 1 bande correspondant à l'isoforme Mex5+ est attendue à 655 pb et une bande correspondant à l'isoforme Mex5- à 352 pb. L'épissage de la titine entre Mex4 et Mex6 est correcte pour les 3 génotypes.

1.3. Une coupure pathologique de la titine mutée par la calpaïne 3 ?

La perte des épitopes en aval du domaine M4 est le fruit d'un clivage par une protéase. Une protéase est d'ores et déjà connue pour couper la titine *in vitro* et *in vivo* dans des conditions normales en aval du domaine M4 de la titine: la calpaïne 3 (Taveau *et al.*, 2003; Kramerova *et al.*, 2004). Cette coupure physiologique de la titine par la calpaïne 3 entraîne la libération d'un fragment de 45 kDa et de 18kDa.

La disparition des domaines C-terminaux de la titine observée dans les muscles humains ou murin HE et HO, pourrait être issue de la coupure excédentaire connue de la titine par la calpaïne 3 qui entraînerait la libération du fragment p45. En effet, les marquages réalisés sur les biopsies murines et humaines permettent de localiser la coupure de la titine, dans le cas des mutations TMD/LGMD2J, entre le domaine M4 et le domaine is6. La localisation du site de coupure physiologique de la titine par la calpaïne 3 se situe dans cette zone (plus exactement en is6), ce qui peut nous amener à penser à une coupure exacerbée de la titine par la calpaïne 3 en présence des mutations à l'origine de la TMD ou la LGMD2J.

1.3.1. La calpaïne 3 coupe la titine en présence de la mutation FINmaj *in vitro*

Afin de déterminer si dans le cas de la présence de la mutation FINmaj, c'est la calpaïne 3 qui est à l'origine de la perte des domaines C-terminaux de la titine, des expériences *in vitro* ont été menées sur le clivage de la titine par la calpaïne 3 portant ou non la mutation FINmaj.

Nous avons cherché à déterminer si les mutations connues dans l'exon Mex6 pouvaient entraîner une modification de la reconnaissance de ces sites de coupures par la calpaïne 3. Des constructions exprimant les exons Mex2 à Mex6 humains sains ou avec les mutations Finlandaise, Lille ou Belge toutes étiquetées par l'épitope V5 ont été indépendamment transfectées dans les cellules HER911 avec une calpaïne 3 inactive (C129S) ou avec la calpaïne 3 sauvage (*Fiche technique 9*) (*Fiche technique 10*). Dans ces cellules, la calpaïne 3 exprimée de façon ectopique est active et est capable de couper ses substrats. Un Western Blot a été réalisé sur les extraits protéiques de ces cellules (*Fiche technique 8*). Dans le cas de la coexpression des exons Mex2 à Mex6 WT avec la calpaïne 3, la libération d'un fragment d'environ 50 kDa (45 kDa + épitope V5) et d'une bande plus basse vers les 18 kDa est visible. Dans le cas de la mutation FINmaj, la bande

attendue à 50 kDa est présente, la calpaïne 3 est donc toujours capable de couper la titine mutée, par contre la bande à 18 kDa attendue ne l'est pas. Néanmoins, une nouvelle bande de clivage à environ 14 kDa est observable. Les constructions utilisées pour les mutations Lille et Belge ne codent que pour les deux derniers exons de la titine (Mex5 et Mex6) entraînant la synthèse d'une protéine d'environ 30 kDa. Pour la mutation Lille, de la même façon que pour la mutation FINmaj, la bande de coupure à 14 kDa remplace celle à 18 kDa et de façon intéressante pour la mutation Belge, la bande à 18 kDa est bien présente (*Figure 45*). La coupure de la titine par la calpaïne 3 dans le domaine is6 semble possible même en présence de la mutation FINmaj, et entraîne la libération d'un fragment de 45 kDa (appelé p45) *in vitro*. Par contre, la présence de la mutation empêche la reconnaissance du site de clivage entraînant la libération du fragment de 18 kDa et pousse l'enzyme à couper à un autre niveau sauf dans le cas de la mutation Belge. Par conséquent la protéolyse de la titine mutée par la calpaïne 3 a toujours lieu mais la présence des mutations Lille et FINmaj entraînent une modification de la localisation du site de coupure.

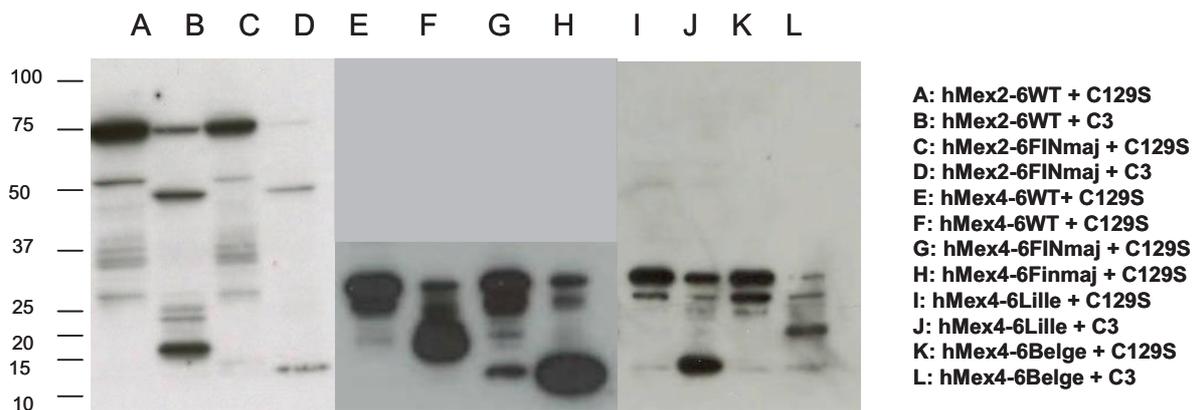


Figure 45 : Coupure de la ligne M de la titine par la calpaïne 3 en présence des différentes mutations connues de la titine. La titine est coupée en 2 points (protéine synthétisée à partir Mex2-6) et en 1 point par (protéine synthétisée à partir Mex4-6). La présence des mutations Lille et FINmaj modifie la localisation du site de coupure C-terminal.

Marquage des protéines avec un anticorps dirigé contre l'épitope V5 après transfert par Western Blot des extraits protéiques de cellules 911 cotransfectées avec les constructions codant pour la partie C-terminale de la titine étiquetées V5 saine ou portant les mutations FINmaj, Lille ou Belge avec les constructions codant la C129S (calpaïne 3 inactive) ou la calpaïne 3.

1.3.2. La calpaïne 3 n'est pas à l'origine de la perte des domaines C-terminaux de la titine mutée dans le muscle

In vivo, des souris KI TTN FINmaj ont été croisées avec des souris capn3^{-/-} afin d'obtenir des souris HO pour la mutation FINmaj et capn3^{-/-}. En effet, si la calpaïne 3 est à l'origine de la

coupure de la titine dans la ligne M chez les KI TTN FINmaj, les domaines C-terminaux de la titine chez les souris HO ; capn3^{-/-} seront présents sinon la partie C-terminale de la titine ne sera pas restaurée. Or, le marquage des bandes de clivage de la titine obtenue en Western Blot sur la souris HO;capn3^{-/-} ne montre aucune restauration de la ligne M de la titine comme ce qui est visible chez une souris WT (*Figure 46*). Ceci indique que la calpaïne 3 n'est pas à l'origine de la coupure protéolytique de la titine dans la ligne M en présence de la mutation FINmaj et donc à l'origine de la perte de la ligne M dans les muscles en présence de la mutation.

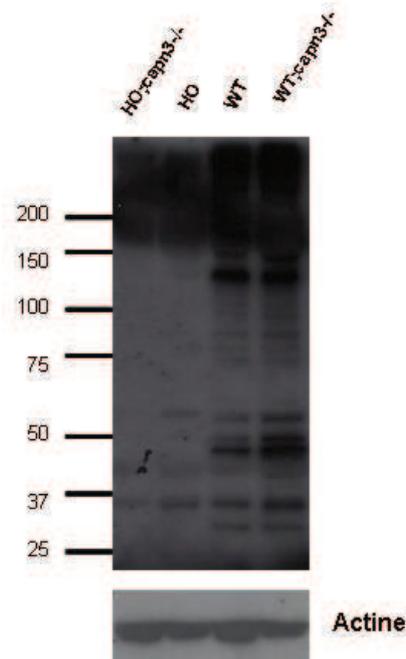


Figure 46 : Marquage des fragments de titine obtenus par fractionnement subcellulaire dans la fraction cytosquelettique avec un anticorps dirigé contre le domaine M10 de la titine sur des souris HO;capn3^{-/-}, HO, WT et capn3^{-/-}.

La coupure de la titine en C-ter n'est pas due à la calpaïne 3 puisque les fragments de titine ne sont pas visible dans le muscle d'une souris HO ;capn3^{-/-}.

1.3.3. Les calpaïnes ubiquitaires peuvent couper la titine WT ou mutée *in vitro*

Les substrats de la calpaïne 3 sont aussi très souvent des substrats des calpaïnes ubiquitaires. Il est donc possible que ces dernières soient capables de couper la titine dans cette zone. C'est pourquoi une expérience de coupure de la titine *in vitro* par les calpaïnes ubiquitaires (calpaïne 1) C1 et (calpaïne 2) C2 a été réalisée. Le plasmide codant les 5 derniers exons de la titine avec ou sans la mutation FINmaj a été cotransfecté en présence de la C1 ou la C2. Le Western Blot réalisé sur les cellules après transfection montre la présence d'une coupure de ce fragment avec ces deux calpaïnes ubiquitaires entraînant la libération d'un fragment non pas de 45 kDa comme

on a pu le constater avec la C3 mais de 55 kDa (*Figure 47*). En termes de prédiction au niveau de la séquence protéique, ces calpaines couperaient plutôt dans le domaine M7 de la titine compris entre les domaines M4 et is6, ce qui n'exclut pas le fait qu'elles soient à l'origine de la perte des domaines C-terminaux de la titine dans le cas de la présence de la mutation FINmaj.

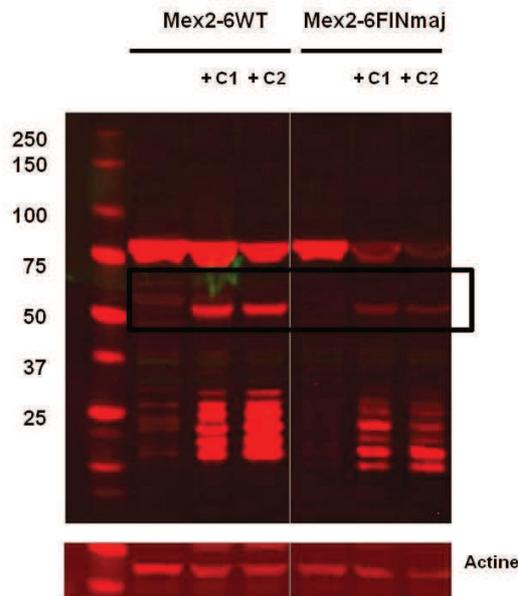


Figure 47 : Coupure de la titine par les calpaines ubiquitaires capn1 (C1) et capn2 (C2). Western Blot réalisé sur extrait de cellules transfectées avec un plasmide codant pour Mex2-6WTV5 ou Mex2-6FINmajV5 en présence ou en absence de la calpaïne 1 ou la calpaïne 2. Marquage de l'étiquette V5 en rouge. Les domaines C-terminaux de la titine peuvent être coupés par les calpaines ubiquitaires 1 et 2.

Conclusion sur les effets des mutations entraînant la TMD et/ou la LGMD2J sur la protéine titine :

La mutation FINmaj entraîne la perte des **domaines C-terminaux** de la titine dans les muscles des souris HE et HO KI TTN FINmaj, de la même façon que ce qui a été mis en évidence chez l'Homme et dans le cœur. L'étude de la souris nous a permis de constater que la perte de ces domaines dans le muscle et le cœur n'est pas la conséquence d'un épissage aberrant de la titine (comme chez l'Homme) mais d'un **clivage protéolytique** qui n'est pas le résultat de l'action de la calpaïne 3 mais qui pourrait être celui des calpaines ubiquitaires.

2. Les conséquences des mutations FINmaj sur la calpaïne 3

Chez l'Homme, une diminution secondaire de la quantité de calpaïne 3 chez les patients atteints de la TMD (de façon très variable) et importante chez les patients atteints de LGMD2J a été démontrée (Haravuori *et al.*, 2001).

La calpaïne 3 est connue pour interagir avec la titine dans la ligne M plus exactement avec le domaine is7 codé entièrement par l'exon Mex5. Cet exon est épissé alternativement selon une proportion plus ou moins importante dépendante du muscle.

2.1. L'interaction de la calpaïne 3 avec la titine en is7 n'est pas perturbée par la présence de la mutation *in vitro*

L'interaction de la calpaïne 3 avec ce domaine a été testée *in vitro* au sein de notre équipe en présence de la mutation FINmaj, Lille et Belge par une technique de double hybride. Cette étude a permis de constater qu'*in vitro*, aucune des mutations testées n'empêchent l'interaction de la calpaïne 3 avec la titine en is7 (*Figure 48*).

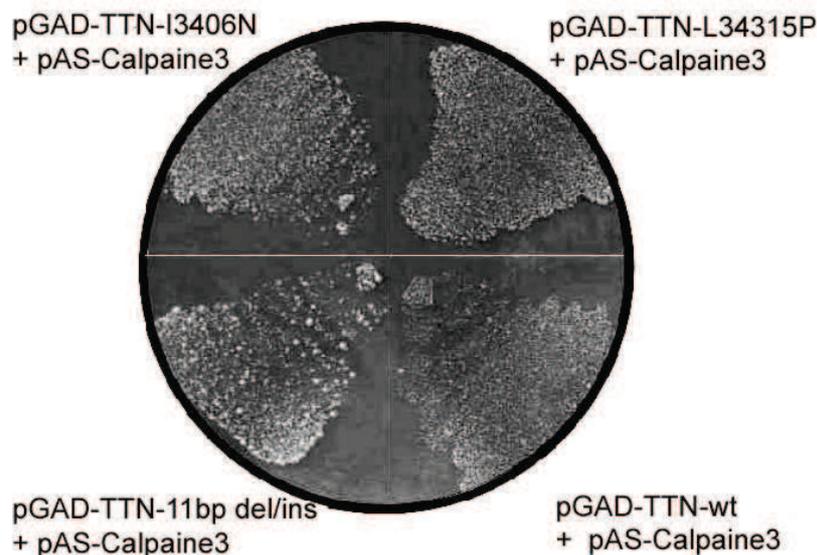


Figure 48 : La présence des mutations Lille (I3406N), Belge (L34315P) et FINmaj n'empêchent pas l'interaction du domaine is7 avec la calpaïne 3. Méthode de double hybride entre la calpaïne 3 et différentes constructions de la titine Mex5-Mex6.

2.2. Diminution du niveau protéique de calpaïne 3 chez les KI
TTN FINmaj

Dans un premier temps, nous avons recherché si la quantité de calpaïne 3 est diminuée dans les muscles des souris KI TTN FINmaj comme ce qui a été mis en évidence chez l'Homme. Un Western Blot réalisé sur des extraits protéiques issus de différents muscles des souris KI TTN FINmaj (SOL, EDL, TA), a permis de constater une diminution de la quantité de la calpaïne 3 chez les souris homozygotes par rapport aux souris saines (comme mis en évidence chez l'Homme) (Figure 49A). La quantification de cette protéine (par rapport à la protéine utilisée comme normalisateur : l'alpha-actine) montre une diminution de trois fois de la quantité de calpaïne 3 chez les souris HO par rapport aux souris saines (n=3) (Figure 49B). Dans le cas des souris hétérozygotes, il ne semble pas y avoir de diminution de cette quantité de calpaïne 3 dans tous les muscles testés (SOL, EDL, TA) (Figure 49A).

De plus, un test d'activité de la calpaïne 3 sur son substrat C129S, mis au point dans notre laboratoire, a permis de montrer qu'il y a certes moins de calpaïne 3 dans les muscles des souris HO, mais que celle-ci est tout autant capable de couper ses substrats (test d'activabilité) (Milic et al., 2007) (Figure 49C).

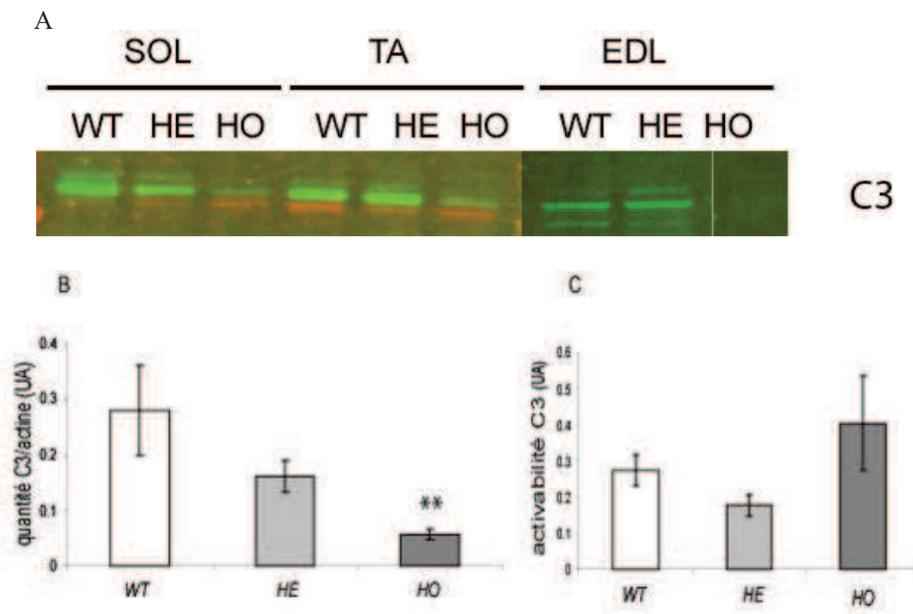


Figure 49 : Conséquences de la mutation FINmaj sur la calpaïne 3 : diminution secondaire chez les HO.

A/ Western Blot calpaïne 3 sur SOL, TA et EDL de souris WT, HE et HO à 4 mois. B/ Quantité de calpaïne 3 rapportée à l'actine en unité arbitraire dans le TA des souris WT, HE et HO en unité arbitraire (UA) (n=3). C/ Quantification de l'activabilité de la calpaïne 3 en unité arbitraire (UA) (n=3).

2.3. Déstabilisation protéique de la calpaïne 3 chez les KI TTN FINmaj

Afin de déterminer si la diminution de la quantité de calpaïne 3 dans les muscles squelettiques des souris HO pour la mutation FINmaj est due à un défaut d'expression de la calpaïne 3 ou à une déstabilisation de la protéine, des RT-PCR quantitatives sur les ARN extraits de muscle des souris KI TTN ont été réalisées avec des oligonucléotides et sondes spécifiques de la calpaïne 3 murine. Les résultats de la RT-PCR quantitative ont permis de mettre en évidence qu'il n'y a pas de différence de la quantité d'expression de cette protéine quel que soit le génotype des souris, le muscle ou l'âge de celles-ci (*Figure 50*). La diminution de la quantité de calpaïne 3 dans les muscles serait due à la déstabilisation protéique de la calpaïne 3 et non à la dérégulation de l'expression de celle-ci.

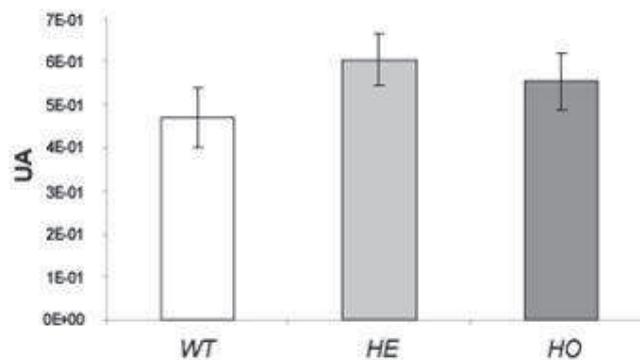


Figure 50 : Quantité d'ARNm calpaïne 3 dans les muscles des souris KI TITIN FINmaj à 4 mois. RT-PCR quantitative de la calpaïne 3 rapporté à PO réalisée sur ARNm extrait de TA (UA). La diminution secondaire de calpaïne 3 est le résultat d'une déstabilisation protéique.

Conclusion sur les conséquences des mutations FINmaj sur la calpaïne 3:

La présence des mutations sur la titine connues pour entraîner la TMD ou la LGMD2J n'empêche pas l'interaction de la calpaïne 3 avec le domaine is7 *in vitro*. Comme chez l'Homme, la quantité de protéine **calpaïne 3** dans les muscles est diminuée et nous avons pu montrer que cette diminution n'est pas due à une régulation négative de la transcription de celle-ci mais plutôt à une **déstabilisation protéique**. Cependant, même en moins grande quantité, la calpaïne 3 semble toujours autant capable de s'activer et cliver ses substrats.

3. Les conséquences de la mutation FINmaj sur l'obscurine et l'obscurine like 1

Une autre protéine de choix a attiré notre attention : l'obscurine et son homologue l'obscurine like 1. En effet, la perte de l'interaction entre l'obscurine et le domaine M10 de la titine par technique de double hybride dans le cas des mutations FINmaj et Lille *in vitro* a été mise en évidence. La mutation Belge, quant à elle, n'entraîne pas cette perte d'interaction. De plus, la même équipe a constaté que la localisation de l'obscurine est perturbée dans la ligne M sur les biopsies des patients LGMD2J. En effet, l'obscurine est toujours présente dans la ligne M mais cette dernière est délocalisée par rapport à la myoméline 1 (Fukuzawa *et al.*, 2008).

La protéine obscurine like 1 (obs1) a été identifiée comme étant une protéine avec des domaines très similaires aux domaines N-terminaux de l'obscurine (Geisler *et al.*, 2007). Celle-ci interagit avec le domaine M10 de la titine mais cette interaction est abolie par la présence de la mutation FINmaj ainsi que Lille (mais pas la Belge) *in vitro* (Fukuzawa *et al.*, 2008). Nous avons recherché sur le modèle KI TTN FINmaj si l'expression et la localisation de ces protéines obscurine et obs1 étaient perturbées par la présence de la mutation FINmaj dans les muscles des souris KI TTN FINmaj.

3.1. L'expression de l'obscurine dans les KI TTN FINmaj n'est pas modifiée

Dans un premier temps, nous avons quantifié l'expression de l'obscurine par RT-PCR quantitative après extraction des ARNm des muscles Psoas des souris KI TITIN à 4, 6 et 9 mois (*Fiche technique 3*) (*Fiche technique 4*). Aucune différence d'expression de l'obscurine n'a été mise en évidence entre les souris WT, HE et HO pour la mutation FINmaj (*Figure 51*, résultats à 9 mois).

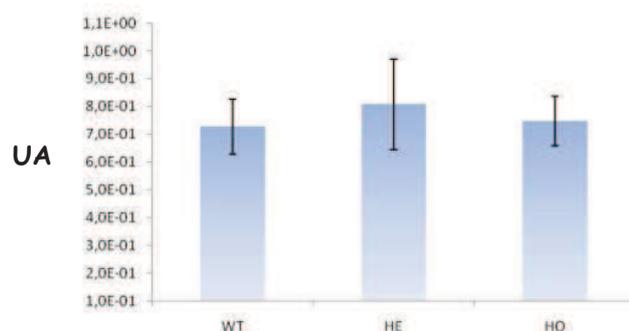


Figure 51 : Expression de l'obscurine dans les muscles des souris KI TTN FINmaj. RT-PCR quantitative spécifique de l'obscurine réalisée sur ARN de muscles Psoas des souris KI TITIN FINmaj WT, HE et HO à 9 mois en unités arbitraires (UA). L'expression de l'obscurine n'est pas modifiée en présence de la mutation FINmaj.

3.2. La localisation de l'obscurine est perturbée chez les souris KI TTN FINmaj HO

Le coimmunomarquage de l'obscurine et de la myoméline (partenaire de la titine dans le domaine M4) a été réalisé sur des coupes de muscles (*Psoas*) des souris KI TTN WT, HE et HO (*Fiche technique 5*) (*Figure 52A*). Quel que soit le génotype des souris, l'obscurine et la myoméline restent bien colocalisées dans la ligne M. En raison des perturbations de la localisation de l'obscurine chez les patients vis-à-vis de la myoméline 1, nous avons réalisé une analyse fine des images obtenues. Une comparaison des mesures de l'intensité de cette colocalisation a été réalisée en déterminant l'étendue des marquages de l'obscurine et de la myoméline sur les sarcomères des souris WT, HE et HO a été réalisée. Le marquage de l'obscurine est plus diffus que celui de la myoméline dans le cas des souris HO (*Figure 52B, gauche*) (*Fiche technique 11*). La mesure en taille réelle de cette différence de localisation montre que le marquage de l'obscurine est plus étendu que celui de la myoméline de 156 nm chez les souris HO, alors que le marquage de la myoméline est normalement plus étendu de 78 nm chez les souris WT que le marquage obscurine. La même quantification sur les images de coimmunomarquage montre une déviation normale du marquage myoméline/obscurine de 72 nm pour les souris HE (*Figure 52B, droite*). L'obscurine n'est donc pas correctement localisée dans le cas de la présence homozygote de la mutation FINmaj (comme ce qui a précédemment été constaté chez l'Homme). Enfin, la mutation n'entraîne pas de perturbation de la localisation de l'obscurine lorsqu'elle est présente à l'état hétérozygote. Bien que visuellement nous n'ayons pas pu montrer la délocalisation de l'obscurine dans la ligne M vis-à-vis de la myoméline 1, l'étude et la quantification des pixels a permis de mettre en évidence comme dans les biopsies des patients LGMD2J, une mauvaise localisation.

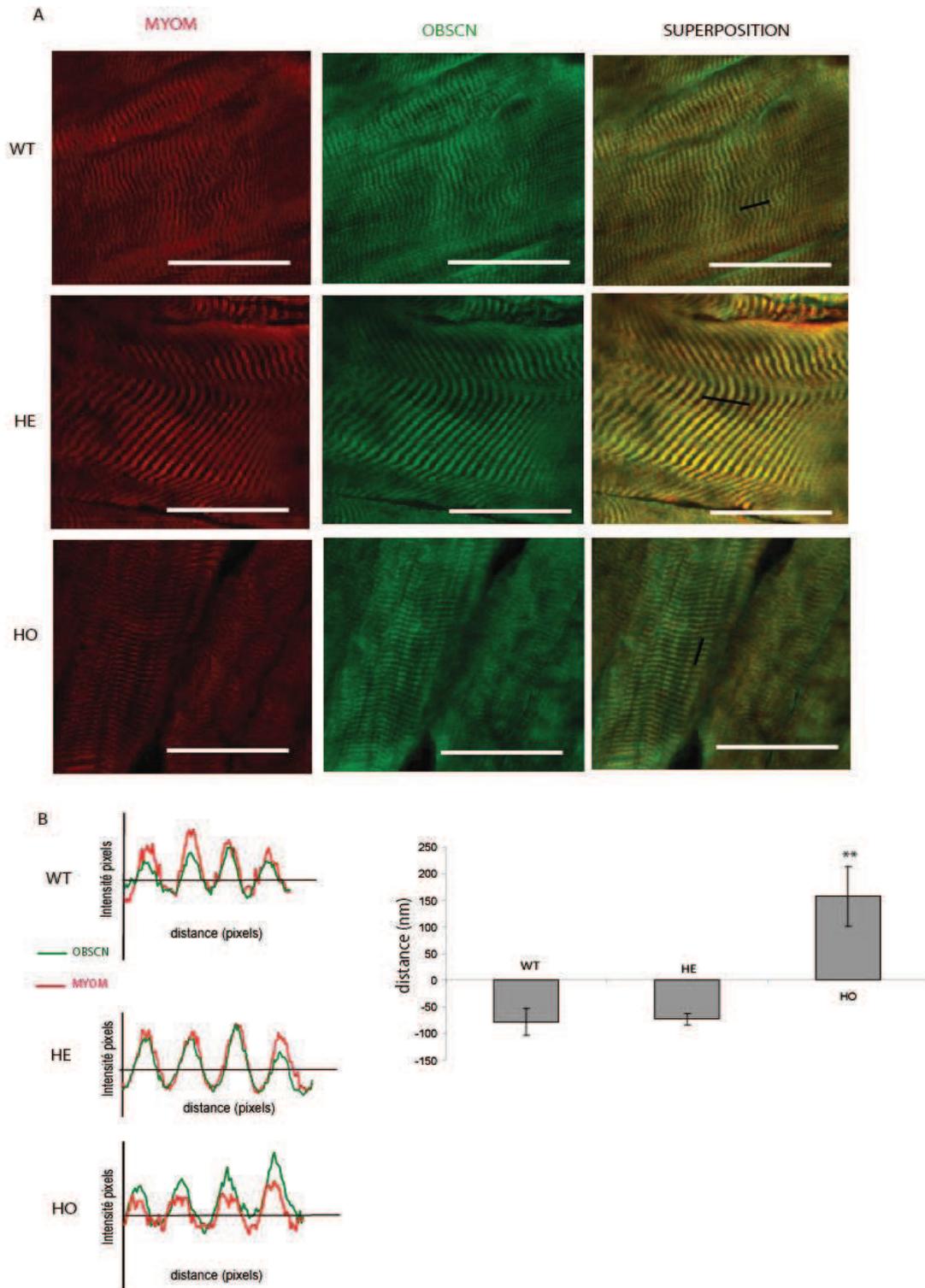


Figure 52 : Conséquence de la mutation *FINmaj* sur la localisation de l'obscurine.

A/ Coimmunomarkage sur *Psoas* de la myoméline 1 (rouge) et l'obscurine (vert) sur coupe WT, HE et HO. Barre d'échelle = 50 μ m. **B/ Gauche :** Intensité des pixels verts et rouges sur la distance représentée par le trait noir (en A). **Droite :** Quantification de la phase de chacune des courbes entre le marquage myoméline et obscurine des souris WT, HE et HO (nm). L'obscurine est sélocalisée chez le souris HO.

3.3. L'expression de l'obs1 n'est pas modifiée dans les souris KI TTN

Afin d'étudier plus en détail l'obscurine-like 1 dans les souris KI TTN, la quantification de cette protéine a été réalisée par Western Blot sur les protéines extraites des TA des souris KI TTN (Fiche technique 8). Il n'y a pas de différence d'expression de l'obs1 observée quel que soit le génotype (Figure 53). La localisation de cette protéine dans les muscles des souris KI TTN FINmaj est en cours.

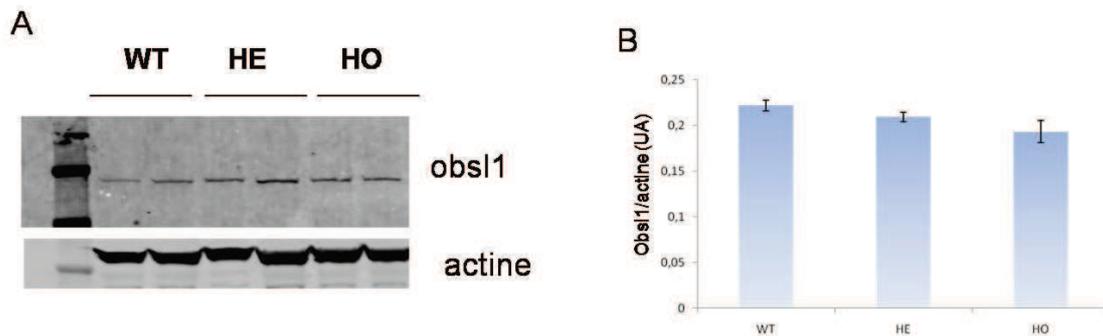


Figure 53 : L'expression de l'obs1 dans les muscles des souris KI TITIN n'est pas modifiée. A/ Mise en évidence de l'obs1 sur Western Blot de protéines extraites de PSOAS de souris WT, HE et HO. B/ Quantification de la protéine obs1 rapporté à l'actine en UA.

Conclusion sur les conséquences de la mutation FINmaj sur l'obscurine et l'obscurine like 1 :

Comme chez l'Homme, nous avons pu constater dans les muscles de souris KI TTN FINmaj HO une **délocalisation** partielle de la protéine **obscurine** dans la ligne M sans toutefois de différence en termes d'expression de celle-ci. Son homologue obs1 ne montre pas, elle, de différence d'expression entre souris WT, HE et HO mais sa localisation n'a pas été recherchée.

CONCLUSION: Etude de la physiopathologie TMD/LGMD2J

La mutation FINmaj entraîne des conséquences sur plusieurs protéines dont la titine. En effet, comme chez l'Homme, la mutation entraîne la **perte des domaines C-terminaux** de la titine qui semble être la conséquence d'une coupure protéolytique. La calpaïne 3, pourtant connue pour couper dans la région C-terminale de la titine dans des conditions physiologiques, n'est pas à l'origine de la coupure pathologique visible dans les muscles des souris KI TTN FINmaj. Cependant, les calpaines ubiquitaires semblent être des bons candidats pour cette protéolyse.

De plus, la présence de la mutation à l'état homozygote chez la souris entraîne la diminution de la quantité de la **calpaïne 3**, comme ce qui a été constaté chez les patients LGMD2J. Cette diminution n'est pas due à une régulation négative de la transcription mais à une **déstabilisation de la protéine**.

L'**obscurine** et l'**obscurine like 1** sont deux autres partenaires du dernier domaine de la titine. L'obscurine, comme chez l'Homme est délocalisée dans la ligne M alors que les résultats obtenus sur l'obs1 ne sont pas suffisant pour savoir si celle-ci subit les conséquences *in vivo* de la mutation FINmaj.

PARTIE III

Etude de la relation entre les protéines de la ligne M et la calpaïne 3

CONTEXTE

La calpaïne 3 est localisée en différents points du sarcomères. Lors de ces travaux, nous nous sommes intéressés aux substrats de la calpaïne 3 qui sont présents dans la ligne M dans le but de mieux comprendre les relations titine/calpaïne 3/substrats dans le cadre des pathologies impliquant des mutations dans la partie C-terminale de la titine. La calpaïne 3 est capable de cliver un certains nombre de substrats présents dans la ligne M. Le plus connu des substrats de la calpaïne 3 présent dans la ligne M est la titine. Nous avons donc étudié le fragment de clivage libéré par cette coupure. Enfin, une nouvelle interaction protéique avec la titine en C-ter et la calpaïne 3 a récemment été caractérisée (la protéine myospryne). Nous avons donc recherché *in vitro* si la calpaïne 3 était capable de couper cette protéine.

1. Etude des fragments de la titine générés par l'activité de la calpaïne 3 *in vitro* et *in vivo*

1.1. Prédiction des sites de coupure de la partie C-terminale de la titine par la calpaïne 3

La titine a été montrée comme pouvant être coupée par la calpaïne 3 en deux points dans sa partie C-terminale. Cette coupure entraîne la libération de deux fragments de 45 kDa et d'environ 20 kDa dans des conditions normales *in vitro* et *in vivo*. Cette coupure *in vivo* a été mise en évidence après sous fractionnement des tissus musculaires (comme expliqué paragraphe I.1.1). Ce fractionnement réalisé sur des muscles squelettiques de souris WT et *capn3^{-/-}* a précédemment permis de mettre en évidence la présence d'une bande spécifique de la titine à 45 kDa issue du fractionnement, qui n'est présente que chez les WT, indiquant le rôle spécifique de la calpaïne 3 dans cette coupure (Taveau *et al.*, 2003; Kramerova *et al.*, 2004).

Des tentatives infructueuses de purification des fragments de coupure de la titine par la calpaïne 3 dans des conditions normales *in vitro* et *in vivo* n'a pas permis de déterminer le site de coupure. Une estimation de la zone de coupure a été réalisée par calcul du poids moléculaire de 45 kDa correspondant à la taille du fragment obtenu après coupure de la titine par la calpaïne 3 en C-ter. Cette estimation a été confortée et précisée grâce à l'identification de séquence pouvant correspondre à un consensus défini comme site de clivage de la calpaïne 3 par l'équipe de Van der Maarel en Hollande (de Morree *et al.*, 2010). A partir de la comparaison des substrats de la calpaïne 3 et leurs sites de clivage, cette équipe a déterminé et validé une séquence consensus

de coupure [vlima]xxxx(3,4)[vlima]xx[vlima][ed] présentes sur les substrats connus de la calpaïne 3. Nous avons recherché la présence de cette séquence consensus reconnue par la calpaïne 3 sur la séquence protéique C-terminale de la titine humaine et murine grâce au site prosite (<https://expasy.org/cgi-bin/prosite>). Cette séquence consensus est présente en quatre points de la séquence protéique humaine, et entraînerait la libération de fragments de 45, 39 20 et de 13 kDa (*Figure 54*). Le premier site consensus potentiel est situé dans le domaine is6, le second en M8, le troisième à cheval sur les domaines M9 et is7 et le dernier dans le domaine is7. Cette séquence consensus est présente en 5 points sur la séquence murine de la titine présente dans la ligne M. D'après cette prédication, le clivage de la titine au niveau de ces sites par la calpaïne 3 induirait la libération de fragments de 84, 64, 45, 20 et 13 kDa environ (*Figure 54*). Cependant, seules trois de ces séquences consensus sont communes entre la séquence murine et humaine et correspondraient à la coupure de fragments de 45, 20 et 14 kDa (*Figure 54*).

Site de clivage consensus reconnu par la calpaïne 3: [vlima]xxxx(3,4)[vlima]xx[vlima][ed]
IS6 M8 M9 IS7 M10

Localisation des mutations Lille (l), Belge (i) et FINmaj (evtw ou eitw)

Séquence de la titine humaine (aa 1000 C-term)

ntsgvltleildchtddsgtyravctnykgeasdyatl dvtggdyt tyasqrrdeevprsvfpeltrteayavssfkktsemeasssvrevksqmtetreslssyeh
 sasaemksaaleeksleeksttrkiktlaariltkprsmtyegesarfscddtgepvptvtwlrkgqvltsarhqvtttkykstfeissvqasdegnysvven
 segkqaeftltiqarvtekavtspvrkspeprvkspeavkspkrvkspepshpkavspptekppteqvhlpsvappkitqflkaeaskaiakltcvvess
 vlrakevtwykdgkklkenghfqfphysadgtyelkinnltesdqgeyvceisgeggtsktnlqfmgqafksihekvsiksetkksdqkttestvtrktepkapepi
 sskpvivtqlrdttvssdvakfavgatgprptaiwtkdgkaiaggkyklsedkggffleihktdtsdsglytctvksnagsvssckltik**aidkteaqkvstqk**
tseitpqqkavvqeeisqkalsrseeikmseaksqeklalkeaskvliseevkksaatsleksivheeitktsqaseevrthaeikafstqmsinegqrlvl
kaniagatdvkwvlnvgelt nseeyrygvsdqdtltikqashrdgiltcisktkegivkccqydltskelsdapafisqprsqninegqnlftceisgeps
peiewfknlpisissnvsirsrnvysleirnasvdsdsgkytikaknfrgqcsataslmlvplveepsrevvlrtsgdtslqgfsqsqvsqmsaskqeaafss
fssssassmtemkfasmsaqsmssmqesfvemsssfmgisnmtqlesstskmlkagirgippkiealpsdisidegkvlvacaftgeptpevtwscg
grkihsqeqgrfhientddltliimdvqkqdgglytlslgnefgsdsatvnihirsi

vkksaatsle: 44-45 kDa **vwv.lnvge** : 39 kDa **aslmvlp**ve: 20-21 kDa **mgisnmtqle** : 13 kDa

Séquence de la titine murine (aa 1000 C-term)

tsgvltleildcqtgedgtyravctnykgeasdyatl dvtggayt tyasqrrdeevpksvfpelktteayavssfkrtseleaasssvrevksqmtetreslstyehey
 asaemksatseeksleekatvrkiktlaariltkprsitvhegesarfscddtgepvptvtwlrregqvstsarhqvtttkykstfeissvqasdegnysvvens
 dgkqeaqft**ltvqkarvie**kavtspvrkspeprvkspevtpkprvkspepvtshpkavspptekppteqvhlpsvappkitqslkaeaskdiakltcavess
 alcakevawykdgkklkenghfqfphysadgtyelkihnlsesdcgeyvcevsgeggtsktsfqtgqsfksieqvssissetktsyqktaesaeakksepiapesi
 sskpvivtqlrdttvssdvakftikvtgppqtitwtkdgkaiaqgskyklsnkeefileiltetsdgglyactvtnsagsvssckltik**avkdteaqkvstqkt**
sevtqqkkaqaeeisqkaltseeikmsevshetlaikaeaskvliaeevkrsaasleksivheevtktsqaseevkthaeiktlstqmnikgqratlk
aniagatdvkwvlngtelpnseeyrygvsdqdtltikqashreegilscigktsqgvvkcqfdltlseelsdapsfitqprsqninegqnlfscevsgeps
peiewfknlpisissnvsirsrnvyleirnaavdsdsgkytikaknfhgqcsatasltvplvepprevvlktsdvslhgsvssqvsqmsaskqeaafss
fssssassmtemkfasmsaqsmssmqesfvemsssfmgkssmtqlesstsrmlkaggrgippkiealpsdisidegkvlvacaftgeptpeitwscg
grkiqnqqqgrfhientddltliimdvqkqdgglytlslgnefgsdsatvnihirsm

ltvqkarvie: 83-84 kDa **vqkt.aesae** : 64 kDa **vkrsaasle**: 44-45 kDa **asltvlp**ve: 20-21 kDa **mgkssmtqle** : 13 kDa

Les trois sites conservés humain/murin :
vkksaatsle/vkrsaasle : 44-45 kDa **aslmvlp**ve/**asltvlp**ve : 20-21 kDa **mgisnmtqle/mgkssmtqle** : 13 kDa

Figure 54 : Localisation des zones de coupure prédictives de la calpaïne 3 sur les séquences de la partie C-terminale de la titine humaine et murine.

1.2. Fonction et localisation du fragment p45

Nous nous sommes intéressés à l'étude du fragment libéré par la coupure de la titine par la capn3, appelé p45, dans la vie du muscle sain et au rôle potentiel de celui-ci. En effet, suite à l'activation de la calpaïne 3, ce fragment est libéré dans la fibre, mais son devenir et sa fonction ne sont pas connus. Nous avons donc cherché à localiser le p45 dans la cellule et comprendre sa fonction en étudiant une souris surexprimant ce fragment. Cette étude a été poursuivie afin de déterminer la fonction et la localisation du fragment de coupure produit après le clivage par la calpaïne 3.

1.2.1. Construction de la souris Tg p45

Nous avons généré et étudié une souris surexprimant de façon constitutive le fragment p45 murin (précédemment défini de façon empirique) (*Fiche technique 1*). Pour cela, une construction comprenant un promoteur desmine, un intron globine et la séquence murine du p45 suivit d'un poly A SV40 a été réalisée au sein de notre laboratoire et utilisé par la Clinique de la Souris (ICS, Illkirsch). Trois souches Tg p45 ont été générées mais les niveaux d'expression du fragment p45 étant relativement similaires, une seule de ces trois souches a été étudiée et caractérisée.

Les souris surexprimant le fragment p45 murin ont été caractérisées après génotypage (*Figure 55A*) (*Fiche technique 1*). Dans un premier temps, une RT-PCR quantitative spécifique de la partie C-terminale de la titine a été réalisée sur les ARN des souris WT et Tg p45 (*Fiche technique 3*) (*Fiche technique 4*) montrant une surexpression d'environ 1000 fois comparée à une souris WT (*Figure 55B*). Enfin, la surexpression de ce fragment p45 a été constatée après dépôt des protéines totales des TA de ces souris et marquage du fragment grâce à un anticorps spécifique du domaine M10 de la titine (*Fiche technique 8*). Aucun marquage n'est mis en évidence dans le cas des souris WT car ce fragment n'est visible qu'après sous fractionnement des cellules du muscle. Chez les souris Tg p45, le fragment p45 est visible dans la fraction totale des protéines du muscle car il se trouve surexprimé en grande quantité (*Figure 55 C*).

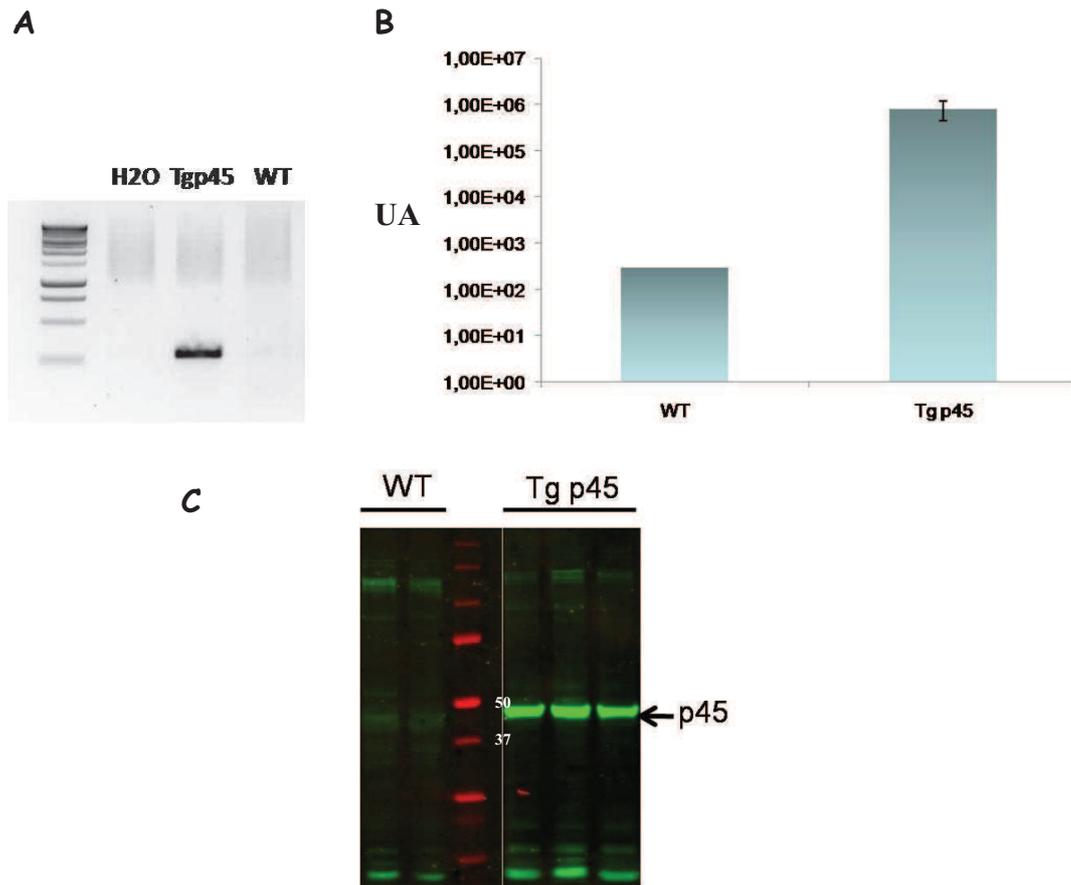


Figure 55 : Construction de la souris transgénique p45.

A/ Génotypage des souris Tg p45. *B/* RT-PCR quantitative réalisée sur ARNs extraits de TA de souris WT et transgéniques surexprimant le fragment p45 avec des oligonucléotides et sondes spécifiques du domaine M10 de la titine rapporté à PO (UA), n=4. *C/* Marquage des protéines totales de muscle de TA de avec un anticorps spécifique du domaine M10 de la titine (vert).

1.2.2. Localisation du fragment p45

Afin de localiser plus précisément ce fragment, un fractionnement subcellulaire des cellules de muscles QUA de ces souris a été réalisé et les fractions déposées en Western Blot (*Fiche technique 8*). Les membranes ont ensuite été hybridées avec l'anticorps spécifique du domaine M10 de la titine. Dans le cas des souris Tg p45, ce fragment est effectivement lui aussi présent dans la fraction cytosquelettique avec en plus une échelle de bandes visibles au dessus de la bande d'intérêt. Le p45 est de plus présent dans la fraction cytosolique et la fraction membranaire. Enfin, la bande plus basse située environ à 15 kDa est présente dans le noyau des souris WT et TG p45 mais aussi dans le cytosol et les membranes de ces dernières en importante quantité (*Figure 56*). Cette souris surexprimant le fragment p45 a alors été utilisée pour étudier la fonction et la localisation de celui-ci.

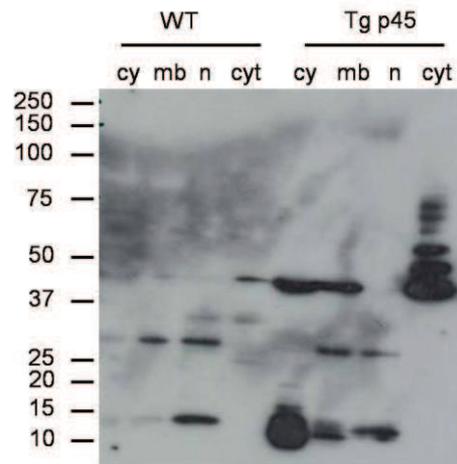


Figure 56 : Localisation des fragments C-terminaux de la titine après fractionnement subcellulaire chez les souris Tg p45.

Dépôt des protéines après fractionnement subcellulaire des cellules des muscles QUA de souris WT et transgénique surexprimant le fragment p45 murin et marqué avec l'anticorps spécifique du domaine M10 de la titine. Cy : cytoplasme, mb : membrane, n : noyau, cyt : cytosquelette. Le fragment p45 est présent dans les fraction cytosoliques, membranaires et cytosquelettiques.

1.2.3. Agrégation du p45 dans les fibres des souris Tg p45

L'histologie des muscles des souris Tg p45 a été réalisée aux âges de 3, 6 et 9 mois. Une atteinte des muscles comme le TA, le PSO, le QUA, le GA, le SOL mais aussi le cœur est visible à partir de l'âge de 3 mois. Cette atteinte se caractérise principalement par la présence importante de fibres centronucléées mais surtout par la présence d'agrégats dans les fibres (*Figure 57A*). Afin de déterminer plus spécifiquement à quoi correspondent ces agrégats dans les fibres des souris Tg p45, des coupes semi fines sur les TA de souris Tg p45 ont été réalisées. De nombreux agrégats sont visibles en histologie après marquage HPS des coupes de muscles à 6 mois (*Figure 57A*). Lorsque des coupes semi-fines sont réalisés sur ces mêmes muscle on peut constater que ces agrégats semblent plutôt être des accumulations de matériel présentes au niveau des sarcomères et détruisant la structure de ceux-ci (*Figure 57B*). Un marquage du domaine M10 de la titine sur des coupes longitudinales de muscle permet de constater que ces vésicules sont fortement marquées avec l'anticorps dirigé contre le domaine M10 (Mex6-1). Ces agrégats sont donc des vésicules contenant une accumulation du fragment p45 (*Figure 57C*).

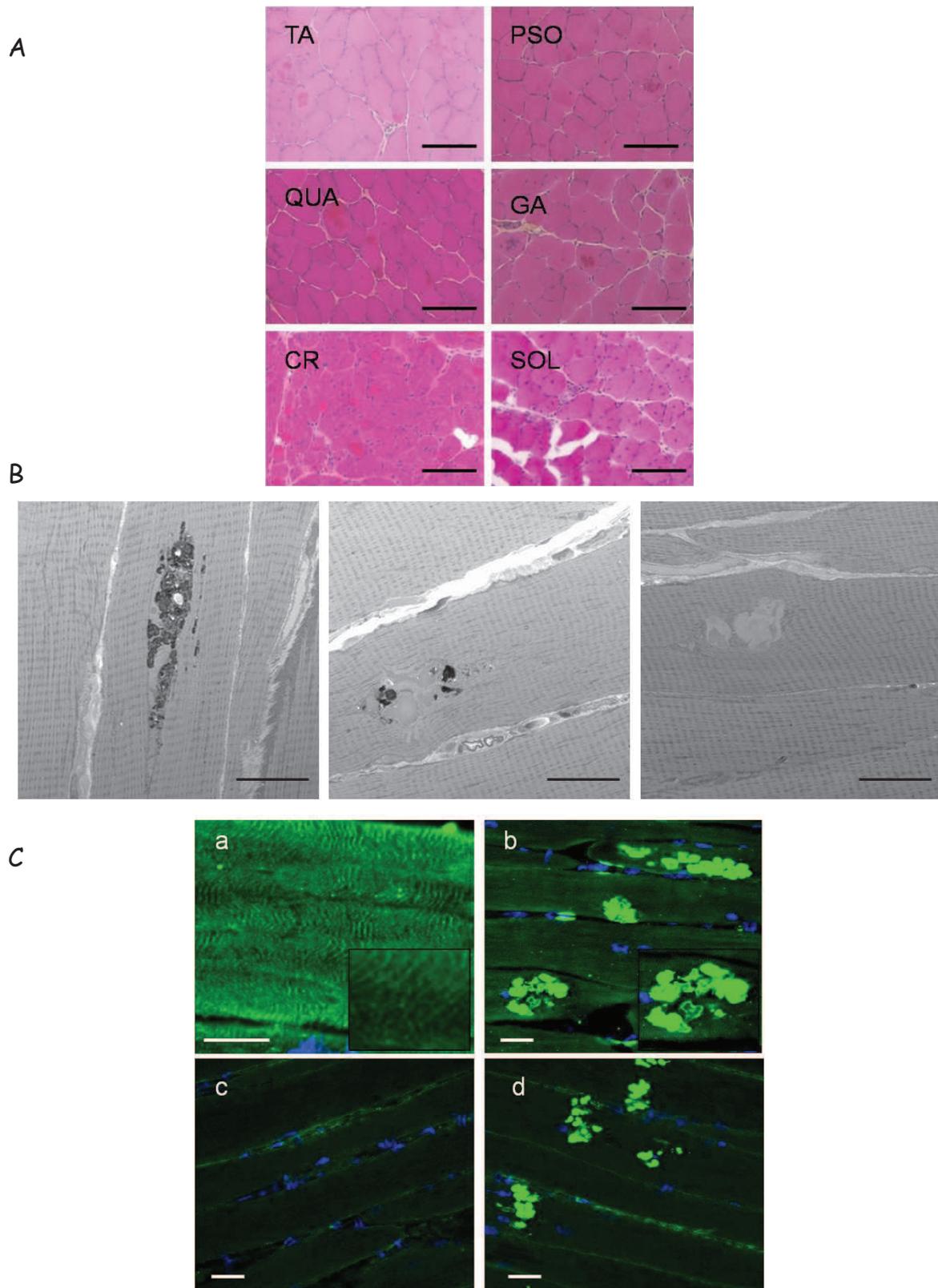


Figure 57 : Histologie des souris Tg p45.

A/ Histologie des muscles des souris Tg p45 après marquage HPS à 6 mois. Barre d'échelle = 100 μ m. B/ Coupes semi-fine de TA de souris Tg p45 au niveau des agrégats. Barre d'échelle = 50 μ m. C/ Marquage immunohistofluorescent spécifique du domaine M10 de la titine sur les coupes de TA des souris WT (a et c) et Tg p45 (b et d). Barre d'échelle = 50 μ m. Présence d'agrégats de fragments p45.

1.2.4. Ubiquitination du fragment p45 chez les souris Tg p45

L'échelle de bandes présente au dessus du fragment p45 sur le Western Blot dans la fraction cytosquelettique (cf *Figure 56*) peut-être la conséquence d'ajouts d'ubiquitine sur le fragment avant la dégradation de celui-ci. Pour vérifier cette hypothèse, un comarquage de la membrane a été réalisé avec l'anticorps dirigé contre le domaine M10 de la titine et un anticorps spécifique des ubiquitines. Les bandes supérieures à la bande à 45 kDa colocalisent avec le marquage ubiquitine, alors qu'aucun marquage de ce genre n'est visible chez les souris WT (*Figure 58*).

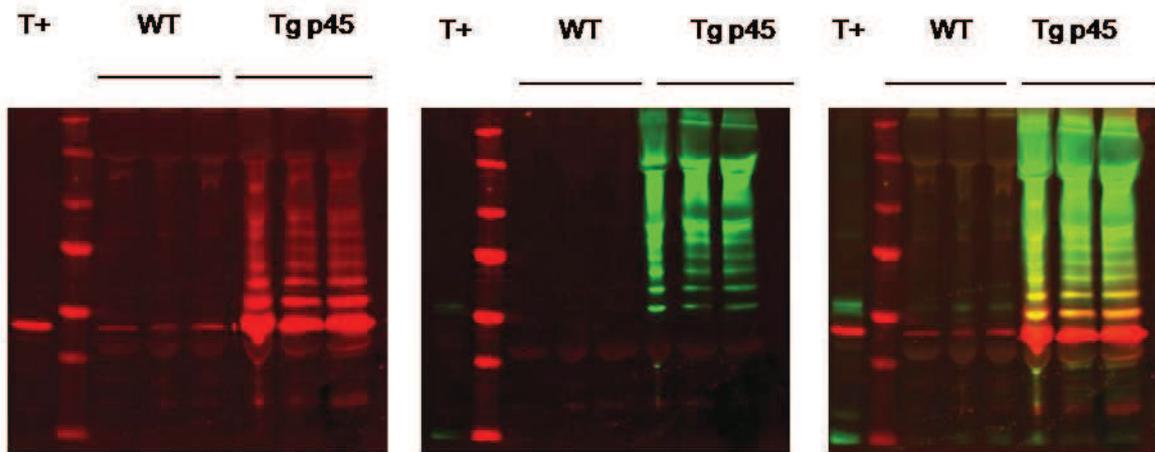


Figure 58 : Ubiquitination du fragment p45 dans les souris Tg p45.

Hybridation des membranes après dépôt des protéines issues du fractionnement subcellulaire des cellules de TA avec un anticorps spécifique du domaine M10 (gauche, rouge), de l'ubiquitine (milieu, vert), superposition (droite).

En conclusion, ce fragment surexprimé dans les souris Tg p45 est fortement exprimé et se localise dès l'âge de 3 mois dans des vésicules à l'intérieur des fibres musculaires. Ces vésicules semblent être formées par l'accumulation de ce fragment ubiquitiné.

Conclusion sur l'étude des fragments de la titine générés par l'action protéolytique de la calpaïne 3:

Le fragment **p45** connu pour être libéré par l'action protéolytique de la calpaïne 3 de la titine dans des conditions normales a été étudié dans une souris surexprimant ce fragment. N'ayant pas pu purifier et séquencer ce fragment, une prédiction informatique pour déterminer le site de **coupure** de la titine par la calpaïne 3 a été réalisé. Ce fragment p45 surexprimé en souris est très vite **ubiquitiné** et **accumulé** au sein des fibres et se localise préférentiellement dans le cytosquelette.

2. Relation entre myospryne et la calpaïne 3 *in vitro*

L'interaction de myospryne (ou CMYA5) avec la calpaïne 3 par technique de double hybride a été mise en évidence dans notre équipe et des expériences de double hybride (en collaboration avec l'équipe du docteur Udd) ont permis de montrer que myospryne interagit avec le domaine M10 de la titine (ces travaux ont fait l'objet d'un article disponible en annexe, (Sarparanta *et al.*). Myospryne, CMYA5 ; cardiomyopathy-associated 5 ou TRIM 76, est une grande protéine spécifique du muscle squelettique et cardiaque de la famille des TRIM protéines (449 kDa) (Benson *et al.*, 2004). Elle a été localisée principalement dans le disque Z (Durham *et al.*, 2006; Kouloumenta *et al.*, 2007), à la périphérie du noyau et en association avec les lysosomes et le réticulum sarcoplasmique. Myospryne interagit avec l' α -actinine (Durham *et al.*, 2006), la desmine (Kouloumenta *et al.*, 2007) et la sous-unité RIIa de la protéine kinase A impliquée dans la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique. Des études récentes ont montré l'implication de myospryne dans la dystrophie musculaire de Duchenne et des pathologies cardiaques. La dystrophine a été montrée comme interagissant avec deux sites dans la partie C-terminale de myospryne (Reynolds *et al.*, 2008). De plus, myospryne semble être nécessaire dans la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA) et dans le trafic vésiculaire (Kouloumenta *et al.*, 2007). Dans le cas de la mutation FINmaj, des expériences de double hybride ont permis de montrer que l'interaction de la titine dans le domaine M10 et de myospryne était abrogée (Sarparanta *et al.*).

Cette nouvelle interaction entre la calpaïne 3 et myospryne ainsi que l'interaction de myospryne avec la titine dans la ligne M (Sarparanta *et al.*), nous a poussé à étudier plus précisément l'interaction de la myospryne et de la calpaïne 3 *in vitro*. Dans un premier temps, il a été constaté que la partie C-terminale de myospryne peut être coupée par la calpaïne 3 *in vitro*, par coexpression dans des cellules rétinoblastiques humaines HER911 des constructions MD9-myc codant pour les 1009 derniers acides aminés de myospryne et de la construction MD7-myc codant pour les 701 derniers acides aminés de myospryne en présence d'une calpaïne 3 active (C3GFP) ou inactive (C129SGFP) (*Fiche technique 10*) (*Fiche technique 8*). L'expression de MD9 en présence de la C129S est détectée en Western Blot à la taille attendue mais montre une bande de clivage à environ 40 kDa en présence de la calpaïne 3 active. Lorsque l'expérience est réalisée avec une construction plus petite de la partie N-terminale de myospryne (MD7) visible en WB à 100 kDa, ce clivage n'est pas constaté en présence de calpaïne 3. MD9 est donc clivé alors que MD7 ne l'est pas (*Figure 59A*). Normalement la calpaïne 3 transfectée dans les cellules

HER911 est rapidement autolysée. Sa taille est alors de 80 et 30 kDa et sa taille entière de 140 kDa (C3 + GFP) n'est pas visible. Cette expérience montre que la calpaïne 3 entière est stabilisée lorsqu'elle est en présence de la construction myospryne MD9 (environ 5 fois plus) que seule ou en présence de la construction MD7 (Figure 59B et C).

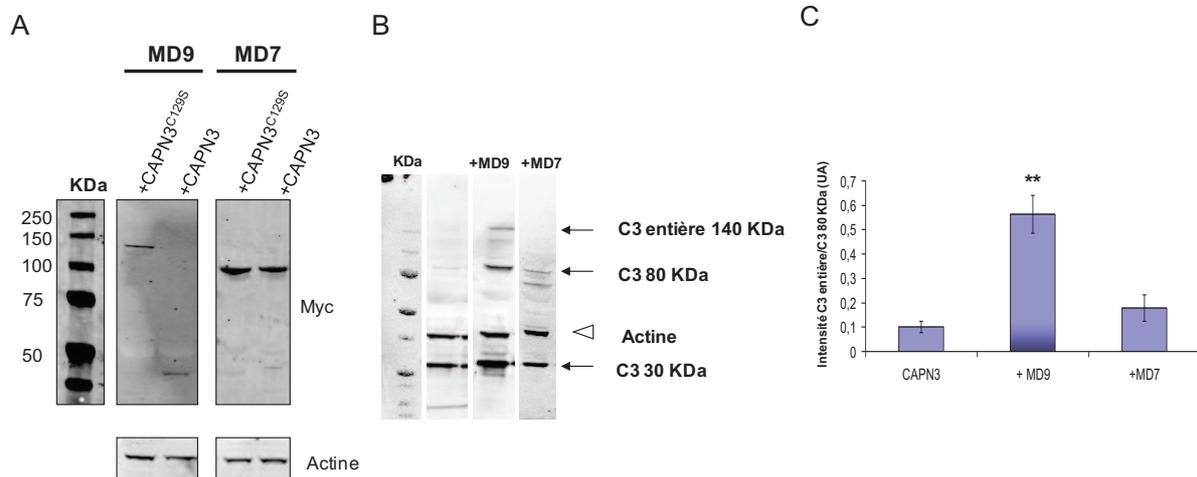


Figure 59 : Myospryne substrat et inhibiteur de la calpaïne 3 *in vitro*.

A/ Western Blot réalisé sur extrait cellulaires de HER911 après transfection des constructions de myospryne MD9 ou MD7 avec la CAPN3^{C129S} ou la CAPN3. B/ Marquage de la calpaïne 3 (entière et autolysée), cotransfectée en présence ou non des constructions MD9 et MD7 et de l'actine. C/ Quantification de l'intensité de marquage de la calpaïne 3 entière par rapport à la calpaïne 3 autolysée à 80 kDa.

Conclusion sur la relation de myospryne et de la calpaïne 3 *in vitro* :

Nous avons pu montrer *in vitro* que la calpaïne 3 est capable de couper myospryne (nouveau partenaire identifiée de la titine en C-ter). De plus l'un des fragments utilisé de myospryne semble pouvoir stabiliser la calpaïne 3 sous sa forme entière.

CONCLUSION: Etude de la relation entre les protéines de la ligne M et la calpaïne 3 :

La calpaïne 3 est capable de couper la titine dans sa partie C-terminale libérant ainsi notamment un fragment de 45 kDa. Afin de déterminer le rôle et la localisation de ce fragment après clivage, nous avons réalisé une souris surexprimant ce **p45**. L'étude de ce modèle a montré que ce fragment est rapidement ubiquitiné et accumulé dans des vésicules.

La protéine **myospryne** a récemment été montrée comme interagissant à la fois avec la titine en C-ter et avec la calpaïne 3. Nous avons montré que celle-ci est un nouveau **substrat** de la calpaïne 3 et qu'elle semble avoir un rôle d'inhibiteur de la calpaïne 3 *in vitro*.

PARTIE IV

*Approches thérapeutiques pour la
TMD et la LGMD2J*

CONTEXTE

Les pathologies TMD et LGMD2J n'ont à l'heure actuelle aucun traitement disponible. La caractérisation du modèle murin pour ces pathologies nous a permis de constater une reproduction de la sélectivité d'atteinte de la TMD et a LGMD2J selon la présentation de la mutation (1 ou 2 allèles mutés). Ce modèle est donc tout à fait adapté à l'essai d'approches thérapeutiques pour ces deux pathologies. L'étude approfondie du modèle murin exprimant la mutation FINmaj, à l'état hétérozygote et homozygote, nous a permis de constater la dérégulation d'une protéine clé : la calpaïne 3. Dans l'idée d'envisager une approche thérapeutique pour ces pathologies, nous avons évalué l'effet de la surexpression ou sous-expression de cette protéase dans les muscles des souris KI TTN FINmaj. Les résultats obtenus nous ont montré qu'une surexpression de C3 était délétère pour le muscle HE et que la diminution de l'expression de la C3 améliore le phénotype dystrophique de ces souris. Il est donc possible d'envisager une approche thérapeutique en diminuant la quantité ou l'activité de la calpaïne 3 pour la TMD.

Dans un deuxième temps, une approche par thérapie génique médiée par les vecteurs AAV pour les pathologies TMD et LGMD2J a été envisagée. Le messenger entier de la titine étant trop grand pour être encapsidé dans un vecteur rAAV, une approche de chirurgie de l'ARNm a donc été privilégiée pour modifier le ou les derniers exons de la titine dans lesquels se situent les mutations connues entraînant la TMD et la LGMD2J. Cette stratégie a été testée sur un minigène codant pour les 5 derniers exons et introns de la titine et a permis de mettre en évidence l'échange possible des derniers exons de l'ARNm de la titine *in vitro*.

1. Modulation de l'expression de la calpaïne 3 dans le modèle murin KI TTN FINmaj

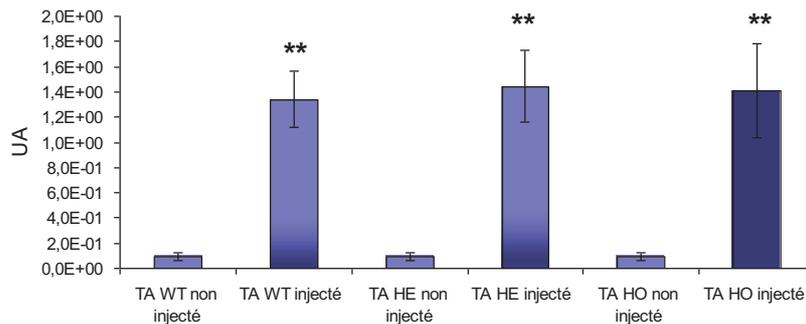
1.1. L'injection de calpaïne 3 aggrave l'atteinte histologique des souris HE et HO pour la mutation FINmaj

Au vu des résultats obtenus et exposés précédemment, en ce qui concerne la diminution de la quantité de la calpaïne 3 visible chez les HO pour la mutation FINmaj, il a été envisagé de palier à ce déficit de calpaïne 3 en augmentant l'expression de cette protéase dans les muscles atteints. Pour cela, un AAV de sérotype 1 contenant la calpaïne 3 humaine en sous promoteur desmine a été injectée dans le TA gauche des souris WT, HE et HO KI TTN FINmaj. Le TA droit a été utilisé comme contrôle non injecté. Ces souris ont été injectées à l'âge de 9 mois et les TA

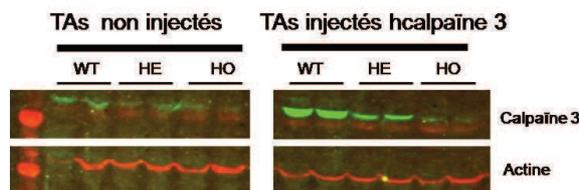
ont été prélevés 1 mois post-injection (*Fiche technique 2*). La vérification de la surexpression de la calpaïne 3 pour les trois génotypes a été réalisée en RT-PCR quantitative (*Fiche technique 3*) (*Fiche technique 4*) grâce à des oligonucléotides et sonde spécifiques de la calpaïne 3 humaine et montre une augmentation d'environ 100 fois (*Figure 60B*). De plus, la quantité de calpaïne 3 a été recherchée après Western Blot sur les extraits protéiques des *TA* injectés (*Fiche technique 8*). Une surexpression de la calpaïne 3 est visible dans les *TA* des souris saines et HE. Cependant, la quantité de C3 chez les souris HO n'est pas augmentée. Ces résultats suggèrent que, même surexprimée, la protéine calpaïne 3 est instable en raison de la présence de la mutation FINmaj (*Figure 60B*).

L'état histologique des *TA* bilatéraux a été examiné après un marquage HPS (*Fiche technique 5*). Une aggravation du phénotype est visible dans les *TA* des souris HE et HO ayant reçu la construction calpaïne 3 (*Figure 60C*). En particulier, la quantification des fibres centronucléées des *TA* chez les HE et HO montre une importante augmentation du nombre de ces dernières dans les *TA* alors qu'aucun effet n'est constaté lors de la surexpression de la calpaïne 3 dans les muscles de souris WT, ce qui corrobore les résultats précédemment obtenus sur la surexpression de la calpaïne 3 dans le muscle (Spencer *et al.*, 2002; Bartoli *et al.*, 2006) (*Figure 60D*). La surexpression de la protéine calpaïne 3 n'améliore donc pas le phénotype des KI TITIN FINmaj HE ou HO mais tend plutôt à aggraver celui-ci.

A



B



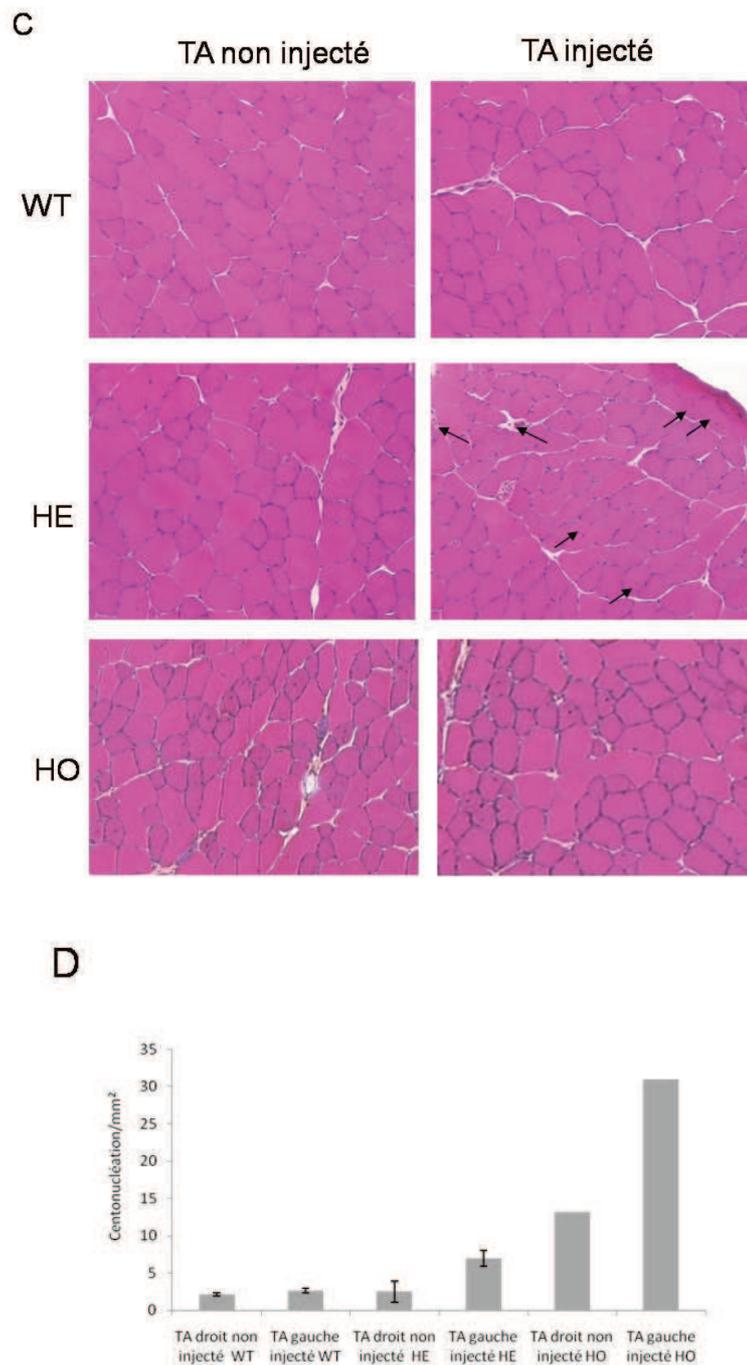


Figure 60 : Effet délétère de l'injection de calpaïne 3 chez les souris KI TITIN FINmaj.
A/ RT-PCR quantitative spécifique de la calpaïne 3 humaine sur TA gauche injecté avec l'AAV1 hcalpaïne 3. Le TA droit non injecté est témoin. **B/ Gauche :** Western Blot calpaïne 3 et actine sur TA droit non injecté et TA gauche injecté avec l'AAV1 hcalpaïne 3. **Droite :** Quantification de la quantité de calpaïne 3 rapporté à l'actine. **C/** Histologie des muscles hétérozygotes et homozygotes pour la mutation FINmaj et WT après injection IM de l'AAV1 codant pour la calpaïne 3 humaine. **D/** Quantification de la centronucléation des fibres des TA non injectés et injectés avec l'AAV1 C3 des souris WT, HE et HO.

1.2. Croisement des souris KI TTN FINmaj avec des souris
Knock Out pour la calpaïne 3

Au vu des résultats précédents, nous avons testé les conséquences de la diminution de la quantité de cette enzyme calpaïne 3 dans les muscles de ces souris en croisant les souris hétérozygotes pour la mutation FINmaj avec des souris déficientes en calpaïne 3 (KO calpaïne 3, *capn3^{-/-}*) (Richard et al., 2000). Une fois les souris hétérozygotes pour la mutation FINmaj et exprimant 50% de calpaïne 3 obtenues (HE; *capn3^{+/-}*), ces souris ont été croisées entre elles. Ces croisements nous ont permis d'obtenir de souris HE ou HO pour la mutation FINmaj exprimant soit 100, 50 ou pas de calpaïne 3 (*Fiche technique 1*). Étonnamment, ces souris se reproduisent plutôt bien. L'étude des ratios de naissance permet de constater que le ratio de génotypes titine obtenu n'est pas celui précédemment obtenu chez les souris KI TTN FINmaj (se référer aux résultats obtenus pour les accouplements des souris HE partie I (25 %, 25 %, 4 %)) mais se rapproche d'une répartition Mendélienne (*Tableau 8A*). La répartition des souris exclusivement hétérozygotes pour l'expression de calpaïne 3, hétérozygote et homozygote (HO; *capn3^{+/-}* et HE; *capn3^{+/-}*) suit une loi Mendélienne (*Tableau 8B*). Par contre, en ce qui concerne les souris n'exprimant pas de calpaïne 3, la distribution des génotypes titine n'est pas corrigée et suit la répartition attendue avec les souris KI TTN FINmaj (*Tableau 8C*).

A/ capn 3^{+/+}

Génotype TITINE	WT	HE	HO	
Total observé	18	34	9	
Total attendu selon le ratio KI TTN	18	18	2,3	$\chi^2=33,7^{**} p<0,01$
Total attendu selon le ratio mendélien	18	36	18	$\chi^2=4,6 p>0,1$

B/ capn 3^{+/-}

Génotype TITINE	WT	HE	HO	
Total observé	10	22	6	
Total attendu selon le ratio KI TTN	9	9	1,2	$\chi^2=32,8^{**} p<0,01$
Total attendu selon le ratio mendélien	7	15	7	$\chi^2=3,7 p>0,1$

C/ capn 3^{-/-}

Génotype TITINE	WT	HE	HO	
Total observé	7	2	1†	
Total attendu selon le ratio KI TTN	4,5	4,5	0,3	$\chi^2=1,9, p>0,5$
Total attendu selon le ratio mendélien	4	8	4	$\chi^2=6,9^* p<0,05$

Tableau 8 : Répartition des naissances des souris KI TTN croisées avec les souris capn3^{-/-}.
A/ Distribution des génotypes titine des souris WT (sans C3 mutée). **B/** Répartition des génotypes titine des souris exprimant 50% de calpaïne 3. **C/** Répartition des génotypes titine des souris n'exprimant pas de calpaïne 3. († Morte avant le sevrage).

1.3. La diminution de la quantité de calpaïne 3 améliore le phénotype musculaire des souris hétérozygotes pour la mutation FINmaj

Afin de déterminer si la diminution de la quantité de calpaïne 3 de 50% dans les muscles des souris hétérozygotes pour la mutation FINmaj pouvait avoir un impact sur l'atteinte histologique de celles-ci, les muscles de ces souris ont été caractérisés. Il est important de noter que les souris n'exprimant que 50% de calpaïne 3 (capn3^{+/-}) ne montrent aucune atteinte histologique. Les muscles des souris WT, HE, capn3^{+/-} et HE;capn3^{+/-} ont été analysés en histologie après marquage HPS à l'âge de 9 et 12 mois (*Fiche technique 5*).

A 9 mois, la quantification du nombre de fibres centronucléées dans les *TA*, *QUA* et *BF* des souris HE ;*capn3*^{-/-} (Figure 61A, B et C) (qui sont des muscles normalement atteints chez les KI TTN HE) montre une nette diminution de celles-ci par rapport aux KI TTN FINmaj HE et une restauration proche de ce qui est constaté chez des souris WT (n=3). La quantification du nombre de fibres ainsi que le diamètre de celle-ci a été comparé entre les *TA* de souris *capn3*^{+/-} versus les HE ;*capn3*^{-/-} afin d'écartier une possible étape de régénération. La quantité de fibre rapportée à la surface ainsi que la répartition du diamètre des fibres est identique entre les deux génotypes (Figure 62).

La caractérisation histologique des souris HE;*capn3*^{-/-} à 12 mois montre, comme vu à 9 mois, une réelle amélioration de l'état des muscles *TA*, *QUA* et *BF* des souris HE;*capn3*^{-/-} (Figure 63A, B et C).

La diminution de la quantité de calpaïne 3 de 50% par croisement des souris HE avec des souris *capn3*^{-/-} chez les souris HE pour la mutation FINmaj abolit l'atteinte dystrophique constatée chez les souris KI TTN FINmaj HE observée à partir de l'âge de 9 mois.

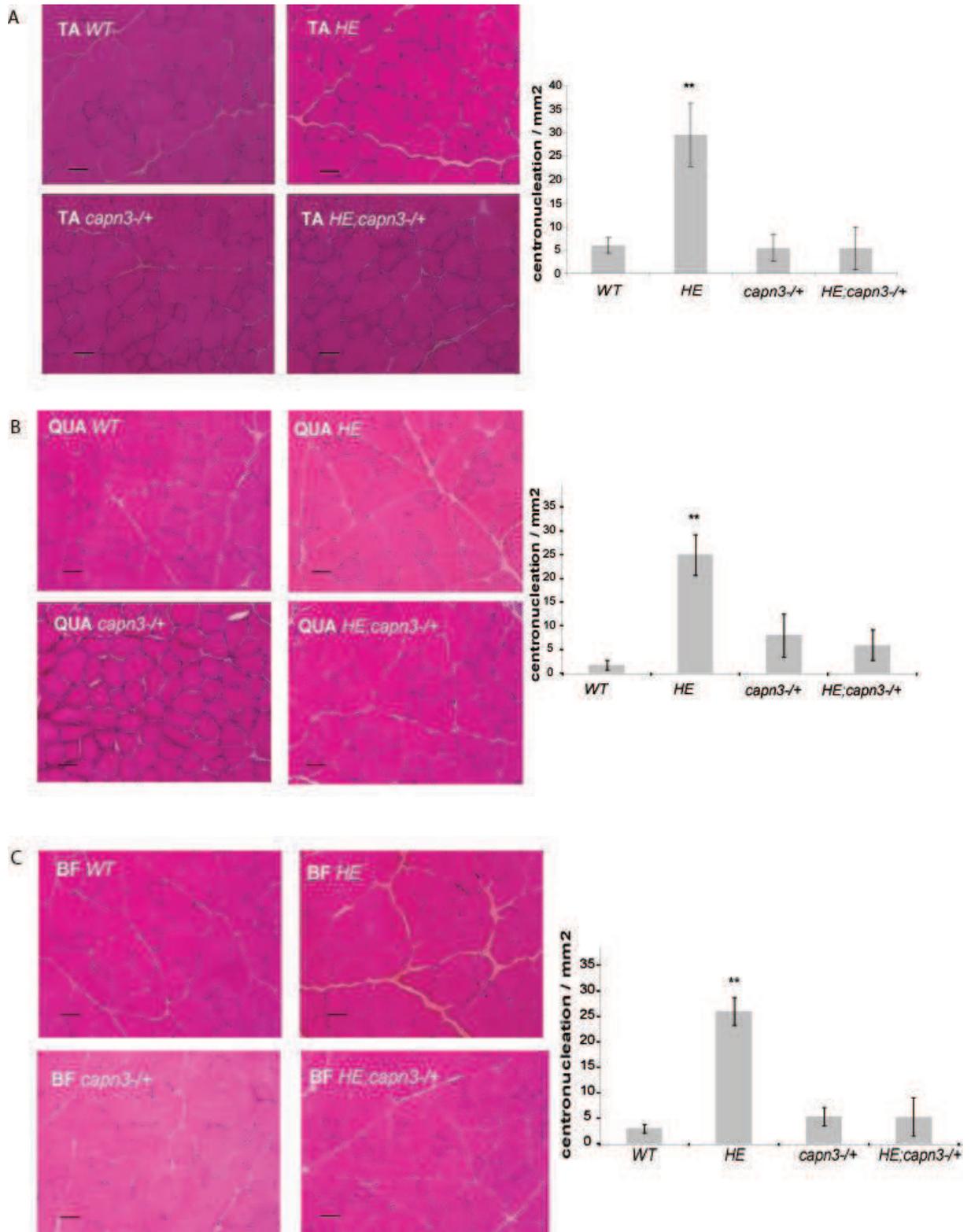


Figure 61 : Histologie des muscles des souris HE et WT, capn3^{-/-} et HE/capn3^{-/-} à 9 mois après marquage HPS et quantification de la centronucléation.
A/ TA. B/ QUAD. C/ BF. Barre d'échelle =50 μ m. Les souris HE/capn3^{-/-} ne montrent pas de signes dystrophiques à 9 mois.

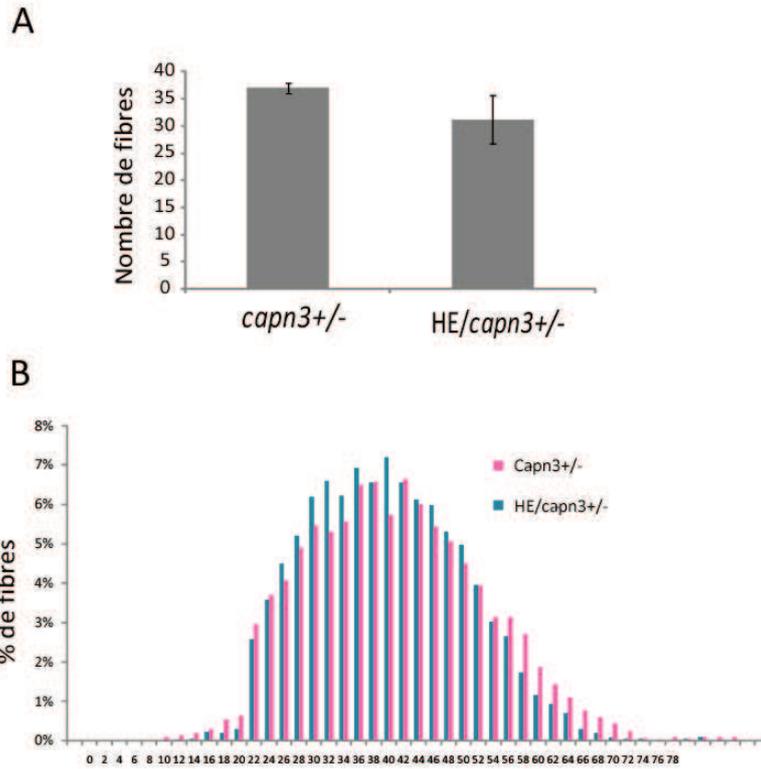


Figure 62 : Répartition du diamètre des fibres chez les HE;capn3^{+/-}.

A/ Quantification du nombre de fibres rapportée à la surface totale sur des TA de souris WT ; capn3^{+/-} et HE ; capn3^{+/-} à 9 mois (n=3). B/ Diamètres des fibres des TA des souris WT ; capn3^{+/-} et HE ; capn3^{+/-} à 9 mois (n=3). La répartition du diamètre des fibres des souris HE/capn3^{+/-} n'est pas différent de la répartition observée chez les souris HE.

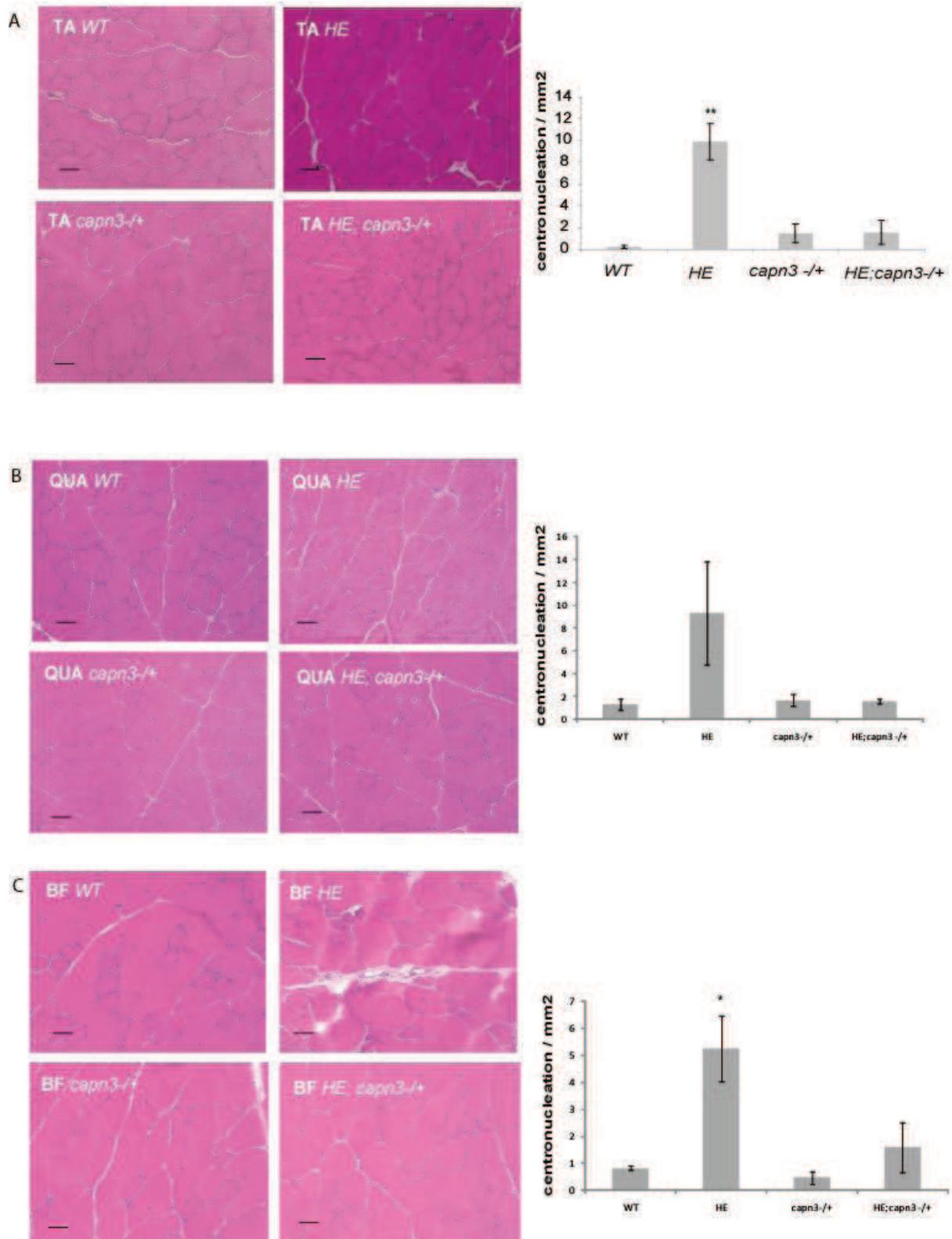
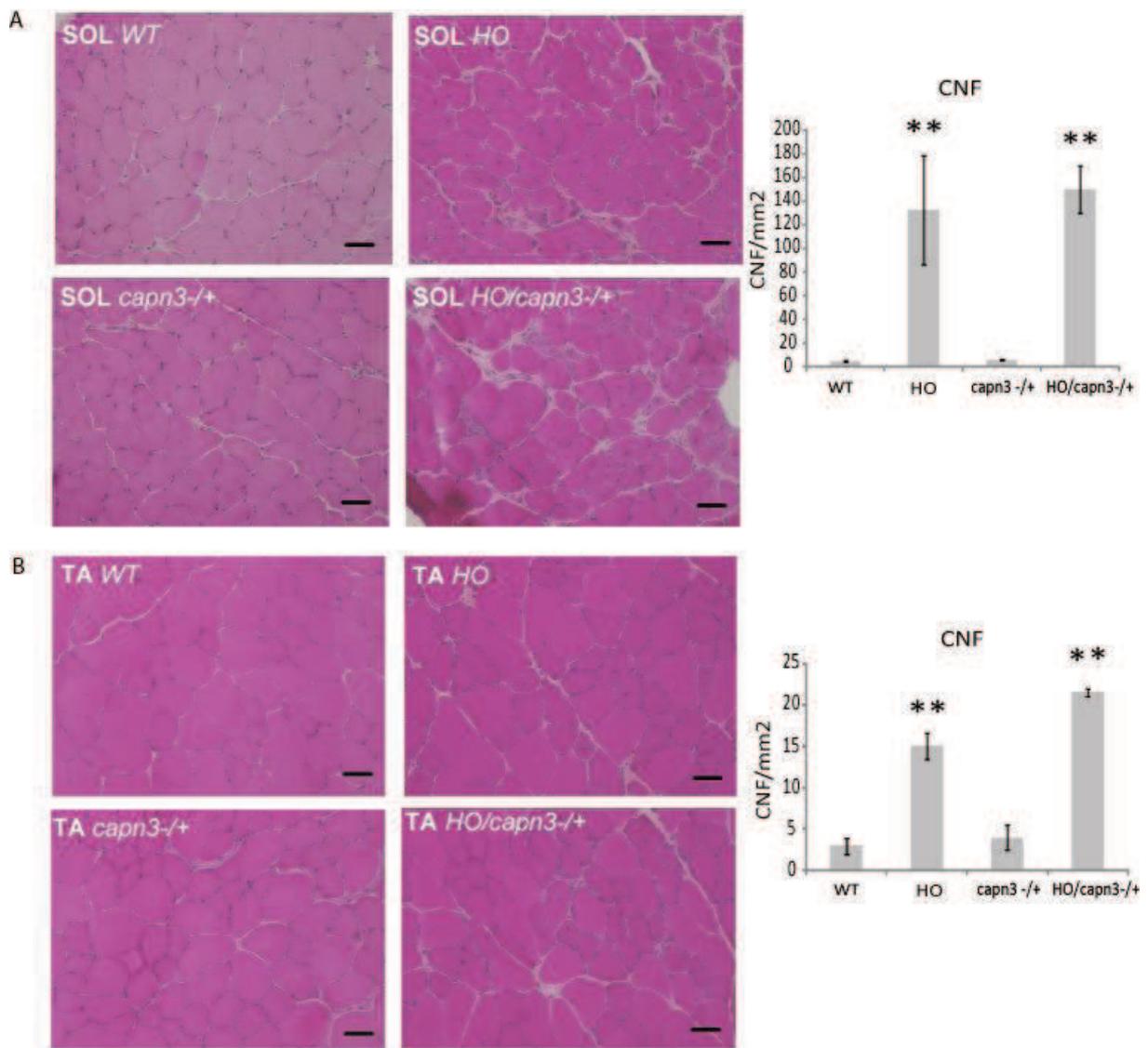


Figure 63 : Histologie des muscles des souris HE et WT, $capn3^{-/-}$ et HE/ $capn3^{-/-}$ à 12 mois après marquage HPS et quantification de la centronucleation.

A/ TA. B/ QUAD. C/ BF. Barre d'échelle =50 μ m. Les souris HE/ $capn3^{-/-}$ ne montrent pas de signes dystrophiques à 12 mois.

1.4. La diminution de la quantité de calpaïne 3 n'améliore pas le phénotype des souris HO pour la mutation *FINmaj*

Afin de déterminer si cette diminution de l'expression de la calpaïne 3 pouvait aussi améliorer l'état des muscles des souris KI TTN *FINmaj* HO, la caractérisation des muscles des souris HO;*capn3*^{-/-} a été réalisée à 9 mois (*Fiche technique 5*). Au contraire des souris HE;*capn3*^{-/-}, aucune amélioration de l'état des muscles n'a pu être constatée, notamment dans les muscles les plus touchés qui sont le *SOL* et le *TA*, avec toujours la présence de nombreuses centronucléations et d'infiltration cellulaire dans le cas du *SOL* (*Figure 64A et B*). De même, l'état du cœur n'est pas modifié, avec toujours une atteinte importante du muscle cardiaque et une fibrose du même ordre que ce qui a été constaté chez les souris HO (*Figure 64C*).



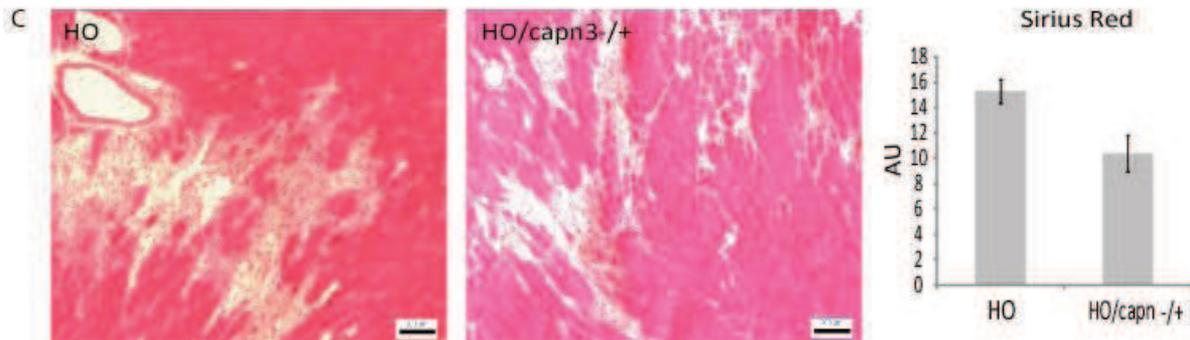


Figure 64 : Histologie après marquage HPS des soléaires des souris WT, HO, capn3^{+/-} et HO ; capn3^{-/-} à 9 mois.

A/ SOL. B/ TA. C/ Cœur. Barre d'échelle =50 µm. L'atteinte dystrophique des muscles et du cœur est identique chez les souris HO ; capn3^{+/-} et HO

2. Approche thérapeutique par trans-épissage de la partie C-terminale de la titine

Etant donné l'impossibilité d'apporter l'ADNc de la titine entier par simple thérapie génique du fait de sa taille, l'approche de correction de l'ARNm de la titine par trans-épissage semble adaptée pour modifier les exons C-terminaux portant les mutations entraînant les TMD et la LGMD2J. Afin de tester cette approche, un minigène codant pour les derniers exons et introns de la titine a été construit et cotransfecté avec des plasmides apportant les séquences nécessaires au trans-épissage. Deux approches ont été testées : échanger seulement le dernier exon de la titine (Mex6) étant donné que la plupart des mutations ont été localisées dans celui-ci, et l'échange des trois derniers exons puisque des mutations ont été localisées dans l'exon Mex5. L'échange de ces exons ainsi que l'amélioration du rendement de trans-épissage en optimisant les séquences du PTM ont pu être mis en évidence *in vitro*.

2.1. Trans-épissage de l'exon Mex6 de la titine

2.1.1. Stratégie utilisée

La plupart des mutations entraînant la TMD et la LGMD2J se localisent dans le dernier exon de la titine (Mex6). Dans un premier temps, nous avons donc choisi d'apporter l'exon Mex6 par trans-épissage. Pour cela, une construction a été réalisée codant pour un PTM constitué d'un promoteur, d'un domaine de reconnaissance de l'intron entre Mex5 et Mex6 suivi d'un intron chimérique comportant toutes les boîtes de régulation nécessaire (BP, PPT et SA) puis l'exon Mex6 humain WT fusionné à une étiquette Flag (*Figure 65*).

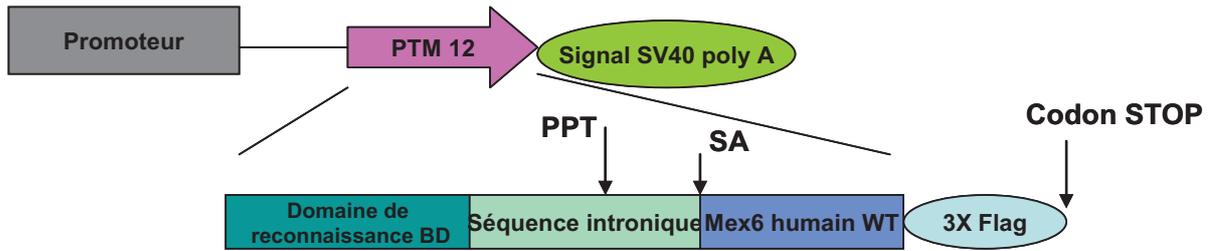


Figure 65 : Plasmide PTM-Mex6

Le PTM utilisé a été construit dans une cassette rAAV. Il est constitué d'un promoteur suivi d'un domaine de reconnaissance de l'intron Mex5-6 (BD), d'une séquence intronique et de la séquence de l'exon Mex6 humain saine suivie d'une étiquette Flag.

Les cellules HER911 ont été choisies pour réaliser la preuve de principe du trans-épissage pour leur facilité à être transfectées contrairement aux cellules musculaires. Ces cellules n'expriment pas la titine, donc un minigène codant pour les exons et les introns Mex2 à Mex6 de la titine et comportant la mutation FINmaj en Mex6 a été construit à partir d'ADN génomique de souris. Ce minigène a été cloné en aval d'un promoteur CMV et étiqueté d'un épitope V5 en C-terminal afin de pouvoir mettre en évidence la protéine (*Fiche technique 9*) (*Figure 66 gauche*).

L'expression de ce minigène en cellule HER911 après transfection a été analysée en WB (*Fiche technique 10*). Le marquage avec un anticorps anti-V5 montre une bande correspondant à l'expression de l'isoforme Mex5+ attendue à 69 kDa et une bande en faible quantité correspondant à la forme alternative Mex5- vers 53 kDa (*Fiche technique 8*). Les autres bandes semblent correspondre à des bandes de dégradation de la protéine synthétisée à partir du minigène de la titine (*Figure 66 droite*).

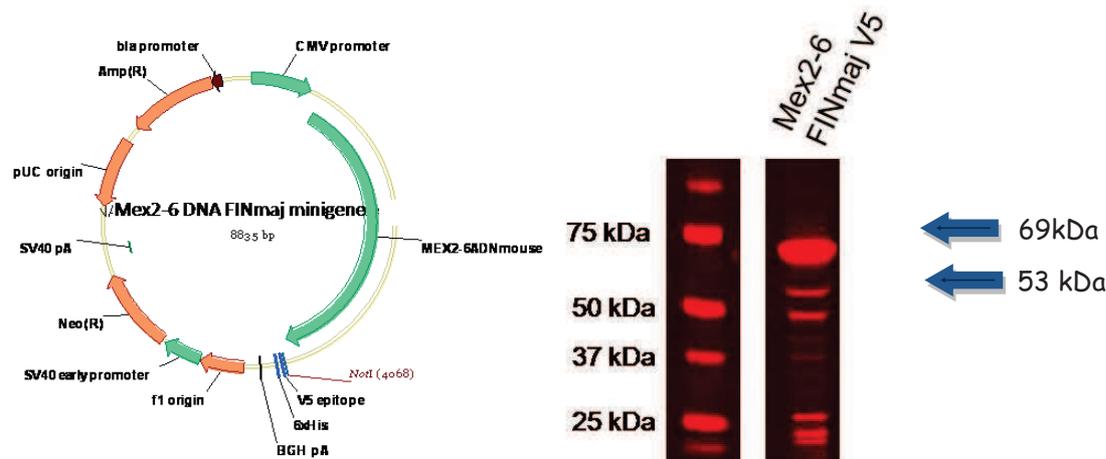


Figure 66 : Réalisation d'un minigène codant la partie C-terminale de la titine.

Gauche : Plasmide codant pour le minigène Mex2-6ADN portant la mutation FINmaj. *Droite :* Marquage de l'épitope V5 (rouge) après dépôt sur Western Blot des protéines issues des cellules HER911 transfectées par le plasmide codant pour le minigène Mex2-6ADN FINmaj. La protéine exprimée à partir du minigène in vitro entraîne les bandes attendues en Western Blot.

Afin de construire une molécule de pré-trans-épissage idéale, nous avons étudié les résultats obtenus par l'équipe de Puttaraju où différentes construction de PTM avec des longueurs de site de reconnaissance différentes avaient été testées (Puttaraju *et al.*, 2001). La construction réalisée pour apporter l'exon Mex6 est constituée d'un site de reconnaissance de l'intron entre Mex5 et Mex6 de 150 nt spécifique seulement de l'intron entre Mex5 et Mex6 et permettant ainsi de créer une boucle de l'ARNpm de 14 nucléotides (construction qui a été montrée comme la plus fonctionnelle pour le trans-épissage du gène muté LacZ) (Puttaraju *et al.*, 2001) (*Figure 67A*) (*Fiche technique 9*).

Différents oligonucléotides ont été synthétisés afin de mettre en évidence spécifiquement l'ARN muté FINmaj (1-2, oligonucléotides en Mex4 et spécifique de la mutation (12pb) en Mex6), l'ARN spécifique du PTM-Mex6 (3-4, oligonucléotides spécifique de Mex6 et Flag) et l'ARNm issu du trans-épissage et corrigé (1-4, en Mex4 et Flag), les tailles attendues sont indiqués dans le tableau (*Figure 67B*).

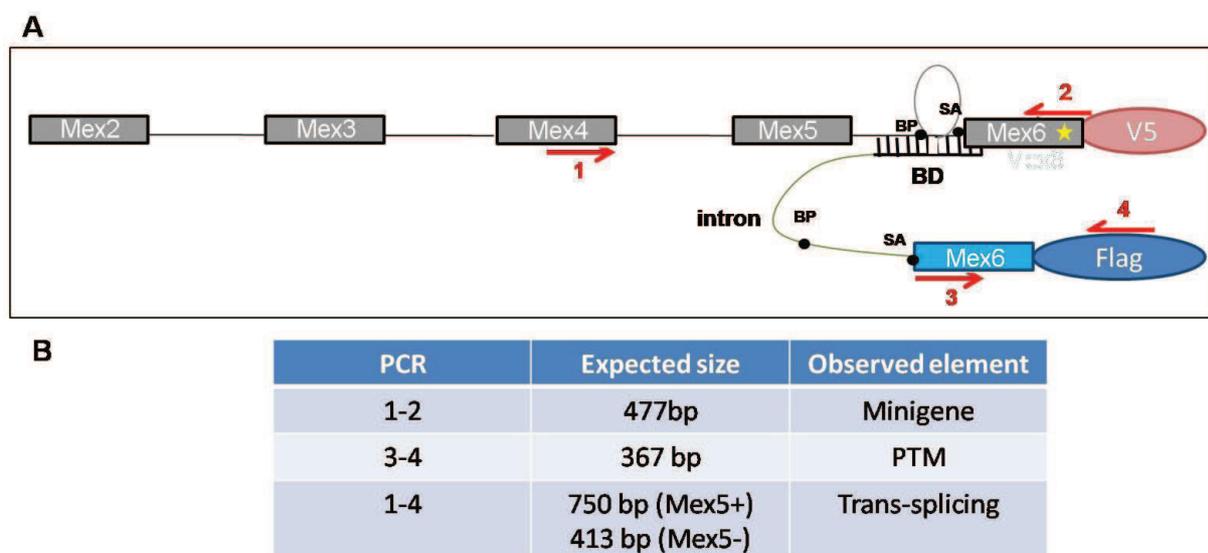


Figure 67 : Stratégie de trans-épissage pour remplacer l'exon Mex6 muté de la titine.

A/ Schéma représentant les 5 derniers exons et introns de la titine étiqueté avec le tag V5 et le PTM s'associant au dernier intron via son BD. La localisation des oligonucléotides spécifiques permettant la mise en évidence des différents éléments est indiquée en rouge. Etoile: mutation FINmaj. **B/** Bandes attendues après RT-PCR permettant de caractériser le minigène, le PTM et le produit de trans-épissage.

2.1.2. Correction du minigène Mex2-6FINmaj *in vitro* en ARN

Les cellules HER911 transfectées soit avec le minigène seul ou le PTM seul ou cotransfectées avec minigène et PTM selon différents ratio moléculaires ont été récoltées 54h après la transfection (*Fiche technique 10*). Les ARN messagers ont été extraits des cellules et une RT a été réalisée (*Fiche technique 3*). La PCR 1-2 permet de mettre en évidence la bande à 477pb qui confirme l'expression du minigène (isoforme Mex5+ seul) dans les échantillons où il a été transfecté ; de même la PCR spécifique du PTM indique la présence du PTM dans les échantillons transfectés (bande à 367 pb).

La réalisation de la PCR spécifique du trans-épissage (1-4) a permis de mettre en évidence la présence d'ARN messenger trans-épissé dans le cas de la cotransfection minigène et PTM : bandes présentes à 750 pb et 413 pb correspondant aux isoformes Mex5+ et Mex5- (*Figure 68*) (*Fiche technique 4*). Etonnamment, l'isoforme Mex5- apparait seulement après le trans-épissage alors qu'il n'est pas visible dans les échantillons transfectés avec le minigène seul. Cet isoforme est néanmoins en moins grande quantité que Mex5+. L'augmentation de la quantité relative de PTM semble améliorer la quantité d'ARNm trans-épissé notamment dans le cas du ratio 1:3 (*Figure 68*).

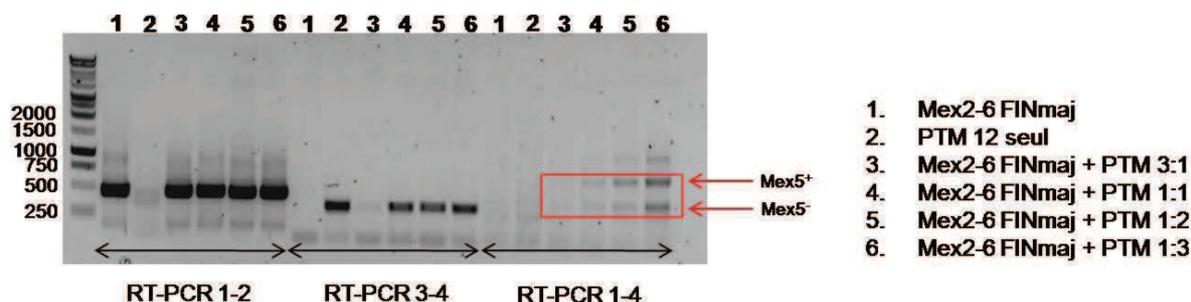


Figure 68 : Preuve de principe du trans-épissage de l'ARNm de la titine *in vitro*.

RT-PCR réalisée après extraction des ARN des cellules transfectées avec le minigène, le PTM ou cotransfectées. Des PCRs spécifiques de chaque élément sont réalisées. 1-2 : minigène, 3-4 : PTM, 1-4 ARNm trans-épissé. L'ARN trans-épissé est visible dans les ratio 1 :1, 1 :2 et 1 :3.

Afin de déterminer si l'épissage entre l'exon Mex5 du minigène et l'exon Mex6 du PTM a maintenu le cadre de lecture de l'ARNm, le séquençage de l'isoforme Mex5+ après trans-épissage a été réalisé grâce à l'oligonucléotide reconnaissant l'étiquette Flag. La séquence obtenue correspond bien à la séquence attendue pour le trans-épissage, c'est-à-dire épissage correct entre le Mex5 murin du minigène et le Mex6 humain apporté par le PTM (*Figure 69*).

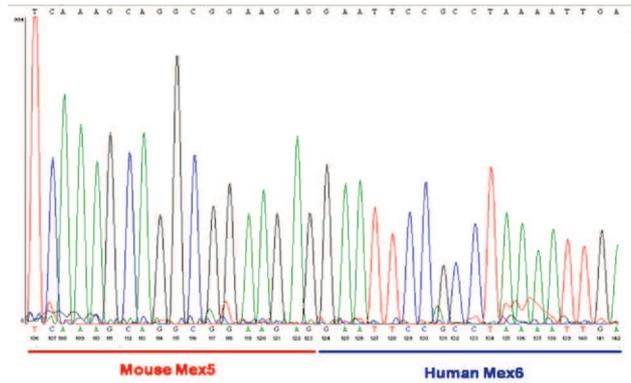


Figure 69: Séquençage du produit de PCR Mex5+ après trans-épissage. La séquence obtenue avec l'oligonucléotide Flag est la séquence attendue après trans-épissage.

2.1.1. Correction de la miniprotéine titine

Les protéines extraites des cellules transfectées sont déposées sur Western Blot et l'hybridation avec l'anticorps anti-V5 et anti-Flag permettent de mettre en évidence respectivement les protéines issues de l'expression du minigène et du trans-épissage (*Fiche technique 8*). Le minigène est présent à la taille attendu de 69 kDa environ (rouge) et le produit de trans-épissage est présent juste au dessous (vert), le produit de trans-épissage étant moins lourd que le minigène) pour le ratio de transfection 1/9 (*Figure 70*). La quantification de la quantité de protéine trans-épissée par rapport à la quantité de protéine totale est de l'ordre de 3 %. Il est important de noter qu'une bande à 15 kDa, spécifique du marquage Flag, est présente dans le cas où le PTM a été transfecté seul. Cette protéine est la conséquence d'un cadre de lecture présent dans le PTM qui induit la traduction d'une protéine de 15 kDa.

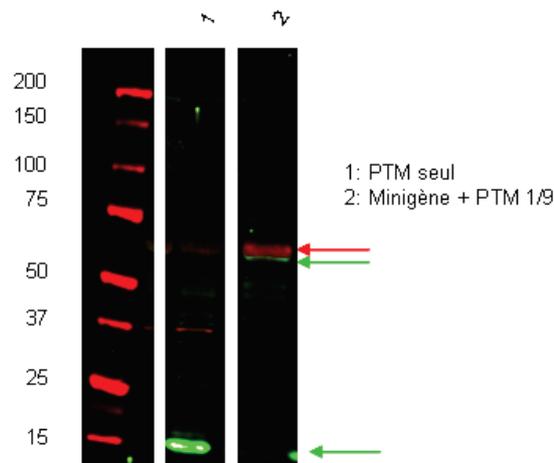


Figure 70 : Trans-épissage de la protéine titine en C-terminal.

Dépôt des protéines extraites à partir des cellules 911 transfectées avec le minigène et/ou le PTM sur Western Blot. Marquage de l'étiquette Flag (vert) et l'étiquette V5 (rouge). Présence de la protéine issue trans-épissage à 60 kDa et présence d'une protéine à 15 kDa.

2.1.1. Ajout de séquences pour l'amélioration du trans-épissage

Pour tenter d'améliorer le rendement d'ARN messager trans-épissé, d'autres constructions de PTM ont été testées. L'une d'entre elle contient la séquence 3'UTR de la titine en aval de l'exon Mex6-FLAG, cette séquence a été amplifiée à partir d'ADN humain et insérée en aval de l'étiquette Flag. Cette séquence 3' UTR serait importante pour un épissage correct des exons en amont (*Fiche technique 9*).

Une autre construction a été réalisée en ajoutant une séquence ISE dans l'intron qui permettrait une meilleure intégration de l'exon Mex6 lors de l'épissage (*Fiche technique 9*). Pour cela, le choix de la séquence ISE s'est fait parmi les séquences consensus connues des ISE étudiés dans différents organes (Castle *et al.*, 2008). Cette équipe a étudié l'expression de 24426 évènements d'épissage alternatif et prédit la régulation en cis dans 48 tissus et lignées cellulaires. Ainsi, ils ont montré l'existence de motifs ISE consensus présents après et avant l'exon permettant l'inclusion de celui-ci selon les organes. Les ISE spécifiques du muscle et présents avant l'exon à intégrer ont souvent un motif U-rich, le motif sélectionné pour notre étude est donc le motif "UUCUCUU" qui a alors été inséré dans la séquence intronique du PTM (*Figure 71*).

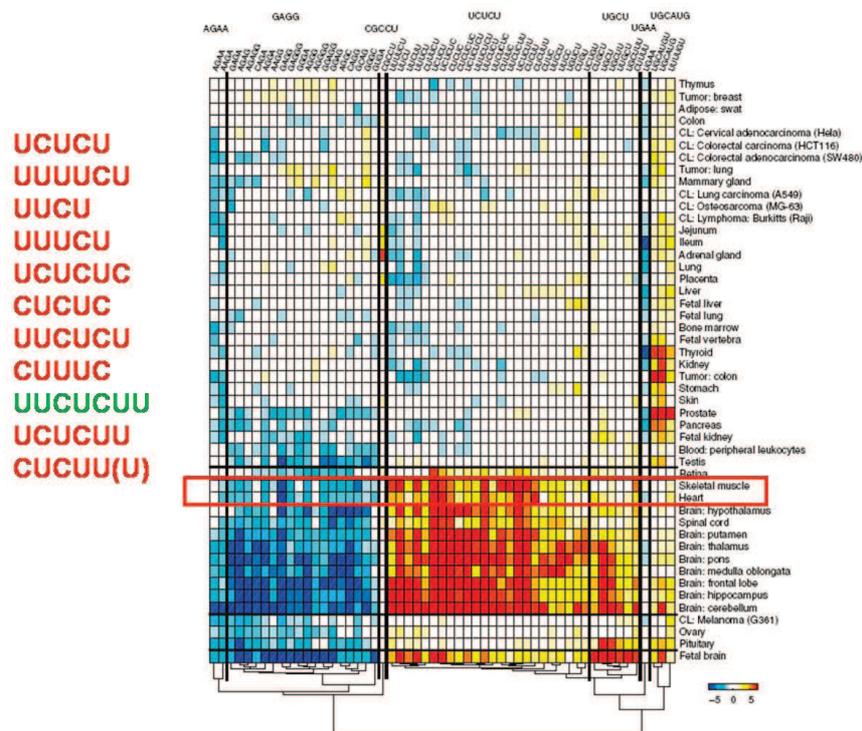


Figure 71 : Séquences consensus ISE déterminées dans différents organes. D'après Castle (Castle *et al.*, 2008). Les séquences consensus ISE sont classifiées selon un score entre -5 (bleu, moins représentées) et 5 (rouge, plus représentées). A droite de la table, les séquences consensus ISE les plus retrouvée dans les muscle et le cœur. La séquence en vert est celle choisie pour notre étude.

La comparaison de ces constructions après RT-PCR sur cellules transfectées (*Fiche technique 10*) (*Fiche technique 3*) (*Fiche technique 4*) a permis de mettre en évidence que l'introduction de la séquence 3'UTR de la titine en aval de l'exon Mex6 améliore la quantité d'ARNm trans-épissé (*Figure 72*). Cette remarque est également valable dans le cas de l'insertion d'un ISE dans l'intron chimérique du PTM (*Figure 72*). Cependant, les ratios ADN utilisé lors de la transfection ne donnent pas les mêmes résultats selon le PTM utilisé. En effet, le ratio 1 :1 est le meilleur dans le cas de l'utilisation du PTM simple et avec 3'UTR alors que le ratio 3 :1 est meilleur dans la construction contenant l'ISE (*Figure 72*).

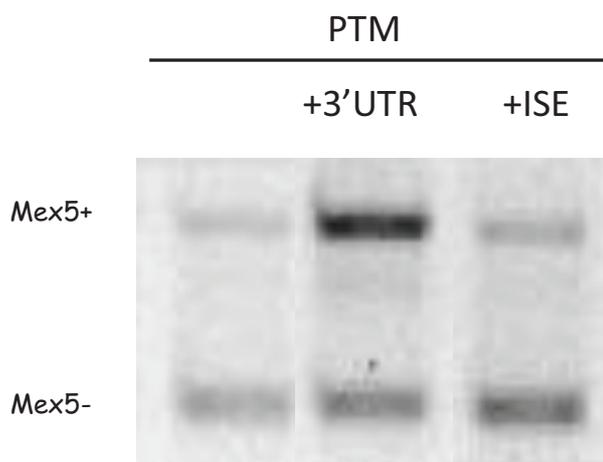


Figure 72 : Comparaison des PTMs simple, avec 3'UTR ou ISE pour le trans-épissage du minigène Mex2-6.

RT-PCR réalisée avec les oligonucléotides spécifiques du trans-épissage sur les ARNs extraits des cellules HER911 cotransfectées avec le minigène et le PTM. La comparaison est faite entre le PTM de base, avec 3'UTR de la titine et celui contenant une séquence ISE dans l'intron.

L'étude de comparaison des quantités de protéine trans-épissée produite pour chaque construction est en cours de réalisation.

2.2. Trans-épissage des exons Mex4 à Mex6 de la titine

Dans le cas des TMD et LGMD2J, d'autres mutations que la mutation FINmaj ont été caractérisées et notamment dans l'exon Mex5. Dans ce cas, la réparation de l'ARNm doit aussi passer par la modification des exons en amont de l'exon Mex6. C'est pourquoi un PTM portant les exons Mex4 à Mex6 a été construit.

2.2.1. Stratégie

Dans ce cas, le PTM apporte les exons Mex4 à Mex6 selon le même mode que pour l'apport de l'exon Mex6 seul (Figure 73). La différence réside dans la construction plasmidique du PTM qui contient les 3 derniers exons de la titine suivis de l'étiquette FLAG (Fiche technique 9). Le domaine de reconnaissance du PTM doit se lier à l'intron entre les exons Mex3 et Mex4 (Figure 73A). D'autres oligonucléotides que ceux précédemment testés ont été dessinés afin de mettre en évidence le minigène, le PTM seul et l'ARN issu du trans-épissage. Les tailles attendues sont indiqués dans le tableau (Figure 73A et B).

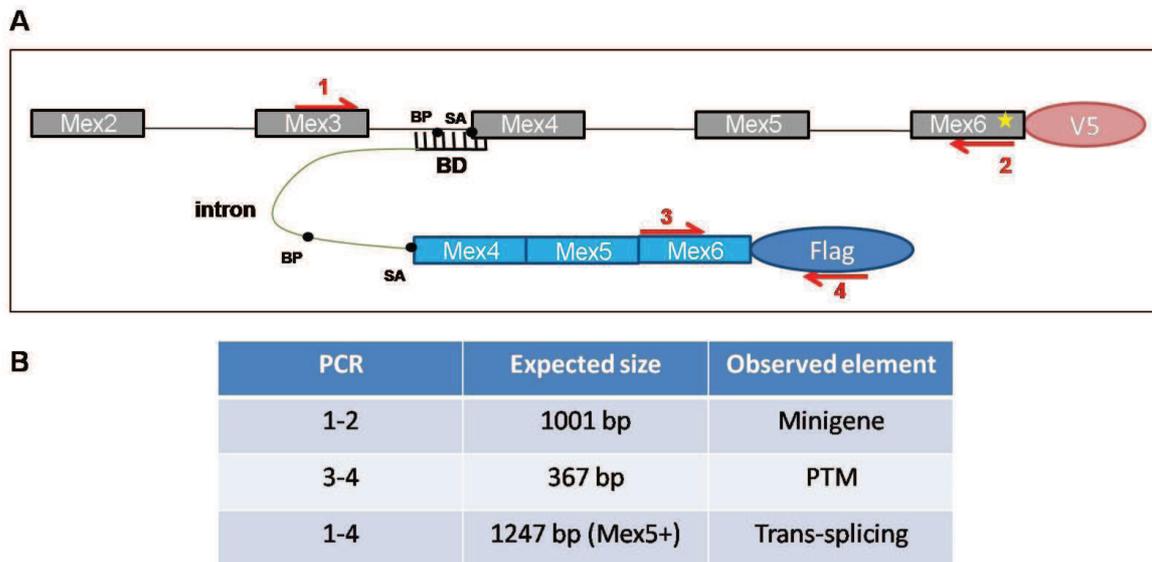


Figure 73 : Stratégie de trans-épissage pour remplacer les exons Mex4 à 6 de la titine.

A/ Schéma représentant les 5 derniers exons et introns de la titine étiqueté avec le tag V5 et le PTM s'associant à l'intron entre Mex3 et Mex5 via son BD. La localisation des oligonucléotides spécifiques permettant la mise en évidence des différents éléments est indiquée en rouge. Etoile: mutation FINmaj. **B/** Bandes attendues après RT-PCR permettant de caractériser le minigène, le PTM et le produit de trans-épissage.

2.2.2. Correction du minigène Mex2-6FINmaj

Les cellules HER911 ont été transfectées avec le minigène codant pour les exons Mex2 à Mex6 portant la mutation FINmaj avec ou sans le PTM Mex3-4 selon différents ratios (Fiche technique 10). Une RT-PCR a été réalisée sur les ARNs extraits des cellules HER911 transfectées grâce aux oligonucléotides spécifiques de chaque élément (Figure 73B) (Fiche technique 3) (Fiche technique 4). La PCR réalisée avec les oligonucléotides 1-4 permet de mettre en évidence une amplification à 1247 pb correspondant à la bande issue du trans-épissage du minigène (Figure 74).

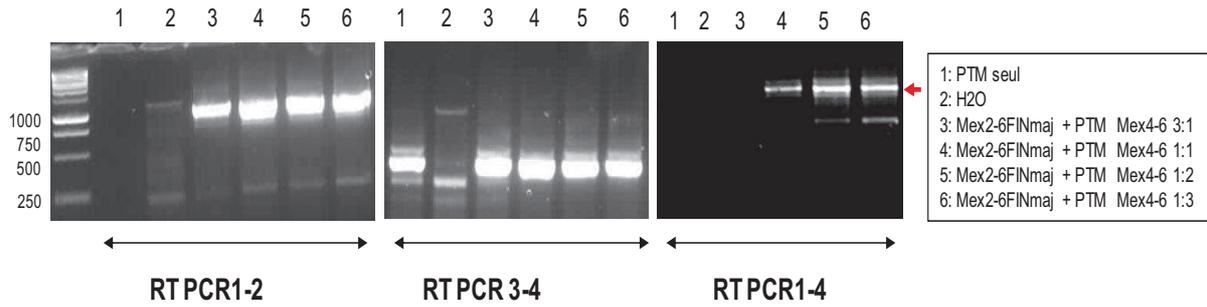


Figure 74 : Mise en évidence du trans-épissage du minigène titine avec le PTM apportant les 3 derniers exons de la titine.

Afin d'augmenter le rendement de production d'ARNm Mex2-6 corrigé par trans-épissage, la séquence ISE a été rajoutée dans l'intron chimérique du PTM Mex3-4 de la même façon que ce qui a été réalisé que le PTM apportant Mex6 (*Fiche technique 9*). En comparant les résultats de RT-PCR obtenus avec les constructions avec ou sans la présence de la séquence ISE dans l'intron, une nette amélioration du trans-épissage dans les conditions où le PTM contient la séquence ISE est constatée grâce à une RT-PCR réalisée avec les oligonucléotides spécifiques de l'ARNm de la titine trans-épissé (*Figure 75*).

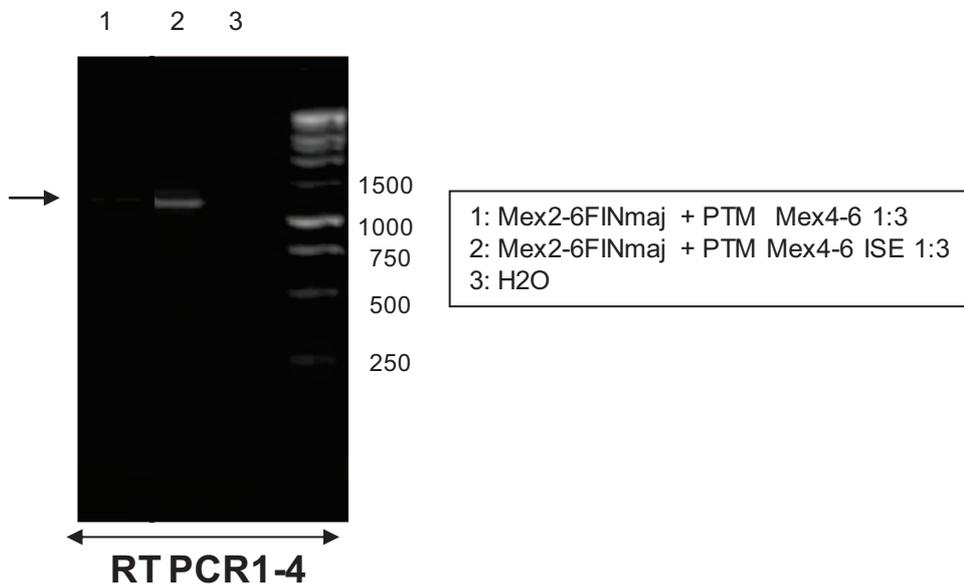


Figure 75 : Comparaison du PTM avec ou sans ISE.

RT-PCR réalisée sur ARNs extraits des cellules HER911 transfectées avec le minigène Mex2-6ADN FINmaj et la construction codant pour le PTM-Mex4-6V5 avec ou sans ISE. PCR réalisée avec les oligonucléotides spécifiques de l'ARNm corrigé.

L'étude des protéines trans-épissée produite après trans-épissage grâce à ces constructions est actuellement en cours.

CONCLUSION: Approches thérapeutiques pour les TMD et LGMD2J

L'étude de la dérégulation de la **calpaïne 3** dans les souris HE et HO pour la mutation FINmaj a permis de constater que la **surexpression** de celle-ci avait tendance à aggraver le phénotype de ces dernières. Par contre, la **diminution de la quantité de C3** dans le cas des souris HE améliore sensiblement le phénotype dystrophique des muscles à 9 mois et 1 an. Cette régulation négative ne permet néanmoins pas la restauration du phénotype des HO.

Le **trans-épissage** des derniers exons de la **titine** a été validé *in vitro* dans des cellules surexprimant le minigène de la titine codant pour ses 5 derniers exons et introns en ARN et en protéine. Les rendements d'ARNm trans-épissés par cette technique ont été améliorés grâce à l'insertion de **séquences régulatrices** de l'épissage dans le PTM.

DISCUSSION

Cette étude a été menée dans le but de mieux comprendre la physiopathologie des TMD et LGMD2J dues à des mutations dans le gène de la titine. Ainsi, en étudiant le modèle KI TTN pour la mutation FINmaj, nous avons pu mettre en évidence que cette mutation entraîne des symptômes dystrophiques assez similaires à ce que l'on peut constater chez l'Homme: atteinte tardive et localisée quand la mutation est à l'état hétérozygote, et une atteinte dystrophique plus généralisée et précoce lorsque celle-ci est à l'état homozygote. Ce modèle, ainsi que des outils utilisés *in vitro*, nous ont permis d'étudier plus en détail les conséquences des mutations entraînant la TMD et la LGMD2J. L'étude de ce modèle a ainsi permis de mieux comprendre les causes de la perte de la partie C-terminale de la titine dans la ligne M dans ces pathologies, la déstabilisation de la calpaïne 3 au niveau protéique et les conséquences de cette mutation sur la protéine obscurine.

Ensuite, nous avons étudié les relations entre la calpaïne 3 et les protéines présentes dans la ligne M. En effet, la calpaïne 3 coupe la titine dans sa partie C-terminale. Nous avons donc étudié le fragment issu de ce clivage *in vitro* et *in vivo*. Un autre partenaire a été montré comme interagissant avec à la fois la calpaïne 3 et la titine dans la ligne M: myospryne. L'étude de la relation entre la calpaïne 3 et myospryne a permis de montrer que cette dernière est un substrat de la calpaïne 3 et pourrait permettre la stabilisation de cette enzyme.

Enfin, nous avons recherché des approches thérapeutiques possibles pour ces pathologies. Au vu des résultats obtenus après croisement des souris KI TTN FINmaj HE avec des souris hétérozygotes pour la calpaïne 3, réguler cette dernière dans les muscles des patients TMD paraît une bonne stratégie pour améliorer l'état dystrophique des muscles. Cette amélioration phénotypique n'a pas été observée dans le cas des souris HO, c'est pourquoi une approche de thérapie génique par trans-épissage a été imaginée et testée *in vitro*. Grâce à cette stratégie, les derniers exons de l'ARNm de la titine muté peuvent-être corrigés.

Cette discussion vise à évaluer la pertinence de nos résultats et est fondée en partie sur des résultats préliminaires non encore confirmés mais présentant un intérêt pour l'élaboration d'hypothèses de travail. Elle est organisée selon les trois parties suivantes: la première présente une comparaison entre l'atteinte du modèle murin pour la mutation FINmaj et l'Homme ainsi que la mortalité embryonnaire observée chez ces souris KI. La deuxième documente les physiopathologies de la TMD et la LGMD2J et propose un modèle pour expliquer celles-ci. Enfin, la troisième partie aborde les approches thérapeutiques testées dans le cadre de ces pathologies et les approches à envisager.

I Un modèle Knock-In murin FINmaj adapté à l'étude des physiopathologies TMD et LGMD2J et aux tests d'approches thérapeutiques

La mutation FINmaj présente dans le dernier exon de la titine Mex6, a la particularité d'entraîner deux types de phénotypes chez l'Homme: une pathologie dominante tardive et peu sévère qu'est la TMD et une pathologie récessive précoce et proximale qu'est la LGMD2J. Afin de mieux comprendre la physiopathologie de ces deux maladies et la caractéristique rare pour une mutation d'aboutir à deux phénotypes distincts (proximal et distal), selon qu'elle soit à l'état hétérozygote ou homozygote, nous avons construit une souris reproduisant la mutation la plus répandue en Finlande. Nous avons ainsi pu caractériser et analyser les souris des 2 génotypes. La première constatation réalisée sur ce modèle concerne une importante mortalité embryonnaire des souris homozygotes et hétérozygotes sur fond *129SVPaSicO/C57Bl/6*. La deuxième constatation concerne les atteintes dystrophiques différentes observées selon le génotype des souris (dans le temps et l'atteinte histologique). Enfin, une importante atteinte cardiaque a été mise en évidence chez les souris HO.

1. Létalité embryonnaire des souris KI TTN FINmaj : implication d'un autre facteur génétique que la titine

Les souris portant la mutation FINmaj sur fond mixte *129SVPaSicO/C57Bl/6* (25%/75%) présentent une distorsion de ratio de naissance importante. En effet, le nombre de souris HE et HO nées est nettement en dessous de la quantité de souris attendue selon les lois de transmission Mendélienne (applicable à la transmission du gène de la titine puisque celui-ci se localise sur le chromosome 2 chez l'Homme et la souris). D'après les résultats que nous avons obtenus chez la souris, la létalité constatée provient d'une mort embryonnaire qui se manifeste entre les stades embryonnaires e12 et e14 (cf [Résultats partie I.2 et Tableau 5](#)). Dans tous les cas, des naissances de souris HE et HO sont néanmoins obtenues, et de façon intéressante, ces souris se portent bien et ne montrent pas de létalité aberrante à l'âge adulte. Ces précédentes indications suggèrent qu'un facteur intervient pendant l'embryogénèse entraînant une mortalité au stade embryonnaire et que les souris nées n'expriment pas ce facteur.

Contrairement aux souris sur fond mixte, les croisements des souris KI TITIN FINmaj sur fond pur *C57Bl/6* (N9) ne montrent pas cette distorsion de ratio de naissance (cf [Résultats partie I.2](#)). Cependant, d'après des résultats préliminaires obtenus récemment (non présentés), l'atteinte musculaire des souris KI TTN FINmaj sur fond pur *C57Bl/6* persiste. Ceci indique que le facteur qui interviendrait dans la mort embryonnaire des souris sur fond mixte, n'est plus présent dans les souris

sur fond pur *C57Bl/6*. Ce facteur provient donc du fond génétique *129SVPaSICO* et n'intervient pas dans le phénotype musculaire dystrophique observé chez les souris KI TTN FINmaj.

Enfin, de façon intéressante, le croisement des souris KI TTN FINmaj avec des souris *capn3^{-/-}* a lui aussi permis de diminuer la mortalité embryonnaire des souris (*Tableau 8*). En effet, la distorsion de ratio n'est pas visible pour les souris HE et HO n'exprimant que 50% de la calpaïne 3. Cependant, pour obtenir cette lignée murine, un croisement entre une souris KI TTN FINmaj sur fond mixte et une souris *capn3^{-/-}* (sur fond pur *C57Bl/6*) a été réalisé. Le fond génétique des souris obtenues est donc modifié (N4). Le facteur génétique induisant la mortalité embryonnaire a été donc moins transmis que dans la N3 et ceci pourrait expliquer la diminution de la mortalité embryonnaire observée.

Le croisement réalisé pour obtenir des souris KI TTN FINmaj sur fond pur montre que la distorsion de ratio de naissance observé est donc la conséquence d'une mortalité embryonnaire due à la mutation FINmaj accompagnée d'un facteur génétique secondaire présent dans le génome des souris *129SVPaSicO*. Nos résultats suggèrent donc qu'un facteur propre au fond génétique *129SVPaSicO* entre en jeu lors de l'embryogénèse et induit la létalité embryonnaire observée.

Les stades embryonnaires situés entre e12 et e14 sont importants puisqu'ils correspondent aux stades où la titine se met en place dans les muscles cardiaque et squelettiques de la souris (Furst *et al.*, 1989). En effet, la titine est présente avant le stade de e12 dans les sarcomères mais n'est visible sur toute la longueur qu'à partir du stade e12 (Furst *et al.*, 1989). De plus, le stade embryonnaire e12 qui correspond à la période de létalité embryonnaire sur fond mixte correspond à la fin de l'organisation du muscle cardiaque (Theiler, 1989). Ce dernier élément peut nous faire penser que la mort embryonnaire des souris KI TTN FIN maj pourrait être la conséquence d'une anomalie cardiaque lors de l'embryogénèse. Une étude détaillée de l'anatomie des embryons pourrait nous conforter dans cette hypothèse. Une comparaison des génomes et des transcriptomes des souris *C57Bl/6* et *129SVPaSicO* nous permettrait aussi d'obtenir des pistes sur les gènes exprimés différemment chez ces souris qui pourraient être la cause de la mortalité embryonnaire.

Ces résultats montrent l'intérêt de caractériser une mutation insérée dans le génome d'une souris sur plusieurs fonds génétiques et sur un fond pur. En effet, les conséquences physiopathologiques d'une mutation sont souvent rapportées comme différentes selon le fond génétique murin étudié. Il est cependant plus rare de constater des problèmes de distorsion de ratio de naissance selon le fond génétique étudié, ce qui est le cas de la mutation FINmaj. Il est important de ne pas perdre de vue que ceci est possible et que modifier le fond génétique d'une mutation peut permettre de renverser

une létalité embryonnaire induite par une mutation. Il faut noter qu'aucun problème de fécondité n'a été rapporté dans les familles finlandaises portant la mutation FINmaj (Udd, 1992), suggérant que le facteur génétique à l'origine des morts embryonnaires chez la souris n'est pas présent dans les familles TMD/LGMD2J connues.

2. Comparaison des atteintes des souris KI TTN FINmaj et humaines

2.1. Etat des lieux

La caractérisation des souris KI TTN FINmaj a été réalisée sur la génération N3 [fond mixte *129SVPaSicO/C57Bl/6* (25%/75%)] en attendant d'obtenir une lignée sur fond pur *C57Bl/6*. De façon intéressante, ce modèle KI TTN FINmaj montre des similarités avec ce qui est observé chez les patients TMD et LGMD2J. Chez la souris, à l'état hétérozygote, la mutation FINmaj induit une atteinte tardive des muscles TA, BF et QUA avec principalement des fibres centronucléées suggérant un phénomène de nécrose-régénération. A l'état homozygote cette mutation entraîne une atteinte musculaire précoce qui commence par l'atteinte du *Soléaire* (avec présence importante de fibres centronucléées et d'inflammation), puis l'atteinte se généralise à d'autres muscles. Le cœur est lui aussi particulièrement atteint dès l'âge de 4 mois

2.2. Souris KI TTN FINmaj HE/TMD (Tableau 9)

La TMD présente des symptômes cliniques qui apparaissent vers l'âge de 35 ans. Le *Tibialis Antérieur* est particulièrement affectée, avec une présentation atrophique. Il faut noter qu'à coté de ce phénotype classique, neuf pourcent des patients montrent une atteinte plus importante avec une dystrophie des muscles *Quadriceps*, *Péronéal*, *Soleus* ou *Gastrocnemius* (Udd *et al.*, 2005). Dans le cas des souris hétérozygotes pour la mutation FINmaj, nous avons pu constater une atteinte tardive (9 mois) avec une importante sélectivité d'atteinte des muscles TA, BF et QUA (*Figure 29*).

L'atteinte du TA à la fois chez les souris HE et l'Homme est particulièrement intéressante si on tient compte du type de fibres constituant ce muscle dans les deux espèces. Le TA chez l'Homme est principalement constitué de fibres lentes alors qu'il est principalement constitué de fibres rapides chez la souris (Staron, 1997; Allen *et al.*, 2001). Ceci peut suggérer que la sélectivité d'atteinte de la TMD n'est pas directement liée au type de myosine qui constitue le muscle.

Cette comparaison de sélectivité d'atteinte entre les muscles humains et murins est difficile car l'utilisation de ceux-ci lors de la marche et/ou l'effort entre le quadripède et le bipède n'est bien sûr pas la même, il donc est difficile de corréliser l'atteinte musculaire humaine (TMD) à l'atteinte

observée chez la souris HE. Enfin, les souris HE ne montrent pas d'atteinte cardiaque ce qui corrèle avec ce qui a été constaté chez l'Homme (Udd *et al.*, 1998). En conclusion, la sélectivité d'atteinte liée à la présence de la mutation FINmaj à l'état hétérozygote étant vraie autant chez l'Homme que chez la souris, nous souhaitons tirer parti du modèle KI TTN FINmaj pour tenter d'identifier les facteurs impliqués dans cette sélectivité. A cette fin, des études de transcriptomique et de protéomique vont être réalisées .

Au niveau histologique, l'atteinte chez les souris HE est principalement visible sous forme de nécrose/régénération des fibres. La mesure des diamètres de fibres montrent des tendances à la variation (fibres plus petites aux âges jeunes, et plus grosses sur les souris plus âgées) (résultats non présentés) cependant rien ne s'est révélé significativement différent de ce qui est observé chez les souris saines. Aucune vacuole bordée n'a été mise en évidence en histologie ou en microscopie électronique. Aucune fibre nécrosée ou remplacement du tissu musculaire par le tissu conjonctif n'a été constaté quel que soit l'âge des souris. Chez l'Homme, il semblerait que l'atteinte soit plus marquée sur les biopsies de patients TMD. En effet, il a été constaté des variations de diamètre de fibres accompagnée de fibres centronucléées, et selon le muscle des fibres nécrosées et basophiles, le remplacement des fibres par du tissu conjonctif ainsi que la présence de vacuoles bordées (Udd *et al.*, 1998). L'atteinte chez la souris HE (sur fond mixte), tout en respectant la sélectivité d'atteinte engendrée par la mutation FINmaj, semble donc moins sévère que ce qui est constaté chez les patients TMD.

2.3. Souris KI TTN FINmaj HO/LGMD2J (Tableau 9)

Les patients atteints de LGMD2J montrent une dystrophie musculaire sévère avec une atteinte des muscles proximaux qui se déclare entre la première et la troisième décade (Udd, 1992). Les souris homozygotes pour la mutation FINmaj présentent, comme chez l'Homme, une atteinte dystrophique précoce qui touche le *Soléaire* (à l'âge de 1 mois), cette atteinte s'étendant aux autres muscles avec l'âge (*TA, PSO, QUAD, GA, GLU* and *BF*) (*Figure 31*). Les muscle *EDL* et diaphragme sont toujours préservés quel que soit l'âge (*Figure 33*).

Le *Soléaire* est un muscle particulier chez la souris puisqu'au contraire des autres muscles, il n'exprime pas la myosine à chaîne lourde IIB qui est la myosine exprimée le plus abondamment chez la souris. De plus, il contient une grande quantité de myosine lente par rapport aux autres muscles (Allen *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter incidemment que le *Soléaire* est un muscle qui est souvent fortement atteint dans les modèles de souris dystrophiques. Malheureusement, les études actuelles

n'ont pas permis de déterminer quel muscle ou groupe de muscle est touché en premier dans la pathologie LGMD2J. L'examen des patients est souvent réalisé tardivement par rapport au début de la pathologie. Il n'est donc pas possible de réaliser une corrélation entre le *SOL* et un muscle humain.

Le fait que le diaphragme ne soit pas atteint chez la souris est en accord avec le fait que les problèmes respiratoires apparaissent très tardivement chez les patients LGMD2J. Par contre, une particularité importante mise en évidence chez la souris KI TTN HO est l'atteinte cardiaque précoce. Celle-ci est observable par une fibrose importante de ce muscle dès l'âge de 4 mois et une cardiomyopathie dilatée mise en évidence à 11 mois (*Figure 39*) (*Figure 40*) (*Tableau 7*). En ce qui concerne les patients atteints de LGMD2J, les 5 patients finlandais décrits sont décédés entre 52 et 65 ans, 4 d'une insuffisance respiratoire et 1 d'un infarctus du myocarde. Un de ces patients a subi une échocardiographie à l'âge de 55 ans qui n'a indiqué aucune cardiomyopathie. L'autopsie d'un autre patient qui est décédé à l'âge de 64 ans a montré que son cœur présentait une hypertrophie ventriculaire. Il est donc difficile, au vu de ces constatations, de conclure à une association d'un phénotype cardiaque à la pathologie LGMD2J. Cependant, les résultats obtenus sur la souris, suggèrent qu'il peut être intéressant de suivre de près l'état cardiaque des patients atteints de titinopathies et d'envisager la possibilité de diagnostic LGMD2J pour des patients atteints d'une dystrophie musculaire associée à des problèmes cardiaques.

L'atteinte histologique des muscles chez la souris montre principalement des profils de nécrose/régénération associés, selon les muscles, à de l'inflammation et de l'infiltration graisseuse. Chez l'Homme, les données obtenues sont principalement relatives aux autopsies des patients LGMD2J. Les muscles de ces patients montrent un remplacement très important du muscle par du tissu graisseux fibrotique (Penisson-Besnier *et al.*, 2010). Néanmoins, une jeune patiente LGMD2J diagnostiquée récemment montre une importante faiblesse musculaire qui n'est pas liée au remplacement du muscle par du tissu graisseux (Penisson-Besnier *et al.*, 2010). La présentation histologique de la mutation à l'état homozygote n'est donc pas totalement comparable entre Homme et souris et l'atteinte histologique du modèle murin sur fond mixte reste moins prononcée (même à des âges avancés) que chez l'Homme.

Des noyaux de fibres apoptotiques ont été constatés sur les biopsies de patients LGMD2J en quantité plus importante que dans les biopsies TMD (Haravuori *et al.*, 2001). Dans les biopsies musculaires de souris, bien que quelques noyaux apoptotiques aient pu être constatés (*Figure 36*), ceux-ci ne sont pas des noyaux de fibres mais des noyaux présents à l'extérieur des fibres qui pourraient correspondre à des cellules satellites. Cette présentation semble différente de ce qui est

observé chez l'Homme. Bien qu'un marquage spécifique des cellules satellites doit être réalisé pour vérifier cette hypothèse, il sera nécessaire de comprendre pourquoi et comment la mutation FINmaj pourrait entraîner la mort d'autres types cellulaires que les fibres elles-mêmes dans ces pathologies.

Conclusion sur la comparaison de l'atteinte Homme-souris:

L'étude du modèle murin KI TTN FINmaj a permis de constater que l'insertion de la mutation FINmaj entraîne chez la souris des conséquences similaires à ce qui a été constaté chez l'Homme. Néanmoins il existe une atteinte histologique plus **modérée** chez la souris et une **létalité embryonnaire** due à la présence de la mutation FINmaj et à un autre facteur génétique qu'il reste à déterminer ainsi qu'une **atteinte cardiaque** non diagnostiquée chez l'Homme (*Tableau 9*). Etant donné que ce modèle est peu sévère, il sera difficile de mettre en évidence une amélioration phénotypique chez les souris KI TTN HE lors d'essais d'approches thérapeutiques. Il faudrait donc tenter d'aggraver le phénotype soit par un croisement en retour sur fond génétique *129SVPA SiCO* (actuellement en cours) soit le fond génétique DBA connu pour être un fond génétique permettant d'obtenir de souris plus sévèrement atteinte au niveau des muscles (Heydemann *et al.*, 2005). Ce modèle semble néanmoins tout à fait adapté à l'étude des physiopathologies de la TMD et de la LGMD2J et à l'essai de stratégies thérapeutiques.

		Homme	Souris
1 allèle muté	Atteinte tardive	+	+
	Peu de muscles atteints	+	+
	Létalité embryonnaire	-	+ (N3)
	Conséquences fonctionnelles	+	-
2 allèles mutés	Manifestations de la maladie précoce	+	+
	Sévère	+	+
	Affecte un grand nombre de muscles	+	+
	Conséquences fonctionnelles	+	+
	Atteinte du cœur	-	+
	Létalité embryonnaire	+	+ (N3)

Tableau 9 : Comparaison des conséquences phénotypiques de la mutation FINmaj chez l'Homme et la souris à l'état hétéro- et homozygote.

II Conséquences moléculaires des mutations à l'origine des TMD/LGMD2J

Les caractéristiques moléculaires observées chez les patients TMD et LGMD2J ont été mises en évidence dans le modèle murin KI TTN FINmaj puisque la perte des domaines C-terminaux de la titine ainsi que la diminution de la quantité de calpaïne 3 ont été constatées. La compréhension de ces conséquences moléculaires est importante pour mieux appréhender les physiopathologies de ces deux maladies et envisager des traitements pour celles-ci.

Les deux pathologies montrent une sélectivité et une sévérité d'atteinte des muscles différentes qui méritent d'être étudiée afin de déterminer les facteurs d'origine. Le mécanisme impliquant la perte de la ligne M et la calpaïne 3 semble être l'unique mécanisme à l'origine de la TMD. La LGMD2J semble être elle la conséquence d'un mécanisme supplémentaire impliquant d'autres partenaires de la titine dans la ligne M. Cette partie de la discussion vise à proposer un modèle pour la compréhension de chacune de ces pathologies par rapport aux événements moléculaires déjà identifiés : perte de la ligne M, dérégulation de la calpaïne 3 et perturbation de l'obscurine dans les différentes mutations connues pour entraîner une TMD.

1. La perte des domaines C-terminaux de la titine

Les marquages WB et immunohistochimiques de la titine à partir de biopsies de patients TMD et LGMD2J avaient préalablement mis en évidence respectivement une diminution et une disparition des domaines C-terminaux de la titine (Hackman *et al.*, 2002). Chez la souris, la perte des domaines en C-ter de la titine a été constatée dans les muscles squelettiques ainsi que cardiaque (*Figure 43*). C'est la première fois que cette perte est rapportée dans le cœur, cette mise en évidence n'ayant pu être réalisée chez les patients TMD ou LGMD2J étant donné la difficulté de réaliser cette recherche. Comme chez l'Homme, cette perte des domaines protéiques a été montrée comme non liée à un problème d'épissage qui aurait pu être engendré par la présence de la mutation (modification d'un ESE par exemple) (Hackman *et al.*, 2002) et (*Figure 44*). Elle est donc probablement liée à une coupure protéolytique de la titine en C-ter. La présence de la mutation FINmaj, n'empêche pas la formation des sarcomères et n'entraîne pas de déstructuration majeure de ce dernier comme nous avons pu le constater grâce aux analyses par microscopie électronique sur les muscles des souris KI TTN FINmaj (*Figure 37*). Il est maintenant important de 1) déterminer où se situe exactement la coupure protéolytique, quelle(s) protéase(s) est/sont à l'origine de cette coupure et à quel moment celle-ci a lieu, 2) déterminer ce que deviennent ces domaines C-terminaux une fois clivés et enfin 4) déterminer

comment cette perte des domaines C-terminaux pourrait concorder avec la sélectivité d'atteinte observée dans la TMD et la LGMD2J, et tout ceci afin de mieux comprendre le mécanisme physiopathologique des TMD et LGMD2J.

1.1. Localisation et provenance de la perte de la partie C-terminale de la titine

Nos résultats indiquent que la coupure protéolytique a lieu en aval du domaine M4 comme ce qui avait déjà été montré chez l'Homme (Hackman *et al.*, 2002) et en amont/ou sur le domaine is6 codé par l'exon Mex3 (*Figure 42*). Une mutation en décalage de phase dans Mex3 est connue pour entraîner l'EOMFC et conduire à un désassemblage des sarcomères (Carmignac *et al.*, 2007). Le fait que les sarcomères des souris et des Hommes homozygotes pour la mutation FINmaj ne montrent aucun désassemblage alors que la position de la mutation EOMFC concorde avec la localisation du site de coupure suggère que la perte des domaines C-terminaux est postérieure à la mise en place des sarcomères. L'étude d'un modèle délété de façon conditionnelle des 4 derniers exons de la titine nous permettra de vérifier que ces domaines C-ter sont nécessaires à l'assemblage du sarcomère.

La calpaïne 3 nous était apparu comme un bon candidat pour expliquer la perte de ces domaines C-ter de la titine. En effet, cette dernière a la particularité d'interagir avec le domaine is7 (Kinbara *et al.*, 1997), est capable de couper la titine en 2 points *in vitro* (Taveau *et al.*, 2003; Kramerova *et al.*, 2004) situés d'après nos prédictions dans les domaines is6 et M9-is7 (*Figure 54*) et enfin semble dérégulée secondairement à la mutation FINmaj. Nos travaux ont montré cependant que la calpaïne 3 n'est pas impliquée dans la coupure des domaines C-terminaux de la titine en présence de la mutation FINmaj puisque ces domaines sont également absents chez une souris HO n'exprimant pas la calpaïne 3 (*Figure 46*). Par contre, les calpaines ubiquitaires se présentent comme protéases candidates pouvant être à l'origine de ce clivage. L'une d'entre elle interagit avec la titine (Delgado *et al.*, 2001) : la calpaïne 1 dont le rôle de coupure de la titine post-motem pour désassembler le sarcomère a déjà été souligné (Astier *et al.*, 1991; Huff-Lonergan *et al.*, 1996; Raynaud *et al.*, 2005). Nous avons montré que la calpaïne 1 et la calpaïne 2 sont capables de couper la titine *in vitro* (*Figure 47*) au niveau du domaine M7 qui correspond en outre à la localisation du site de la perte des domaines C-ter de la titine en présence de la mutation FINmaj (entre M4 et is6). Afin de relier la coupure de la titine mutée aux calpaines ubiquitaires, des inhibiteurs de ces dernières pourraient être utilisés pour définir si celles-ci sont à l'origine de la coupure (Hoang *et al.*).

1.2. Relation entre sélectivité d'atteinte et perte des domaines C-terminaux de la titine

Cette perte des domaines C-terminaux de la titine s'élève à 50% chez les souris HE et 100% chez les souris HO (*Figure 43*) Ces domaines sont absents dans tous les muscles testés dont l'EDL qui a la particularité d'être un muscle non atteint dans les deux pathologies murines. La perte des domaines C-terminaux de la titine dans tous les muscles, qu'ils soient sains ou atteints, peut indiquer que ces domaines sont plus importants dans certains muscles que d'autres.

La question qui reste en suspens est donc quelle est la différence moléculaire qui existe entre les muscles atteints et les muscles non atteints au niveau de la titine dans la ligne M et qui pourrait expliquer cette sélectivité? Une différence connue à propos de ces domaines C-terminaux de la titine selon les muscles, est l'inclusion alternative de l'exon Mex5. Les données obtenues sur l'inclusion de Mex5 selon le muscle n'ont été réalisées que chez le lapin (Kolmerer *et al.*, 1996). Selon le muscle, ce domaine est plus ou moins inclus dans la titine. Certains muscles ont donc plus besoin de ce domaine que d'autres. Dans le cas des TMD et de la LGMD2J ainsi que chez la souris, la perte des domaines C-terminaux de la titine inclut ce domaine is7. Par conséquent, il est possible que les muscles correspondant exprimant normalement une grande quantité d'isoforme is7+ soient plus atteints que ceux exprimant naturellement moins d'isoforme is7+. Afin de déterminer si le type d'isoforme normalement exprimé et l'atteinte du muscle sont liées, la quantification des ratios des isoformes Mex5+/Mex5- dans tous les muscles de souris saines est actuellement en cours. L'étude d'une souris délétée du domaine is7 pourrait être intéressante pour mieux comprendre l'utilité de ce domaine dans le muscle.

Enfin, les interactions protéiques de la titine dans la ligne M peuvent être différentes selon le muscle. Certains partenaires de la ligne M de la titine sont peut-être exprimés ou ont une fonction différente selon les muscles. De ce fait, l'étude de la physiopathologie des TMD et LGMD2J doit être basée sur les interactions protéiques de la titine dans la ligne M. Des quantifications de chacune de ces protéines partenaires (calpaïne 3, obscurine, obsl1, et myospryne) dans chacun des muscles de la souris permettraient peut-être de corrélérer l'atteinte des muscles de la souris avec la sélectivité d'atteinte de chacune des pathologies.

1.3. Devenir de la partie C-terminale de la titine

Bien que nous ne sachions pas exactement où a lieu la coupure protéolytique de la titine en présence de la mutation FINmaj, nous avons pu montrer qu'elle se localise dans un intervalle entre les domaines M4 et is6 de la titine. L'étude de la localisation et de la fonction du fragment de titine C-ter de 45 kDa libéré par la coupure de la calpaïne 3 peut nous aider à comprendre le devenir des domaines C-terminaux coupés de la titine en condition pathologique. Nous avons pu montrer que le fragment p45 surexprimé dans une souris est ubiquitiné et se condense dans des vacuoles qui perturbent l'état de la cellule (*Figure 58*). Dans le cas de la mutation FINmaj, on peut être amené à penser que le fragment libéré lors de la coupure pathologique de la titine mutée étant en quantité excédentaire, et ayant des tendances à l'aggrégation, va s'accumuler et finir par engorger la machinerie du protéasome et/ou d'autophagie le rendant toxique pour la cellule. La quantification de l'activité des différentes enzymes du protéasome ainsi que l'expression des marqueurs de l'autophagie sont en cours sur le modèle KI TTN FINmaj afin de déterminer si ces voies de dégradation sont modifiées.

2. Dérégulation de la calpaïne 3

La diminution de la quantité de calpaïne 3 avait été constatée chez les patients LGMD2J et de façon aléatoire chez les patients TMD (Haravuori *et al.*, 2001). Chez la souris, il a été constaté que la quantité de calpaïne 3 n'est pas diminuée dans les muscles des souris HE mais fortement diminuée dans les muscles des souris HO. L'étude approfondie des muscles des souris KI TTN FINmaj HO a permis de conclure au fait que cette diminution protéique est due à une déstabilisation de la calpaïne 3 et non à une diminution de la transcription de son ARNm (*Figure 49*) (*Figure 50*). Il reste à comprendre pourquoi une déstabilisation de calpaïne 3 a lieu et comment cette dernière entraîne-t-elle des conséquences pathologiques chez les TMD et LGMD2J.

2.1. Lien entre la perte des domaines C-terminaux de la titine et la diminution de la quantité de calpaïne 3

La perte des domaines C-terminaux de la titine n'est pas due à l'action de la calpaïne 3. Il est par contre possible que la perte de ces domaines C-terminaux soit la cause de la dérégulation de la quantité de calpaïne 3. Une diminution de la quantité de calpaïne 3 dans le muscle avait déjà été constatée dans un autre modèle murin présentant une délétion de 83 acides aminés dans la région N2A, les souris *mdm*. De façon intéressante, cette région comporte un site d'interaction à la calpaïne 3 (Garvey *et al.*, 2002; Huebsch *et al.*, 2005). De plus, cette région a été montrée de façon

expérimentale comme inhibant la calpaïne 3 (Hayashi *et al.*, 2008). Le fait que les mêmes résultats soient constatés dans le modèle KI TTN FINmaj renforce l'idée que la ligne M (et plus particulièrement le domaine is7) puisse jouer le même rôle régulateur que le domaine en N2A. En effet, la calpaïne 3 se fixe au domaine is7 (Kinbara *et al.*, 1997) de la titine et ce domaine n'est plus présent dans les souris KI TTN HO . Cette calpaïne 3 ne peut donc plus se fixer à son inhibiteur potentiel et va alors s'activer et couper ses substrats . Les conditions de la diminution de la quantité de calpaïne 3 serait donc similaire dans ces deux modèles murins : la perte du domaine d'interaction entraînerait la libération de la calpaïne 3 qui irait va alors couper ses substrats dont-elle-même, ce qui induirait une diminution secondaire de la quantité de cette protéine (*Figure 76*).

Dans le cas de la mutation à l'état hétérozygote, il serait intéressant de déterminer pourquoi aucune diminution de calpaïne 3 n'est constatée chez la souris alors que 50% des domaines C-terminaux de la titine sont absents et devraient donc entraîner des conséquences similaires. Cette différence de présentation entre l'Homme et la souris n'est pas résolue.

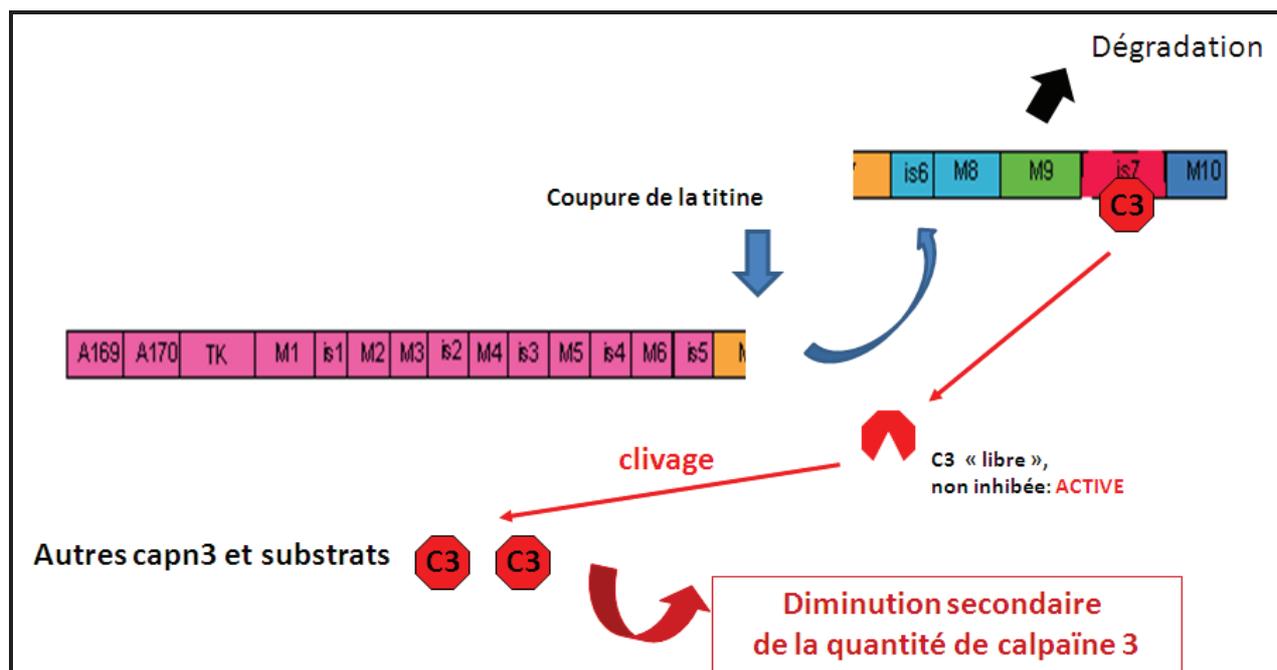


Figure 76 : Modèle proposé pour expliquer la diminution de la quantité de la calpaïne 3 dans les muscles des souris HO et des patients LGMD2J.

2.2. Implication de la calpaïne 3 dans la TMD et la LGMD2J

2.2.1. Chez les HE

L'injection de calpaïne 3 dans les souris HE montre une aggravation de l'état dystrophique du muscle (*Figure 60*), alors qu'une diminution de 50% de la quantité de calpaïne 3 dans les souris KI TTN FINmaj HE permet la restauration de l'état du muscle aux âges de 9 et 12 mois (*Figure 61*). Ceci indique que la dérégulation de la calpaïne 3 chez les souris HE pour la mutation FINmaj est un mécanisme majeur dans la pathologie et donc probablement pour la TMD. Cependant, il reste à comprendre pourquoi aucune diminution de calpaïne 3 dans les muscles des souris n'a été constatée. L'étude de la fonction de la calpaïne 3 dans ce modèle peut nous aider à mieux comprendre le rôle de cette dernière dans le muscle mais aussi de mieux comprendre la cascade d'évènements qui a lieu en aval de la calpaïne 3 dans la TMD et pourquoi celle-ci est particulièrement importante dans les trois muscles de souris atteintes à l'état hétérozygote : le *TA*, *QUA* et le *BF*.

2.2.2. Chez les HO

Dans le cas des souris HO, les domaines C-terminaux de la titine sont totalement absents, la calpaïne 3 n'est donc plus du tout régulée. Elle est donc potentiellement très active et pourrait donc entraîner des conséquences beaucoup plus délétère que la présentation des souris HE. Pourtant lorsque ces souris sont croisées avec des souris calpaïne 3 déficientes, aucune amélioration musculaire n'a été constatée (*Figure 64*) suggérant que la calpaïne 3 n'intervient pas seulement dans la pathologie LGMD2J contrairement à la TMD. Ceci peut nous amener à penser que la diminution de la quantité de calpaïne 3 dans les muscles des souris et des patients LGMD2J pourrait entraîner des conséquences proches de ce qui est vu chez les patients LGMD2A ou les souris *capn3^{-/-}*. La comparaison des souris KI TTN FINmaj HO et *capn3^{-/-}* (*Tableau 10*) indique que l'atteinte est effectivement ressemblante, néanmoins certains muscles montrent une atteinte plus importante chez les KI TTN FINmaj (comme le *QUA*). De plus, les données obtenues en IRM chez les patients (Udd *et al.*, 2005), ainsi que lors de la caractérisation des souris, montrent que la LGMD2J est plus sévère que la LGMD2A. Par conséquent, il est possible qu'un autre mécanisme supplémentaire à celui en cause chez les HE soit à l'origine de l'atteinte entraînée par la mutation à l'état homozygote. Cet autre mécanisme pourrait passer par les autres partenaires de la titine dans la ligne M telle que l'obscurine par exemple.

Muscle	KI TTN FINmaj HO 6 mois	capn3 ^{-/-} 6 mois
TA	centro +++	centro +++
SOL	centro+++/inflammation+++/perte de force+	centro+++/inflammation+++/perte de force+
PSO	centro+++/inflammation+	centro +++/inflammation -
QUA	centro ++	pas d'atteinte
GLU	centro +/inflammation ++	centro +/inflammation ++
GA	centro+ / inflammation ++	centro+ / inflammation ++
EDL	pas d'atteinte	pas d'atteinte

Tableau 10 : Comparaison de l'atteinte histologique des souris capn3^{-/-} et KI TTN FINmaj N3.
Centro=centronucléation

3. Implication de l'obscurine et de l'obscurine like 1 dans les TMD/LGMD2J

L'obscurine et son homologue l'obscurine like 1 interagissent avec la titine (domaine M10) via leurs domaines Ig1. L'obscurine est délocalisée dans les biopsies de patients atteints de LGMD2J (Fukuzawa *et al.*, 2008). Cette étude n'a pour le moment pas été menée sur des biopsies de muscles de patients TMD. Nos travaux nous ont permis de montrer que c'est aussi le cas dans les souris homozygotes pour la mutation FINmaj mais pas dans le cas des HE (*Figure 52*). Cependant, dans le cas des souris HE comme des patients TMD, il est possible que 50% de titine WT suffise à maintenir la stabilité générale de l'obscurine. En tous les cas, ces résultats confortent l'idée que l'obscurine a un rôle important à jouer dans la physiopathologie de la LGMD2J.

Une meilleure connaissance du rôle de l'obscurine pourrait nous aider à mieux comprendre son implication dans la physiopathologie de la LGMD2J. La seule anomalie musculaire constatée chez les souris KO obscurine est la présence de fibres centronucléées dans le TA à partir de l'âge de 12 mois (Lange *et al.*, 2009b). L'étude de ce modèle a permis de montrer que les interactions croisées obscurine-sAnk1.5 et titine permettraient l'organisation des composants du réticulum sarcoplasmique à la strie Z et à la ligne M (Armani *et al.*, 2006). De toute évidence, tous ces paramètres méritent d'être étudiés dans les souris KI TTN FINmaj, notamment les conséquences sur les protéines Ank1.5, l'état du réticulum sarcoplasmique chez celles-ci ainsi que la régulation du calcium dans ce modèle.

4. Un modèle pour la TMD et la LGMD2J ?

L'étude de la mutation FINmaj dans le modèle murin ainsi que les données que nous avons chez l'Homme permet de dessiner un premier aperçu des physiopathologies de la TMD et de la LGMD2J. Cette mutation FINmaj entraîne des conséquences telles que la perte de la ligne M, une diminution de calpaïne 3 ainsi que la délocalisation de l'obscurine *in vivo*. *In vitro*, la présence de la mutation empêche le domaine M10 d'interagir avec l'obscurine ainsi que l'obs1 et myospryne. Enfin, notre étude a montré qu'en présence de la mutation, la calpaïne 3 coupe la titine de façon aberrante.

La comparaison des conséquences moléculaires de l'ensemble des mutations responsable de TMD et de LGMD2J et l'identification des points communs devraient nous permettre de dégager les éléments sous tendant la physiopathologie ([Tableau 11](#)). Ces points communs entre chacune des mutations décrites (Lille, Belge et FINmaj) sont la perte de la ligne M ainsi que le fait que la structure 3D de la partie C-ter de la titine soit modifiée (structure 3D [Figure 77](#) et (Pernigo *et al.*, 2010)). Pour aucune des mutations, l'interaction avec la calpaïne 3 n'est abolie *in vitro* ([Figure 48](#)). Les différences concernent l'interaction avec les protéines obscurine et obscurine like 1 qui interagissent toujours avec la mutation Belge *in vitro*. Mais il est à noter que la mutation Belge a la caractéristique d'entraîner une TMD beaucoup moins sévère que les autres, donc ces protéines partenaires sont probablement des facteurs supplémentaires qui jouent sur la sévérité de la TMD.

	<u>FINmaj</u>	<u>Lille</u>	<u>Belge</u>
Perte des domaines C-ter de la titine	+	+	+
Perte interaction obscurine <i>in vivo/ vitro</i>	+ / +	+ / ?	- / ?
Perte interaction C3	-	-	-
Perte interaction myospryne <i>in vitro</i>	-	?	?
Structure 3D modifiée	+	+	+ / -
Aberration de clivage des domaines C-ter de la titine <i>in vitro par la calpaïne 3</i>	+	+	-

Tableau 11 : Comparaison des conséquences moléculaires connues par les mutation FINmaj, Lille et Belge.

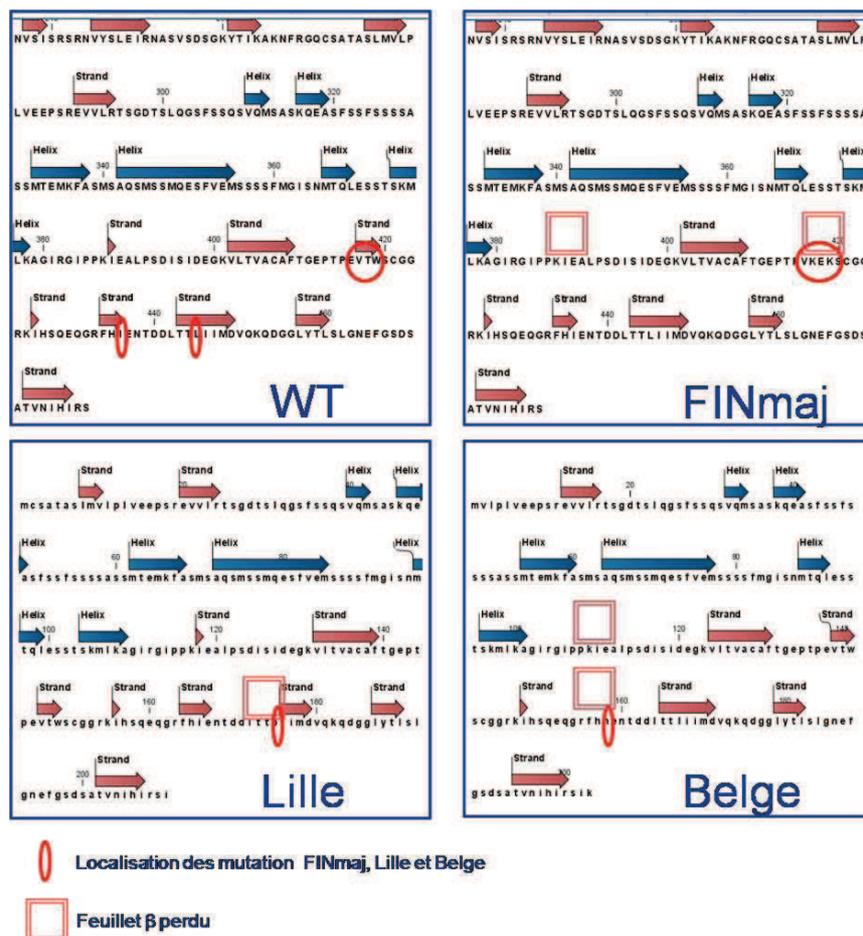


Figure 77 : Localisation des hélices α et feuillets β des derniers domaines de la titine selon la présence de la mutation WT, FINmaj, Lille et Belge. Figures obtenues par le logiciel CLC BIO : <http://www.clcbio.com/>.

Toutes ces données peuvent nous permettre de postuler un mécanisme : le sarcomère se forme correctement avec soit 50% (TMD) soit 100% de titine mutée (LGMD2J). La titine est plus ou moins bien repliée à cause de la présence des mutations. Le modèle proposé par Shabarchin et coll. (Shabarchin and Tsaturyan, 2010), suggère que la ligne M régule le domaine TK de la titine présent en amont. Si la ligne M est mal structurée, celle-ci ne peut donc pas correctement réguler ce domaine essentiel dans la vie du sarcomère. On peut donc penser que ce domaine normalement régulé de façon négative dans le sarcomère au repos et activé lors de l'étirement, va, en présence de mutations, réagir de façon différente à l'ATP et activer dans certaines conditions anormales des voies de signalisation qui vont entraîner la coupure de la ligne M par une enzyme encore à définir. Afin de déterminer si l'hypothèse de l'implication du domaine TK dans ces pathologies, l'étude des voies de signalisations connues en aval du domaine TK doit être réalisées et la cinétique de liaison de l'ATP au

domaine TK en présence de la mutation FINmaj devrait être étudiée en utilisant la microscopie à force atomique (AFM) par exemple (Puchner *et al.*, 2008).

Cette perte des domaines C-terminaux va entraîner la libération des partenaires de la ligne M dont la calpaïne 3 qui peut alors couper ses substrats. Dans la TMD, 50% de la titine WT permettrait de tamponner la calpaïne 3 et stabiliser les autres partenaires et limiter les dégâts (Figure 78). Cependant, dans les deux cas, ces mécanismes sont probablement beaucoup plus complexes que ce qui est expliqué et une meilleure compréhension des physiopathologies permettra d'étoffer et de valider ou invalider ces modèles.

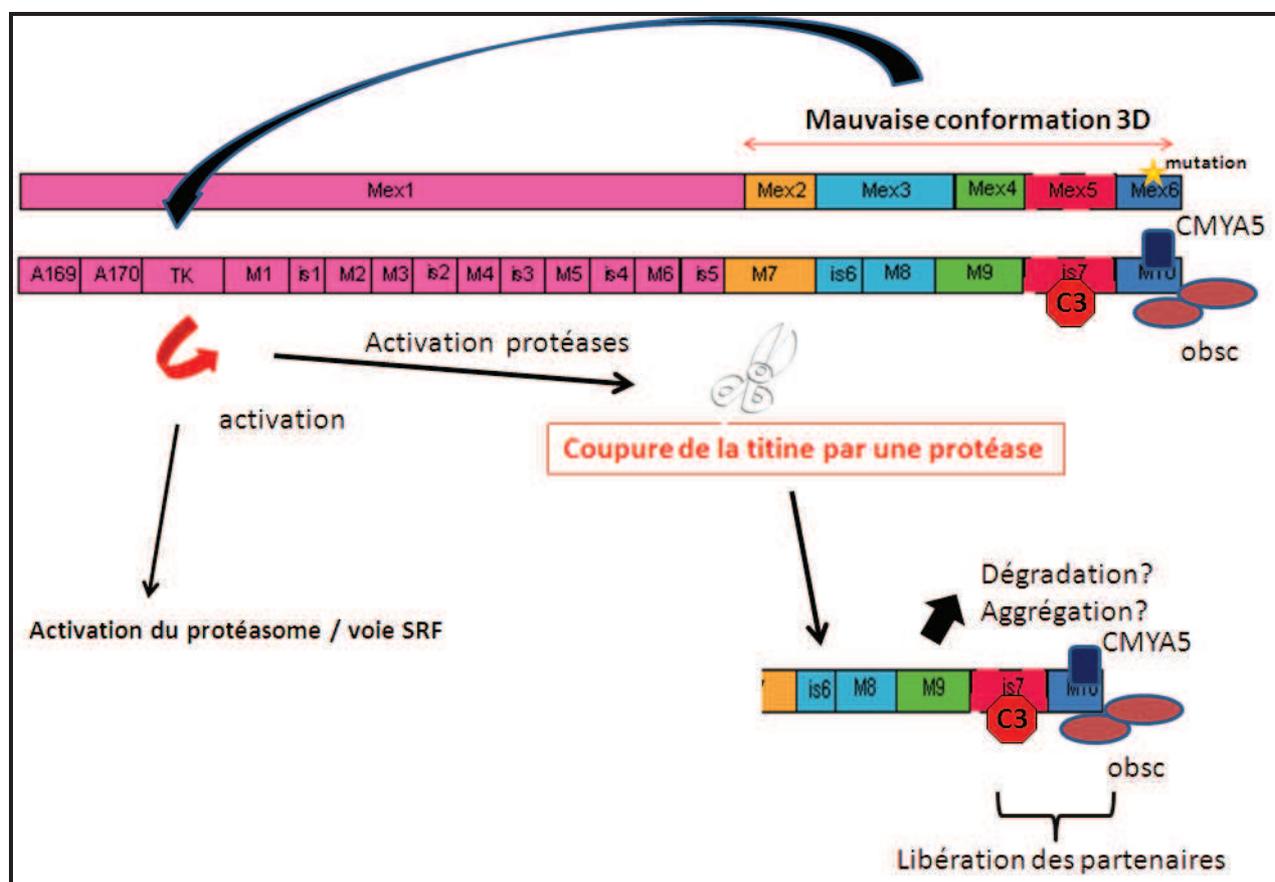


Figure 78 : Modèle proposé pour le mécanisme induit par la présence des mutations à l'origine de la TMD et de la LGMD2J.

Conclusion sur les conséquences moléculaires de la mutation FINmaj:

En conclusion, le modèle KI TTN FINmaj reproduit les conséquences moléculaires de la TMD et la LGMD2J (*Tableau 12*). La **dérégulation de la calpaïne 3** qui semble être due à la perte des domaines C-terminaux de la titine semble être un mécanisme majeur dans la TMD et il semble que d'autres partenaires comme l'**obscurine** semblent être impliqués dans la LGMD2J. L'étude de ce modèle a et va continuer à servir à mieux **comprendre la physiopathologie** de ces maladies mais aussi mieux comprendre le fonctionnement des **complexes protéiques** présents dans la ligne M : titine, calpaïne 3, obscurine, obscurine like 1, les myomésines et myopsryne.

		Homme	Souris
1 allèle muté	Perte des domaines C-terminaux de la titine 50%	+	+
	Diminution de la quantité de C3	+/-	-
	Déstabilisation de l'obscurine	?	-
2 allèles mutés	Perte des domaines C-terminaux de la titine 100%	+	+
	Diminution variable de la quantité de C3	+	+
	Déstabilisation de l'obscurine	+	+

Tableau 12 : Comparaison des conséquences moléculaires de la mutation FINmaj chez l'Homme et la souris à l'état hétéro- et homozygote.

III Approches thérapeutiques pour la TMD et la LGMD2J

Les patients atteints de TMD ou de LGMD2J n'ont à l'heure actuelle aucune thérapeutique disponible. L'étude des souris KI TTN FINmaj a permis d'envisager une approche thérapeutique pour les patients TMD par diminution de la quantité de calpaïne 3 exprimée. Néanmoins, cette approche ne paraît pas valable pour les patients atteints de LGMD2J. C'est pourquoi une approche de thérapie génique par trans-épissage a été imaginée pour les deux pathologies.

1. Diminuer la quantité de calpaïne 3 chez les patients TMD

1.1. Etat des lieux

L'étude des souris KI TTN FINmaj a permis de constater qu'une diminution de 50% de la quantité de calpaïne 3 permet d'empêcher l'apparition des signes de la pathologie (nécrose-régénération) dans les muscles touchés des souris HE. Une approche thérapeutique par diminution de la quantité de calpaïne 3 modérée serait donc adaptée au traitement des patients TMD.

1.2. Les approches envisageables

Afin d'envisager une approche thérapeutique pour les TMD, il est nécessaire de réaliser une preuve de principe de la diminution partielle de la quantité de calpaïne 3 dans le muscle *in vivo*. Pour cela différentes stratégies sont envisagées : La première consiste à diminuer la quantité de calpaïne 3 par l'utilisation d'ARN interférent. Des oligonucléotides 2'OMe antisens spécifiques de la calpaïne 3 sont actuellement en cours d'essai sur les muscles de souris WT afin de déterminer si l'un d'entre eux permet de diminuer l'expression de la calpaïne 3 *in vivo*. La seconde approche consiste à réaliser du saut d'exons dans l'ARNpm de la calpaïne 3 grâce à des oligonucléotides antisens permettant d'éliminer un exon critique pour l'activité protéolytique ou d'induire une rupture du cadre de lecture en début de séquence. Enfin, il serait également possible d'utiliser un inhibiteur spécifique de l'enzyme calpaïne 3 cet inhibiteur pouvant être un anticorps de la calpaïne 3, une molécule chimique, une protéine ou un peptide ayant une activité inhibitrice spécifique. Concernant l'utilisation d'anticorps spécifiques de la calpaïne 3, certains sont disponibles et pourraient être testés. Concernant les protéines ou peptides d'intérêt, nos travaux nous ont permis de constater que la protéine myospryne (CMYA5, cardiomyopathy-associated 5) pourrait permettre d'assurer l'inhibition de la calpaïne 3 (*Figure 59*). Pour toutes ces approches, une injection en loco-régional pourrait suffire puisque peu de muscles sont touchés chez l'Homme atteint de TMD.

Les autres pathologies connues entraînant une diminution de calpaïne 3 (Carmignac *et al.*, 2007) présentent peut être aussi des signes dystrophiques conséquences de la suractivation de la calpaïne 3. Si cela s'avère être le cas, elles pourraient aussi jouir d'une telle approche thérapeutique.

Chez les souris *mdm*, la diminution de la quantité de calpaïne 3 pour diminuer les symptômes a été testée avec la génération d'un double mutant *mdm* et KO *capn3*. Cependant aucune amélioration du phénotype *mdm* n'a été constatée. Or, le fait d'induire un KO total de la calpaïne 3 entraîne une dystrophie des muscles des souris (Richard *et al.*, 2000). Une diminution de la quantité de calpaïne 3 de 50% serait donc probablement plus adaptée pour déterminer si la diminution de la quantité de calpaïne 3 dans les souris *mdm* pourrait permettre une restauration partielle ou totale du phénotype.

1.3. Les limites

Le problème majeur de ces approches reste le fait que diminuer la quantité de calpaïne 3 chez les patients TMD est un problème éthique puisqu'en effet la calpaïne 3 mutée à l'état homozygote entraîne elle-aussi une dystrophie des ceintures (LGMD2A) (Ono *et al.*, 1998). De ce fait, ces approches thérapeutiques doivent permettre certes la diminution de la quantité de calpaïne 3 mais ne pas totalement l'inhiber. Les deux techniques envisagées ont rarement des efficacités de 100%, ce qui permet de ne pas tendre vers l'inhibition totale de la calpaïne 3. De plus, ces traitements pourraient être injectés de façon espacés pour éviter une trop forte inhibition de la calpaïne 3 dans le temps. Dans tous les cas, ces approches thérapeutiques doivent être envisagées avec suffisamment de recul et nécessitent de trouver des solutions pour réguler finement l'inhibition de la calpaïne 3 chez les patients.

2. Trans-épissage de la partie C-terminale de la titine

2.1. Etat des lieux

La diminution de la quantité de calpaïne 3 ne semble pas améliorer le phénotype des souris HO, la précédente approche ne pourra donc pas être applicable seule aux patients atteints de LGMD2J. C'est pourquoi une autre approche thérapeutique doit être envisagée. La thérapie génique classique ne permet pas d'apporter le cDNA de la titine entière du fait de sa taille. Une approche de chirurgie de l'ARNm par trans-épissage a donc été adaptée à la titine. L'échange du dernier exon de la titine (Mex6) ou des trois derniers exons (Mex4-5-6) a été réalisé *in vitro* sur un minigène codant les cinq derniers exons de la titine. Les expériences menées pour démontrer la faisabilité de cette approche a permis de mettre en évidence en ARN le trans-épissage du minigène que ce soit avec les

constructions apportant le dernier exon ou les trois derniers. Les quantités d'ARN trans-épissé restant cependant faibles, des améliorations telles que l'ajout du 3'UTR endogène de la titine et l'ajoute d'un ISE dans l'intron synthétique, ont permis de mettre en évidence un meilleur rendement de l'ARNm trans-épissé. Enfin, la protéine trans-épissée a été constatée avec une efficacité de trans-épissage de l'ordre de 3% de la protéine totale.

2.2. Amélioration du trans-épissage

Un certain nombre de laboratoires ont testé des approches par trans-épissage pour des gènes à l'origine de maladies monogéniques. La plupart des preuves de principe ont montré un trans-épissage de leur ARNm d'intérêt *in vitro* et quelques une *in vivo* (Tableau 3). Néanmoins, dans tous ces travaux, la quantité d'ARN ou de protéine obtenue après trans-épissage est souvent faible (Mansfield *et al.*, 2000; Puttaraju *et al.*, 2001; Chao *et al.*, 2003).

Dans ce travail, nous avons réalisé la preuve de principe de trans-épissage de la titine *in vitro*. Nous avons testé différents PTM sur un minigène de la titine, codant pour les 5 derniers exons de celle-ci, afin de déterminer celui qui pourrait donner les meilleurs résultats. Dans le cas du trans-épissage de la partie C-terminale de la titine, il semble clair que l'ajout de la séquence 3' UTR est favorable à une meilleure intégration des exons apportés (Figure 72). Les séquences présentes dans le 3'UTR interviennent probablement sur l'épissage lui-même mais aussi dans la stabilité de l'ARNm produit (Bolognani and Perrone-Bizzozero, 2008). De la même façon, l'ajout d'un ISE dans l'intron du PTM a permis d'améliorer le trans-épissage comme ce qui a été constaté pour l'échange d'exon dans la dystrophine (Lorain *et al.*, 2010). Ces séquences ISE sont tout à fait appropriées à ce genre d'approche puisqu'elles permettent une meilleure intégration de l'exon ou des exons apportés par le PTM. Afin de correctement comparer les différents PTM utilisés, il serait nécessaire de réaliser une quantification par RT-PCR quantitative de chacun d'entre eux. Les témoins nécessaires à cette expérience sont en cours de construction au sein du laboratoire.

Enfin, la comparaison du taux de trans-épissage de la protéine selon les PTM utilisés doivent être réalisées. Pour le moment, un taux de trans-épissage de 3% de la protéine totale a été mis en évidence avec notre construction de base permettant l'échange de l'exon terminal Mex6. Ce pourcentage est faible mais les taux d'efficacité de trans-épissage en ARN comme en protéine déjà obtenus dans la littérature sont de l'ordre de 1 à 45% en ARN et de 1 à 8% en protéine (Mansfield *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2003; Lorain *et al.*, 2010) et nos PTMs peuvent être améliorés grâce à l'utilisation des séquences citées plus haut. De plus, des améliorations phénotypiques ont été

constatées *in vivo* dans des pathologies comme SMN (Coady and Lorson, 2010), montrant que, bien que le trans-épissage soit un phénomène assez rare, celui-ci peut permettre de corriger une atteinte.

Avant d'envisager une approche de trans-épissage de la titine *in vivo*, il est nécessaire de montrer la faisabilité du trans-épissage sur l'ARNpm endogène. L'aboutissement de ce travail passera par le test du trans-épissage de la titine *in vivo* sur les souris KI TTN FINmaj grâce à un vecteur AAV apportant le PTM ayant démontré la meilleure efficacité de trans-épissage du ou des derniers exons la titine.

2.3. Une thérapie par trans-épissage : envisageable et adaptée pour les TMD et LGMD2J?

Le trans-épissage des derniers exons de la titine, comme nous avons pu le montrer, est réalisable pour les TMD et LGMD2J et par définition cette approche peut être adaptée à toutes les titinopathies et de façon plus large à toutes les maladies monogéniques. Cependant, certains points concernant la particularité des derniers domaines de la titine, l'efficacité et la spécificité de cette méthode méritent d'être discutée ici dans le cadre des TMD/LGMD2J.

Le trans-épissage permettant l'échange du dernier exon Mex6 nécessite d'apporter celui-ci dans un PTM, dans lequel les séquences en amont de cet exon sont différentes de celles de l'ARNpm naturel de la titine. L'exon Mex5 est un exon alternatif dont l'épissage dépend notamment des séquences introniques en amont et en aval. Par conséquent, le fait d'apporter Mex6 entouré de séquences différentes peut perturber l'épissage alternatif naturel de Mex5 dans la cellule. Nous ne connaissons pas les risques sur la cellule d'une perturbation de cet épissage alternatif et donc d'une modification du ratio naturel des isoformes Mex5+ et Mex5- de la titine.

Nous avons également testé le trans-épissage de la titine en apportant les exons Mex4 à 6. Dans ce cas, la séquence du PTM apporte l'ADNc codant les exons Mex4 à Mex6. Par conséquent, l'exon Mex5 est présent dans toutes les molécules d'ARN trans-épissé et seul l'isoforme Mex5+ peut être synthétisé. Afin d'éviter des problèmes physiologiques liés à l'inclusion ou l'exclusion de Mex5, il semble nécessaire d'apporter les derniers exons de la titine ainsi que les derniers introns afin que l'épissage de Mex5 soit correctement épissé. L'approche de trans-épissage doit de façon général prendre en compte les épissages alternatifs naturels de l'ARNpm ciblé.

La viabilité d'une approche de trans-épissage nécessite de savoir si une faible quantité d'ARNm titine réparée est suffisante pour réverser le phénotype TMD ou LGMD2J. Chez les LGMD2J, il est clair que la correction de 50% de la titine mutée permettrait au moins d'améliorer le phénotype des

patients puisque la TMD reste nettement moins sévère que la LGMD2J. Par ailleurs, les constatations réalisées sur les patients souffrant d'EOMFC (mutations en Mex1 ou Mex3) a permis de déterminer que les parents porteurs sains hétérozygotes de la mutation exprimaient en fait une quantité relative plus importante de titine saine que de titine mutée tronquée en c-ter en raison d'un mécanisme de Nonsense Mediated RNA Decay (NMD). L'incorporation de plus de 50% de titine saine dans le sarcomère permet donc d'éviter à ces porteurs sains hétérozygotes de déclencher une pathologie musculaire. Ceci peut nous amener à penser qu'un peu plus de 50 % de titine saine intégrée dans le sarcomère permettrait de réverser le phénotype TMD. Par conséquent, le taux d'efficacité du trans-épissage ne nécessite pas d'être très important pour penser réverser le phénotype TMD.

Le trans-épissage a de nombreux avantages : en effet, la modification des exons ayant lieu sur l'ARNpm, la titine reste sous le contrôle de son promoteur endogène, ce qui n'est souvent pas le cas dans les approches de thérapie génique classique. De plus, l'épissage alternatif peut être conservé en ajoutant les introns nécessaires. Enfin, aucune réponse immune contre le transgène ne devrait avoir lieu. Des point négatifs sont tout de même à souligner notamment le risque de trans-épissage croisé avec d'autres ARNpm (Puttaraju *et al.*, 1999; Kikumori *et al.*, 2001) et le fait que le PTM seul puisse générer une protéine (montré dans le cas du PTM de la titine) ([Figure 70](#)) qui pourrait alors soit s'accumuler dans la cellule, ou encore entraîner une réponse immune. Il est donc nécessaire de modifier les séquences du PTM de façon à ce que ces deux derniers points n'aient pas lieu notamment en évitant les cadres de lectures existants par modification des ATG présents sur le PTM.

3. Perspectives et autres approches thérapeutiques pour les TMD/LGMD2J

Les approches thérapeutiques décrites dans ce mémoire semblent adaptées au traitement de la TMD et de la LGMD2J. Cependant, il existe des inconvénients non négligeables à ces deux approches : dans le cas de la diminution de calpaïne 3 pour la TMD, le fait que la calpaïne 3 est à l'origine d'une autre dystrophie des ceintures peut être un frein à la mise en place de cette approche chez l'Homme. Enfin la quantité de trans-épissage de l'ARNm de la titine pourrait ne pas suffire à générer suffisamment de titine saine et donc pourrait ne pas permettre de réverser les phénotypes des deux pathologies décrites. Une réflexion particulière doit donc être menée sur les autres voies possibles pour traiter ces pathologies.

L'étude de la physiopathologie des TMD et LGMD2J sur les souris KI TTN FINmaj nous a déjà donnée une piste sur la régulation de la calpaïne 3 dans le cas des TMD. L'étude plus approfondie de

ce modèle murin peut nous permettre de déterminer plus en détail ces physiopathologies et ainsi envisager d'autres approches géniques ou pharmaceutiques.

L'approche de saut d'exon peut être envisagée pour certaines titinopathies où la mutation se trouve dans un domaine répété de la titine mais cette approche n'est pas éligible dans le cas des mutations connues à l'origine des TMD et/ou LGMD2J. En effet, ces mutations sont positionnées dans une séquence unique et par conséquent entraînerait probablement des conséquences graves sur la protéine.

Enfin, comme expliqué précédemment, l'incorporation de plus de 50% de titine saine dans le sarcomère permet d'éviter aux porteurs sains hétérozygotes des mutations en Mex1 ou Mex3 de déclencher une pathologie musculaire. Par conséquent, la diminution de l'ARNm muté de la titine dans le cas de la mutation FINmaj pourrait permettre d'améliorer le phénotype des patients TMD. Des approches utilisant les oligonucléotides antisens peuvent permettre de diminuer l'allèle muté et privilégier l'incorporation de la titine saine dans le sarcomère des patients TMD.

Conclusion sur les approches thérapeutiques:

Ce travail a permis de proposer deux approches thérapeutiques pour la TMD et la LGMD2J. **La diminution de la quantité de calpaïne 3** pour la TMD peut-être envisagée *via* l'utilisation d'oligonucléotides antisens. En parallèle l'approche par **trans-épissage** doit être améliorée pour augmenter la quantité d'ARN et de protéine trans-épissée. Enfin, l'étude plus approfondie du modèle murin peuvent permettre d'envisager d'autres approches thérapeutiques pour ces pathologies. Dans tous les cas, les approches thérapeutiques devront être testées *in vivo* sur le modèle KI TTN FINmaj avant de déterminer laquelle est la plus adaptée et d'envisager alors une approche clinique .

CONCLUSION

L'étude du modèle KI TTN FINmaj nous a permis de mieux comprendre la physiopathologie des TMD et LGMD2J, cependant toutes les conséquences moléculaires de la présence des mutations dans l'avant dernier et le dernier exon de la titine n'ont pas été encore élucidées. La compréhension de la de l'origine de la perte des domaines C-terminaux ainsi que les dérégulations observées sur les partenaires (calpaïne 3, obscurine) doit être poursuivie. En effet, mieux connaître une pathologie c'est aussi mieux comprendre comment la traiter. Cette constatation est d'autant plus vraie que c'est sur ce modèle que l'étude de la calpaïne 3 chez les KI TTN FINmaj nous a permis de déterminer que la régulation de l'expression de cette protéase chez les souris HE pourrait permettre d'améliorer l'état dystrophique des muscles. Les stratégies pour diminuer cette quantité de calpaïne 3 dans les muscles sont à l'essai (saut d'exon ou RNAi). Enfin, comme cette approche ne semble pas être applicable à la LGMD2J, l'approche de trans-épissage envisagée peut être efficace pour les deux pathologies. Pour le moment, la preuve de principe a été réalisée *in vitro*, mais le modèle murin, qui comme l'a montré cette étude reproduit plutôt bien les pathologies humaine, va nous permettre de tester les constructions les plus efficaces *in vivo* afin de déterminer si cette approche est viable et suffisante pour traiter l'une et/ou l'autre de ces pathologies. La meilleure approche thérapeutique pour chacune de ces pathologies vise ainsi à être déterminée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Fiche technique 1 : Construction des souris KI TITIN, Tg p45 et KO conditionnel ligne M, croisements et génotypages de ces lignées murines

Toutes les souris ont été traitées conformément à la directive du Conseil de la Communauté européenne du 24 Novembre 1986 (86/609/CEE).

Les constructions des souris Knock-In pour la mutation FINmaj, ainsi que les souris Tg p45 ont été réalisées par la Clinique de la Souris en accord avec les protocoles standardisés (MCI/ICS, Illkirch).

Souris KI TITIN FINmaj

➤ **Construction**

La construction du vecteur de ciblage utilisé pour la génération de la souris Knock-In FINmaj a été réalisée à l'Institut « Clinique de la souris » (ICS, France). Un fragment de 2,2 kb englobant les exons Mex2 à Mex6 de la titine a été amplifié par PCR sur de l'ADN génomique de souris 129S2/SvPas avec des amorces modifiées afin d'introduire la mutation *GAAATAACATGG* → *GTGAAAGAAAAA* dans l'exon 6. Le fragment muté a été sous-cloné dans un vecteur contenant une cassette de résistance lox- néomycine. Deux fragments de 2,8 kb et 3,6 kb (correspondant aux bras d'homologie 5' et 3', respectivement) ont été amplifiés par PCR sur de l'ADN génomique de souris 129S2/SvPas et sous-clonés directement en amont et en aval de la construction du plasmide précédent afin de générer la construction finale. La séquence des plasmides a été vérifiée par restriction et tous les exons et les jonctions exon-intron ont été séquencés.

La construction linéarisée a été électroporée dans des cellules souches embryonnaires (ES) de souris 129S2/SvPas, et les colonies G418-résistantes ont été isolées et amplifiées. La séquence des clones obtenus a été validée après amplification PCR en utilisant des amorces externes et confirmée par Southern blot avec des sondes externes 5' et 3' et a permis d'identifier un clone avec un allèle correctement ciblé. Après caryogramme, le clone transgénique ES a été injecté dans des blastocystes C57BL/6 qui ont été réimplantés dans des mères porteuses pour générer des souris chimères. La transmission à la lignée germinale a été obtenue après croisement des chimères mâles avec des femelles transgéniques CMV-CRE exprimant la CRE recombinase sous le promoteur CMV, permettant l'excision de la cassette néo. Le transgène Cre a été éliminé par un premier croisement sur fond C57BL/6; les souris hétérozygotes résultantes ont ensuite été récroisées sur 3 générations sur fond C57BL/6, puis croisées entre elles. Toutes les souris ont

été traitées conformément à la directive du Conseil de la Communauté européenne du 24 Novembre 1986 (86/609/CEE).

L'introduction de la mutation dans le génome murin a été vérifiée par séquençage de fragments de PCR obtenus par amplification de l'ADN de queue, isolé en utilisant le kit REExtract-N-PCR AmpTM tissues (Sigma), à l'aide des amorces TTN 1180-située autour du site-loxP (GCTATCTGCACCTCAAAATCTGTGGGTTG) et TTN 1183 (GAACCCTGACCCTCTGGAAGAACATC). Les allèles résultant de type sauvage et mutant correspondent à des fragments de PCR de 414 et 502 pb respectivement.

➤ **Génotypage des souris**

Extraction d'ADN : un prélèvement du bout de la queue de la souris est réalisé (0,5 cm). Ce fragment tissulaire est ensuite digéré et l'ADN génomique en est extrait en suivant le protocole du kit REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (SIGMA).

Amplification PCR : Les oligonucléotides utilisés s'hybrident de part et d'autre du fragment lox présent dans le génome du modèle KI-TITIN. Leurs séquences sont :

- 5'-GCTATCTGCACCTCAAAATCTGTGGGTTG -3' pour l'amorce en 5'
- 5'- GAACCCTGACCCTCTGGAAGAACATC -3' pour l'amorce en 3'.

La polymérase utilisée est la Jumpstart Taq contenue dans le kit REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (SIGMA). L'amplification PCR est réalisée pendant 30 cycles, l'hybridation se faisant pendant 30s à 59°C.

Migration : les produits de PCR sont déposés sur gel 2%. Les tailles de fragments attendus sont de 414 pb pour l'allèle normal, 502 pb pour l'allèle muté (car une séquence lox est restée après excision de la cassette néo).

➤ **Séquençage de la mutation**

Oligonucléotides utilisés :

Mex4F : 5' GGCTAAGAATTTCCACGGCC 3'

Souris KI TTN / KO^{C3}

Le modèle de souris portant à la fois la mutation FINmaj et l'allèle mutant de la calpaine 3 a été obtenu par croisement de souris femelles avec des souris mâles déficients en calpaine 3 (Richard et al., 2000). Le génotypage pour les mutations FINmaj et calpaine 3 a été réalisé sur l'ADN de

queue extrait comme décrit ci-dessus pour les allèles sauvages et mutés de la titine. L'amplification par PCR pour les allèles calpaïne 3 a été réalisée avec les amorces

GW255 5' : (AGTCTTCCTTCCAAAGTTGCCTGC)

GW 257 5' : (GTGCTACTTCCATTTGTCACGTCC)

GW 259 3' : (ACTTCTCTGAAGCAAAGTCCAGCC).

La polymérase utilisée est la Jumpstart Taq contenue dans le kit REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (SIGMA). L'amplification PCR est réalisée pendant 30 cycles, l'hybridation se faisant pendant 30s à 63°C.

Les produits de PCR résultant de type sauvage et mutant correspondent à des fragments de PCR de 380 et de 480 pb respectivement.

Souris Tg p45

La construction du vecteur à insérer utilisé pour la génération de la souris Tg p45 a été réalisée à l'Institut « Clinique de la souris » (ICS, France). La transmission à la lignée germinale a été obtenue après croisement des chimères mâles avec des femelles transgénique CMV-CRE exprimant la CRE recombinase sous le promoteur CMV, permettant l'excision de la cassette néo. Le transgène Cre a été éliminé par un premier croisement sur fond C57BL/6; les souris hétérozygotes résultantes ont ensuite été rétrocroisées sur 3 générations sur fond C57BL/6, puis croisés entre elles.

➤ **Génotypage des souris**

L'extraction d'ADNc été réalisée comme décrit ci-dessus.

Amplification PCR : Les oligonucléotides utilisés s'hybrident de part et d'autre du fragment lox présent dans le génome du modèle KI-TITIN. Leurs séquences sont :

5'- GGGACATCTTCCATTCTAAACAACACC -3' pour l'amorce en 5'

5'-GTCAGGAGGGATACAAATAG -3' pour l'amorce en 3'.

La polymérase utilisée est la Jumpstart Taq contenue dans le kit REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (SIGMA). L'amplification PCR est réalisée pendant 30 cycles, l'hybridation se faisant pendant 30s à 59°C.

Migration : les produits de PCR sont déposés sur gel 2%. La taille du fragment attendu est de 292 pb pour l'allèle muté (car une séquence lox est restée après excision de la cassette néo).

Fiche technique 2 : Expérimentation animale

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

➤ **Prélèvement des muscles**

Pour l'étude des protéines : les muscles sont congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

Pour l'histologie : les muscles sont disséqués et congelés en isopentane refroidi dans l'azote liquide, puis coupés au cryostat.

Pour l'extraction des ARN : les muscles sont congelés en azote liquide et stockés à -80°C.

➤ **Prélèvement des embryons**

Les embryons ont été prélevés après la mise en accouplement des souris KI TTN FINmaj entre elles. La détermination d'un bouchon ovarien à J1 (lendemain de la mise en accouplement) a permis de suggérer le succès de l'accouplement. A différent stade de l'embryogenèse, les embryons ont été prélevés des utérus des souris anesthésiées. Les embryons ont été retirés de l'utérus et du placenta par dissection et ont été congelés dans l'azote liquide et ont fait l'objet d'un génotypage selon le protocole présenté précédemment (*Fiche technique 1*). Les souris mères ont été recousues après ouverture.

➤ **Injections de vecteurs *in vivo***

Les vecteurs rAAV hcalpaine 3 ont été injectés par voie intramusculaire à raison de $1,5 \cdot 10^{10}$ génomes viraux en solution dans 15 μL de sérum physiologique (soit environ $1 \cdot 10^{12}$ particules physiques par ml de préparation virale). Les TA des souris anesthésiées ont été injectés avec 25 μL de préparation virale.

Certaines expériences ont nécessité l'injection de marqueur Bleu Evans, marqueur des fibres nécrotique. L'injection a été réalisé en intrapéritonéal (0,1 mg/10g de masse corporelle), la veille du sacrifice.

Fiche technique 3 : Extraction d'ARN à partir de cellules et de muscles

Pour les cellules

48 à 72 h après transfection, les cellules sont récoltées et culotées.

Sur le muscle

200ul de broyat de muscle auquel est ajouté 2ul de RNAsine

Extraction des ARNs :

Les ARN ont été extraits à partir de cellules culotées ou de biopsies musculaires homogénéisées dans un tampon contenant 20mM de Tris (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 2 mM d'EGTA, 1 % (v/v) de TRITON X-100, un cocktail d'inhibiteur de protéase (ROCHE) et 2 μ M d'E64 (Sigma).

L'extraction a été réalisée selon le protocole suivant :

- Mettre 200 μ L de lysat cellulaire ou de broyat musculaire dans un tube RNase-free, DNase-free et ajouter 1 μ L de RNAsin (Promega)
- Ajouter 0,8 ml de TRIZOL reagent (Invitrogène) et mélanger
- Ajouter 0,2 mL de chloroforme (Prolabo), mélanger et laisser reposer 3 min à température ambiante
- Centrifuger à 12000g à 4°C pendant 15 min
- Récupérer la phase supérieure contenant les ARN, ajouter 0,5 mL de Propanol-2 (Prolabo), mélanger et laisser reposer 10 min à température ambiante
- Centrifuger à 12000g à 4°C pendant 15 min
- Eliminer le surnageant et laver le culot avec 0,5 mL d'éthanol 75% froid (Prolabo)
- Centrifuger à 12000g à 4°C pendant 10 min
- Eliminer le surnageant et laisser sécher partiellement le culot à l'air

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

A l'issue de l'extraction, la qualité des ARN a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1% et leur concentration a été évaluée par mesure de la DO.

Transcription inverse

La synthèse d'ADNc a été réalisée à partir d'1 μg d'ARN à l'aide du kit « Verso cDNA Kit » (Thermo Fisher) selon les instructions du fournisseur.

Le mix de réaction (volume total de 20 μl) contient:

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

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

Fiche technique 4 : PCR et PCR quantitative en temps réel

PCRs

Les PCR ont été réalisées sur ADN et ADNc (volume final du mélange réactionnel : 20 µl)

Composition :

- 100 ng d'ADNc
- 1 µl d'oligonucléotide spécifique (10 µM)
- 10 µl de RedExtract N-Amp™ PCR Ready Mix™ (Sigma)

L'amplification PCR est réalisée pendant 30 cycles, l'hybridation se faisant pendant 30s à 54°C.

Migration : les produits de PCR sont déposés sur gel 2%.

Oligonucléotides utilisés pour les PCR

- **Pour Mex4-6 murin**

Mex4F : 5' GGCTAAGAATTTCCACGGCC 3'

Mex6R : 5' TTACATAGAACGGATATTAATATTC 3'

- **Pour le 3'UTR de la titine**

Sens : GAGGGCCTGTGCCCTTATACTCTACA

Antisens : AATTTATACTTGCATGAAAG

- **Pour les expériences de trans-épissage**

Nom	Séquence
Mex3F souris (1')	5' GAAGAAGTCAAAACTCACGCGG 3'
Mex4F souris (1)	5' GGCTAAGAATTTCCACGGCC 3'
Mex6F humain (3)	5' CACCATGGGAATTCCGCCTAAAAT 3'
Mex6Rmouse FINmaj (2)	5' CCACCACAGGATTTTTCTTTCACT 3'
Flag R (4)	5' CTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCG 3'
FlagR Mex4-6 (4')	5' CTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCA 3'

PCR quantitative en temps réel

Principe de la PCR quantitative

La PCR quantitative en temps réel est basée sur l'activité nucléasique 5'-3' de l'enzyme AmpliTaq Gold (Roche) qui permet la détection de produit de PCR par libération d'un rapporteur fluorescent durant la PCR. Ce rapporteur est situé en 5' de la sonde nucléotidique qui est également marquée par un quencher en 3'. Le rapporteur fluorescent est FAM. Le quencher est TAMRA. Quand la sonde est intacte, la proximité du rapporteur et du quencher entraîne un phénomène de FRET (suppression de la fluorescence du reporteur par le quencher). Au cours de la PCR, si le gène d'intérêt est présent, la sonde spécifique se fixe entre les primers. L'activité nucléolytique 5'-3' de l'AmpliTaq Gold coupe la sonde entre le rapporteur et le quencher uniquement si la sonde s'est hybridée au gène d'intérêt (l'AmpliTaq Gold ne digère pas la sonde si elle est libre). La sonde est alors déplacée de la cible et la polymérisation du brin continue. La séparation du rapporteur et du quencher entraîne une augmentation de la fluorescence du rapporteur. Cette augmentation de fluorescence est mesurée par l'appareil et est la conséquence directe de l'amplification du gène ciblé au cours de la PCR.

Protocole expérimental de la PCR quantitative

Le mix de PCR a été préparé de la façon suivante, à partir de l'ADNc dilué 1:8,5, de l'*Absolute QPCR ROX MIX* (ABGENE) et des amorces et sondes *TaqMan* commandées chez Biorad.

Les conditions de la réaction ont été les suivants :

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

		température (°C)	temps (min)
Hold	1	95	10:00
Cycles	40	95	00:15
		60	01:00

L'expression du gène ubiquitaire de l'acide ribophosphoprotéique (PO) a été utilisée pour normaliser les résultats. Chaque échantillon a été dosé en duplicat et le dosage a été répété au moins 3 fois. Les résultats présentés correspondent à des moyennes (+/- SEM). Leur significativité a été évaluée à l'aide du test *Mann Whitney*.

Les amorces et sondes utilisées sont indiquées dans le tableau suivant :

Mex2-3 F	TCGAGCTGCAAGCGACAAT
Mex2-3 R	TCGAGCTGCAAGCGACAAT
Sonde Mex2-3 probe	AGACACCGAGGCACAGAAAGTATCTACCCA
Murine calpaïne 3 F	ACAACAATCAGCTGGTTTTCCACC
Murine calpaïne 3 R	CAAAAAACTCTGTCACCCCTCC
Sonde calpaïne 3	TGCCAAGCTCCATGGCTCCTATGAAG
Mex6 WT F	GAGCCTACTCCAGAAATAACATGG
Mex6 WT R	GGTCAGGTCATCTGTGTTTTCAAT
Sonde Mex6 WT	GTGGTGGAAGGAAAATCCAAAACCAAGAAC
Mex6 FINmaj F	GAGCCTACTCCAGTGAAAGAAAAA
Mex6 FINmaj R	GGTCAGGTCATCTGTGTTTTCAAT
Sonde Mex6 FINmaj	GTGGTGGAAGGAAAATCCAAAACCAAGAAC.
Obscurine F	ATC CCC ATT TGC TG AGA GA
Obscurine R	CCC GCC CCT CCA AAA C
Mex5+ F	AAAACGAGCAGTGACGTGAGC
Mex5+ R	TTCAGTCATGCTGCTAGCGC
Sonde Mex5+	TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC
Calpaïne 3 F humaine AAV	CGCCTCCAAGGCCCGT
Calpaïne 3 R humaine AAV	GGCGGAAGCGCTGGCT
Sonde calpaïne 3 humaine AAV	CTACATCAACATGAGAGAGGT

Fiche technique 5 : Immunohistochimie et marquages histologiques

➤ Immunohistochimie

Des cryosections (8 ou 10 µm d'épaisseur) ont été préparées à partir de muscles squelettiques, cardiaques et ovaires congelés. Les sections transversales ont été traitées pour la coloration histologique hématoxyline phloxine safran (HPS). La quantification du nombre de fibres centronucléées a été réalisé grâce au logiciel Histolab (Microvision, Evry, France) sur la section totale du muscle après acquisition à l'objectif 10X (CCD camera, Sony). La fibrose des cœurs a été marquée avec le rouge Sirius.

L'immunomarquage de la laminine, de la chaîne lourde de myosine développementale et des CD11b a été réalisé selon le protocole ARK kit peroxydase (DAKO). Ces immunomarquages ont été réalisés pour mettre en évidence le diamètre minimal des fibres, les fibres centronucléées, le type de fibre et les infiltrats inflammatoires, respectivement. Les anticorps utilisés pour ces détections sont les anticorps anti-laminine polyclonal (Progen, P-4417, la dilution 1:1000), l'anticorps monoclonal contre la myosine lourde (Sigma, M-8421, dilution 1:1,000), et l'anticorps monoclonal murin contre les CD11b (BD Pharmingen, (Mac-1a chain), 62.5 µg/m).

➤ Immunomarquages fluorescents

Afin de détecter les fibres musculaires positives pour diverses protéines, un marquage immunohistochimique couplé est effectué.

Les anticorps utilisés sont les suivants :

L'immunodétection de la titine a été réalisée sur des coupes de TA ou de cœur en utilisant l'anticorps monoclonal 2Q1063 (US Biological, dilution 1:10) ou l'anticorps M9 (T51 ; dilution 1 :10) donné gracieusement par le Prof D. Furst, l'anticorps polyclonal A169-170 (Mex1, 1 :100) donné par le Pr. S. Labeit et Mex6-1 (dirigé contre le domaine M10, épitope NEFGSDSATVNIINIRSMC, 1 :100, Agrobio, France). Le marquage de la titine dans le domaine is6 a été réalisé avec l'anticorps donné par le Pr. K. Wilson (Zastrow *et al.*, 2006).

Les marquages myoméline 1 ont été réalisés avec l'anticorps M4 myoméline (1:100; Developmental Studies Hybridoma Bank à l'Université de l'Iowa) et l'obscurine avec l'anticorps lapin anti-obscurine (1:200) (anticorps donné par le Pr. Gautel).

Les marquages ont été réalisés avec le protocole suivant :

Les lames sont sorties du congélateur et mises à sécher à T° ambiante pendant 10 minutes, puis les coupes sont entourées au Dakopen (DAKO). Les coupes sont ensuite saturées en BSA 3%-PBS 1X pendant 45 minutes à T° ambiante en chambre humide. Le milieu de saturation est remplacé par la solution d'anticorps primaire dilué en PBS - BSA 0,3% sur la nuit à 4°C en chambre humide. Trois lavages successifs en PBS 1X pendant 5 minutes sont réalisés avant d'hybrider avec la solution d'anticorps secondaire nécessaire couplé à un fluorochrome Alexa 594 ou 488 (1/1000) en PBS - BSA 0,3% pendant 45 minutes à TA en chambre humide. Une dernière série de trois lavages de 5 minutes en PBS 1X est réalisé et un montage lames-lamelles en Fluoromount (avec ou sans DAPI) est réalisé.

Protocole spécifique à l'anticorps Mex6-1 :

Dans le cas de marquages simples ou de comarquages avec l'anticorps Mex6-1, il est nécessaire avant le marquage de faire bouillir les lames 10 min dans du PBS, puis de les tremper dans un bain à température T° ambiante après avoir fait sécher les lames.

Le reste du protocole reste identique.

Protocole spécifique à l'anticorps obscurine :

Le comarquage de la myoméline et de l'obscurine a été réalisé sur de coupes de PSO fixées avec acétone refroidi -20°C pendant 5 minutes puis avec 4% de paraformaldéhyde dans du PBS pendant 6 minutes. Le paraformaldéhyde est ensuite neutralisé avec 0,1 M de glycine repris en PBS, puis les coupes sont traitées avec 0,2% de Triton X100 en PBS. Le protocole est ensuite le même que précédemment.

➤ **Marquage des noyaux apoptotiques sur coupes musculaires (TUNEL)**

Après décongélation, les coupes transversales (obtenues comme décrit précédemment) ont été fixées dans une solution de formaline 3.7 % (Sigma) pendant 20 min avant d'être rincées dans du PBS à température ambiante. La fragmentation de l'ADN a été visualisée à l'aide du kit "In Situ Cell Death Detection" (Boehringer Mannheim) selon les instructions du fournisseur. Les montages entre lames et lamelles ont été réalisés à l'aide de *Vectashield* contenant du DAPI (4'-6'-

DiAmidino-2-PhenylIndole) (VECTOR Laboratories). Les témoins positifs ont été obtenus en traitant certaines coupes avec 0,5 mg/ml de DNAase1 (Sigma) pendant 10 min à température ambiante avant de réaliser le marquage TUNEL. Les témoins négatifs ont été obtenus de la même façon en supprimant l'addition terminale de TdT. L'analyse par microscopie à fluorescence a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal (*DMRE*Leica).

Fiche technique 6: Coupes Semi-fines et Microscopie Electronique

Les muscles soléaires et TA utilisés pour la microscopie électronique ont été disséqués et préfixés dans 2,5% de glutaraldéhyde dans 0,1M tampon phosphate (pH7.4) sur la nuit à 4°C. Les échantillons ont été rincés dans du tampon Phosphate et fixés dans du tetroxide d'osmium à 2%. Après lavage dans du PBS, chaque échantillon a été déshydraté dans une séries de bains de différentes dilutions d'éthanol et inclus dans de la résine Epon (EMS LYNX Automated Tissue Processor). De coupes semi-fines de 1µm ont été coupées et regardées en microscopie afin de déterminer les zones d'observations. Les tissus ont été coupés suivant une épaisseur de 80 nm avec un microtome (LEICA Ultracut R). Les grilles ont été marquées avec de l'acétate d'uranyl et examinés avec le microscope électronique à transmission Philips Tecnai F20.

Fiche technique 7: Analyse fonctionnelle des muscles de souris

Evaluation de la fragilité des fibres musculaires suite à l'exercice

Les souris sont soumises à un exercice de course sur tapis afin d'induire des lésions musculaires dans les fibres.

Protocole de course sur tapis roulant :

- déclinaison : 15°
- vitesse du tapis : 10m/min
- temps de course : 30 min

Les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de Bleu Evans (1mg/ml, 0,1 ml pour 10 g de souris) 24 heures avant le sacrifice et sont soumises à cet exercice 8 heures après l'injection. Au sacrifice, les muscles d'intérêt sont prélevés, montés et congelés en isopentane refroidi afin de réaliser des coupes histologiques.

Mesure de l'activité locomotrice

L'activité locomotrice a été évaluée en plaçant les souris dans des cages de 45 cm² placées dans un moniteur d'activité 8811 IR muni d'un moteur équipé de 16 rayons de photocellule infrarouges horizontaux (BIOSEB, Chaville, la France). Les mouvements de souris interrompent les rayons et ces interruptions ont été additionnées pendant 6 heures. Des chambres de test ont été protégées du bruit externe et la lumière, mais chaque cage de test a été illuminé avec une lumière fluorescente blanche et a été entièrement aéré.

Analyse des propriétés contractiles et mécaniques sur muscles isolés

Les mesures de mécanique musculaire sont réalisées sur les muscles *EDL* (*Extensor Digitorum Longus*) et soléaires, choisis pour l'individualisation des tendons à chaque extrémité, ce qui permet d'avoir un isolement complet et sans lésion du muscle. Les muscles isolés sont conservés dans une solution physiologique de Krebs (NaCl 118mmol/l, NaHCO₃ 25mmol/l, KCl 5mmol/l, KH₂PO₄ 1mmol/l, MgSO₄ 1mmol/l, CaCl₂ 2,5mmol/l et glucose 5mmol/l) oxygénée (95% O₂ et 5% de CO₂) et maintenue à 21°C. Le muscle est placé dans la cuve et relié au capteur de force et au pot vibrant. Il est stimulé électriquement à l'aide d'électrodes situées le long de la cuve, parallèlement au muscle. Pendant toute la durée des tests, la solution de Krebs oxygénée circule dans la cuve. La contraction excentrique peut être reproduite en appliquant un étirement de 10%

de sa longueur L_0 (longueur pour laquelle le muscle développe sa force maximale) sur un muscle en contraction tétanique à la vitesse de 1 longueur de fibre par seconde (L_f/s). Le muscle EDL est stimulé à une fréquence de 125 Hz pendant 300 msec, avec un étirement du muscle d'environ 10% de L_0 après 100 msec de contraction. Le muscle développe alors une force environ 1,5 fois supérieure à sa force maximale isométrique. Il est soumis à 5 contractions excentriques successives espacées de 3 minutes. Cela produit une chute progressive de la force isométrique qui peut être quantifiée en exprimant sa chute relative entre la première et la cinquième contraction excentrique.

Test de marche

La déambulation des souris a été analysée en trempant les pattes de celles-ci dans de l'encre puis en les laissant marcher sur un papier sur une trajectoire rectiligne. La distance entre les pattes arrière/ avant, gauche/droite a été alors mesurée.

Test d'échappement

L'activité globale des souris a été évaluée en utilisant le test d'échappement (Carlson and Makiejus, 1990). Les souris ont été placées sur une plate-forme en face d'un tube de 30 cm de long. Un anneau a été placé autour de la queue de la souris et connecté à un capteur de force fixe. En réponse au pincement de la queue, les souris essaient de s'échapper dans le tube. Ceci est empêché par l'attache de la queue au capteur de force et la force déployée par la souris est enregistrée. La force maximale et la moyenne des cinq forces les plus hautes sont normalisées par rapport au poids de la souris.

Echocardiographie

Des échocardiographies transthoraciques conventionnelles ont été exécuté sur des souris placées sur une plate-forme chauffante inclinée et anesthésiée en utilisant 1 % isoflurane. Le rythme du cœur (HR) a été maintenu constant pendant l'échocardiographie. Un système d'échocardiographie (Vevo 770, VisualSonics, SUR, le Canada) a été utilisé. Pour améliorer la qualité d'images, la vitesse de champ, la profondeur, et le gain ont été optimisés. Des images de Mode B et M ont été obtenues au niveau du plus grand diamètre ventriculaire gauche (LV) et en fin de diastole (LVEDD, le mm), le diamètre de LV en fin de systole (LVESD, le mm), la taille du septum inter-ventriculaire (IVS), les épaisseurs murales et le mur postérieur (LV PW) selon les règles définies par la convention de la société américaine d'échocardiographie.

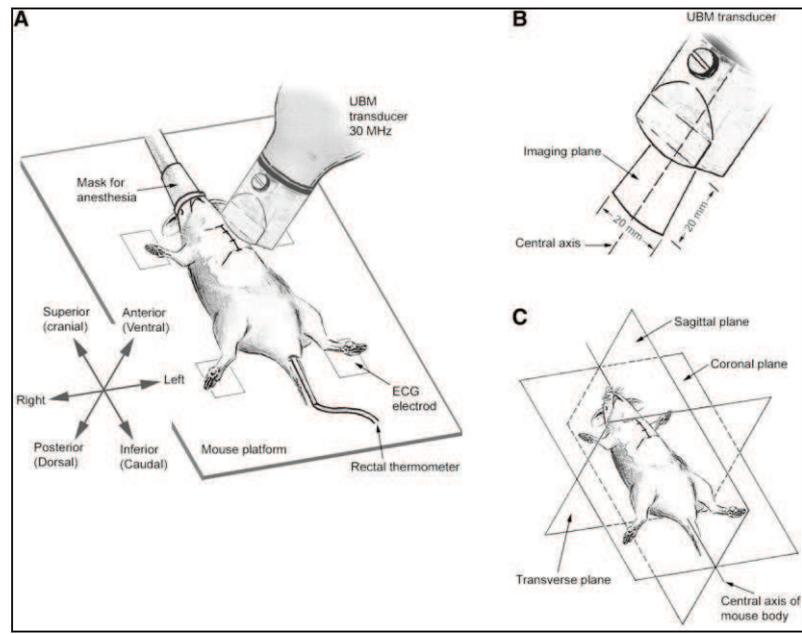


Figure 79 : Echocardiographie transthoracique sur souris.
D'après (Zhou et al., 2004)

Fiche technique 8 : Extraction des protéines et analyses

Extraction des protéines à partir de lysat cellulaire ou de tissu musculaire

❖ Extraction des protéines totales

Sur cellules : 24 heures après transfection (pour les cellules 911), les cellules ont été grattées directement dans leur milieu et centrifugées à 500g, 5 minutes à 4°C ; les protéines ont été ensuite extraites pendant 30 minutes dans un tampon contenant 20 mM de Tris (pH 7,5), 2 mM d'EGTA, 1 % (v/v) de TRITON X-100, 150 mM de NaCl et des inhibiteurs de protéases (*complete mini protease inhibitor cocktail*; Roche Biomedicals) additionné d' inhibiteur des calpaïnes (E64, (Sigma)).

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

Les protéines solubles sont retrouvées dans le surnageant, après élimination des éléments insolubles par centrifugation à 12000g, pendant 10 min à 4°C.

La concentration en protéines des extraits obtenus (issus de cellules ou de tissus entiers) a été déterminée par la méthode *BCA* (PIERCE).

❖ Extraction des protéines par fractionnement subcellulaire

Dans le cas de certaines de nos expériences, l'extraction des protéines a été réalisée à partir du muscle ou des cellules à l'aide du kit « Subcellular Proteome Extraction Kit» (Calbiochem) dans le but de réaliser un sous-fractionnement permettant d'obtenir les protéines en différentes fractions : la fraction cytosolique, la fraction nucléaire, les protéines du cytosquelette et les protéines des membranes et organelles.

Test d'activité C3

Prendre 20 µg de protéines et ajouter 25 µl d'un mix le substrat calpain3 C129S + 5 mM de CaCl₂ + tampon de lyse contenant 20 Mm Tris-HCl Ph7,5, 150 Mm NaCl, 2 mM EGTA, 0,1% Triton X100 + PIC puis incuber 1 heure à 37°C. La réaction est stoppée en ajoutant 16,5 µl de LDS Nupage

buffer 4 X (Invitrogen) avec 400mM de DTT (concentration finale 1X). Dénaturer 10 minutes à 70°C. Les protéines ont ensuite été déposées et analysées par Western blot.

Analyse protéomique par la technique du Western-Blot

Après extraction, les protéines ont été dénaturées par addition de 10 μ L de tampon dénaturant (*Nupage LDS Sample Buffer* (Invitrogen)) additionné de DTT (100mM) et chauffage à 70°C pendant 10 minutes. La protéine contrôle FLAG est une BAP-FLAG de chez Sigma attendue à 49 kDa. Les échantillons protéiques ont ensuite été déposés sur gels de sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide précoulés (4-12 % Bis-Tris) (Invitrogen) et soumis à une électrophorèse à l'aide du système NuPage (Invitrogen), pendant 1h à 150 V. Les protéines, une fois séparées, ont été électro-transférées sur membrane *Immobilon-P PVDF* (Millipore) par le système BIORAD, pendant 1 h à 100 V. Afin d'évaluer l'efficacité de ce transfert, les protéines présentes sur les membranes ont ensuite été colorées au Rouge Ponceau 0.2 % (w/v). Deux méthodes de marquage ont été utilisées : après saturation dans du lait 3%-TTBS (Sigma)-BSA 0.5 % (w/v) (Sigma) ou du Blocking Buffer (LI-COR, Odyssey) pendant 1 h, les membranes ont été hybridées avec les anticorps primaires tous dilués dans du TTBS-lait 1% (w/v) ou du Blocking Buffer (selon la méthode de révélation utilisée) pendant 1h à température ambiante. Après lavages dans du TTBS (4x5 min), les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires dirigés contre des Ig G de souris ou le lapin couplés à la HorseRadish Peroxidase (HRP) (dilution 1:10000) ou couplé à des fluorophores émettant à 800nm (vert) ou 700 nm (rouge) (LI-COR) pendant 45 min à température ambiante. Après lavages dans du TTBS (4x5 min), la révélation a été réalisée avec le kit « SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate » (PIERCE), ou lecture au Li-COR ODYSSEY à 680 et 488nm.

Lors de ces analyses, les poids moléculaires des protéines ont été estimés par comparaison avec le marqueur *Precision Plus Protein Standards* (BIORAD).

Les membranes PVDF ont pu être deshybridées par incubation dans un tampon contenant du Tris (pH 6,8 ; 65 mM), 2 % de SDS (w /v) et du DTT (100 mM) pendant 30 min à 50 °C. Les membranes ont ensuite été lavées (6x5 min) dans un grand volume de TTBS, avant d'être ré-hybridées avec d'autres anticorps.

Anticorps utilisés

L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope V5 (Invitrogène, dilution 1:5000) et l'anticorps monoclonal anti-myc (Invitrogen, 1 :5000) ont été utilisé pour la détection du minigène ainsi que la C129SV5 et des constructions de myospryne (respectivement). L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'épitope Flag (Genetex, dilution 1 :1000 ou Sigma-M2 1 :1000) ont été utilisés contre le PTM. L'anticorps anti-actine de lapin (1 :5000, Invitrogène) a été utilisé pour la normalisation des marquages.

Les fragments de titine ont été reconnus par l'anticorps contre M10-1 (dilution 1:100) qui nous a été gracieusement fourni par Bjarne UDD.

La protéine GFP a été détectée grâce à un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la GFP (Abcam, 1 :500). L'obs1 a été détectée en WB par un anticorps lapin anti-obs1 (1 :400) gracieusement fourni par le Pr. Mathias Gautel.

La calpaïne 3 a été détectée en utilisant un anticorps polyclonal de lapin (B3) dirigé contre l'épitope QESEEQQFRNIFKQ présent dans l'exon 17 (Baghdigian 1999). L'anticorps cité a été gracieusement fournis par le docteur Ahmed Ouali ou avec un anticorps de souris 12A2 (Novocastra, 1/200^{ème}).

L'ubiquitine a été reconnue par l'anticorps mouse anti-ubiquitine (p4D1) au 1 :1000) (Santacruz ; sc-8017).

Fiche technique 9: Les constructions plasmidiques

Les constructions plasmidiques utilisées dans ce mémoire sont les suivantes :

Etude de la ligne M de la titine *in vitro*

Pcdna3.1Mex26FINmaj ET WT ont été construits à partir de cDNA humain de muscle squelettique. L'amplification par PCR a été réalisée entre la fin de Mex1 jusqu'au codon STOP grâce aux oligonucléotides Mex1.a 5'-CACCATGACTGAACCAAAAAGCTCCTG-3' et Mex6.m. 5'-AATGGATCGAATATGTATATT-3' et sous-cloné dans le pcDNA3.1D/V5-HisTOPO (Invitrogène).

Le plasmide pGAD424-cn52 a été gentiment cédé par H. Sorimachi, il code pour les exons Mex5-6 de la titine humaine. Les mutations Belge Ile34306Asn et Lille Leu34315Pro ont été introduites par un kit de mutagenèse dirigée (QuickChange site-directed mutagenesis kit, Stratagène). Les modifications ont été introduites dans la séquence par le remplacement des codons ATT en AAT pour la mutation Belge et CTG en CCG pour la mutation Lille. Les oligonucléotides utilisés sont les suivants :

I34306N.a	5'-
CAGGGGAGGTTCCACAATGAAAACACAGATGACCTG-3'	
I34306N.m	5'-
CAGGTCATCTGTGTTTTTCATTGTGGAACCTCCCCTG-3'	
L34315P.a	5'-
GATGACCTGACAACCCCGATCATCATGGACG-3'	et
L34315P.m.	5'-
CGTCCATGATGATCGGGGTTGTCAGGTCATC-3'	

Tous les plasmides ont été vérifiés par séquençage pour vérifier les séquences.

Les plasmides pSRDcalpaine 1 et calpaine 2 étaient disponibles au laboratoire.

Etude de myospryne et de la calpaine 3

Le plasmide codant pour la myospryne MD9 et MD7 ont été fournies par Bjarne Udd.

Le plasmide pSRD-C3 était disponible dans notre laboratoire (Herasse *et al.*, 1999) ainsi que la construction de la calpaine 3 C129S (Bartoli *et al.*, 2006).

Etude du trans-épissage

Le minigène PcDNA3.1Mex2-6ADNFINmaj a été amplifié à partir d'ADN murin de souris KI TTN FINmaj HO. L'amplification des exons et introns de Mex2 au STOP final a été réalisé avec les oligonucléotides Mex2F : 5'-CACCATGACTGAACCAAAAAGCTCCTG-3' et Mex6R : 5'-AATGGATCGAATATGTATATT-3 puis clone dans un plasmide pcDNA3.1D/V5-HisTOPO (Invitrogène).

Les plasmides PTMMex6FLAG ainsi que PTMMex4-6FLAG ont été synthétisé par Genscript dans un plasmide AAV de la bande de Généthon.

L'ajout du 3'UTR a été réalisé après la sortie par PCR du 3'UTR sur ADN humain avec les oligonucléotides sens : GAGGGCCTGTGCCCTTATACTCTACA et antisens :

AATTTATACTTGCATGAAAG flanqués des séquences reconnues par les enzymes Mfe1 et Not1. L'entrée du 3'UTR a été réalisée en aval du STOP de l'exon Mex6 avec ces mêmes enzymes. L'ajout de l'ISE a été réalisé par mutagenèse dirigée (QuickChange site-directed mutagenesis kit, Stratagène). Les modifications ont été introduites dans la séquence par le remplacement de 4 paires de bases avec les oligonucléotides suivants: 5'GAAGAAGTCAAACTCACGG3' et 5'CCGCGTGAGTTTTGACTTCTTC3'.

Fiche technique 10: Les cultures et transfections de cellules 911

La lignée cellulaire HER911 (rétinoblastes humains) a été obtenue auprès de l'*American Type Culture Collection* (Rockville, Md.).

Les cellules HER911 sont cultivées en milieu DMEM (Gibco-BRL) contenant 10 % de SVF (sérum de veau fœtal, Sigma), 1% MEM (*essential amino acids*, Sigma) et 10 µg/mL de gentamicine (Gibco-BRL).

Transfections

Méthodes :

Les transfections de plasmides ont été réalisées à l'aide du *FUGENE 6 transfection reagent* (Roche Applied Science) 24 h après ensemencement des cellules, soit à une confluence de 80 % environ, selon le protocole suivant :

Pour 1 puit d'une plaque 12 puits ou 6 puits:

- Déposer 200µL de DMEM sans SVF dans un tube polystyrène (T1)
- Ajouter 2 µL de FUGENE par µg de plasmide utilisé et mélanger doucement. Laisser incuber 10 min.
- Dans un second tube (T2) déposer 1µg de plasmide pour un puit de plaque 12 puit, 2µg pour un puit de plaque de 6 puits
- Reprendre les 200µl de FUGENE + DMEM et les déposer goutte à goutte dans le T2
- Mélanger doucement et incuber 30 à 45 min sans aucune agitation
- Changer le milieu des cellules par 1 mL de milieu complet propre
- Déposer le contenu d'un tube par puits
- Mélanger doucement et placer la boîte dans l'incubateur au moins 24h à 48h.

Fiche technique 11 : Imagerie et Logiciels d'analyses

Les logiciels suivants ont été utilisés - vérifiés pour la dernière fois le 09/05/2010

NNSplice: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

SpliceView: http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html

Eusplice : <http://66.170.16.154/EuSplice/>

Prosite: <http://expasy.org/cgi-bin/prosite/>

CLC Bio: <http://www.clcbio.com/>

Imagerie

Analyses en microscopie confocale

Les coupes de muscles après marquage sont analysées sous un microscope confocal Leica. Les longueurs d'onde d'excitation sont de 488 nm et 594 nm.

Analyses de comarquages

Les coupes ont ensuite été examinées avec le microscope confocal (TCS SP2.AOBS, Leica, Germany) en utilisant les ondes à 488nm d'un laser argon (12% puissance) and 633 nm (HeNe laser 25mW, 40% puissance). Toutes les images ont été acquises au format 1024x1024 avec un objectif 40X ou 63 X HCS PLAPO. L'étude des images a été réalisée avec Adobe Photoshop CS2 9.0.2 (Adobe Systems Inc., CA), et ImageJ 1,38x (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Les calculs de différence d'intensité de marquage obscurine/myoméline 1 pixel-intensity curves transversely to sarcomeres ont été déterminées par Image J. Le logiciel Excel software a permis de calculer la différence de répartition des marquages en quantifiant la différence de phase de chaque courbe après ajustement de la ligne de base de chaque courbe. L'analyse a été réalisée sur 90 sarcomères de chaque génotype WT, HE and HO.

Quantification des Western-Blot

Les révélations faites en fluorescence, par la technique Odyssey (Li-cor), permettent de réaliser la quantification par la mesure d'intensité de fluorescence des bandes, directement via leur logiciel.

Fiche technique 12 : Analyses statistiques

Les données sont présentées \pm SEM. Les moyennes individuelles entre deux groupes sont comparées en utilisant le test non paramétrique Mann-Whitney. Ce test est utilisé pour montrer une significativité entre deux populations dans l'index de centronucléation, les quantifications protéiques et les mesures d'évaluation fonctionnelle. Le test de χ^2 est utilisé pour comparer les groupes de naissance des souris. Les mesures de taille de fibres sont analysées à l'aide du test de Kolmogorov Smirnov. Pour les analyses de différence d'intensité de marquage obscurine le test de Student est utilisé pour leur comparaison.

Dans toutes les analyses statistiques, les différences sont considérées significatives à $p < 0,05$ (*) et très significative à $p < 0,01$ (**).

PUBLICATIONS

Article n°1: Revue

RNA-targeting approaches for neuromuscular
diseases

Trends in Molecular Medicine

RNA-targeting approaches for neuromuscular diseases

Florence Le Roy¹, Karine Charton¹, Christian L. Lorson² and Isabelle Richard¹

¹ Généthon, CNRS/UEVE UMR8587 LAMBE, 1, rue de l'Internationale, 91000 Evry, France

² Department of Veterinary Pathobiology, Bond Life Sciences Center, University of Missouri, Columbia, MO, USA

Although most molecular therapy strategies for genetic diseases are based on gene replacement, interesting alternative approaches target RNA. These strategies rely on the modification of the mutated gene's expression *in vivo* by modulating pre-mRNA splicing, mRNA stability or mRNA translation. Here, we review recent progress using these RNA-based approaches in the field of muscle and muscle-related genetic diseases. Different molecular tools, including modified antisense oligonucleotides, pre-mRNA trans-splicing molecules, ribozymes or chemical compounds have been used successfully on patient cells or animal models of disease. These diverse strategies show tremendous therapeutic potential and several clinical trials have been initiated with Duchenne muscular dystrophy patients with promising results.

Neuromuscular diseases and RNA-based therapy

Inherited neuromuscular diseases are debilitating diseases with no treatment to date apart from supportive care. In experimental models, gene transfer strategies have shown great promise for many of these diseases [1,2], leading to several ongoing clinical trials (<http://www.clinicaltrials.gov>). In addition to these approaches, alternative strategies that directly target RNA are being developed. These exploit knowledge of the molecular mechanisms associated with the genetic defects and the specific nature of the disease-causing gene [3]. Several therapeutic approaches involving RNA manipulation have been achieved: (i) by forcing the splicing machinery to alter exon inclusion/exclusion patterns; (ii) by inducing or blocking degradation of mutated mRNAs; and (iii) by forcing translational read-through at premature stop codons (Box 1). In this review, we focus on RNA-based therapeutic approaches that have been applied to inherited muscle diseases and we provide an update on recent clinical developments (Boxes 1 and 2, Tables 1–3).

Until now, these approaches have been focused on four neuromuscular diseases: Duchenne muscular dystrophy (DMD), spinal muscular atrophy (SMA), myotonic dystrophy type 1 (DM1) and Ullrich disease (UCMD). Following studies that provided proof of concept obtained on patients' cells and in animal models, six clinical trials are currently underway for DMD that involve two of these strategies, and encouraging results have recently been reported. For the less advanced RNA-based methods, the therapeutic potential still needs to be explored, but hopefully these will benefit from the lessons learned from current trials.

Modulation of pre-mRNA quality

Modifying the primary mRNA sequence is the first opportunity to intervene and correct mutations at the RNA level. This can be accomplished by forcing the spliceosome to exclude, include or exchange sequences during the process of RNA maturation [3]. Although exchange could be applicable to virtually all types of genetic mutations, inclusion and exclusion would only be suitable for specific cases. Indeed, exon exclusion (or skipping) could be used only if the resulting truncated protein would retain sufficient functionality to correct or improve the symptoms of disease, whereas exon inclusion would be relevant for mutations leading to a deletion within the mRNA. These three different approaches of manipulating pre-mRNA splicing events have been applied successfully in animal models, patients' cells or directly in patients (Tables 1–3), as described below.

Exon exclusion

Exon exclusion can be achieved by the use of antisense oligonucleotides (AONs) (Tables 1 and 2). AONs sterically block binding of trans-acting factors that are necessary for exon definition during pre-mRNA splicing, thereby preventing the inclusion of specific exons into the mature mRNA (Box 2).

Glossary

Antisense oligonucleotides (AONs): oligomers that are complementary to the cellular pre-mRNA or mRNA that is targeted.

Exon skipping/inclusion: consists of removing or including an exon during the process of pre-mRNA splicing.

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD): pathway that elicits the decay of mRNAs harboring a nonsense codon that is more than 50–55 nucleotides upstream of an exon-exon splicing junction.

Premature termination codon (PTC): a UAA, UAG or UGA nonsense codon that resides within mRNA upstream of the normal termination codon and terminates translation.

Read-through: suppression of a nonsense mutation within the mRNA, by reducing the efficacy of the translation-termination machinery and inserting an amino acid at the premature stop codon.

Ribozyme: RNA molecule that catalyzes a chemical reaction such as RNA cleavage (self-cleaving) or splicing (self-splicing).

Small interfering RNA (siRNA): double-stranded RNA of around 21 nucleotides that interferes with the expression of a specific gene at the level of transcription, mRNA stability or translation.

Spliceosome: complex of small nuclear RNA (snRNA) and protein subunits (U1, U2, U4, U5, U6 snRNPs) that removes introns from a transcribed pre-mRNA segment.

Splicing: consists of removing the introns from a pre-mRNA and joining together the adjacent exons to form the mature mRNA. This process is catalyzed by the spliceosome and is termed cis-splicing because it occurs within one pre-mRNA.

Trans-splicing: splicing between two separate pre-mRNAs to form a chimeric mRNA.

Corresponding author: Richard, I. (richard@genethon.fr).

Box 1. RNA-based strategies**Pre-mRNA splicing**

Forcing the splicing machinery to induce specific exon exclusion, exon inclusion or exon replacement in the mutated pre-mRNA.

RNA stability

Inducing or blocking decay of the mutated mRNA.

mRNA translation

Forcing the translation machinery to read-through stop codons in the mutated mRNA.

To date, DMD has been the primary focus of exon-skipping strategies, either experimentally to establish the proof-of-principle *in vivo* (Tables 1 and 2) or more recently in clinical trials (Table 3). DMD is an X-linked recessive disorder that affects 1/3500 males. This life-threatening disease is characterized by rapid and progressive skeletal muscle degeneration, weakness and occasional cardiomyopathy. DMD results from the absence of dystrophin, a 427-kDa protein that links the cytoskeleton to the extracellular matrix (ECM), protecting muscle fibers from contraction-induced damage [4]. Dystrophin has two essential domains: an N-terminal actin-binding domain and a C-terminal transmembrane β -dystroglycan-binding domain connected by a central rod domain [5]. The majority of DMD patients carry mutations that disrupt the reading frame of the dystrophin (*DMD*) gene, resulting in truncated dystrophin that lacks the C-terminal bridging domain [6]. Interestingly, Becker muscular dystrophy (BMD) [7], a milder allelic disease, is frequently due to mutations that maintain the *DMD* reading frame but result in an internally truncated dystrophin protein that only lacks part of the central rod domain. These observations have led to the concept that it is possible to use, either for gene replacement or in exon-skipping strategies, a dystrophin protein with a partially deleted flexible central rod domain. Indeed, diverse functional studies have determined that relatively large internal segments of the *DMD* gene can be deleted without dramatically reducing functionality [8].

AON-mediated exon skipping and subsequent restoration of the *DMD* reading frame has been achieved in cultured myoblasts from DMD patients and in animal models [9–21]. The most commonly used animal models are the X-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse [4,22] and the Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) dog [23]. The nature of their mutations makes both animal models excellent experimental contexts for testing exon-skipping strategies (Table 1). Moreover, the dog model offers additional advantages for translational studies because larger animals are useful for investigating issues related to delivery, biodistribution and toxicology of AONs before moving to patients [9,24].

AON chemistry has evolved considerably since the initial use of 2'-O-methyl phosphorothioate-AONs (2'OMePS-AONs) and is still being refined to reduce its toxicity while improving its affinity, stability, delivery and biodistribution (Table 2, [9–21]). The chemistry of each AON can exhibit advantages and disadvantages. For example, systemic injections of 2'OMePS-AONs or phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) in animal models did not restore

critical cardiac dystrophin expression to levels observed in skeletal muscle compared with their carrier-conjugated forms (Table 2) [11,12,15–17,20,21]. A possible drawback to peptide-conjugated chemistries (cell-penetrating peptide-conjugated peptide nucleic acid, CPP-PNA; cell-penetrating peptide-conjugated PMO, CPP-PMO; cell penetrating peptide-muscle-targeting heptapeptide-conjugated PMO, CPP-MSP-PMO) is their potential to induce an immune response if repeated administration is required (Table 2). For this purpose, PMO conjugated with a non-peptidic carrier have been developed (dendrimeric octaguanidine-PMO or vivo-PMO) (Table 2) [20]. The use of cationic polymethylmethacrylate (PMMA) nanoparticles bound to 2'OMePS-AONs provides another alternative approach which enhances skeletal muscle delivery while reducing the AON dosage, decreasing the immune response and the possibility of off-target activity *in vivo* [25].

AON strategies must also address hurdles such as whole body delivery and long-term expression. These issues have been improved by using adeno-associated virus (AAV) and/or by targeting the AON to the spliceosome machinery by incorporating a small RNA motif derived from the U7 small nuclear RNA (snRNA, U7smOPT) (Table 2) [26–29]. This strategy, in combination with cell therapy, has also proven effective in the *scid/mdx* mouse [30]. Taken together, the efficiency of exon skipping in *DMD* pre-mRNA observed in myofibers varies significantly based upon factors such as AON chemistry (Table 1), the route of delivery, the age of the animal and the method used to measure dystrophin expression. However, even with low levels of dystrophin expression (5–10%), this amount is sufficient to confer a long-term benefit to the entire muscle from morphological and functional perspectives [12,27,29].

To move towards clinical trials, other studies went on to validate exon-skipping strategies in human-specific contexts, using DMD patient cells or a humanized transgenic DMD mouse model (hDMD) [19,31–35]. Anticipating future regulatory hurdles, there has been an effort to define single molecular entities that can correct the maximal number of genetic mutations. The theoretical applicability of single exon skipping is 64% of all DMD patients [36]. Exon 51 is a particularly attractive target because its skipping could be applicable in 13% of all DMD cases, and consequently this exon is the focus of current clinical trials (Table 3, Figure 1a) [36]. Different attempts at multi-exon skipping using 2'OMePS-AONs in DMD patients' cells were not conclusive [37], but use of a cocktail

Box 2. Molecular tools for muscle diseases

- (i) Modified antisense oligonucleotides (AONs) to induce exon inclusion or exclusion in the mutated pre-mRNA.
- (ii) Pre-mRNA trans-splicing molecule (PTM) or self-splicing ribozyme to replace a mutated exon by a wild type exon in the pre-mRNA.
- (iii) Self-cleaving ribozyme, siRNA or AONs to degrade mutated mRNA.
- (iv) siRNA to block nonsense-mediated decay (NMD) of the mutated mRNA.
- (v) Chemical compounds to suppress premature termination codons in the mutated mRNA.

Review

Table 1. Comparison of RNA-directed strategies

Strategies	Molecular tools	Targeted mutations	Development	Refs
Exon exclusion ^a	Single and bifunctional AONs	Applicable only if the resulting truncated protein retains sufficient functionality	<i>mdx</i> mouse, <i>scid/mdx</i> mouse, hDMD mouse, GRMD dog, CXMD dog, DMD patient cells	[9–21,25–30,35–37]
Exon inclusion	Single and bifunctional AONs	Mutations leading to a deletion within the mRNA	SMA patient cells, SMA mouse	[38–46]
Exchanging exon	PTM, self-splicing ribozyme	All types of mutations	SMA patient cells, SMA mouse, human cells	[58,60,61,64]
Inducing mRNA decay	Hammerhead ribozyme, AON	Dominant negative mutation on one allele	DM1 patient myoblasts, DM1 mouse	[65,66]
Blocking mRNA decay	siRNA	Mutations that lead to destabilization of the mRNA but still conserve protein function at least partially	UCMD patient fibroblasts, DM1 patient myoblasts, DM1 mouse	[70,71]
Inducing read-through at PTC ^a	Chemical compounds: novel aminoglycosides, gentamicin, negamycin, PTC124	Nonsense mutation at non-essential residue	<i>mdx</i> mouse, SMA patient cells, SMA mouse	[75–84]

^aStrategies currently used in clinical trials.

of three PMOs was successful in canine X-linked muscular dystrophy (CXMD) by intravenous injection [24]. This discrepancy suggests that efficient multi-exon skipping might be difficult to achieve and could depend on AON chemistry and the targeted sequences.

In summary, the use of AONs to induce exon exclusion is very promising and already two DMD clinical trials are ongoing using either 2'OMePS-AON or PMO chemistries targeting exon 51 (Table 3). The remaining challenges include efficient bodywide delivery, in particular to the cardiac tissue, and the elimination of long-term toxicity. These obstacles could be reduced by developing new carriers with a low immunological response and a wider biodistribution. Along these lines, the use of 2'OMePS-AON bound to cationic PMMA nanoparticles or PMO conjugated to a non-peptidic carrier (vivo-PMO) shows remarkable potential for therapeutic application [20,25].

Exon inclusion

In addition to exon exclusion, AONs can also be used to induce exon inclusion [38–46] (Table 1, Box 2). These AONs possess an antisense sequence that masks intronic or exonic splice silencers (ISS or ESS), elements that normally inhibit the retention of specific exons. Bifunctional AONs have also been designed for exon exclusion [35]. These possess firstly an antisense sequence that targets exonic or intronic sequences, and secondly an additional untethered RNA sequence comprising exonic elements that serve as a binding site for pre-mRNA regulatory proteins that facilitate exon retention [47].

Exon inclusion is a potential strategy for the treatment of SMA, considering the genetic organization that orchestrates the protein defect in this disease. SMA is an autosomal recessive neurodegenerative disorder with an incidence of 1/6000 affecting infants to adults [48,49]. SMA is caused by the loss of the survival motor neuron protein (SMN) and subsequent degeneration of spinal cord α -motor neurons and muscle weakness [50]. There are two homologous SMN genes (*SMN1* and *SMN2*) that differ by only 11 nucleotides, which are all either silent or in non-coding regions [51,52]. Remarkably, although these genes

are nearly identical only mutations in *SMN1* lead to SMA development. The molecular basis for this functional difference is a C/T transition at the nucleotide 6 position within exon 7 in *SMN2* that inactivates a potent ESE that is bound by splicing enhancer SF2/ASF [52–54]. Concomitantly, this change creates a negatively acting ESS that is bound by the splicing inhibitor hnRNP-A1 [55]. Both events lead to exon 7 exclusion in nearly 90% of *SMN2*-derived transcripts, producing a truncated and exceptionally unstable SMN Δ 7 protein that exhibits low levels of activity [51,56] (Figure 1b,c). Importantly, a correlation between the levels of fully functional SMN protein produced from full-length *SMN2* transcript and reduction of the severity of disease was observed [48,57], leading to the notion that augmentation of *SMN2* full-length expression would improve SMA pathology.

Increasing the level of full-length SMN protein by stimulating *SMN2* exon 7 inclusion was achieved either by masking a pro-splicing sequence or by trapping pro-inclusion factors. Single 2'OMePS-AON, bifunctional AONs, U7smOPT-AON or PNA-peptide targeting exon 7, exon 8 or intronic splice silencer elements in intron 6 and intron 7 were used successfully either in different SMA mouse models or in fibroblasts from SMA patients [38–43,45,46]. In bifunctional AONs, the tail added downstream of the antisense sequence contains different binding platforms to tether either splicing enhancer factors like SF2/ASF, SRp55 or hTra2 β [38–41] or splicing silencer factor like hnRNPA1 [45]. In addition to this, the peptide conjugated to PNA mimics the standard activation domain present in the splicing enhancer SR proteins to promote exon 7 inclusion in *SMN2* mRNA [44].

Owing to the tethering of splicing factors on the target pre-mRNA, bifunctional AONs are more efficient than single AONs for exon inclusion. They have considerable potential as therapeutic agents in SMA, and also potentially for other diseases with mutations leading to a deletion within the mRNA. Because the molecular tools are similar, the limitations of exon inclusion are similar to those described previously for exon exclusion.

Table 2. Chemistry of antisense oligonucleotides

Name	Chemistry	Advantage	Disadvantage	Development	Refs
2'-O-methyl AON (2'OMePS-AON)	AON with 2'-O-methyl-substituted ribose and a phosphorothioate backbone	Simple chemistry, relatively cheap	Cytotoxicity, immunogenic response	<i>mdx</i> mouse, GRMD dog, DMD patient myoblasts, SMA patient cells, SMA mouse, SMA mouse cells, DM1 patient cells, DM1 mouse	[9–11,14,15,19,25,31,32,34,37,38,41–43,45,46,66]
U1snRNA-AON and U7smOPT-AON	AON conjugated with U1small nuclear RNA (U1snRNA) or modified-U7 small nuclear RNA (U7smOPT)	U1snRNA and U7smOPT facilitate the proper subcellular localization of the AON and its inclusion into the spliceosome	Need vectorization, immunogenic response against the virus-associated proteins	<i>mdx</i> mouse, hDMD mouse, DMD patient cells, SMA patient cells, human cells, SMA mouse	[26–29,33,35,39,40]
Peptide nucleic acids (PNAs)	AON sugar phosphate backbone is replaced with a synthetic peptide backbone, uncharged	Stable, more efficient than 2'OMePS-AON, resistant to proteases and nucleases, non-toxic, high binding capacity to complementary DNA or RNA	Their non-ionic nature impedes cell delivery, less efficient than PMO	<i>mdx</i> mouse	[11,13]
Cell-penetrating peptide-conjugated peptide nucleic acid (CPP-PNA)	Same as PNA with a conjugated peptide	Same as PNA, increased cell delivery compared with PNA	Risk of immune response against the peptide	<i>mdx</i> mouse, human cells	[13,44]
Phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs)	AON phosphodiester bond replaced by phosphoramidate linkage, AON ribose replaced by morpholino moiety, uncharged	Non-toxic, more efficient than 2'OMePS-AON and PNA, resistant to degradation, high-binding capacity to complementary DNA or RNA	Their non-ionic nature impedes cell delivery	GRMD dog model, CXMD dog, <i>mdx</i> mouse	[9,11,24]
Cell-penetrating peptide-conjugated PMO (CPP-PMO)	Same as PMO with a conjugated peptide	Same as PMO, increased cell delivery compared with PMO	Risk of immune response against the peptide	<i>mdx</i> mouse, GRMD dog	[9,16–18]
Octa-guanidine-conjugated PMO (vivo-PMO)	Same as PMO with a conjugated non-peptide dendrimeric octaguanidine	Same as PMO, increased cell delivery compared with PMO, no immune response, non-toxic		<i>mdx</i> mouse	[20]
Cell penetrating peptide-muscle-targeting heptapeptide-conjugated PMO (CPP-MSP-PMO)	Same as PMO with two conjugated peptides	Same as PMO, increased cell delivery compared with PMO, CPP-PMO or MSP-PMO	Risk of immune response against the peptide	<i>mdx</i> mouse	[21]

Spliceosome-mediated RNA trans-splicing

Sequence exchange within pre-mRNA can be achieved by a nuclear pre-mRNA splicing event *in trans* between two independent RNA molecules, e.g. the mutated endogenous pre-mRNA and the exogenous therapeutic pre-mRNA trans-splicing molecule (PTM) that provides the correct RNA sequence. The PTM acts by blocking the endogenous splicing and diverting the splicing machinery towards itself to replace the mutated exon with a wild type template. Trans-splicing has been applied either using self-splicing ribozyme [58] or more frequently using spliceosome-mediated RNA trans-splicing methods (Box 2) [59]. To date, trans-splicing has been applied to two muscle-related diseases, SMA and DM1 (Table 1). In SMA, the goal was to induce an alternatively spliced exon, and in DM1, the goal was to exchange the pathogenic 3' untranslated region (3'UTR) with a normal sequence.

In SMA, trans-splicing was used to incorporate the final coding exon 7 into *SMN2* pre-mRNA [60] (Figure 1c). The PTM was expressed from an AAV2 vector and was shown to redirect *SMN2* cis-splicing through a specific trans-splicing reaction, resulting in increased steady-state levels of SMN in primary SMA fibroblasts (Figure 1c)

[60]. More recently, *SMN2* trans-splicing efficiency was significantly enhanced by competitively disabling the downstream intron 7/exon 8 splice site using an AON [61]. Although the original trans-splicing molecule failed to increase SMN levels in an animal model of SMA, intracerebral injection of the optimized trans-splicing/antisense vector significantly increased SMN levels in the spinal cord of SMA mice [61].

DM1 is an autosomal dominant disease affecting 1/8000 individuals worldwide. It is characterized by hyperexcitability of skeletal muscle, progressive muscle weakness and wasting, cataract development, testicular atrophy and cardiac conduction defects. DM1 is caused by a CTG expansion (80–4000 repeats) in the 3'UTR of the myotonic dystrophy protein kinase gene (*DMPK*). The numerous CUG repeats in this transcript form double-stranded hairpin structures recognized by muscleblind-like (MBNL) proteins [62]. As a consequence, these proteins are trapped in nuclear foci with *DMPK* mRNA, decreasing MBNL activity and leading to aberrant MBNL-dependent splicing events in several genes including the muscle-specific insulin receptor isoform (*IR-B*) (Figure 2a) [63]. A PTM targeting *DMPK* intron 14 was

Review

Table 3. Clinical trials for Duchenne muscular dystrophy RNA-targeting approaches

Therapeutic approach	Description	Administration	Patients	Results	Phase	NCT number	Refs
PRO051 (2'OMePS-AON)	2'OMePS AON targeting exon 51 to induce its exclusion in <i>DMD</i> mRNA	Intramuscular injection (TA) ^a	Tested on four patients with deletions of exons 48–50, 49–50, 50 or 52	Safe, increased expression of dystrophin in 64–97% of myofibers within the treated area	I/II	N/A ^b	[85]
		Subcutaneous injection		Ongoing	I/II	N/A ^b	
AVI-4658 (PMO)	PMO targeting exon 51 to induce its exclusion in <i>DMD</i> mRNA	Intramuscular injection (EDB) ^c	Tested in seven patients with deletions of exons 45–50, 47–50, 48–50, 49–50, 50, 50, 52 or 52–63	Safe, increased expression of dystrophin in 44–79% of the myofibers within the treated area	I/II	NCT00159250	[86]
		Intravenous injection		Ongoing	I/II	NCT00844597	
Gentamicin	Inducing read-through at PTC in <i>DMD</i> mRNA	Intravenous injection	Tested on four patients with nonsense mutations	Three out of four patients showed increased dystrophin expression in muscles	I/II	N/A ^b	[87]
		Intravenous injection	Tested on four patients with PTC mutations	No effect detected in the muscles of the four patients	I/II	N/A ^b	[88]
		Intravenous injection		Ongoing	I/II	NCT00451074	
PTC124	Inducing read-through at PTC in <i>DMD</i> mRNA	Orally	Tested on 62 healthy male and female adult volunteers.	Safe	I	N/A ^b	[89]
		Orally	Tested on 38 patients with nonsense mutations.	Completed	II	NCT00264888	
		Orally	Tested on 38 patients with nonsense mutations.	Ongoing (long-term extension trial)	IIa	NCT00759876	
		Orally	Tested on ~165 patients with nonsense mutations.	Ongoing	IIb	NCT00592553	
		Orally	Tested on ~174 patients with nonsense mutations	Ongoing (long-term extension trial)	IIb	NCT00847379	

^a TA: *tibialis anterior*, ^b N/A: not applicable, ^c EDB: *extensor digitorum brevis*.

designed to edit the pathogenic 3'UTR, resulting in 7% of RNA trans-splicing in human cells [64]. However, this result needs to be confirmed at the protein level before it can be considered as a potential strategy for DM1 disease.

By modifying the endogenous mRNA, trans-splicing offers the advantages of maintaining native cellular expression, introducing the modification only in cells expressing the native targeted transcript, and also permitting the use of a small transgene. In theory, this method could be applied to all types of mutations compared with exon skipping or exon inclusion, but it is necessary to provide the transgene on a vector. However, the demonstration that trans-splicing efficiency can compete with that of the normal cis-splicing approaches still has to be demonstrated, and more work in animal models and on optimization of the PTM are required.

Modulation of mRNA quantity

In addition to the modification of mRNA structure, modulating mRNA quantity could prove to be beneficial in some contexts (Box 1), i.e. to reduce the expression of an allele carrying a dominant-negative mutation or to increase the quantity of mRNA carrying a mutation that leads to its destabilization but still conserves at least partially the function of the protein. Different methods used either to induce or to inhibit mRNA decay of the mutated gene involved in DM1 or Ullrich disease are described below (Table 1).

mRNA decay induction

A variety of molecular tools (self-cleaving hammerhead ribozyme, AON, siRNA) targeting a mutant gene can be used to induce degradation of the mRNA [3]. To date, in muscle-related diseases these approaches have been applied to DM1 to prevent the nuclear accumulation of mutant *DMPK* mRNA [65,66] (Table 1, Box 2) but they should be relevant to any dominant-negative disease allele.

A nuclear-retained hammerhead ribozyme designed to target and cleave the 3'UTR of the mutant *DMPK* mRNA led to 60% reduction of the mutant *DMPK* mRNA level in DM1 patient myoblasts (Figure 2a, [65]). This decrease corroborates the observed reduction of *DMPK* mRNA-containing nuclear foci and a partial restoration of MBNL splicing activity. However, this ribozyme presented a lack of specificity to the mutant mRNA [65]. A 2'OMePS-AON targeting CUG repeats was able to induce, in DM1 patient cells, mutant-specific silencing at levels of up to 90%, leaving the wild type *DMPK* mRNA mostly intact [66]. Its specificity for CUG-containing mRNA was further confirmed using the DM1 mouse model [66]. However, even if the 2'OMePS-AON is more specific and efficient than the hammerhead ribozyme approach, its mode of action is still unknown. This uncertainty might slow its development for clinical application.

Aside from the specific case of DM1, further evidence for the therapeutic efficacy of mRNA decay induction in muscle disease is still needed, in order to provide an

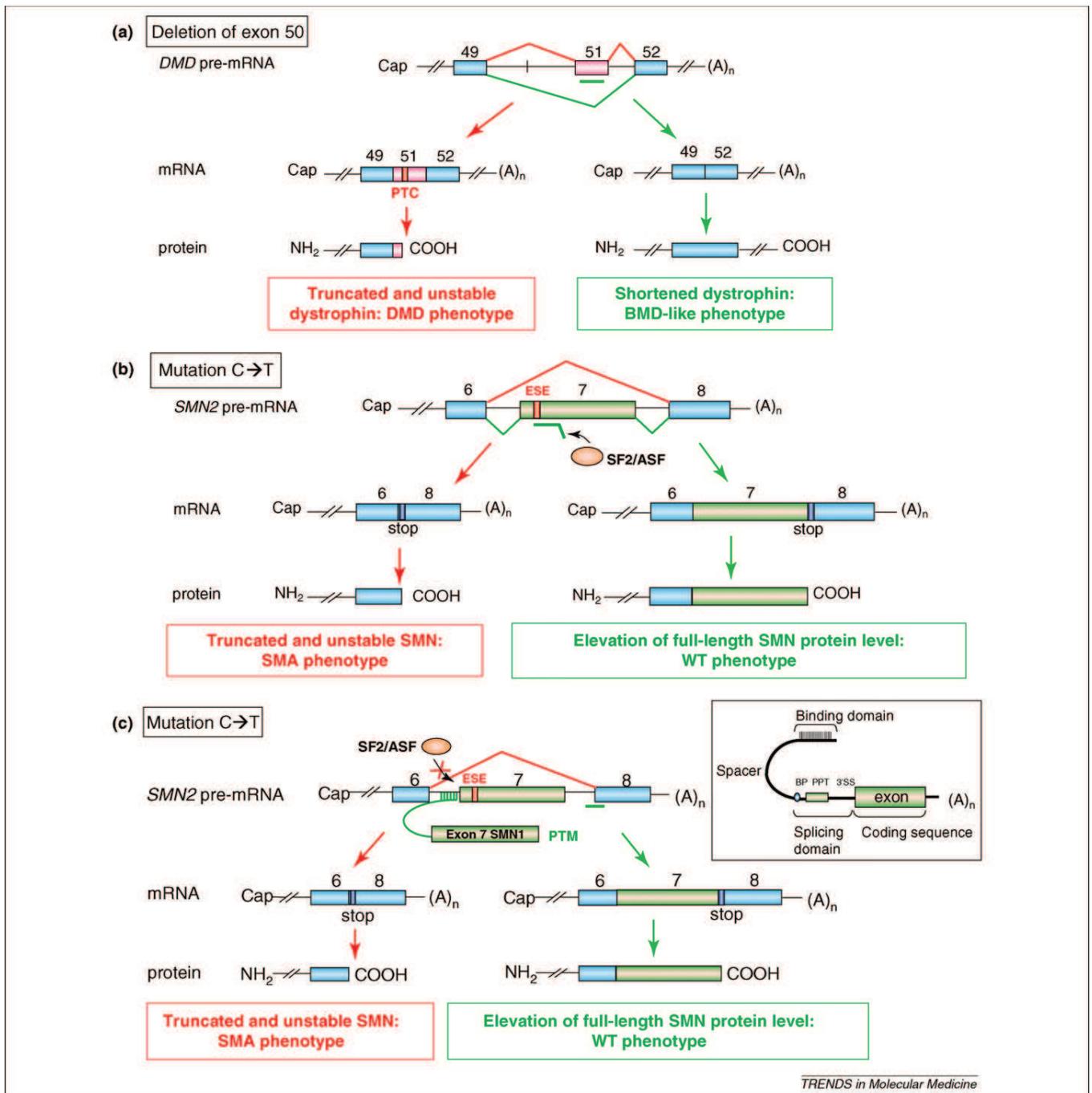


Figure 1. Modulation of pre-mRNA quality. **(a)** Exon exclusion of exon 51 in *DMD* mRNA of a DMD patient [85]. A deletion of exon 50 in the *DMD* gene introduced a PTC in exon 51 of the *DMD* mRNA. Consequently, a truncated, unstable and non-functional dystrophin is produced leading to a DMD phenotype (red). The 2'OMePS-AON PRO051 (green bar), targeting exon 51, induces specific skipping of this exon during pre-mRNA splicing and can restore dystrophin expression. The dystrophin produced is shorter than the wild type (WT) protein but is more stable, and partially functional, potentially producing a less severe phenotype (BMD-like) (green). **(b)** Exon inclusion of exon 7 in *SMN2* mRNA in a SMA mouse model [41]. A C→T mutation inactivates the ESE present in exon 7 of *SMN2* pre-mRNA, leading to exon 7 exclusion. Consequently, 90% of the *SMN2* mRNAs lack exon 7 and encode a truncated, unstable and non-functional SMN protein (red). In SMA type 1 patients with a disruption in the *SMN1* gene, *SMN2* mRNA bearing exon 7 (only 10%) are not sufficient to compensate for the reduction in SMN production, unless their proportional expression (ratio) is increased. In an SMA mouse model, the use of a bifunctional U7smOPT-AON (green bar) conjugated to an ESE sequence tethering SF2/ASF protein to exon 7 facilitates exon 7 inclusion in *SMN2* mRNA, increases the level of full-length SMN protein and decreases the severity of the phenotype (green). **(c)** Spliceosome-mediated RNA trans-splicing of *SMN1* exon 7 in *SMN2* pre-mRNA of an SMA mouse model [61]. Pre-trans-splicing molecules (PTM) contain three main domains: (i) a binding domain, complementary to a sequence on the target pre-mRNA; (ii) a splicing domain containing the splicing elements found in cis-spliced pre-mRNA, such as a branch point (BP), a polypyrimidine-rich tract (PPT) and a 3' splice site (3'SS); and (iii) a coding domain, consisting of one or more exons with a polyA signal (PA). The PTM used consists of a U7smOPT, a sequence complementary to *SMN2* intron 6 and a wild type *SMN1* exon 7 with a polyA signal. The incorporation efficiency of the PTM by trans-splicing in *SMN2* mRNA is increased by the simultaneous use of an AON (green bar) targeting the downstream exon 8 splice site and decreasing the activity of the cis-splicing pathway. In a mouse model, the inclusion of *SMN1* exon 7 in *SMN2* mRNA results in an increased expression level of a full-length and functional SMN protein (green). This method could potentially lead to a phenotype that is close to wild type and could be useful for SMA type 1 patients. (A)_n: polyA tail; Cap: 7-methylguanosine; ESE: exon splicing enhancer; PTC: premature termination codon; SF2/ASF: splicing factor 2/alternative splicing factor; stop: normal stop codon.

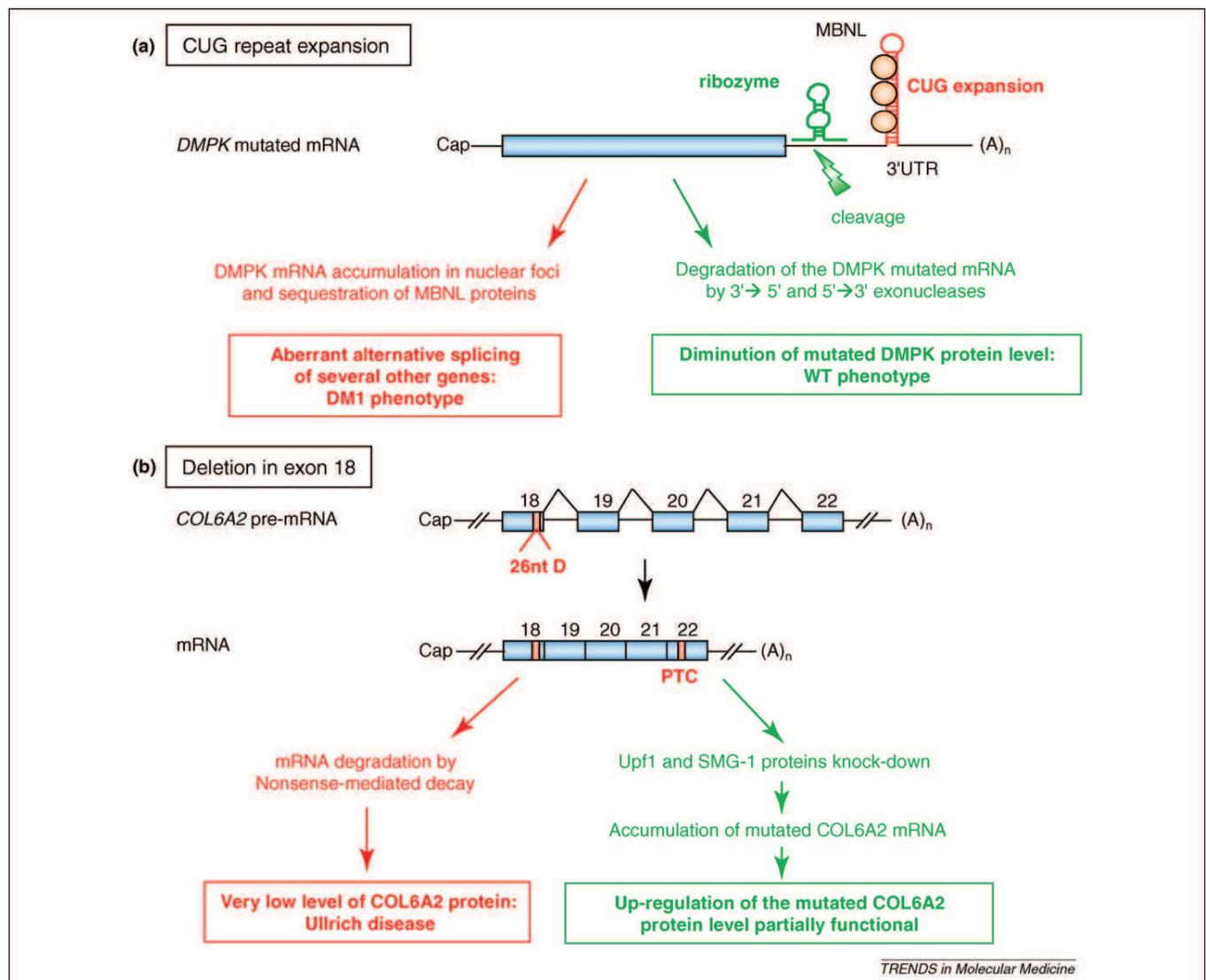


Figure 2. Modulation of mRNA quantity. **(a)** mRNA decay induction of the *DMPK* mRNA in DM1 patient myoblasts [65]. *DMPK* mRNA, bearing 750 CUG repeats in the 3'UTR, accumulates in the nucleus and sequesters the splicing regulators MBNL. Loss of function of MBNL protein lead to aberrant splicing events associated with the DM1 phenotype (red). To reduce the amount of this mRNA in nuclear foci, a nuclear-retained hammerhead ribozyme has been used to degrade the mRNA. The fragments from endonucleic cleavage are degraded by specific 3'→5' and 5'→3' exonucleases. The ensuing decrease in the mutated *DMPK* protein level could potentially lead to a more wild type (WT) phenotype in DM1 patients (green). **(b)** *COL6A2* mRNA decay inhibition in Ullrich patient cells [71]. This patient harbors a homozygous 26-bp deletion in exon 18 of the collagen VI $\alpha 2$ (*COL6A2*) gene, causing a frameshift mutation and introducing a PTC in exon 22. The resulting *COL6A2* mRNA is degraded by nonsense-mediated decay (NMD), which decreases *COL6A2* protein levels and leads to Ullrich disease (red). To re-establish a minimal amount of *COL6A2* protein in fibroblasts from this patient, *COL6A2* NMD was blocked by siRNA-mediated knockdown of Upf1 and SMG-1, two major players in the NMD pathway. The reduction in the expression levels of these proteins leads to an accumulation of the mutated *COL6A2* mRNA and an upregulation of the corresponding partially functional protein (green). (A)_n: polyA tail; Cap: 7-methylguanosine; MBNL: muscleblind-like protein; PTC: premature termination codon.

alternative approach to siRNA-mediated knockdown of mutant alleles in other tissues [3].

mRNA decay inhibition

An approach to facilitate the expression of a recessive mutated gene is to block its mRNA decay. Transcripts containing premature termination codons (PTCs) are often targeted for rapid degradation, through the nonsense-mediated decay (NMD) pathway (reviewed in Ref. [67]). Inhibition of NMD could provide a means of stabilizing mutant transcripts. Although this does not lead to expression of a wild type protein, even reduced activity of a mutant protein could be sufficient to lessen disease severity in some instances. This strategy has been applied to

Ullrich disease, in which a frameshift mutation leads to NMD of the causative gene. Ullrich disease is an autosomal recessive congenital muscular dystrophy (UCMD), with a prevalence of 0.1/100 000. Patients present with muscle weakness and wasting, proximal joint contracture and hyperextensibility in distal joints [68]. This disease is due to mutations in the collagen VI $\alpha 2$ (*COL6A2*) gene that lead to a defect in triple-helical collagen VI protein integration in the ECM and a decrease in the interaction between the ECM and the cell [69].

Two studies have been performed on cells from a UCMD patient presenting a homozygous frameshift mutation caused by a 26-bp deletion in exon 18, thereby introducing a PTC in *COL6A2* mRNA and targeting it for NMD

(Figure 2b) [69,70]. The objective was to decrease *COL6A2* mRNA decay by blocking NMD either by using pharmacological drugs that inhibit a NMD factor (wortmannin and caffeine) or by performing siRNA-mediated knockdown of essential NMD-associated proteins (Upf1 or SMG-1) (Figure 2b). Accumulation of the mutant *COL6A2* mRNA was obtained in both cases, and as a consequence the mutated and partially functional *COL6A2* protein was upregulated and integrated into the ECM [70,71].

Despite the initial results achieved using this strategy, downregulating NMD components or using drugs that specifically inhibit NMD could have adverse consequences because cellular clearance of mRNAs is a critical house-keeping function. Alternatively, developing an AON that could preclude NMD complex recognition of a specific PTC-containing mRNA could be envisioned as a more appropriate strategy, but will only be applicable for particular cases where the truncated protein conserves its functionality [67].

Modulation of mRNA translation

Apart from the strategies presented above, it is also possible to intervene at the translational level. Current approaches aim to suppress pathogenic nonsense mutations within the mRNA by reducing the efficacy of the translation–termination machinery (Boxes 1 and 2). This results in translational read-through by the insertion of an amino acid at the premature stop codon, and thereby restoration of the reading frame [72]. Read-through activity correlates inversely with established translation–termination efficiencies: the highest read-through activity is observed at UGA stop codons, followed by UAG and then UAA [73]. Proof-of-concept and clinical studies have examined the potential of read-through-based therapeutics for a variety of muscle-related diseases, including DMD and SMA (Tables 1 and 3).

Aminoglycosides and negamycin

Aminoglycosides are antibiotics that bind to 18S ribosomal RNA and interfere with the translation–termination process, subsequently inducing a low frequency read-through event at PTCs [74]. Gentamicin was the first aminoglycoside antibiotic tested to modulate translation fidelity [75]. Restoration to 10–20% of normal full-length dystrophin levels was observed in striated muscles of *mdx* mouse injected subcutaneously with gentamicin, using a narrow window of doses [75]. Although not caused by a PTC, SMA can also benefit from a read-through strategy. Novel aminoglycosides were tested for their capacity to induce nonsense suppression within the mutated *SMN2* mRNA. Among them, few were able to induce read-through and led to a protein with longer C-terminus which is more stable and exhibits increased functionality than *SMNΔ7* [76–80]. Although the read-through event occurs at a relatively low frequency, increasing the stability of the existing pool of SMN products provides an alternative means to elevate SMN levels that is distinct from the promoter or splicing enhancing strategies.

Unfortunately, aminoglycosides have limitations including (i) their lack of specificity to PTCs; (ii) the strong dependency on the nature of the stop codon and its prox-

imal sequence for read-through efficiency; and (iii) nephrotoxicity and ototoxicity [73,81]. To overcome these hurdles, compounds such as negamycin have been examined [82]. Negamycin is a dipeptide antibiotic, already used in prokaryotes, that alters translation–termination by binding to the eukaryotic rRNA-decoding A-site [83]. Negamycin treatment led to an increased level of dystrophin expression up to ~10% of normal levels in skeletal and cardiac muscles of *mdx* mice without causing lethality or ototoxicity. Nevertheless, negamycin specificity for the PTC was not demonstrated and should be addressed before considering this as a therapeutic candidate for DMD patients [82].

PTC124

In an effort to identify read-through promoting compounds that are less toxic, a new drug that does not share any structural similarity to aminoglycosides, named PTC124 (generic name Ataluren), was identified in a high-throughput screening approach [84]. This compound promotes read-through specifically at a PTC without affecting normal termination. When PTC124 was administered orally or intraperitoneally to *mdx* mice, it was able to promote nonsense suppression at the PTC in *DMD* mRNA (Figure 3) and to increase dystrophin expression levels by up to 20–25% in muscles [84]. This expression led to protection against contraction-induced injury in *extensor digitorum longus* and to reduction in serum creatine kinase levels. PTC124 represents a potential therapeutic agent and is currently being studied in several clinical trials (see below). It might also be interesting to test PTC124 in combination with AONs that block NMD on PTC-containing mRNA, to stabilize the mutant mRNA and promote the translation of a full-length protein.

Strategies designed to modify the regulation of mutant mRNA translation represent a new therapeutic avenue for patients with diseases caused by nonsense mutations. The different clinical trials that are in progress for gentamicin and PTC124 illustrate this point. However, this approach can only be applied to proteins for which the introduction of a random amino acid at the position of the premature stop codon or a C-terminus sequence does not alter functionality. For such cases, a particular advantage of these newly identified compounds is that they can be administered orally or systemically, reaching all muscles at once.

Therapeutic implications

Among the different strategies summarized here, two have reached clinical trials in DMD patients: namely, exon skipping using AONs and nonsense codon read-through using gentamicin or PTC124 (Table 3). An update on these clinical studies is presented below.

A first in-human phase I/II trial exploring the safety, tolerability and dystrophin-restoring activity of a single intramuscular dose of a 2'OMePS-AON (PRO051) has been successfully completed in the Netherlands [85]. This AON was able to specifically induce exon 51 skipping, following injection into the *tibialis anterior* (TA) muscle of four DMD patients with deletions of exons 50, 52, 48–50 or 49–50 (Figure 1a) (Table 3). Four weeks after injection, muscle biopsies revealed an exclusion of exon 51 and

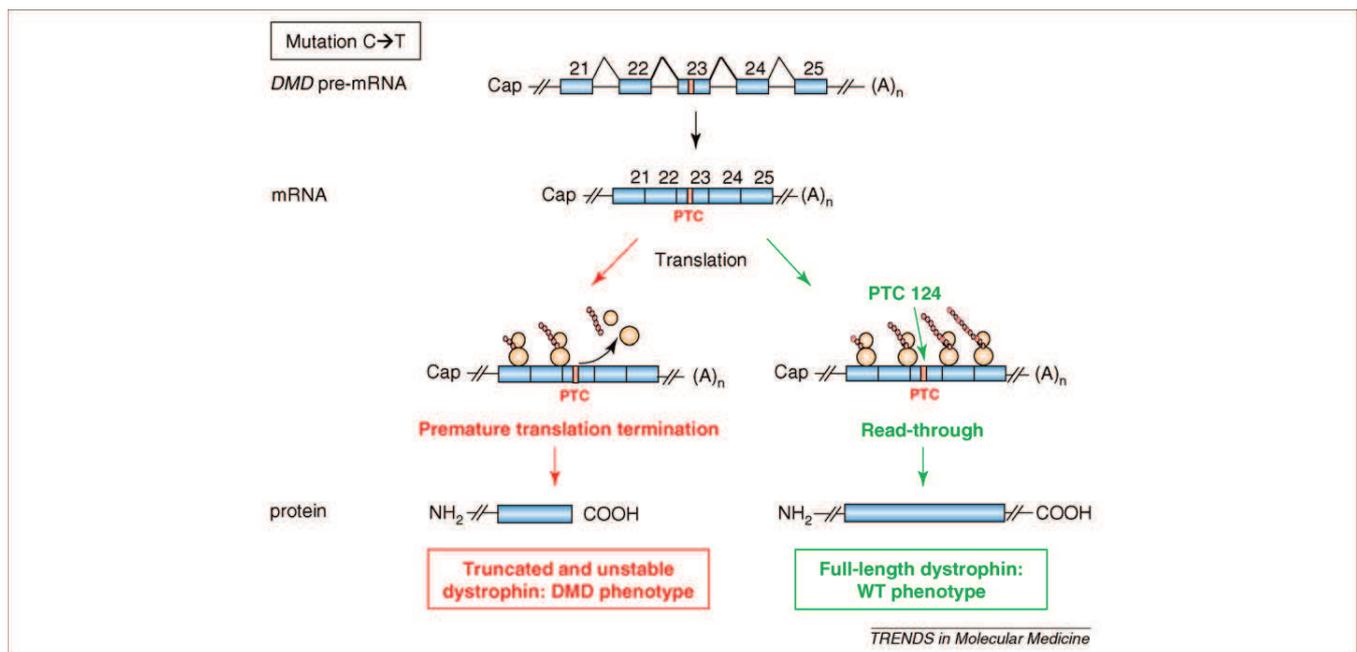


Figure 3. Modulation of mRNA translation. Translation read-through at a PTC in exon 23 of the *mdx* mouse model [84]. The *DMD* gene in the *mdx* mouse contains a nonsense mutation that leads to the introduction of a PTC in *DMD* mRNA and prevents production of functional full-length dystrophin (red). PTC124 is a chemical compound that promotes read-through specifically at PTC without affecting normal translation termination or cellular mRNA stability. This molecule induces nonsense suppression at the PTC in exon 23 and allows the translation of a full-length mutated dystrophin that is functional (green). This compound is currently being tested in a phase IIb clinical trial and represents a promising approach for reducing the severity of disease for DMD patients with PTC mutations. (A)_n: polyA tail; Cap: 7-methylguanosine; PTC: premature termination codon.

restored expression of sarcolemmal dystrophin in 64–97% of myofibers within the treated area. These cellular effects did not lead to observed increases in strength within the treated muscles. The same team recently initiated a multicenter phase I/II clinical study exploring the effects and the safety of PRO051 systemic injections in DMD patients (<http://www.prosensa.eu>). Another phase I/II trial targeting exon 51 using AONs with a different chemistry was also completed recently in the UK, with seven DMD patients with deletions of exons 45–50, 47–50, 48–50, 49–50, 50, 50, 52 or 52–63 [86]. A 30mer PMO (AVI-4658) was injected into the *extensor digitorum brevis* (EDB) muscle of patients to induce exon 51 skipping. This clinical trial was successful because intramuscular injection of the PMO was observed to be safe, and 44–79% of the myofibers showed increased levels of dystrophin expression within the treated area [86]. As a result, a new phase I/II study was initiated to assess the safety of intravenous administration of AVI-4658 PMO in DMD patients (Table 3). The results so far indicate that exon skipping is a promising therapeutic option for DMD. However, several issues remain to be clarified or overcome, such as (i) systemic distribution of AONs in the musculature; (ii) specific targeting to skeletal and cardiac muscles and prevention of liver accumulation; and (iii) cost of development and clinical trials of each specific AON that might be needed to target each group of patients.

Two phase I/II clinical trials using gentamicin have been performed on a group of DMD patients with PTC mutations. Although three out of four patients responded positively to intravenous gentamicin treatment in the Politano *et al.* study [87], contrasting results were obtained by Wagner *et al.* who could not detect dystrophin expression in DMD/BMD patients after equivalent treatment [88]

(Table 3). This discrepancy could be due to the purity level or the ratio between the three isomers of gentamicin used for these studies. A new phase I clinical trial is currently ongoing (Table 3). In parallel, the safety of PTC124 administered orally has been tested in a phase I trial in healthy volunteers [89] (Table 3). Following encouraging results, a phase IIa trial was set up. A phase IIb multisite, open-label, dose-ranging clinical trial is now in progress to evaluate the safety of PTC124 using long time periods of administration and the clinical benefit for walking, muscle function and strength in ~165 boys with DMD/BMD (Table 3). These ongoing clinical trials are encouraging and open new perspectives for DMD patients.

Among the other approaches presented in this review, RNA-based strategies for SMA will probably be the next to reach the clinic. Because the patients retain *SMN2*, this gene represents an ideal target for an exon inclusion strategy using AONs. The advanced studies of AONs used for exon exclusion might facilitate the development of strategies for SMA therapy.

Concluding remarks

With advances in our understanding of the molecular genetic defects underlying neuromuscular diseases and the development of RNA modifying tools, new therapeutic strategies for these genetic diseases have emerged, experimental proof-of-concept studies have been achieved and the era of clinical trials has begun. The characteristics of the skeletal muscle (e.g. easily accessible and transducible) and its disease-causing genes (e.g. specific genetic defects, large size) have provided a good platform for examining a variety of strategies that are designed to rescue or manipulate RNA expression.

Box 3. Outstanding questions

- How specific are these molecular tools for their mutant RNA targets?
- How can delivery of these molecules be improved?
- How can immune responses to peptidic carriers or viral proteins be avoided?
- What is the optimal therapeutic window, in terms of disease stage, for administration of “RNA-based tools” to treat these neuromuscular diseases?
- Will these molecules exhibit toxicity for patients during long-term administration?
- Will frequent administration be needed and how constraining will such therapies be for patients?
- How costly will it be to develop molecules that are specific for each group of mutations?

Apart from the examples presented here, similar RNA tools have been tested in clinical studies for diseases affecting other tissues: for example, an siRNA approach has been used to target a mutant of keratin KRT6A in congenital pachyonychia [90] or PTC124 has been used to target nonsense mutations of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CTFR) gene in cystic fibrosis [91] (<http://www.clinicaltrials.gov>, NCT00716014 and NCT00351078). As the molecular bases of other genetic disorders are uncovered, it is likely that additional RNA-based strategies will be developed to “correct” or modulate mutant RNAs. However, because these strategies aim to manipulate the specific mRNA to correct the genetic defect, an essential corollary is that they are designed according to the particular mutational context. Therefore, each tool will be relevant for only specific groups of patients. Thus, to progress towards clinical trials, two practical issues are important to highlight: (i) access to detailed patient registries will be important and (ii) the orientation towards personalized medicine will need to be taken into account by regulatory agencies. In addition, the key question that remains to be resolved is whether these treatments will achieve any reversal of pathology, this is particularly crucial for the congenital forms of SMA and DM1.

In conclusion, although this field clearly has hurdles to overcome, such as delivery, sustainability and specificity (Box 3), tremendous progress has been made in several cell-based and animal models, and more recently in clinical trials. Therefore, RNA modulation has the potential to become an important and powerful tool in our arsenal against these neuromuscular diseases and also potentially for other devastating diseases.

Acknowledgment

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM).

References

- Daniele, N. *et al.* (2007) Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 1608–1624
- Blankinship, M.J. *et al.* (2006) Gene therapy strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol. Ther.* 13, 241–249
- Wood, M. *et al.* (2007) Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet.* 3, e109
- Hoffman, E.P. *et al.* (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928
- Koenig, M. *et al.* (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–228
- Aartsma-Rus, A. *et al.* (2006) Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144
- Koenig, M. *et al.* (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am. J. Hum. Genet.* 45, 498–506
- Athanasopoulos, T. *et al.* (2004) Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther.* 11 (Suppl. 1), S109–S121
- McCloy, G. *et al.* (2006) Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther.* 13, 1373–1381
- Lu, Q.L. *et al.* (2003) Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat. Med.* 9, 1009–1014
- Fletcher, S. *et al.* (2006) Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide. *J. Gene Med.* 8, 207–216
- Alter, J. *et al.* (2006) Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat. Med.* 12, 175–177
- Yin, H. *et al.* (2008) Effective exon skipping and restoration of dystrophin expression by peptide nucleic acid antisense oligonucleotides in mdx mice. *Mol. Ther.* 16, 38–45
- Laws, N. *et al.* (2008) Long-term administration of antisense oligonucleotides into the paraspinal muscles of mdx mice reduces kyphosis. *J. Appl. Physiol.* 105, 662–668
- Lu, Q.L. *et al.* (2005) Systemic delivery of antisense oligonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 198–203
- Jearawiriyapaisarn, N. *et al.* (2008) Sustained dystrophin expression induced by peptide-conjugated morpholino oligomers in the muscles of mdx mice. *Mol. Ther.* 16, 1624–1629
- Yin, H. *et al.* (2008) Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3909–3918
- Fletcher, S. *et al.* (2007) Morpholino oligomer-mediated exon skipping averts the onset of dystrophic pathology in the mdx mouse. *Mol. Ther.* 15, 1587–1592
- Madden, H.R. *et al.* (2009) Characterization of a complex Duchenne muscular dystrophy-causing dystrophin gene inversion and restoration of the reading frame by induced exon skipping. *Hum. Mutat.* 30, 22–28
- Wu, B. *et al.* (2009) Octa-guanidine morpholino restores dystrophin expression in cardiac and skeletal muscles and ameliorates pathology in dystrophic mdx mice. *Mol. Ther.* 17, 864–871
- Yin, H. *et al.* (2009) A fusion peptide directs enhanced systemic dystrophin exon skipping and functional restoration in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4405–4414
- Bulfield, G. *et al.* (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 1189–1192
- Kornegay, J.N. *et al.* (1988) Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* 11, 1056–1064
- Yokota, T. *et al.* (2009) Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann. Neurol.* 65, 667–676
- Rimessi, P. *et al.* (2009) Cationic PMMA nanoparticles bind and deliver antisense oligonucleotides allowing restoration of dystrophin expression in the mdx mouse. *Mol. Ther.* 17, 820–827
- Goyenvalle, A. *et al.* (2004) [An opening in Duchenne muscular dystrophy: persistent therapeutic rescue of dystrophin by vectorized antisense mediated exon skipping in mdx mice]. *Med. Sci. (Paris)* 20, 1163–1165
- Denti, M.A. *et al.* (2008) Long-term benefit of adeno-associated virus/antisense-mediated exon skipping in dystrophic mice. *Hum. Gene Ther.* 19, 601–608
- Denti, M.A. *et al.* (2006) Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum. Gene Ther.* 17, 565–574

Review

- 29 Denti, M.A. *et al.* (2006) Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3758–3763
- 30 Benchaouir, R. *et al.* (2007) Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 1, 646–657
- 31 van Deutekom, J.C. *et al.* (2001) Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1547–1554
- 32 Aartsma-Rus, A. *et al.* (2007) Antisense-induced exon skipping for duplications in Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med. Genet.* 8, 43
- 33 De Angelis, F.G. *et al.* (2002) Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9456–9461
- 34 Bremmer-Bout, M. *et al.* (2004) Targeted exon skipping in transgenic hDMD mice: a model for direct preclinical screening of human-specific antisense oligonucleotides. *Mol. Ther.* 10, 232–240
- 35 Goyenvalle, A. *et al.* (2009) Enhanced exon-skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: promising tool for DMD therapy. *Mol. Ther.* 17, 1234–1240
- 36 Aartsma-Rus, A. *et al.* (2009) Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 30, 293–299
- 37 van Vliet, L. *et al.* (2008) Assessment of the feasibility of exon 45-55 multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med. Genet.* 9, 105
- 38 Skordis, L.A. *et al.* (2003) Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4114–4119
- 39 Marquis, J. *et al.* (2007) Spinal muscular atrophy: SMN2 pre-mRNA splicing corrected by a U7 snRNA derivative carrying a splicing enhancer sequence. *Mol. Ther.* 15, 1479–1486
- 40 Meyer, K. *et al.* (2009) Rescue of a severe mouse model for spinal muscular atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation. *Hum. Mol. Genet.* 18, 546–555
- 41 Baughan, T.D. *et al.* (2009) Delivery of bifunctional RNAs that target an intronic repressor and increase SMN levels in an animal model of spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1600–1611
- 42 Singh, N.K. *et al.* (2006) Splicing of a critical exon of human survival motor neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1333–1346
- 43 Singh, N.N. *et al.* (2009) A short antisense oligonucleotide masking a unique intronic motif prevents skipping of a critical exon in spinal muscular atrophy. *RNA Biol.* 6, 341–350
- 44 Cartegni, L. and Krainer, A.R. (2003) Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat. Struct. Biol.* 10, 120–125
- 45 Dickson, A. *et al.* (2008) A negatively acting bifunctional RNA increases survival motor neuron both in vitro and in vivo. *Hum. Gene Ther.* 19, 1307–1315
- 46 Williams, J.H. *et al.* (2009) Oligonucleotide-mediated survival of motor neuron protein expression in CNS improves phenotype in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J. Neurosci.* 29, 7633–7638
- 47 Garcia-Blanco, M.A. *et al.* (2004) Alternative splicing in disease and therapy. *Nat. Biotechnol.* 22, 535–546
- 48 Feldkotter, M. *et al.* (2002) Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 358–368
- 49 Thieme, A. *et al.* (1994) Chronic childhood spinal muscular atrophy in Germany (West-Thuringen) – an epidemiological study. *Hum. Genet.* 93, 344–346
- 50 Munsat, T. and Davies, K. (1996) Spinal muscular atrophy. 32nd ENMC International Workshop. Naarden, The Netherlands, 10–12 March 1995. *Neuromuscul. Disord.* 6, 125–127
- 51 Lefebvre, S. *et al.* (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165
- 52 Monani, U.R. *et al.* (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1177–1183
- 53 Lorson, C.L. *et al.* (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 6307–6311
- 54 Cartegni, L. and Krainer, A.R. (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* 30, 377–384
- 55 Kashima, T. and Manley, J.L. (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 34, 460–463
- 56 Burghes, A.H. and Beattie, C.E. (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 597–609
- 57 Wirth, B. *et al.* (2006) Spinal muscular atrophy: from gene to therapy. *Semin. Pediatr. Neurol.* 13, 121–131
- 58 Phylactou, L.A. *et al.* (1998) Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat. Genet.* 18, 378–381
- 59 Puttaraju, M. *et al.* (1999) Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat. Biotechnol.* 17, 246–252
- 60 Coady, T.H. *et al.* (2007) Restoration of SMN function: delivery of a trans-splicing RNA re-directs SMN2 pre-mRNA splicing. *Mol. Ther.* 15, 1471–1478
- 61 Coady, T.H. *et al.* (2008) Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts. *PLoS ONE* 3, e3468
- 62 Miller, J.W. *et al.* (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)_n expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* 19, 4439–4448
- 63 Cho, D.H. and Tapscott, S.J. (2007) Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 195–204
- 64 Chen, H.Y. *et al.* (2009) Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther.* 16, 211–217
- 65 Langlois, M.A. *et al.* (2003) Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol. Ther.* 7, 670–680
- 66 Mulders, S.A. *et al.* (2009) Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of a RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13915–13920
- 67 Kuzmiak, H.A. and Maquat, L.E. (2006) Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol. Med.* 12, 306–316
- 68 Ullrich, O. (1930) Kongenitale, atonisch-sklerotische Muskeldystrophie, ein weiterer Typus der hereditären Erkrankungen des neuromuskulären Systems. *Z Gesamte Neurol Psychiatr* 126, 171–201
- 69 Higuchi, I. *et al.* (2001) Collagen VI deficiency in Ullrich's disease. *Ann. Neurol.* 49, 544
- 70 Usuki, F. *et al.* (2004) Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann. Neurol.* 55, 740–744
- 71 Usuki, F. *et al.* (2006) Specific inhibition of nonsense-mediated mRNA decay components, SMG-1 or Upf1, rescues the phenotype of Ullrich disease fibroblasts. *Mol. Ther.* 14, 351–360
- 72 Linde, L. and Kerem, B. (2008) Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet.* 24, 552–563
- 73 Howard, M.T. *et al.* (2000) Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 48, 164–169
- 74 Hermann, T. (2007) Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1841–1852
- 75 Barton-Davis, E.R. *et al.* (1999) Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* 104, 375–381
- 76 Wolstencroft, E.C. *et al.* (2005) A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1199–1210
- 77 Mattis, V.B. *et al.* (2006) Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts. *Hum. Genet.* 120, 589–601
- 78 Mattis, V.B. *et al.* (2008) A SMNDelta7 read-through product confers functionality to the SMNDelta7 protein. *Neurosci. Lett.* 442, 54–58
- 79 Mattis, V.B. *et al.* (2009) Delivery of a read-through inducing compound, TC007, lessens the severity of a spinal muscular atrophy animal model. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3906–3913
- 80 Heier, C.R. and DiDonato, C.J. (2009) Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1310–1322

Review

Trends in Molecular Medicine Vol.xxx No.x

- 81 Kaufman, R.J. (1999) Correction of genetic disease by making sense from nonsense. *J. Clin. Invest.* 104, 367–368
- 82 Arakawa, M. *et al.* (2003) Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *J. Biochem.* 134, 751–758
- 83 Uehara, Y. *et al.* (1976) Specific inhibition of the termination process of protein synthesis by negamycin. *Biochim. Biophys. Acta* 442, 251–262
- 84 Welch, E.M. *et al.* (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87–91
- 85 van Deutekom, J.C. *et al.* (2007) Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.* 357, 2677–2686
- 86 Kinali, M. *et al.* (2009) Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 8, 918–928
- 87 Politano, L. *et al.* (2003) Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* 22, 15–21
- 88 Wagner, K.R. *et al.* (2001) Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann. Neurol.* 49, 706–711
- 89 Hirawat, S. *et al.* (2007) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 47, 430–444
- 90 Leachman, S.A. *et al.* (2008) Therapeutic siRNAs for dominant genetic skin disorders including pachyonychia congenita. *J. Dermatol. Sci.* 51, 151–157
- 91 Kerem, E. *et al.* (2008) Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* 372, 719–727

Article n°2:

Removal of the calpain 3 protease reverses the myopathology in a mouse model for titinopathies

Human Molecular Genetics

Removal of the calpain 3 protease reverses the myopathology in a mouse model for titinopathies

Karine Charton¹, Nathalie Danièle¹, Anna Vihola², Carinne Roudaut¹, Evelyne Gicquel¹, François Monjaret¹, Anne Tarrade³, Jaakko Sarparanta², Bjarne Udd^{2,4,5} and Isabelle Richard^{1,*}

¹Genethon, CNRS UMR8587 LAMBE, 1, rue de l'Internationale, 91000 Evry, France, ²Department of Medical Genetics, Folkhalsan Institute of Genetics, University of Helsinki, Finland, ³Laboratoire Structure-Activité des Biomolécules Normales et Pathologiques INSERM/UEVE 829, Université d'Evry, 91000 Evry, France, ⁴Neuromuscular Research Unit, Tampere University Hospital and Medical School, Tampere, Finland and ⁵Department of Neurology, Vasa Central Hospital, Vasa, Finland

Received June 22, 2010; Revised and Accepted September 3, 2010

The dominant tibial muscular dystrophy (TMD) and recessive limb-girdle muscular dystrophy 2J are allelic disorders caused by mutations in the C-terminus of titin, a giant sarcomeric protein. Both clinical presentations were initially identified in a large Finnish family and linked to a founder mutation (FINmaj). To further understand the physiopathology of these two diseases, we generated a mouse model carrying the FINmaj mutation. In heterozygous mice, dystrophic myopathology appears late at 9 months of age in few distal muscles. In homozygous (HO) mice, the first signs appear in the *Soleus* at 1 month of age and extend to most muscles at 6 months of age. Interestingly, the heart is also severely affected in HO mice. The mutation leads to the loss of the very C-terminal end of titin and to a secondary deficiency of calpain 3, a partner of titin. By crossing the FINmaj model with a calpain 3-deficient model, the TMD phenotype was corrected, demonstrating a participation of calpain 3 in the pathogenesis of this disease.

INTRODUCTION

The giant protein titin is one of the most abundant proteins of the striated muscle (1). The titin protein is a ~1 µm long molecule that spans half the length of a sarcomere, from the N-terminal Z-disc region to the C-terminal M-line region (2). Mutations in the titin gene (*TTN*) induce a spectrum of severe cardiac and skeletal muscle disorders (3). So far, four different phenotypes are associated with mutations in the titin C-terminus: hereditary myopathy with early respiratory failure (4), early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy (EOMFC) (5), tibial muscular dystrophy (TMD) (6) and limb-girdle muscular dystrophy type 2J (LGMD2J) (6). Interestingly, the last two phenotypes were initially described as both segregating in the same large Finnish family (7). They were found to be due to a unique complex mutation in the last coding exon of titin. This mutation, referred to as the FINmaj mutation, leads to the replacement of the four amino

acids EITW by VKEK in the M-line portion of titin (6). TMD arises when the mutation is present on one allele and presents as an autosomal dominant late-onset distal myopathy with weakness and atrophy of the anterior compartment muscles of the lower leg (8). LGMD2J, a far more severe phenotype, arises when the mutation is present on both alleles and presents as an autosomal recessive early-onset proximal muscular dystrophy (7,9,10). The TMD prevalence was reported to be >1 in 10 000 in Finland, with almost 10% of the patients presenting phenotypes differing from the classical TMD presentation (10). In addition, six other mutations in the C-terminal titin, both missense and nonsense, found in unrelated French, Belgian, Spanish and Italian families, also lead to TMD/LGMD2J phenotypes (11–14).

Titin is the largest known protein with a mass varying between 3 and 4 MDa, depending on the isoform (3,15). It has a multimodular structure formed mostly by immunoglobulin (Ig) and fibronectin-like domains, interspersed with

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 169472938; Fax: +33 160778698; Email: richard@genethon.fr

several unique sequences, including the N2A/B, PEVK regions and a serine/threonine kinase domain (titin kinase, TK) near the C-terminus (3). The region of titin which is anchored in the M-line of the sarcomere extends from the TK domain up to the C-terminus and is divided into 10 different Ig-fold domains (M1–M10) and seven titin-specific domains (is1–is7; Fig. 1A) (3). This region is encoded by the last six coding exons (Mex1–Mex6). Mex5, which encodes the is7 domain, is the only exon in this region known to be subject to alternative splicing, leading to a variable proportion of is7+ or is7– titin isoforms depending on the muscle (16,17).

Titin is primarily known as a structural protein crucial for sarcomere assembly, structure, elasticity and integrity but it has been thought to orchestrate several signalling pathways (3). Through its various partners, the M-line region participates in various functions: (1) the translation of mechanical signals into modulation of serum-response factor-dependent gene expression is performed by a molecular cascade initiated by the autoinhibitory kinase of the TK domain, through its binding partner Next-to-BRCA1 (Nbr1) (4); (2) the precise alignment of thick filaments is ensured by cross-linking of the M4 domain of M-line titin with myomesin and M-protein, stabilizing the sarcomere during muscle contraction (18); (3) several metabolic enzymes such as creatine kinase are anchored in the M4 region of titin by the titin partner four and a half LIM domain-2 (FHL2) and participate in ATP production within this energy-demanding region (19) and (4) finally, an important role in the excitation/contraction mechanism seems to be carried out by obscurin, a titin M10 partner that tethers the longitudinal sarcoplasmic reticulum around the myofibrils (20–22).

Interestingly, mutations in another M-line partner, calpain 3, are responsible for a muscle disease, LGMD2A (23). Calpain 3, a multi-substrate calcium-dependent cysteine protease whose function is not yet fully understood, binds titin at several points, including is7 (24). Titin has been suggested to stabilize calpain 3 from autolytic degradation, although it was analysed only for the N2A region of titin (25,26). Moreover, the calpain 3 level was demonstrated to be reduced in LGMD2J and in some TMD patients (27), suggesting that this protease might play a role in the physiopathology of TMD/LGMD2J.

To explore the molecular pathogenesis of TMD and LGMD2J, we reproduced the FINmaj mutation within a mouse strain and investigated the resulting phenotype of heterozygous (HE) and homozygous (HO) mice. Overall, the myopathology findings of this model replicate quite well parts of the human pathology: in HE animals, dystrophic features arise late in few muscles, whereas in HO animals the disease manifestations appear earlier, are more severe and affect a larger number of muscles. The molecular characteristics of the two diseases are also reproduced: the mutation leads to the loss of the extreme C-terminus of titin and to a secondary protein instability of calpain 3. To investigate further the role of calpain 3 in this physiopathology, we subsequently crossed this model with a calpain 3-deficient model and observed a correction of the phenotype in HE animals, demonstrating a participation of calpain 3 in the pathogenesis caused by titin deficiency.

RESULTS

A partial embryonic lethality is observed at N3 but, once born, the HE and HO FINmaj animals have a normal lifespan and exhibit a normal growth

To obtain a model that would enable us to investigate the pathological mechanisms of TMD and LGMD2J, we introduced the FINmaj mutation in the murine genome by a knock-in strategy. The Mex 6 sequence GAA ATA ACA TGG of the *Ttn* gene was replaced by GTG AAA GAA AAA in order to lead to the modification of the four amino acids EITW to VKEK of the FINmaj mutation (for details, see Materials and Methods). The targeting vector encompasses Mex2–Mex6 and carries a neomycin (neo) cassette in its 3' region and two flanking homologous recombination arms: a short one 2.8 kb upstream of the mutation and a longer one 3.6 kb downstream of the *neo* resistance gene (Fig. 1B). After electroporation of the construction and subsequent introduction of G418-resistant embryonic stem (ES) clones in blastocysts, chimeric animals were generated and mated with Cre-transgenic mice in order to obtain germline transmission and excision of the neo cassette. After backcrosses on a C57BL/6 background, HE N3 mice were interbred to generate HE (FINmaj/WT), HO (FINmaj/FINmaj) and wild-type (WT) mice. PCR genotyping (Fig. 1C, left) and sequencing (Fig. 1C, right) confirmed the introduction of the mutation in the knock-in animals.

To check whether the mutation affects titin expression, Mex2–3-specific quantitative RT–PCR (qRT–PCR) was performed on muscles of 4-month-old mice. Titin mRNA levels were similar in the three populations tested, i.e. in WT, HE and HO mice, as seen in *Tibialis Anterior* (TA) and heart muscle (Fig. 1D, left). Similar results were obtained using *Gastrocnemius* (GA), *Soleus* (SOL), *Extensorum Digitorum Longus* (EDL) and *Psoas* (PSO) (data not shown). The respective expression of each allele (WT and FINmaj) was determined in WT, HE and HO TA and heart by FINmaj and WT allele-specific qRT–PCR. Consistent with the genotype, 100% of the transcripts were of the WT genotype in WT mice, 100% are of the FINmaj genotype in HO mice and 50% are of each genotype in HE mice, reflecting the stability of the mutated transcript (Fig. 1D, right panel). Immunostaining using a titin antibody whose epitope is situated outside the mutated region (2Q1063 N2A antibody, US Biological) confirmed the sarcomeric presence of the titin protein in every condition in TA muscles (Fig. 1E). These results indicate that the introduction of the FINmaj mutation does not influence either the overall expression level or the integration of mutant titin within the sarcomeres.

A severe transmission ratio distortion was observed with this mixed background. Among the 198 offspring engendered from HE crosses, 93 mice had a WT genotype, 93 mice had a HE genotype and 12 had a HO genotype, displaying a statistically significant deviation ($P < 0.01$) from the Mendelian transmission (Table 1). Considering that the number of WT mice obtained in HE breeding (93 animals) should correspond to 25% of the total of expected pups, 372 animals should have been born (instead of 198). Therefore, as only 93 and 12 animals were obtained for HE and HO animals, respectively, the real distribution of heterozygotes and homozygotes is 25 and 3.2%

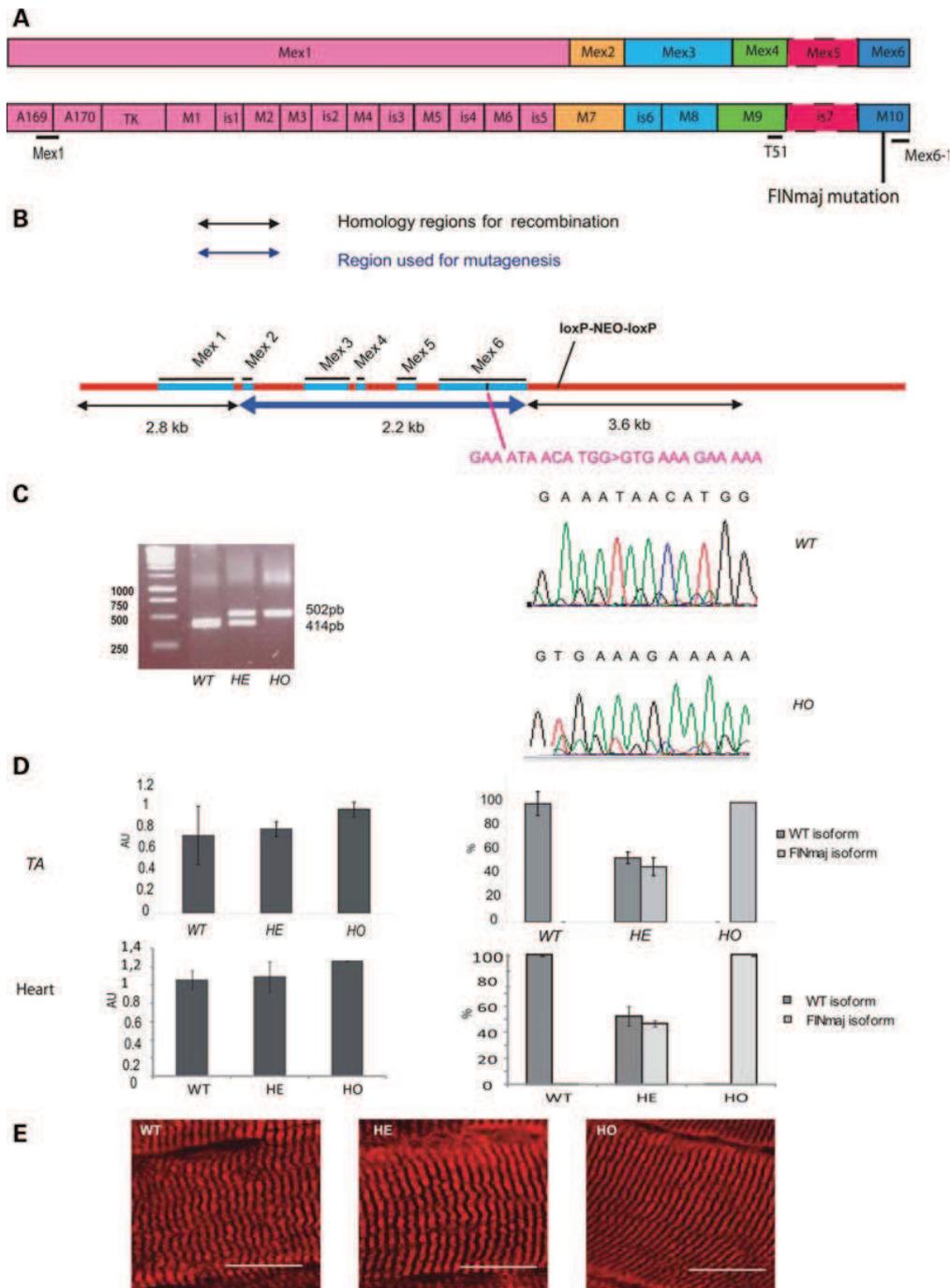


Figure 1. Construction and molecular characterization of a transgenic mouse model reproducing the human FINmaj mutation. **(A) Top:** Representation of the C-terminal extremity of titin messenger with the last six exons of titin (Mex1–Mex6). **Bottom graph:** Modular structure of M-line titin protein showing the locations of the domains, of the antibodies used herein and of the FINmaj mutation causing TMD and LGMD2J. **(B)** Schematic representation of the strategy used to construct the FINmaj mouse model. A 2.2 kb fragment encompassing exons Mex2–Mex6 was used to introduce the FINmaj mutation in Mex6. Two fragments of 2.8 and 3.6 kb were amplified by PCR to construct the two homology arms. **(C) Left:** WT, HE and HO mice genotyping. Specific PCR was used to amplify WT and mutant alleles on tail DNA, generating fragments of 414 and 502 bp, respectively. **Right:** Sequencing of the mutated region confirms the GAA ATA ACA TGG>GTG AAA GAA AAA replacement. **(D) Left:** Titin mRNA levels in WT, HE and HO animals. qRT–PCR was performed on the TA with Mex2–3-specific primers and probe and results were normalized by P0 ($n = 4$). No difference in titin expression is observed in TA and heart. **Right:** Quantification of WT allele and mutated FINmaj allele in WT, HE and HO TA and heart by qRT–PCR using Mex6 WT and Mex6 FINmaj primers and probe and normalized by P0 ($n = 4$). As expected, about 50% of each allele is present in HE mice in each muscle. AU, arbitrary unit. **(E)** Titin localization within the myofibre. Immunostaining of N2A-titin domain was carried out on TA longitudinal sections of WT, HE and HO mice and shows no differences between the three phenotypes. Scale bar = 25 μm .

Table 1. The distribution of WT, HE and HO offspring of HE crosses

	WT	HE	HO	Total
Observed	93	93	12	198
Expected	93	186	93	372
χ^2	0	46.5 ($P < 0.01$)	70 ($P < 0.01$)	117 ($P < 0.01$)

Data show the observed and expected numbers of animals and their distribution according to their genotypes at the titin locus. Of the 198 offspring engendered from HE crosses, 93 mice have a WT genotype, 93 mice have a HE genotype and 12 an HO genotype. Since the number of WT mice obtained in heterozygote breeding should correspond to 25% of the total number of birth, 372 mice should have been born. Therefore, since only 12 and 93 animals were obtained for HE and for HO animals, respectively, the real distribution of HE and HO is 25% and 3.2% (line 1), instead of the 50% and 25% expected (line 2). Statistical significance was determined using the chi square test (χ^2).

(instead of the 50 and 25% expected). As a consequence, prenatal loss affects half the HE animals and nearly 9/10 of HO mice. Genotyping using tissues harvested from embryos of HE crosses demonstrated that the distribution of WT, HE and HO embryos at E12 differs from the distribution obtained at birth (four WT, seven HE and five HO obtained from two litters; $P < 0.01$) and is fully in accordance with the Mendelian inheritance ($P > 0.9$). Furthermore, an examination of dissected litters demonstrated that mutants start dying from E12, since necrotic embryos were observed after this stage. Once born, HE and HO animals exhibit a postnatal weight and appearance similar to WT littermates and develop normal behavioural activity. Transgenic mice have been kept alive for 18 months with no increase in spontaneous deaths.

HE mice develop a mild restricted phenotype similar to the human TMD and HO mice exhibit a progressive muscular dystrophy similar to LGMD2J

Considering the difference between the human TMD and LGMD2J phenotypes, we characterized the transgenic model for both the HE and HO genotypes. It should be noted that, for all genotypes examined, no difference was ever detected between males and females.

The pathological aspect of hematoxylin–phloxine–safran (HPS)-stained frozen cross-sections of the main muscles of both limbs and the diaphragm (DIA) was evaluated in HE and HO mice at 1, 4, 6 and 9 months of age and compared with muscles from age-matched WT mice. HPS staining evidenced that both HE and HO animals present a distinctive selective muscle involvement that progresses with age. In HE mice, dystrophic features arise rather late (from 9 months of age) in three specific muscles, TA, *Biceps Femoris* (BF) and *Quadriceps* (QUAD) (Fig. 2A and Supplementary Material, Fig. S1A). In HO mice, the SOL is the first muscle to be affected, from 1 month of age (Fig. 2A and Supplementary Material, Fig. S1B), whereas TA, PSO, QUAD, GA, *gluteus* (GLU) and BF show the first signs of dystrophy later, at 6 months of age (Fig. 2A and Supplementary Material, Fig. S1C). EDL and DIA muscles never show dystrophic signs at any age in any genotype (data not shown). Histologically, the main pathological features are the presence of fibres with centrally located nuclei and heterogeneity of fibre sizes within the entire muscle area. The quantification

of fibres containing centrally located nuclei at 9 months of age showed that the TA and the SOL are the most affected muscles in HE and HO animals, respectively (Fig. 2B). Among all the muscles tested, the HO SOL is the only one presenting developmental myosin heavy chain (dMHC) positive fibres as a marker of necrotizing injury (in 9-month-old animals; Supplementary Material, Fig. S2A) and secondary lymphocytic infiltrates (detected at 4 and 9 months of age by anti-CD11b staining; Supplementary Material, Fig. S2B). Slow-twitch fibres were quantified using slow MHC (sMHC) staining on SOL, TA and PSO in 9-month-old mice and did not display any significant difference in the proportion of fibre types in any genotype (data not shown). Furthermore, neither HE nor HO animals presented noticeable increase in sarcolemmal membrane permeability as assessed by intraperitoneal injection of Evans blue dye (EBD), even if the animals were excised before the analysis (data not shown).

Electron microscopy examination reveals the integrity of sarcomere structure

Both light and electron microscopy studies on human TA muscle biopsy of TMD patients have previously evidenced the presence of rimmed vacuoles within these muscles (28). Since light microscopic study of transgenic mice did not show rimmed vacuolar change, electron microscopy was performed on TA and SOL muscles of both HE and HO mice at 9 months of age. No autophagic vacuoles were detected in any of the muscles examined. Importantly, as in human patients, the overall sarcomeric structure is preserved in all HE and HO muscles studied (Fig. 2Cb–f). In HO muscles, the only remarkable feature is the presence of a higher number of vacuoles in the I-band and I/A-band junction than in WT (twice as much), probably representing enlarged sarcolemmal structures (Fig. 2Cc, h and i).

SOL muscle mechanical function is impaired in HO mice

Considering the histopathological changes observed in skeletal muscles of both HE and HO animals, we analysed the functional status of their muscles. *In vivo*, no differences were evidenced on the global force of 4- or 9-month-old animals, as measured by escape test or in an open-field actimeter (data not shown). *In vitro*, the specific force generated after tetanic stimulation was measured in the EDL and SOL of 4- and 9-month-old male and female mice. EDL force remains normal in HE and HO mice, consistent with the fact that this muscle is histologically unaffected in both models (data not shown). Inversely, the SOL-specific force is significantly reduced in HO animals, with a loss of 32 and 40% at 4 and 9 months of age, respectively (Fig. 3). The half-relaxation time after isometric tetanic contraction was normal in both HE and HO animals (Supplementary Material, Table S1). Considering the role of titin in passive tension and muscle elasticity, we also performed an experiment to evaluate the stiffness profiles of the EDL and SOL muscles. Isolated muscles were subjected to a passive stretch protocol where the muscles were submitted to three of ramp-and-hold extensions. The peak incremental stiffness and the steady incremental stiffness were normal compared with WT muscles (Supplementary Material, Table S1).

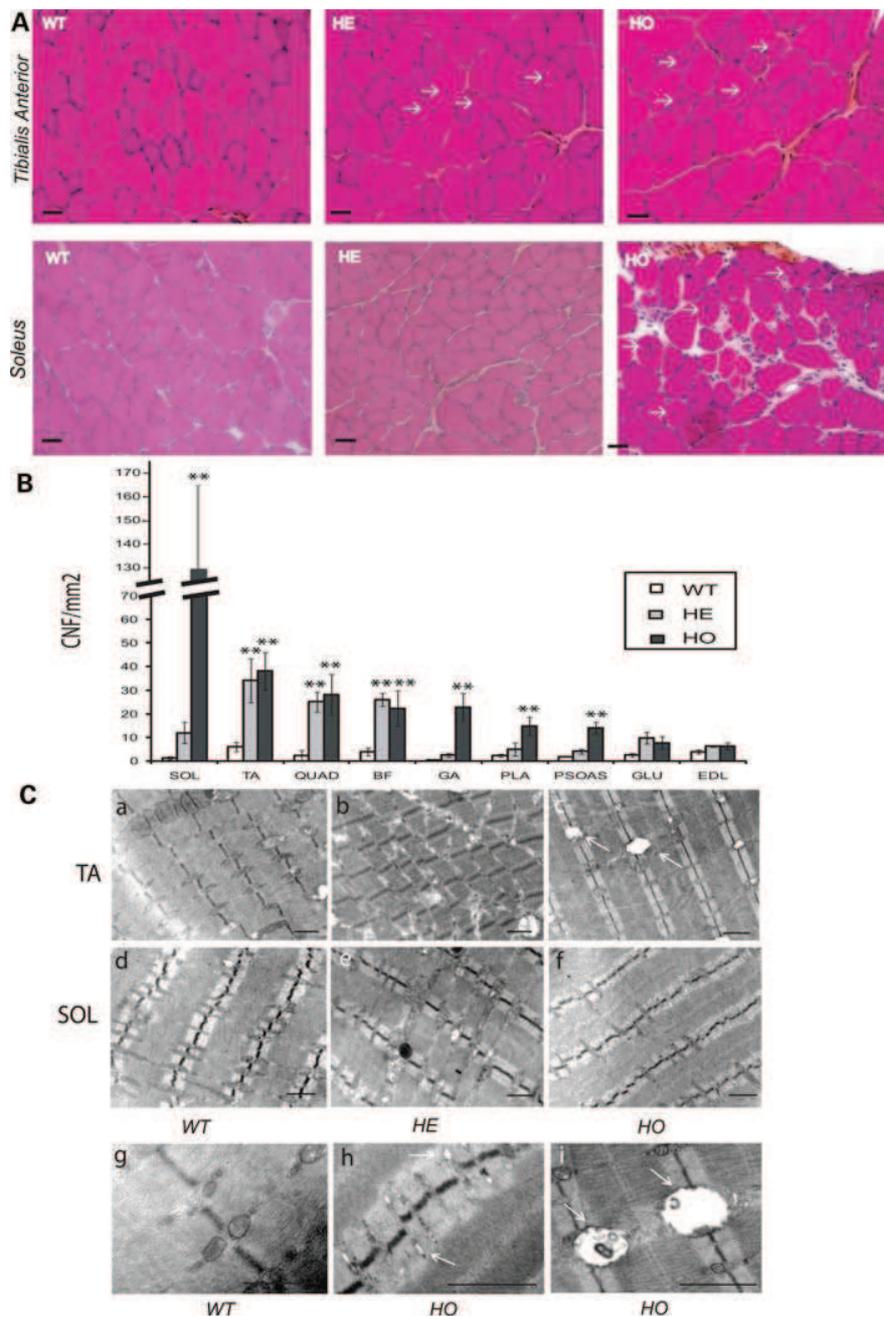


Figure 2. Histological characterization in the *FINmaj* models. (A) Histology of muscles sections of WT, HE and HO mice. HPS-stained representative sections of two of the most affected muscles (TA: upper panel and SOL: lower panel) at 9 months of age are presented. Centronucleated fibres (CNFs) are observed in HE and HO TA and HO SOL (white arrows), whereas inflammatory and fibrotic areas are restricted to the HO SOL. Scale bar = 50 μm . (B) Histogram representing the number of fibres with centrally localized nuclei per mm^2 in different muscles of 9-month-old WT, HE and HO mice ($n = 4$). In HE mice, TA, BF and QUAD are the only muscles severely affected by the degeneration–regeneration process. In the case of the HO mice, most muscles show intense degeneration–regeneration with SOL as the most affected muscle. $**P < 0.01$. (C) Ultrastructural analysis of TA and SOL in 9-month-old WT, HE and HO mice (a–i). In all cases, the overall sarcomeric structure is preserved (a–f). In HO muscles, the presence of multiple non-autophagic vacuoles corresponding to enlarged sarcomeric structure and abnormal disorganized mitochondria (white arrows; c, h and i) is noticed. Scale bar = 1 μm .

The HO mice displays dilated cardiomyopathy with heart muscle fibrosis and left ventricular dysfunction

The impact on the heart of the presence of the *FINmaj* mutation was analysed. First, cardiac histology was examined

at 4 and 9 months of age in each genotype. The HPS-stained cross-sections of HE hearts always show normal features, whereas HO hearts display a marked pathology noticeable as early as 4 months of age, as shown by the large areas of damaged tissue (Fig. 4A). Consistently, Sirius red staining

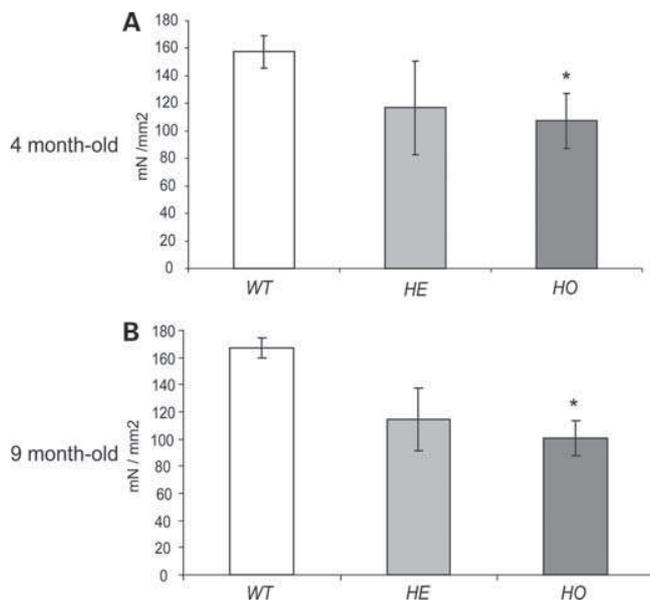


Figure 3. Characterization of muscle function. SOL-specific force at 4 and 9 months of age ($n = 6$). Tetanic-specific force was measured at L_0 in WT, HE and HO animals. The specific force of the SOL is reduced significantly in HO mice at both 4 and 9 months of age. P -values for significance between WT and deficient animals muscles are shown as $*P < 0.05$.

revealed extensive regions of interstitial fibrosis in hearts of HO mice (Fig. 4B). The histological aspect and quantification of collagen areas coloured by Sirius red showed that myocardial alterations increase with age in HO mice (Fig. 4A–C).

Second, transthoracic echocardiography of 11-month-old WT, HE and HO mice was performed in order to assess the structural and functional performance of the heart (Table 2). M-mode images showed that, while HE heart features are normal, HO mice present dilation of the left ventricle, as demonstrated by increased left ventricular (LV) end-diastolic and end-systolic dimensions (LVEDD and LVESD) without the modification of septum and posterior wall thicknesses (LVvol_d: 71.3 ± 3.7 versus $60.4 \pm 4.7 \mu\text{l}$ and LVvol_s: 37.7 ± 3.6 versus $28.1 \pm 2.6 \mu\text{l}$, $P < 0.05$, LVEDD: 4.03 ± 0.09 versus 3.75 ± 0.13 mm and LVESD: 3.09 ± 0.12 versus 2.69 ± 0.15 mm; $P < 0.05$, $n = 3$; Table 2 and Supplementary Material, Fig. S3). LV fractional shortening and ejection fraction are significantly reduced in HO animals (0.23 ± 0.01 and 0.47 ± 0 versus 0.39 ± 0.02 and 0.55 ± 0 , respectively; $n = 3$, $P < 0.05$), indicating LV systolic dysfunction, whereas no abnormalities are seen in HE mice. These functional parameters are consistent with the histology. It should be noted that, notwithstanding these abnormalities, we never observed any unexpected sudden death. Altogether, the presence of the FINmaj mutation in the HO state in the corresponding murine genome leads to marked myocardial fibrosis, dilated cardiomyopathy and systolic dysfunction of the heart.

The FINmaj mutation leads to a loss of the C-terminal extremity of titin in skeletal and cardiac muscles

Immunostaining experiments have previously demonstrated that the titin protein is lost downstream of M4 in human

LGMD2J muscles biopsies (6,12). To check whether the mouse model reproduces this feature, analyses using various titin M-line antibodies were performed on skeletal and cardiac muscles of WT, HE and HO mice. In western blot, the intensity of the titin bands is markedly reduced in HE mice and completely lost in HO animals for both TA and cardiac muscles (Fig. 5A). The same results were obtained in WT and HO SOL, EDL, TA, PSO and QUA muscles (Supplementary Material, Fig. S4A). To check whether the staining is, as expected from the results obtained in human patients, specifically lost downstream of M4, antibodies directed against the A169/170 domain (Mex1) and M9 (T51) were used for co-immunostaining on TA of WT and HO mice (Fig. 5B). M9-specific staining totally disappears in HO mice TA, whereas A169/170 staining is unaffected by the presence of the mutation in the HO state, confirming that the destabilization of titin starts downstream of the A169/170 domains. Co-immunostaining with antibodies directed against M8/9 domain and α -actinin shows the same pattern and confirms that the loss of signal truly concerns the M-line (Supplementary Material, Fig. S4B). In an attempt to localize more precisely the initiation site of this destabilization, we performed immunostaining with an antibody recognizing myomesin, a titin partner reported to interact at M4 (29). The expression pattern of myomesin is similar in HO and in WT, indicating that the titin binding region for myomesin is conserved in HO muscles (Fig. 5C). In the heart, cardiac sections of WT and HO immunostained with M10 or myomesin antibodies revealed a similar disappearance of the M10 staining, while the myomesin staining is unaffected (Fig. 5D).

In HO muscles, obscurin staining at the M-band is modified

Immunostaining using antibodies directed against obscurin has previously demonstrated that obscurin loses its sharply defined M-band localization in LGMD2J biopsies (30). To check whether the mice reproduce this feature, immunohistochemistry colocalization analyses using obscurin and myomesin antibodies were performed on PSO muscles of WT, HE and HO mice at 2 months of age. With this analysis method, the M band localization of both obscurin and myomesin appears to be unaffected by the presence of the titin mutation (Fig. 6A). We therefore proceeded to a more precise analysis of the width of the staining for both proteins using pixel-intensity curves. The mean width of obscurin staining is higher than the mean width of myomesin staining in HO sarcomeres (156 nm), whereas obscurin width is lower in WT and HE sarcomeres (78 and 72 nm, respectively, $P < 0.01$). A similar result has been obtained with myomesin 2 (data not shown). These data suggests that obscurin is slightly modified at the M-band in HO sarcomeres as it is in LGMD2J (Fig. 6B).

The FINmaj mutation leads to a secondary reduction in calpain 3 in both HE and HO mice

Another defect previously observed in human patients is a secondary deficiency in calpain 3 (27). Calpain 3 expression and activity in WT, HE and HO muscles were therefore measured simultaneously using a test previously developed in our

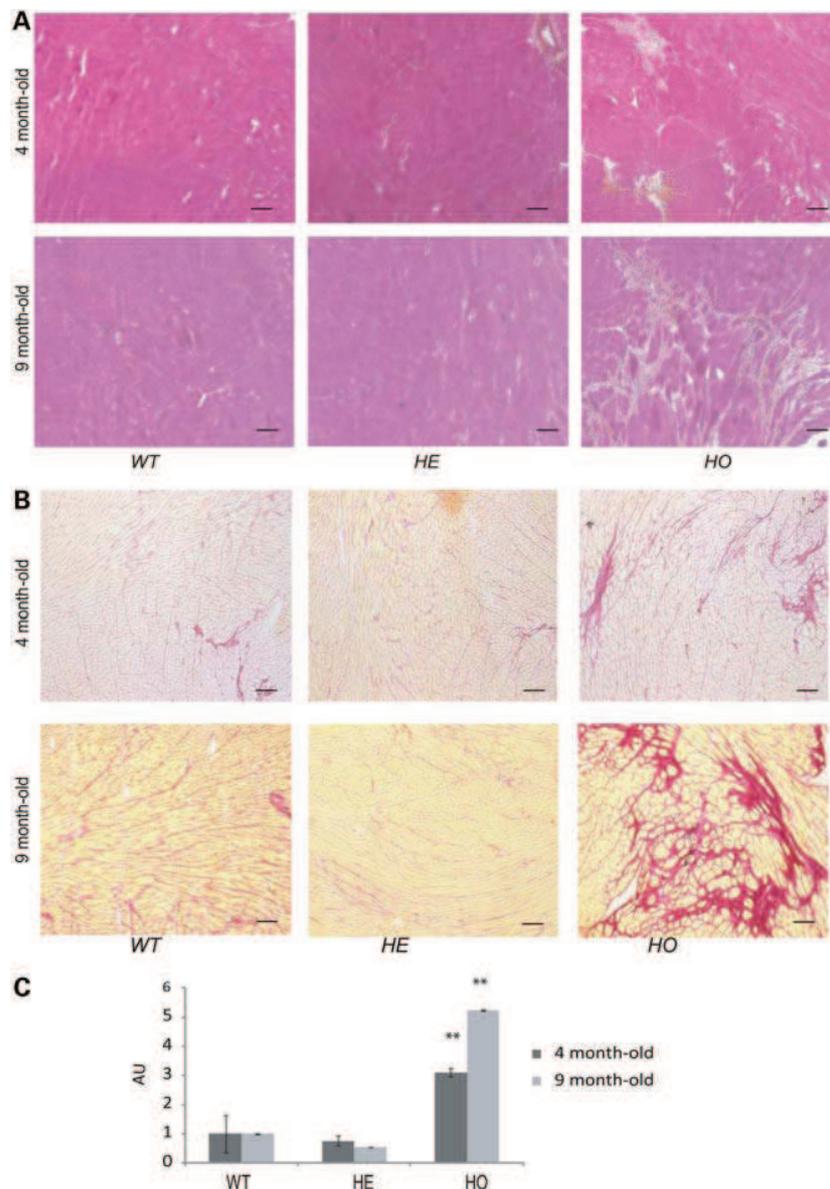


Figure 4. Histology and function of the cardiac muscle. (A) Histological analysis of heart sections of WT, HE and HO mice. Representative HPS-stained sections of hearts at 4 and 9 months of age. The heart is severely affected from 4 months of age in HO, but not in HE mice. The impairment worsens with age (compare images of 4- and 9-month-old animals). Scale bar = 200 μ m. (B) Sirius red staining on heart sections of 4- and 9-month-old WT, HE and HO animals. Note the progression of the collagen connective tissue areas with time (compare the hearts of 9-month-old animals with those of 4 month-old mice). Scale bar = 200 μ m. (C) The quantification of Sirius red area corrected by the total surface of the muscle section shows an important increase in the collagen connective tissue fraction over time ($n = 4$ per point). AU, arbitrary units (** $P < 0.01$).

laboratory (31). The results show that calpain 3 expression is reduced in HO TA muscles (Fig. 7A, left and middle panels, $P < 0.01$), although some decrease is observed occasionally in some HE muscles. Nonetheless, calpain 3 enzymatic-specific activity normalized to the quantity of protein is unchanged in presence of the titin mutation, indicating that the FINmaj mutation has no consequences on the functionality of the remaining calpain 3 molecules (Fig. 7A, right). Calpain 3 qRT-PCR was carried out on RNA extracts of muscles of the three genotypes. No difference in calpain 3 mRNA expression was ever observed (Fig. 7B), which indicates that

the reduction in calpain 3 expression results from the destabilization of the protein. This destabilization is possibly due to an autolytic activation and instability caused by the loss of the stabilizing interaction with titin.

Crossing this model with a calpain 3-deficient model rescues the number of siblings and attenuates the myopathology in HE

Considering the possibility that the secondary reduction in calpain 3 was due to an increased turnover and therefore an

Table 2. Echocardiographic assessment of WT, HE and HO mice

	WT	HE	HO
LVEDD	3.75 ± 0.13	3.72 ± 0.02	4.03 ± 0.09
LVESD	2.69 ± 0.15	2.34 ± 0.31	3.09 ± 0.12*
IVS_d	0.83 ± 0.11	0.93 ± 0.05	0.93 ± 0.12
IVS_s	1.09 ± 0.21	1.28 ± 0.07	1.19 ± 0.1
LVPW_d	0.78 ± 0.06	0.96 ± 0.11	0.82 ± 0.04
LVPW_s	1.03 ± 0.1	1.36 ± 0.13	1.04 ± 0.13
LVvol_d	60.4 ± 4.7	59.3 ± 1.01	71.3 ± 3.7*
LVvol_s	28.1 ± 2.6	20.05 ± 5.61	37.7 ± 3.6*
LV m/w	4.1 ± 0.3	4.68 ± 0.78	5.1 ± 0.6*
EF %	0.55 ± 0	0.67 ± 0.11	0.47 ± 0*
FS %	0.39 ± 0.02	0.37 ± 0.09	0.23 ± 0.01*
PWTh (%)	0.32 ± 0.04	0.42 ± 0.02	0.27 ± 0.15
CO (ml/min)	16.3 ± 1.7	19.15 ± 0.15	19.3 ± 2
VelPW_d (mm/s)	26.16 ± 1.15	33.97 ± 8.37	36.13 ± 0.7*
VelPW_s (mm/s)	21.47 ± 2.17	25.73 ± 10.77	24.03 ± 0.69

Transthoracic echocardiography of 11-month-old WT, HE and HO mice was performed. LVEDD (mm), LV end-systolic diameter (LVESD, mm), IVS wall (mm) and LVPW (mm) thicknesses were measured at diastole and systole stages. LV volume (LVvol, μ l) is calculated at diastole by $LVvol_d = [7/(2.4 + LVEDD)] \times LVEDD^3 \times 1000$ and at systole by $LVvol_s = [7/(2.4 + LVESD)] \times LVESD^3 \times 1000$. LV mass divided by the total mouse weight (LVm/w; where w is the total weight of the mouse) was obtained after calculation of $LVm = 1.055 \times (IVS_d + LVEDD + LVPW_d)^3 - (LVEDD)^3$, where 1.055 is the specific gravity of the myocardium. LV fractional shortening (FS, %) and LV ejection fraction (EF, %) were calculated using the following equations: $FS (\%) = (LVEDD - LVESD/LVEDD) \times 100$ and $EF (\%) = (LVvol_d - LVvol_s)/LVvol_d \times 100$ as measures of systolic function. Posterior wall thickening (PWth) was calculated from the above dimensions using: $(LVPW_s - LVPW_d)/LVPW_d$. Cardiac output was calculated as follows: $CO (ml/min) = (LVvol_d - LVvol_s) \times HR \times 0.01$. Velocity of posterior wall (VelPW, mm/s) is measured using the tissue doppler tool of the echocardiograph.

Only the HO mice show dilated cardiomyopathy as characterized by increased LV dimensions with no modification of septum and wall thicknesses. A systolic dysfunction of the heart was also noticed since LV fractional shortening and ejection fraction were significantly lower in HO than in WT. Values in bold are significantly different from the WT values.

*Reflects a significance of $P < 0.05$.

over-activation of the protein, we investigated the consequences of a reduction of the quantity of calpain 3 by inter-strain crossing. We crossed HE mice with a calpain 3 (CAPN3)-deficient model (*capn3*^{-/-} mice) (32) to obtain HE/*capn3*^{-/+} pups. They were obtained with a normal Mendelian ratio and were subsequently interbred to obtain HE and HO FINmaj animals bearing two, one or no calpain 3 normal alleles. Interestingly, the distribution of the obtained offspring was significantly different of the ratio previously obtained in HE FINmaj crosses (Table 3, total distribution). Indeed, reduced expression of calpain 3 based on heterozygosity at the CAPN3 locus results in the recovery of a correct number of pups, as HO/*capn3*^{-/+} and HE/*capn3*^{-/+} are obtained with a normal Mendelian ratio (Table 3, titin HE at calpain 3 locus). However, no correction of the ratio was obtained in the total absence of calpain 3 (Table 3, titin HO at calpain 3 locus).

Muscles from HO/*capn3*^{-/+} and HE/*capn3*^{-/+} mice were subjected to histological analysis. It should be noted that muscles from *capn3*^{-/+} mice do not present any histopathological signs at any age (32). In 9-month-old mice, the HPS-stained frozen cross-sections of HE/*capn3*^{-/+} TA, QUA and BF muscles do not show any dystrophic features

in contrast to what we previously observed for HE animals. Quantification of fibres with centrally located nuclei in these muscles shows normalization towards the WT level (Fig. 8A and B). In addition, the number and distribution of sizes are similar between fibres of HE/*capn3*^{+/-} and *capn3*^{+/-} control littermates (Supplementary Material, Fig. S5). Heart muscle is not affected neither in HE nor in HE/*capn3*^{+/-} mice (Fig. 8C). Regarding HO/*capn3*^{-/+}, although the number of animals is small ($n = 3$), the decrease in calpain 3 does not seem to influence the dystrophic signs, especially in SOL and TA (Supplementary Material, Fig. S6A and B). The heart is severely affected in both HO and HO/*capn3*^{+/-} mice (Supplementary Material, Fig. S6C). Altogether, it seems that the reduction of calpain 3 leads to a rescue of the myopathological phenotype only of the monoallelic titinopathy, suggesting that the pathophysiology is different from the biallelic titinopathy.

DISCUSSION

The observation that distinct phenotypes, one dominant, late onset and distal (TMD) and the other recessive, early onset and proximal (LGMD2J) arise depending on the presence of an identical Mex6 mutation in one or two alleles is particularly intriguing. To further understand the physiopathology of these two diseases, we generated a knock-in mouse model carrying the FINmaj mutation and analysed the phenotypes of HE and HO animals. Interestingly, this model shows, at the level of the skeletal muscle, a myopathology with a high similarity to the human situation (Table 4).

The classical TMD presentation is mild, with clinical symptoms occurring after the age of 35 years. The anterior compartment of the lower legs is predominantly affected, the initial atrophy of the TA extending later on to the long toe extensor muscles and hamstrings. Occasionally, QUA, *Pero-neal*, SOL or GA muscles can also be involved (10). HE animals present a late-onset muscle pathology with a high selectivity of impairment affecting TA, BF and QUA from 9 months of age, though no significant functional impairment is detected. It should be noted that we never observed any alterations of the foreleg muscles, consistent with the absence of upper limb impairment in humans. The involvement of the TA muscle both in human TMD and the HE mouse is of interest. Regarding the conventional fibre-type categories, the TA in human is a slow fibre muscle, whereas in the mouse it is mainly composed of fast fibres (33,34). This observation suggests that titinopathies are connected to molecular fingerprints that are independent of the myosin-based ATPase characteristic but still are shared by both species. In contrast, the molecular fingerprint of EDL seems to be very different in man and mice, since EDL (together with *Extensor Hallucis Longus*) is the next one after the TA muscle, to be fully damaged in TMD, but remain unaffected in our mouse model.

LGMD2J patients have a severe muscular dystrophy, with early onset in the first to third decade and impairment of all proximal muscles (9). Consistently, HO animals present the first dystrophic signs early, at 1 month of age in the SOL that extends later on to other muscles (TA, PSO, QUAD,

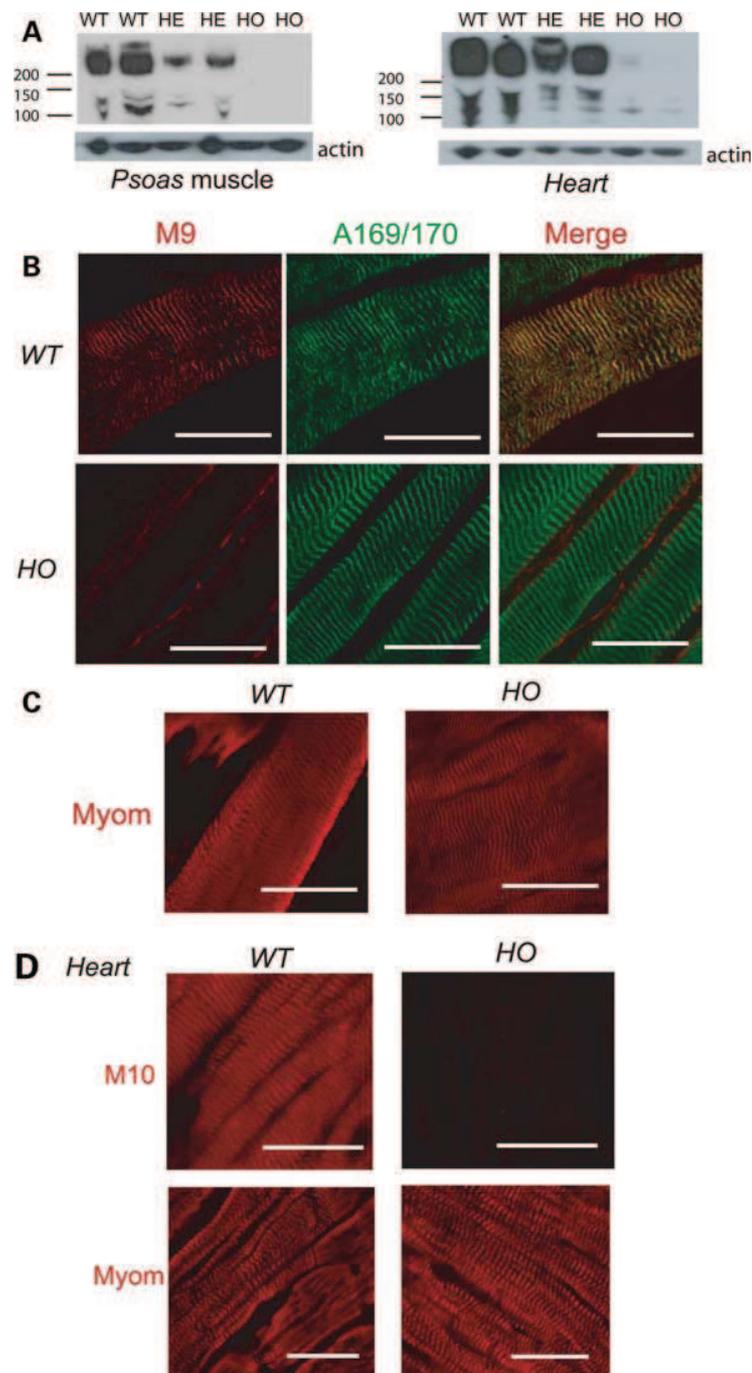


Figure 5. Titin M-line disruption in muscle and heart. (A) Cytoskeletal proteins prepared using the S-PEK kit were separated by SDS-PAGE and analysed by western blot. Membranes were probed with M10-1 antibody, specific for the titin M10 domain (12). Under these experimental conditions, western blots of the cytoskeletal fraction using the M10 antibody revealed specific titin bands as seen in Supplementary Material, Figure S4. The intensity of C-terminal titin bands is reduced by half in HE mice and completely lost in HO animals in skeletal muscle (left panel). The same results were obtained with cardiac samples (right panel). Alpha-actin is used to normalize the quantity of proteins. (B) The co-immunostaining of a longitudinal section of TA with antibodies directed against A169/170 and M9 domains show that the signal is completely lost downstream of the M9 C-terminal region of titin in HO mice. Scale bar = 50 μm . (C) Myomesin staining of longitudinal sections of TA is normal in HO muscle, indicating that the loss of the C-terminal M-line region starts downstream of the M4 domain. Scale bar = 50 μm . (D) M10 and myomesin stainings reveals the same loss of the titin C-terminus in HO mice downstream of the M4 domain on heart sections. Scale bar = 50 μm .

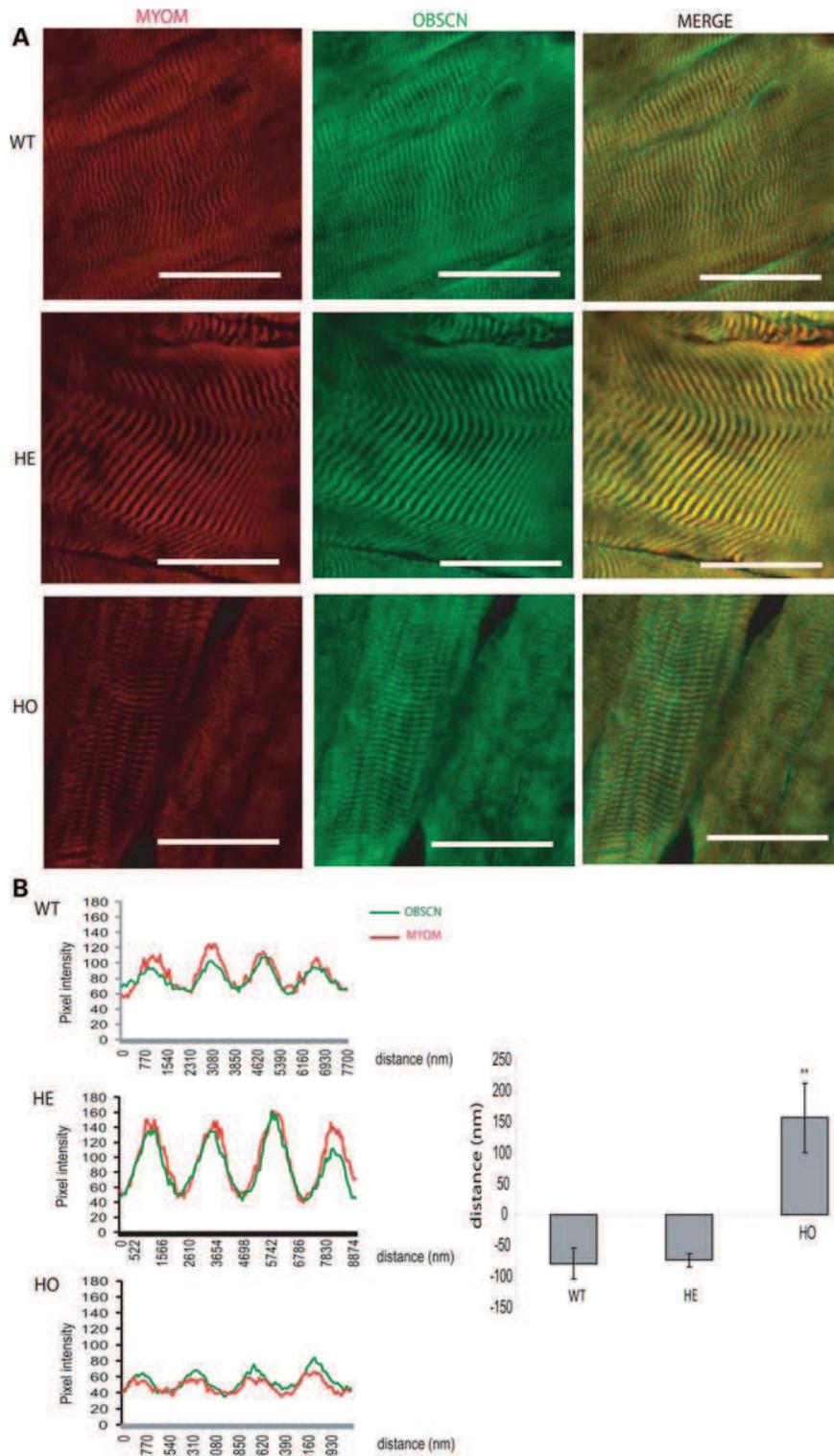


Figure 6. Obscurin mislocalization at the M-band in HO animals. **(A)** Colocalization at the M-band of obscurin (green) and myomesin (red) in confocal analysis of 2-month-old WT, HE and HO PSO muscle sections. The results show that obscurin localization appears unaffected by the titin mutation. Scale bar = 30 μ m. **(B)** Image analysis of the width of obscurin staining compared with myomesin. *Left:* Superimposition of pixel-intensity curves across four sarcomeres for obscurin (green) and myomesin (red) in WT, HE and HO mice. X-axis: nm and Y-axis: pixel intensity. *Right:* Plots of obscurin width and myomesin width staining in WT, HE and HO muscles show that obscurin is found in broader stripes in the M-band in comparison to WT and HE animals, whereas myomesin remains constant (** $P < 0.01$).

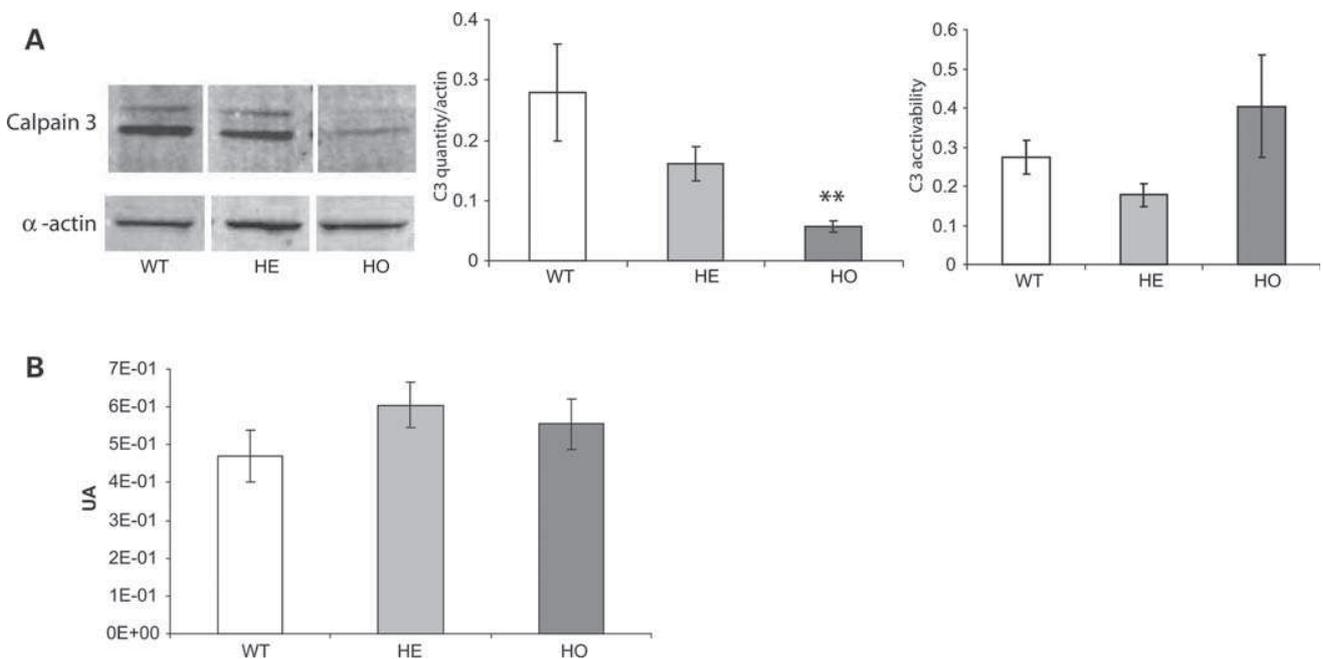


Figure 7. Calpain 3 in FINmaj model. (A) Assessment of both calpain 3 expression and activity in TA muscles. A V5-tagged inactive form of calpain 3 (used as a substrate) was pre-incubated with the muscle proteins extracted from WT, HE and HO animals and calpain 3-specific western blot was carried out. For the analysis of calpain 3 expression, the quantification of calpain 3 was performed with a specific antibody and normalized to α -actin (left panel). The quantity of calpain 3 is approximately three times lower in HO than in WT mice (middle panel, $P < 0.05$). Similar results were observed in SOL, EDL, QUA and BF muscles. The activity of calpain 3 is calculated using the quantification of the remaining calpain 3 substrate (detected using an antibody recognizing the V5-tag) normalized by the total quantity of calpain 3 (right panel). Calpain 3 is at least as active in HO as it is in WT. (B) Calpain 3-specific qRT-PCR. No significant difference in calpain 3 transcript expression was observed between the three phenotypes, indicating that the decreased expression of the calpain 3 protein is due to the destabilization of the protein and not due to impaired transcription.

GA, GLU and BF), but spares the EDL and DIA. The murine SOL contains a larger proportion of slow myosin than most other mouse muscles, with a proportion similar to that of human proximal muscles (34). Unfortunately, because the examination of LGMD2J patients occurred too late in the course of the pathology, the first muscles affected are not known and no parallel can be put forward between the two species so far. Finally, relative sparing of DIA in the murine model is not surprising, since respiratory failure occurs very late in human LGMD2J patients, after the total loss of all limb muscle activity (13).

Cardiomyopathy has not been diagnosed in TMD patients (28) and the absence of cardiac phenotype in HE mice is consistent with these human data. Concerning LGMD2J, of the originally described five Finnish patients, they all died at ages ranging between 52 and 65 years, four of respiratory failure and one of myocardial infarction. One of these patients underwent echocardiography at the age of 55 years with no indication of cardiomyopathy. However, an autopsy of another patient who died at the age of 64 showed that his heart presented mild LV hypertrophy (13). Considering these observations, mild subclinical cardiomyopathy may exist in LGMD2J but severe presentation is evidently not a systematic feature. The situation is more clear-cut concerning the HO mice, since they all present a dilated cardiomyopathy phenotype apparent at both histological and echocardiographic levels. This phenotype presents as extensive myocardial fibrosis starting from 4

months of age and LV dilation with impaired systolic function at 11 months of age. Considering these observations, a strict cardiac follow-up of patients affected with a LGMD2J could be necessary and should help clarify the issue of cardiac involvement.

Overall, it seems that C-terminal part of titin encompasses functions of importance for the homeostasis and the integrity of the striated muscle and that are conserved in between human and mouse species. In view of its characteristics, the FINmaj model seems perfectly relevant for studies towards understanding these particular titin functions, as well as the downstream mechanisms leading to TMD or LGMD2J. Since the mutated FINmaj titin is incorporated into the sarcomere, the corresponding titin domain is apparently dispensable for sarcomere assembly during development, in contrast to what was observed with the titin deleted of the TK domain (35). However, partial embryonic lethality starting from E12 was observed both for HE and HO animals. It should be noted that primary and retrospective examination of the large original Finnish family did not reveal any indications of abnormal offspring proportions (9). We pursued a backcross on a C57BL/6 background and crossed N9 animals to obtain HO mice. Interestingly, the ratio obtained on 44 pups is congruent with a Mendelian transmission. These preliminary data indicate that there is a modifying factor expressed at the embryonic stage in the 129 murine genome that is deleterious for FINmaj embryos. Understanding the cause of the lethality would require further investigations and could

Table 3. Distribution of WT, HE and HO offspring obtained from HE/capn3^{-/+} HE crosses

Titin genotype		WT	HE	HO	
Total distribution of titin animals					
1	Observed	18	34	9	
2	Expected according to the titin ratio	18	18	2.3	$\chi^2 = 33.7$ ($P < 0.01$)
3	Expected according to the Mendelian ratio	18	36	18	$\chi^2 = 4.6$ ($P > 0.1$)
Details of the titin animals HE at the calpain 3 locus ^a					
1	Observed	10	22	6	
3	Expected according to the titin ratio	9	9	1.2	$\chi^2 = 32.8$ ($P < 0.01$)
5	Expected according to the Mendelian ratio	7	15	7	$\chi^2 = 3.7$ ($P > 0.1$)
Details of the titin animals HO at the calpain 3 locus ^b					
1	Observed	7	2	1 ^c	
3	Expected according to the titin ratio	4.5	4.5	0.3	$\chi^2 = 1.9$ ($P > 0.5$)
5	Expected according to the Mendelian ratio	4	8	4	$\chi^2 = 6.9$ ($P < 0.05$)

Lane 1 = observed data.

Lane 2 = expected number of animals with the different titin genotypes calculated considering the distribution previously found in HE crosses (25, 25 and 4% for WT, HE and HO animals, see Table 1).

Lane 3 = expected number of animals considering a Mendelian distribution. This calculation method assumes that WT animals were obtained at a normal level (25, 50 and 25% for WT, HE and HO animals). The χ^2 significance between the observed and the expected distributions is indicated at the right of the table.

^aHeterozygosity at the calpain 3 locus seems to allow a recovery of a correct number of pups since HO/capn3^{-/+} and HE/capn3^{-/+} are obtained with a normal Mendelian ratio.

^bThe distribution of the different genotypes is not corrected by complete calpain 3 deficiency.

^cDead before weaning.

help to decipher why, after the critical prenatal period, no further lethality was observed.

Previous observations and the present data highlight the absence of major ultra-structural defects of the sarcomere both in FINmaj human and mouse adult muscles, even in the absence of M9–M10 portion of titin (6,8). Contrarily, human frameshift mutations arising upstream in the M-line (out-of-frame deletions in Mex1 and Mex3 in EOMFC) and defects of mutant M-line mice models (in frame deletion of Mex1 and Mex2) all lead to sarcomeric disassembly (5,36). The cause of this instability is probably related to the loss of anchoring of critical structural proteins such as myomesin and M-protein in the M-line, secondary to lack of the corresponding interacting titin domain. The M9–M10 region of titin probably does not have a strict structural function at least in terms of anchoring titin into the sarcomere. Since the same mutation has different phenotypic consequences depending on its presence in one or two alleles, it is possible that two different pathophysiological mechanisms are at stake in these diseases and that the biallelic titinopathy cumulates them both.

Obscurin is one of the few titin partners known to bind to the titin region and is known to provide links between the myofibrillar apparatus to the sarcomeric reticulum (3,22,30). It has been shown, in a forced yeast two-hybrid assay, that

obscurin exhibits a much weaker interaction with FINmaj mutated M10 than with a normal fragment (30). In addition, in LGMD2J biopsies, a subtle loss of defined M-line localization was observed (30). Consistently, confocal analysis carried out in our murine model seems to indicate that obscurin binding is modified, although the difference observed between HO and control animals is far weaker than in LGMD2J samples. Nevertheless, our results are in agreement with the idea that obscurin dysregulation participates specifically in the pathogenesis of LGMD2J but not of TMD. The vacuolar changes observed in FINmaj mutated HO SOL muscles may correspond to mildly disorganized sarcoplasmic reticulum secondarily to this abnormality of obscurin localization.

As shown by the correction of phenotype obtained after crossing FINmaj mice with calpain 3-deficient mice, an overall disrupted calpain 3 regulation seems to be a major part of the mechanism, at least for TMD-related pathogenesis. Considering that titin staining is lost downstream of the M4 domain and that calpain 3 protein level is reduced, it is possible that the presence of the mutation in the vicinity of the calpain 3-binding site causes a major conformation change (6,37), leading to the disruption of the buffering inhibitory regulation of the proteolytic activity of calpain 3. As a result, calpain 3 activity would heighten, leading to an increased turn-over of the protein, as reflected by a decrease in its steady-state level, and an excess of cleavage of its substrates. It is indeed possible that the disappearance of the titin C-terminus would be one of the consequences. Interestingly, although mostly expressed in skeletal muscle, calpain 3 is weakly expressed in heart, which is consistent with the possibility that calpain 3 is the protease responsible for this cleavage (38,39). Nevertheless, since the non-affected EDL muscles present as the other muscles the loss of M-band titin, it seems that it is not this event *per se* that is pathogenic. The pathophysiological mechanism may then be related to aberrant proteolysis of other substrates and/or loss of anchoring of C-terminal titin partners that would be deleterious only in specific muscles. This mechanism should be present in both TMD and LGMD2J. The difficulty in obtaining HO/capn3^{-/-} has prevented us to evaluate at late stage whether the phenotype of the HO is reduced, at least in the TA and therefore to confirm this hypothesis.

In conclusion, this new mouse model reproduces with reasonable reliability clinical and molecular features of the human diseases and shows that the disruption of calpain 3 regulation seems to be a major factor in the pathological mechanism in HE animals. This abnormality, together with the anomaly of obscurin localization observed in HO animals provides the first clue to understand the basis of the different phenotypic outcomes between mono- and biallelic titinopathies. Considering the human–murine similarity in phenotype and in molecular consequences, at both HE and HO levels, the FINmaj model will be valuable for enlarging our understanding of the function of the titin extreme C-terminus. In particular, it may be used to document the complex functional relationships between titin, calpain 3 and the other partners in the M-line of the sarcomere. Ultimately, this knowledge should help to define appropriate therapeutic strategies.

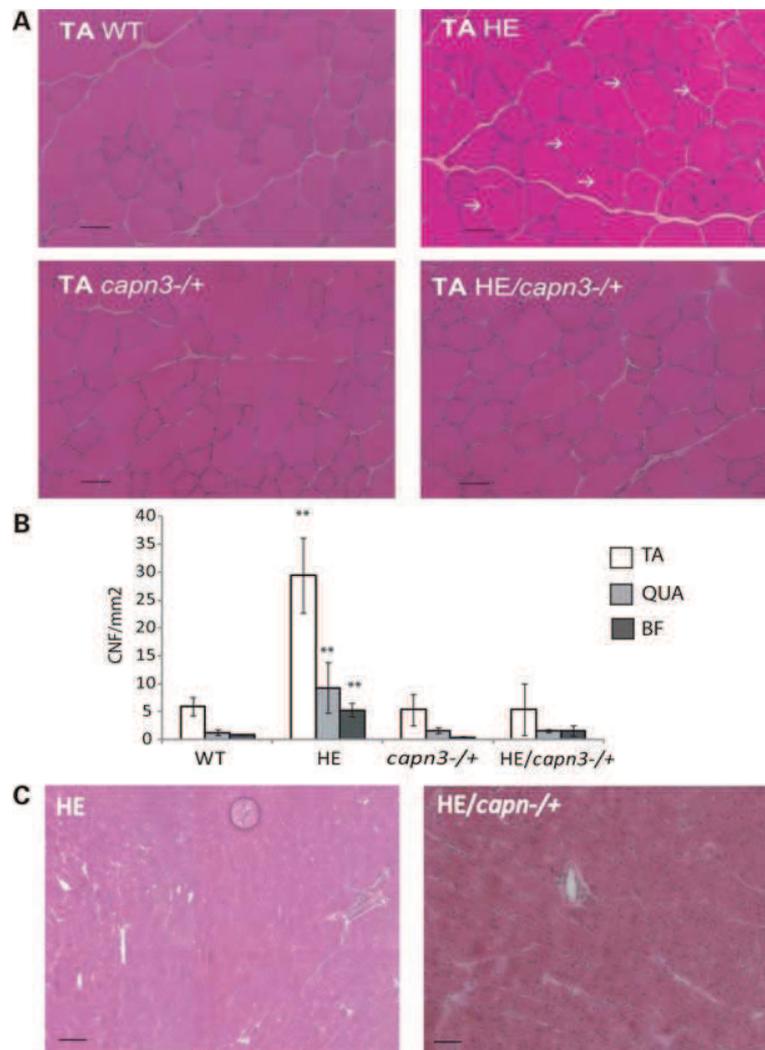


Figure 8. Calpain 3 role in the molecular pathophysiological mechanism in HE animals. *Left:* Histology of (A) TA muscles for WT, HE/*capn3*^{+/-} and HE/*capn3*^{-/-} at 9 months of age. White arrows indicate some fibres with centrally located nuclei. The general histological aspect of HE/*capn3*^{+/-} muscles is improved when compared with HE muscles. Scale bar = 50 μ m. (B) Quantification of CNFs in TA, BF and QUA of 9-month-old animals. The centronucleation index of HE/*capn3*^{+/-} muscles is similar to the one measured in WT mice, showing that the reduction of calpain 3 expression within the HE background ameliorates muscle histology (***P* < 0.01). (C) Histological analysis of heart sections of HE and HE/*capn3*^{+/-}. Representative HPS-stained sections of hearts at 9 months of age. The heart is not affected in either HE or in HE/*capn3*^{+/-} mice. Scale bar = 200 μ m.

MATERIALS AND METHODS

Mouse model construction and genotyping

Construction of the targeting vector and generation of the murine knock-in model for the FINmaj titin mutation were performed at the 'Mouse Clinic Institute' (MCI, France). A 2.2 kb fragment encompassing exons Mex2–Mex6 of titin was amplified by PCR on 129S2/SvPas genomic DNA with modified primers to introduce the mutation GAAATAACA TGG GTGAAAGAAAAA in exon Mex6. The mutated fragment was subcloned in an MCI proprietary vector containing a loxed neo resistance cassette. Two fragments of 2.8 and 3.6 kb (corresponding to the 5' and 3' homology arms, respectively) were amplified by PCR on 129S2/SvPas genomic DNA and subcloned directly upstream and downstream of the construction in the previous plasmid to

generate the final targeting construct. The plasmid sequence was verified by restriction digestion and all exons and exon–intron junctions were sequenced.

The linearized construct was electroporated into 129S2/SvPas mouse ES cells, and G418-resistant colonies were isolated and expanded. The sequences of targeted clones were validated by PCR using external primers and further confirmed by Southern blot with 5' and 3' external probes. The presence of the correctly targeted allele was confirmed in one positive ES clone. After a caryotyping, the transgenic ES clone was injected into C57BL/6J blastocysts which were re-implanted into foster mothers to generate chimeric mice. Germline transmission was obtained through the breeding of male chimeras with CMV-cre (cre recombinase under the control of the CMV promoter) transgenic females, which also permits the excision of the neo cassette. The Cre transgene was

Table 4. Similarities and differences between M-line titinopathies in human and mouse

		Human	Mouse
One mutant allele	Late dystrophic features	+	+
	Few selective muscles involved	+	+
	Embryonic lethality	-	+
	Functional consequences	+	+
Two mutant alleles	Early disease manifestations	+	+
	Severe	+	+
	Affect a larger number of muscles	+	+
	Functional consequences	+	+
	Myocardial alterations	-	+
	Embryonic lethality	-	+

Note that embryonic lethality was observed at N3 on a C57BL/6 backcross.

segregated by a first cross on C57BL/6 background; the resulting HE mice were backcrossed for three generations and then interbred. All mice were handled in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

The introduction of the mutation in the murine genome was verified by sequencing PCR fragments obtained by amplification of tail DNA isolated using a REDEExtract-N-AmpTM tissue PCR kit (Sigma) using the forward primer TTN 1180, located around the loxP site, and the reverse primer TTN 1183 (Supplementary Material, Table S2). PCR amplification was performed using PCR ReadyMixTM (Sigma) for 30 cycles with annealing cycles at 59°C for 30 s. The resulting WT and mutant alleles generate PCR fragments of 414 and 502 bp, respectively.

For the analysis of embryonic lethality, timed matings were set-up between HE mice. The gestational age was dated by the appearance of the vaginal plug on the morning after mating and/or embryo staging by comparison with established references (40). The studies covered embryonic days E12.5 to E15.5. Pregnant mice were sacrificed by cervical dislocation, and a caesarean section was performed to remove the uterus intact. The uterus was dissected and the embryos were removed under sterile conditions. The genotypes of embryos were determined by TTN PCR as above using DNA from the embryonic tissue.

The mouse model carrying both the FINmaj mutation and a deficiency in calpain 3 was obtained by crossing of HE female mice with calpain 3-deficient male mice (32). Genotyping for the FINmaj and calpain 3 mutations was performed on tail DNA, respectively, as described above and using primers for calpain 3 (forward primers: GW 255 and GW 257 and reverse primer GW 259; Supplementary Material, Table S2). PCR amplification was performed using PCR ReadyMixTM (Sigma) for 30 cycles with annealing cycles at 62°C for 30 s. The resulting WT and mutant alleles generate PCR fragments of 380 and 480 bp, respectively.

Histology, immunohistochemistry and morphometry

Cryosections (8 or 10 mm thickness) were prepared from frozen skeletal and cardiac muscles. Transverse sections were processed for HPS or Sirius red histological staining.

In some experiments, mice were injected intraperitoneally with EBD (1 mg/g of body weight) the day before sacrifice after a course of 30 min. EBD-positive fibres were revealed by fluorescence excitation at 633 nm and counted.

Colorimetric immunostaining with laminin, dMHC, sMHC and CD11b were performed according to the ARK peroxidase kit protocol (DAKO) to assess the number and minimal diameter of fibres, regenerative fibres, fibre types and inflammatory infiltrates, respectively. The antibodies used for these detections were: an anti-laminin polyclonal antibody (Progen, P-4417, dilution 1:1000), a monoclonal antibody specific for sMHC (Sigma, M-8421, dilution 1:1000), a monoclonal antibody specific for dMHC (Novocastra, NCL-dMHC, dilution 1:1000) and a monoclonal mouse antibody produced against CD11b (BD Pharmingen, Mac-1 α chain, 1:40). Digital images of stained sections were acquired with a CCD camera (Sony) and a motorized stage on a Nikon Eclipse E60 microscope. Images were analysed with Ellix (laminin), Cartograph (myosin and CD11b) or Histolab (Sirius Red) softwares (Microvision, France).

Immunofluorescence detection of titin was performed on unfixed longitudinal TA and heart sections using the mouse monoclonal antibody: 2Q1063 (US Biological, dilution 1:10), M9 domain titin antibody (T51; a gift from Professor D. Furst; dilution 1:10), the rabbit polyclonal antibodies: A169-170 titin (Mex1; dilution 1:100) and M8/9 titin (a gift from Professor S. Labeit dilution 1:100), a mouse monoclonal antibody alpha-actinin, (clone EA-53, Sigma-Aldrich; dilution 1:5000) and a rabbit polyclonal Mex6 antibody (Mex6.1; dilution 1:100 on boiled sections) that we generated by injection of the peptide NEFGSDSATVNINIRSMC from M10 domain (Agrobio, France).

Myomesin 1 and 2 and obscurin immunostaining was performed on PSO of 2-month-old mice sections fixed with pre-chilled acetone for 5 min at -20°C and with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 6 min. After neutralization with 0.1 M glycine in PBS, sections were treated with 0.2% Triton X-100 in PBS. After washing with PBS, samples were blocked with 5% normal goat serum for 30 min. The sample was incubated with mouse M4 myomesin primary antibody (1:100; Developmental Studies Hybridoma Bank at The University of Iowa) or myomesin-2 (1/100; Santa Cruz Biotechnology, H-65) and rabbit anti-obscurin (1:200; a gift from Professor M. Gautel) in 1% BSA for 1 h. Sections were then incubated for 30 min with goat anti-mouse or goat anti-rabbit antibodies conjugated with Alexa-488 or 594 dyes (dilution 1:1,000; Invitrogen). The sections were examined with a confocal microscope (TCS SP2.AOBS, Leica, Germany) using the 488 nm line of an argon laser (12% power range) and 633 nm (HeNe laser 25 mW, 40% Power).

All images were acquired in 1024 \times 1024 format with a 63 \times HCS PLAP0 objective. Image processing and analysis was done using Adobe Photoshop CS2 9.0.2 (Adobe Systems Inc., CA, USA), and ImageJ 1.38x (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). For the calculation of the obscurin/myomesin labelling width ratio, pixel-intensity curves transversely to sarcomeres were determined by Image J for both stains. Excel software was used to calculate the width of the staining in the second quartile of each oscillation, after adjustment of the baselines of both curves. Ninety sarcomeres for every phenotype (WT and HO) were

counted. The difference in mean width between obscurin and myomesin was calculated and plotted.

Electron microscopy

For electron microscopy, SOL and TA muscles were dissected and pre-fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) overnight at 4°C. Pieces of the sample were placed in the same fixative for a further 2 h, rinsed in PB and post-fixed in 2% osmium tetroxide. After washing with PBS, each sample was dehydrated in a graded series of ethanol baths and embedded in Epon resin (EMS LYNX Automated Tissue Processor). Semi-thin sections (1 µm) were cut and evaluated by light microscopy to define more accurately the field of observation. The tissues were then cross-sectioned at 80 nm thickness with a microtome (LEICA Ultracut R). The grids were stained with uranyl acetate and examined under a Philips Tecnai F20 transmission electron microscope.

In vitro and *in vivo* evaluation of muscle function

Animals were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (100 mg/kg). The muscles were surgically excised and maintained in Krebs buffer. Measurements of isometric contractile properties and resistance to eccentric contractions were performed on EDL and SOL muscles according to methods previously described (41). For the evaluation of stiffness, isolated muscles were subjected to a passive stretch protocol where the muscles were submitted to three of ramp-and-hold extensions of 2.5 mm in amplitude. The peak incremental stiffness (N/m) and the steady incremental stiffness (N/m²) were calculated according to Anderson *et al.* (42). For the escape test, the mouse tail is attached to a force sensor and the force developed by the mice after pitching the tail is measured (43). The spontaneous global activity of mice was recorded during 6 h in an open field (LE 8811 IR motor activity monitor equipped with 16 horizontal infrared photocell beams; BIOSEB, France).

Echocardiogram

Conventional transthoracic echocardiographies were performed on mice placed on a heated, tilt platform and anaesthetized using 1% isoflurane. The heart rate (HR) was maintained constant during echocardiography. An echocardiograph system (Vevo 770, VisualSonics, ON, Canada) with a 30 MHz scanhead was used for the investigation of the heart. In order to improve the quality of images, sweep speed, depth, focus and gain settings were optimized. B- and M-mode images were obtained from long-axis view at the level of the largest LV diameter for measurements of LVEDD (mm), LVESD (mm) (measures of LV dilation), inter-ventricular septal (IVS) wall thicknesses and posterior wall (LVPW) according to the rules defined by the convention of the American Society of Echocardiography (44).

Western blot and calpain 3 activity assay

Muscle tissue was weighed and homogenized using an Ultra-Turrax T8 (Ika, Germany) in a lysis buffer containing 20 mM

of Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA and 0.1% Triton X-100 supplemented with Complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) and 2 µM E64 (Sigma). *In vitro* calpain 3 activity assay was subsequently performed on these extracts as previously described (31). After SDS-PAGE performed on precast 4–12% acrylamide gradient Nu-PAGE gels (Invitrogen), reaction products were transferred onto a PVDF membrane for 1 h at 100 V in transfer buffer (0.2 M glycine, 25 mM Tris pH 8, 0.1% SDS, 20% ethanol). The efficacy of the transfer was verified by Ponceau red staining (0.2% Ponceau red/1% acetic acid). Analysis of calpain 3 protein level and cleavage activity was performed by probing membranes with a rabbit polyclonal anti-calpain 3 antibody directed against a part of the IS2 region (45) (dilution 1:150) and mouse monoclonal anti- α -actin (A4700, Sigma; dilution 1:500) for normalization. Membranes were incubated with anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies (1:10 000) coupled with IRDye[®] for the revelation by the infrared-scanner Odyssey (LI-COR Biosciences, NE, USA). Quantification of protein revealed by the Odyssey system was performed with the software Odyssey 2.1 (LI-COR Biosciences). The calpain 3 protein level was obtained by normalizing with the α -actin level and the activity of calpain 3 was calculated using the quantification of the remaining calpain 3 substrate normalized by the total quantity of calpain 3 (31).

For titin western blot, after Ultra-Turrax homogenization, proteins were extracted with the ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction Kit (S-PEK, Calbiochem, Germany). Western blots were performed as described above using 50 µg of proteins of the cytoskeletal fraction. Detection of titin bands was performed using the M10 antibody. Membranes were incubated with anti-rabbit secondary antibody (1:10 000) coupled with horseradish peroxidase (HRP; Amersham Biosciences, NJ, USA). Revelation was performed with the HRP chemiluminescent substrate Super Signal West Pico kit (Pierce, IL, USA). Under these experimental conditions, western blots of the cytoskeletal fraction using M10 antibody revealed specific titin bands.

qRT-PCR

Total RNA was isolated from mouse muscles using Trizol reagent (GibcoBRL). One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA using the SuperScript II first-strand synthesis kit (Invitrogen) and random oligonucleotides. Expression was monitored by a real-time qRT-PCR method using TaqMan probes and primers (Supplementary Material Table S2). The ubiquitous acidic ribosomal phosphoprotein (P0) was used to normalize the data across samples. P0 expression was monitored by SYBRGreen incorporation.

Statistical analysis

Individual means and distributions were compared using the Mann-Whitney and the Kolmogorov-Smirnov non-parametric tests, respectively. Differences were considered to be significant at $P < 0.05$ or $P < 0.01$. Differences in birth among the mice groups were tested using the χ^2 test

with Yates correction when necessary. A *P*-value of less than 0.05 was considered significant.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.C., N.D., B.U. and I.R. discussed and designed this study, interpreted the data and wrote this manuscript. K.C. and A.T. supervised the experiments. K.C., C.R., E.G., F.M., A.V. and J.S. conducted the experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professors M. Gautel, S. Labeit and D. Furst for providing antibodies and Dr D. Stockholm for image analyses.

Conflicts of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was funded by the 'Association Française contre les Myopathies'. The mouse mutant line was constructed at the MCI (Institut Clinique de la Souris, MCI/ICS) in the Mutagenesis, Transgenesis and Molecular Phenotyping Department with funds from the Sigrid Juselius Medical Research Foundation and the Finnish Academy research funds (B.U.).

REFERENCES

1. Tskhovrebova, L. and Trinick, J. (2003) Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 679–689.
2. Granzier, H.L. and Labeit, S. (2004) The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ. Res.*, **94**, 284–295.
3. 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.
4. Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B. *et al.* (2005) The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, **308**, 1599–1603.
5. Carmignac, V., Salih, M.A., Quijano-Roy, S., Marchand, S., Al Rayess, M.M., Mukhtar, M.M., Urtizberea, J.A., Labeit, S., Guicheney, P., Leturcq, F. *et al.* (2007) C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann. Neurol.*, **61**, 340–351.
6. Hackman, P., Vihola, A., Haravuori, H., Marchand, S., Sarparanta, J., De Seze, J., Labeit, S., Witt, C., Peltonen, L., Richard, I. *et al.* (2002) Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 492–500.
7. Udd, B., Kaariainen, H. and Somer, H. (1991) Muscular dystrophy with separate clinical phenotypes in a large family. *Muscle Nerve*, **14**, 1050–1058.
8. Udd, B., Partanen, J., Halonen, P., Falck, B., Hakamies, L., Heikkilä, H., Ingo, S., Kalimo, H., Kaariainen, H., Laulumaa, V. *et al.* (1993) Tibial muscular dystrophy. Late adult-onset distal myopathy in 66 Finnish patients. *Arch. Neurol.*, **50**, 604–608.
9. Udd, B. (1992) Limb-girdle type muscular dystrophy in a large family with distal myopathy: homozygous manifestation of a dominant gene? *J. Med. Genet.*, **29**, 383–389.
10. Udd, B., Vihola, A., Sarparanta, J., Richard, I. and Hackman, P. (2005) Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. *Neurology*, **64**, 636–642.
11. Van den Bergh, P.Y., Bouquiaux, O., Verellen, C., Marchand, S., Richard, I., Hackman, P. and Udd, B. (2003) Tibial muscular dystrophy in a Belgian family. *Ann. Neurol.*, **54**, 248–251.
12. Hackman, P., Marchand, S., Sarparanta, J., Vihola, A., Penisson-Besnier, I., Eymard, B., Pardo-Fernandez, J.M., Hammouda el, H., Richard, I., Illa, I. *et al.* (2008) Truncating mutations in C-terminal titin may cause more severe tibial muscular dystrophy (TMD). *Neuromuscul. Disord.*, **18**, 922–928.
13. Pénisson-Besnier, I., Hackman, P., Suominen, T., Sarparanta, J., Huovinen, S., Richard-Crémieux, I. and Udd, B. (2010) Myopathies caused by homozygous titin mutations: limb-girdle muscular dystrophy 2J and variations of phenotype. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*.
14. Pollazzon, M., Suominen, T., Penttilä, S., Malandrini, A., Carluccio, M.A., Mondelli, M., Marozza, A., Federico, A., Renieri, A., Hackman, P. *et al.* (2010) The first Italian family with tibial muscular dystrophy caused by a novel titin mutation. *J. Neurol.*, **257**, 575–579.
15. Fukuda, N., Granzier, H.L., Ishiwata, S. and Kurihara, S. (2008) Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J. Physiol. Sci.*, **58**, 151–159.
16. Kolmerer, B., Witt, C.C., Freiburg, A., Millevoi, S., Stier, G., Sorimachi, H., Pelin, K., Carrier, L., Schwartz, K., Labeit, D. *et al.* (1999) The titin cDNA sequence and partial genomic sequences: insights into the molecular genetics, cell biology and physiology of the titin filament system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **138**, 19–55.
17. Kolmerer, B., Olivieri, N., Witt, C.C., Herrmann, B.G. and Labeit, S. (1996) Genomic organization of M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J. Mol. Biol.*, **256**, 556–563.
18. Obermann, W.M., Gautel, M., Weber, K. and Furst, D.O. (1997) Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO J.*, **16**, 211–220.
19. Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schafer, B.W., Perriard, J.C. and Ehler, E. (2002) Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J. Cell Sci.*, **115**, 4925–4936.
20. Bagnato, P., Barone, V., Giacomello, E., Rossi, D. and Sorrentino, V. (2003) Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J. Cell Biol.*, **160**, 245–253.
21. Kontogianni-Konstantopoulos, A., Catino, D.H., Strong, J.C., Sutter, S., Borisov, A.B., Pumplun, D.W., Russell, M.W. and Bloch, R.J. (2006) Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *FASEB J.*, **20**, 2102–2111.
22. Lange, S., Ouyang, K., Meyer, G., Cui, L., Cheng, H., Lieber, R.L. and Chen, J. (2009) Obscurin determines the architecture of the longitudinal sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.*, **122**, 2640–2650.
23. Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougereuse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C. *et al.* (1995) Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, **81**, 27–40.
24. Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S. and Suzuki, K. (1997) Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 99–107.
25. Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K. *et al.* (2006) Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 by N2A connectin/titin in a genetic reporter system. *J. Biol. Chem.*, **281**, 18519–18531.
26. Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S. *et al.* (2008) Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **283**, 14801–14814.
27. Haravuori, H., Vihola, A., Straub, V., Auranen, M., Richard, I., Marchand, S., Voit, T., Labeit, S., Somer, H., Peltonen, L. *et al.* (2001) Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene. *Neurology*, **56**, 869–877.
28. Udd, B., Haravuori, H., Kalimo, H., Partanen, J., Pulkkinen, L., Paetau, A., Peltonen, L. and Somer, H. (1998) Tibial muscular dystrophy—from

- clinical description to linkage on chromosome 2q31. *Neuromuscul. Disord.*, **8**, 327–332.
29. Obermann, W.M., Gautel, M., Steiner, F., van der Ven, P.F., Weber, K. and Furst, D.O. (1996) The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.*, **134**, 1441–1453.
 30. Fukuzawa, A., Lange, S., Holt, M., Vihola, A., Carmignac, V., Ferreiro, A., Udd, B. and Gautel, M. (2008) Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *J. Cell Sci.*, **121**, 1841–1851.
 31. Milic, A., Daniele, N., Lochmuller, H., Mora, M., Comi, G.P., Moggio, M., Noulet, F., Walter, M.C., Morandi, L., Poupiot, J. *et al.* (2007) A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an *in vitro* assay. *Neuromuscul. Disord.*, **17**, 148–156.
 32. Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguian, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H. *et al.* (2000) Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated IkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J. Cell Biol.*, **151**, 1583–1590.
 33. Staron, R.S. (1997) Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can. J. Appl. Physiol.*, **22**, 307–327.
 34. Allen, D.L., Harrison, B.C., Sartorius, C., Byrnes, W.C. and Leinwand, L.A. (2001) Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **280**, C637–645.
 35. Weinert, S., Bergmann, N., Luo, X., Erdmann, B. and Gotthardt, M. (2006) M line-deficient titin causes cardiac lethality through impaired maturation of the sarcomere. *J. Cell Biol.*, **173**, 559–570.
 36. Gotthardt, M., Hammer, R.E., Hubner, N., Monti, J., Witt, C.C., McNabb, M., Richardson, J.A., Granzier, H., Labeit, S. and Herz, J. (2003) Conditional expression of mutant M-line titins results in cardiomyopathy with altered sarcomere structure. *J. Biol. Chem.*, **278**, 6059–6065.
 37. Pernigo, S., Fukuzawa, A., Bertz, M., Holt, M., Rief, M., Steiner, R.A. and Gautel, M. (2010) Structural insight into M-band assembly and mechanics from the titin-obscurin-like-1 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 2908–2913.
 38. Fougousse, F., Anderson, L.V., Delezoide, A.L., Suel, L., Durand, M. and Beckmann, J.S. (2000) Calpain3 expression during human cardiogenesis. *Neuromuscul. Disord.*, **10**, 251–256.
 39. Taveau, M., Stockholm, D., Spencer, M. and Richard, I. (2002) Quantification of splice variants using molecular beacon or scorpion primers. *Anal. Biochem.*, **305**, 227–235.
 40. Theiler, K. (1989) *The House Mouse. Atlas of Embryonic Development*. Springer-Verlag, New York.
 41. Fougousse, F., Gonin, P., Durand, M., Richard, I. and Raymackers, J.M. (2003) Force impairment in calpain 3-deficient mice is not correlated with mechanical disruption. *Muscle Nerve*, **27**, 616–623.
 42. Anderson, J., Li, Z. and Goubel, F. (2001) Passive stiffness is increased in soleus muscle of desmin knockout mouse. *Muscle Nerve*, **24**, 1090–1092.
 43. Carlson, C.G. and Makiejus, R.V. (1990) A noninvasive procedure to detect muscle weakness in the mdx mouse. *Muscle Nerve*, **13**, 480–484.
 44. Schiller, N.B., Shah, P.M., Crawford, M., DeMaria, A., Devereux, R., Feigenbaum, H., Gutgesell, H., Reichek, N., Sahn, D., Schnittger, I. *et al.* (1989) Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, **2**, 358–367.
 45. Baghdiguian, S., Martin, M., Richard, I., Pons, F., Astier, C., Bourg, N., Hay, R.T., Chemaley, R., Halaby, G., Loiselet, J. *et al.* (1999) Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat. Med.*, **5**, 503–511.

Article n°3:

INTERACTIONS WITH M-BAND TITIN AND CALPAIN 3
LINK MYOSPRYN (CMYA5) TO TIBIAL AND LIMB-GIRDLE
MUSCULAR DYSTROPHIES

The Journal of Biological Chemistry

Interactions with M-band Titin and Calpain 3 Link Myospryn (CMYA5) to Tibial and Limb-girdle Muscular Dystrophies*

Received for publication, January 28, 2010, and in revised form, July 5, 2010. Published, JBC Papers in Press, July 15, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.108720

Jaakko Sarparanta^{†1}, Gaëlle Blandin[§], Karine Charton[§], Anna Vihola[‡], Sylvie Marchand[§], Astrid Milic[§], Peter Hackman[‡], Elisabeth Ehler[¶], Isabelle Richard[§], and Bjarne Udd^{‡||**}

From the [†]Folkhälsan Institute of Genetics and Department of Medical Genetics, Haartman Institute, University of Helsinki, 00014 Helsinki, Finland, [§]Généthon-CNRS UMR8587, 91000 Evry, France, the [¶]Randall Division of Cell and Molecular Biophysics and Cardiovascular Division, King's College London, London SE1 1UL, United Kingdom, the ^{||}Department of Neurology, Tampere University Hospital and Medical School, 33520 Tampere, Finland, and the ^{**}Department of Neurology, Vaasa Central Hospital, 65130 Vaasa, Finland

Mutations in the C terminus of titin, situated at the M-band of the striated muscle sarcomere, cause tibial muscular dystrophy (TMD) and limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) type 2J. Mutations in the protease calpain 3 (CAPN3), in turn, lead to LGMD2A, and secondary CAPN3 deficiency in LGMD2J suggests that the pathomechanisms of the diseases are linked. Yeast two-hybrid screens carried out to elucidate the molecular pathways of TMD/LGMD2J and LGMD2A resulted in the identification of myospryn (CMYA5, cardiomyopathy-associated 5) as a binding partner for both M-band titin and CAPN3. Additional yeast two-hybrid and coimmunoprecipitation studies confirmed both interactions. The interaction of myospryn and M-band titin was supported by localization of endogenous and transfected myospryn at the M-band level. Coexpression studies showed that myospryn is a proteolytic substrate for CAPN3 and suggested that myospryn may protect CAPN3 from autolysis. Myospryn is a muscle-specific protein of the tripartite motif superfamily, reported to function in vesicular trafficking and protein kinase A signaling and implicated in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. The novel interactions indicate a role for myospryn in the sarcomeric M-band and may be relevant for the molecular pathomechanisms of TMD/LGMD2J and LGMD2A.

Titin forms a continuous filament system in the myofibrils of striated muscle, with single molecules spanning from the sarcomeric Z-disc to the M-band (1). Titin guides myofibrillogenesis, provides myofibrils with elasticity, distributes forces across sarcomeres, and maintains the sarcomeric structure during muscle contraction (reviewed in Ref. 2). The titin regions located at the sarcomeric Z-disc, N2-line, and M-band sense the mechanical status of the sarcomere and convey infor-

mation for signaling pathways regulating muscle function (3–5).

Mutations in the extreme C terminus of titin, situated in the periphery of the M-band, underlie two muscle diseases. When present on one allele, mutations lead to tibial muscular dystrophy (TMD,² MIM #600334), a late-adult-onset distal myopathy typically restricted to the anterior muscles of the lower leg (6, 7). The same mutations, when present on both alleles, result in limb-girdle muscular dystrophy type 2J (LGMD2J, MIM #608807), in which most skeletal muscle groups are affected, leading to early disability (6–8).

The known TMD mutations are missense or truncating changes affecting the unique sequence region is7 or the Ig-like domain M10 of titin (Fig. 1A) (6, 9, 10). The Finnish founder mutation, FINmaj, changes four amino acids in M10 (EVTW → VKEK), presumably leading to domain misfolding (6). The downstream mechanisms leading to muscular dystrophy remain unknown, but in the absence of major ultrastructural defect in the sarcomere (6, 11), the pathogenesis is likely to depend on altered regulatory functions of M-band titin. Immunofluorescence microscopy of LGMD2J muscles reveals an absence of titin epitopes from the region M9-is7-M10 (6), suggesting that the mutations lead to a grossly altered conformation or proteolytic cleavage of the entire mutant C terminus. In either case, loss of protein interactions of the affected titin region is a likely consequence.

The skeletal muscle-specific protease calpain 3 (CAPN3) (Fig. 1B) binds M-band titin at is7 (12, 13), within the region affected by the TMD/LGMD2J mutations. Accordingly, a secondary deficiency of CAPN3 in LGMD2J muscle is evident in Western blotting (14) and in immunofluorescence microscopy.³

Calpains function in irreversible modulation of protein function through defined proteolytic events (15). The identified substrates of CAPN3 are sarcomeric or cytoskeletal compo-

* This work was supported by Association Française Contre les Myopathies (to B. U. and I. R.), the Folkhälsan Research Foundation, the Academy of Finland, The Sigrid Jusélius Foundation (to B. U.), and University of Helsinki Research Foundation and EMBO Short Term Fellowship ASTF 13-08 (to J. S.).

¹ Graduate student at the Helsinki Graduate School in Biotechnology and Molecular Biology, University of Helsinki. To whom correspondence should be addressed: Folkhälsan Institute of Genetics, Biomedicum Helsinki C307b, P. O. Box 63, FI-00014 University of Helsinki, Helsinki, Finland. Tel.: 358-9-19125619; Fax: 358-9-19125073; E-mail: jaakko.sarparanta@helsinki.fi.

² The abbreviations used are: TMD, tibial muscular dystrophy; CoIP, coimmunoprecipitation; CT, C terminus; FN3, fibronectin type 3-like domain; CFP, cyan fluorescent protein; IF, immunofluorescence; LGMD, limb-girdle muscular dystrophy; MIM, Mendelian Inheritance in Man; PLA, proximity ligation assay; SPRY, domain in SPIA and RYanodine receptor; SR, sarcoplasmic reticulum; T-tubule, transverse tubule; WB, western blotting; Y2H, yeast two-hybrid; PFA, paraformaldehyde; ab, antibody.

³ A. Vihola and B. Udd, unpublished data.

nents, and CAPN3 has been proposed to participate in sarcomere maintenance and remodeling (16, 17), to regulate the dysferlin-dependent membrane repair system (18), and to act in the titin-based signaling complexes (19).

Mutations in CAPN3 lead to another form of recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2A (MIM #253600) (20), suggesting that the pathogenetic mechanisms underlying TMD/LGMD2J and LGMD2A may be partly shared. Interactions with titin may protect CAPN3 from autolytic activation (12), and their disruption in titinopathies could result in CAPN3 dysregulation.

To elucidate the pathogenetic processes of TMD/LGMD2J and LGMD2A, we searched for proteins interacting with M-band titin and calpain 3 and identified myospryn (CMYA5, cardiomyopathy-associated 5) as a ligand for both proteins. Myospryn is a large protein (449 kDa; 4069 amino acids in human), comprising a repetitive, acidic N-terminal part and a C-terminal domain structure related to the tripartite motif proteins (Fig. 1C) (21). Myospryn is specifically expressed in striated muscle (21, 22), where it has been suggested to associate with sarcoplasmic reticulum (SR) and costameres (23, 24).

Myospryn seems to play a dual role in protein kinase A (PKA) signaling and vesicular trafficking (reviewed in Ref. 25). It binds the regulatory RII α subunit of PKA and functions as an protein kinase A-anchoring protein regulating the spatial specificity of cAMP-PKA signaling (26). A role in vesicular trafficking or protein sorting is implied by the interaction of myospryn with dysbindin-1, a subunit of BLOC-1 (biogenesis of lysosome-related organelles complex 1) (21), and evidence exists for myospryn participating in lysosomal biogenesis and positioning (24). Recently, myospryn was implicated in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy; in the dystrophin-deficient *mdx* mouse, disrupted interaction of myospryn with dystrophin leads to mislocalization of myospryn and RII α and to impaired PKA signaling (27).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Two-hybrid Constructs—The titin bait constructs pGBKT7-M10 WT and FINmaj were produced by cloning the corresponding cDNA sequences to the pGBKT7 vector of the Matchmaker 3 system (Clontech). The baits spanned the 132 C-terminal amino acids of the human titin is7⁻ isoform, thus covering the M10 domain preceded by the last 34 amino acids of M9 (Fig. 1A). To generate the bait construct for the CAPN3 interaction screen, the cDNA sequence encoding Thr⁴¹⁷–Ser⁶⁴³ of human CAPN3 isoform a (Fig. 1B) was cloned into the pB27 plasmid as a LexA C-terminal fusion (28).

To generate the myospryn prey constructs pGADT7-CMYA5^{3811-CT} and pGADT7-CMYA5^{3860-CT} used in further Y2H studies, coding regions of the corresponding myospryn inserts were PCR-amplified from the original pACT2 prey constructs, cloned into pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen), and transferred to pGADT7 (Clontech). The same procedure was used for producing the myospryn deletion constructs covering the regions Ala³⁸¹¹–Ser³⁹⁴¹, Leu³⁸⁶²–CT (C terminus), Asn³⁸⁶⁵–CT, Gln³⁸⁶⁷–CT, Tyr³⁸⁷⁵–CT, Gly³⁸⁸³–CT, Leu³⁸⁹²–CT, and Ile³⁹³¹–CT (Fig. 1C).

Mammalian Expression Constructs—M-band titin constructs pEF6-is6-M8-V5, -is6-M9-V5, -is6-is7-V5, and -is6-M10-V5 (is7⁺/is7⁻, WT/FINmaj) were generated by cloning the corresponding wild-type (WT) or FINmaj mutant titin cDNA sequences into pEF6/V5-His-TOPO (Invitrogen). These constructs encoded different fragments of is7⁺ and is7⁻ titin isoforms (see Fig. 1A), fused to a C-terminal 45-residue tag containing V5 and His₆ sequences. An untagged construct pEF6-is6-M10 is7⁺ WT was produced in a similar fashion.

To produce pAHC-is6-M10 is7⁺ WT, encoding the is6-M10 region N-terminally HA-tagged (HA-is6-M10), the insert was PCR-amplified, cloned into pCR-Blunt II-TOPO, and then subcloned into pAHC (modified pCI-Neo (29)). The construct pEGFP-M10 WT, encoding the wild-type human titin M10 domain with an N-terminal GFP tag (GFP-M10), has been described previously (30).

The construct pCMV-Myc-MD7, encoding the 701 C-terminal amino acid residues of mouse myospryn (corresponding to 707 C-terminal amino acids of the human protein) with an N-terminal Myc tag (Myc-MD7), has been described previously (21). The myospryn insert MD9, encoding the 1009 C-terminal amino acids of mouse myospryn (1018 amino acids in human), was PCR-amplified from pCI-Neo-MD9 (21) and cloned into pCR-Blunt II-TOPO. N-terminally Myc-tagged myospryn constructs pAMC-MD9 (encoding Myc-MD9) and pAMC-CMYA5^{3811-CT} (Myc-CMYA5^{3811-CT}) were produced by cloning the respective inserts to pAMC (modified pCI-Neo, (29)). Corresponding constructs with N-terminal GFP tags, pEGFP-MD9 (GFP-MD9) and pEGFP-CMYA5^{3811-CT} (GFP-CMYA5^{3811-CT}), were produced by cloning the inserts to pEGFP-C1 (Clontech). For an overview of myospryn constructs, see Fig. 1C.

The utilized calpain 3 constructs have been described previously. The constructs pTOM-rCAPN3 and pTOM-rCAPN3^{C129S} encoded wild type and proteolytically inactive C129S versions of rat CAPN3, tagged N-terminally with YFP and C-terminally with CFP (31). pSRD-rCAPN3^{C129S} encoded inactive rat CAPN3 without tags (32).

Interaction Screens—The yeast two-hybrid screen for identifying ligands of the titin M10 domain was performed at the two-hybrid core facility of Biocentrum Helsinki, University of Helsinki. The bait pGBKT7-M10 WT was screened against a human skeletal muscle prey library in pACT2 (Clontech). Yeast clones positive for interaction were selected by culturing on SD-LWHA + 2.5 mM 3-amino-1,2,4-triazole + X-gal. The prey plasmids from positive colonies were isolated and screened by AluI digestion, and inserts encoding putative interacting proteins were identified by sequencing.

The yeast two-hybrid screen for identifying CAPN3 ligands was performed at Hybrigenics S.A. (Paris, France), using a mating method and following previously described protocols for prey library construction, large scale screening, and identification of interacting fragments (28). The prey library was constructed from adult (catalogue no. AM7983 Ambion; Applied Biosystems, Austin, TX) and fetal (catalogue no. 778020, Stratagene, La Jolla, CA) human skeletal muscle poly(A) RNAs. Random-primed cDNA fragments were isolated from the two RNA pools, cloned into pB6 as C-terminal fusions of the *GAL4* tran-

Myospryn Interacts with Titin and Calpain 3

scription-activating domain, and separately amplified in *Escherichia coli* (50–100 million independent bacterial clones). Equimolar fractions of the two cDNA libraries were pooled and used to transform the Y187 yeast. The CAPN3^{Thr-417–Ser-643} bait was screened against the prey library, and the growth ability of 106 million diploid clones (equivalent to 10-fold coverage of the library) was tested on appropriate medium. Prey fragments from all positive clones were PCR-amplified and identified by sequencing.

Further Yeast Two-hybrid Studies—To verify the results of the titin interaction screen, selected putative ligands of M10 were studied in pairwise Y2H experiments using the Matchmaker 3 system. The pGBKT7-M10 WT and FINmaj baits were tested against various pGADT7 prey constructs. As negative controls, appropriate empty vectors were tested against the different bait and prey constructs. The pair pGBKT7-53/pGADT7-T served as a positive control. The experiments were carried out with the mating strategy as described in the Clontech Yeast Protocols Handbook, with the bait constructs in AH109 and prey constructs in the Y187 strain. Activity of the nutritional reporter genes was assayed by culturing on different selection plates (SD-LWH, SD-LWHA, and SD-LWHA + 2.5 mM 3-amino-1,2,4-triazole) for up to 11 days. Activity of the β -galactosidase reporter was assayed with the Herskowitz laboratory X-gal overlay method. Same procedures were used for testing the myospryn deletion constructs against the pGBKT7-M10 WT and FINmaj baits.

Antibodies—The following previously described primary antibodies (ab) were used in Western blotting (WB), immunofluorescence (IF), and proximity ligation assay (PLA) studies: rabbit polyclonal ab M10-1 against a peptide epitope from the titin M10 domain (10) at 1:1000 (WB); rabbit polyclonal ab Tm8ra against the titin M8 domain (33) at 1:50 (IF); mouse monoclonal ab T51 against the titin M9 domain (33) at 1:20 (IF, PLA); mouse monoclonal ab T41 against the titin M-is4 region (33) at 1:30 (PLA); rabbit polyclonal ab 653 against sarcomeric α -actinin (34) at 1:200 (IF); and rabbit polyclonal ab Des122 against myospryn (21) at 1:1000 (WB)/1:50 (IF, PLA).

In addition, the following commercial primary antibodies were used: mouse monoclonal Myc ab 9E10 for IF at 1:100 (Roche Applied Science) and for WB at 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA); mouse monoclonal anti-Myc ab R950-CUS (Invitrogen) at 1:5000 (WB); mouse monoclonal V5 ab SV5-P-k (Invitrogen) at 1:5000 (WB); rat monoclonal HA ab 3F10 (Roche Applied Science) at 1:100 (IF) and mouse monoclonal sarcomeric α -actinin ab EA-53 (Sigma) at 1:500–1:5000 (IF); mouse monoclonal dystrophin antibody Dy4/6D3 (Novocastra NCL-DYS1, Leica Biosystems Newcastle Ltd., Newcastle Upon Tyne, UK) at 1:20 (IF); rabbit polyclonal CAPN3 ab RP2 (Triple Point Biologics, Inc., Forest Grove, OR) at 1:5000 (WB); rabbit polyclonal GFP ab (Abcam plc, Cambridge, UK) at 1:2500 (WB); and rabbit polyclonal actin ab (Sigma) at 1:400 (WB).

For IF staining of muscle sections, secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor dyes (Molecular Probes, Invitrogen) were used at 1:500. For staining of cultured cardiomyocytes, preabsorbed secondary antibodies conjugated with cyanine dyes (Cy2, Cy3, and Cy5) were used at 1:100 and

unabsorbed Cy3-anti-mouse antibody at 1:500 (all from Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).

In Western blotting, HRP-conjugated secondary antibodies (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) were used at 1:5000 for ECL detection, and IRDye-labeled secondary antibodies (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) were used at 1:10,000 for fluorescent detection. Agarose-conjugated goat polyclonal anti-V5 and anti-Myc antibodies (Novus Biologicals, Inc., Littleton, CO) and EZview Red Anti-c-Myc Affinity Gel (Sigma) were used for coimmunoprecipitation.

Coimmunoprecipitation—Coimmunoprecipitation was performed according to a protocol modified from Lykke-Andersen (35). COS-1 cells were seeded on 6-well plates at 200,000 cells per well and cultured in DMEM containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and penicillin/streptomycin. The following day, the cells were cotransfected with appropriate plasmid constructs using 1 μ g of DNA and FuGENE 6 transfection reagent (Roche Applied Science). Two days after transfection, the cells were washed with PBS, scraped into PBS, and pelleted at 200 \times g, 10 min. The cells were lysed in 200 μ l of ice-cold freshly prepared hypotonic gentle lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 \times Complete Protease Inhibitor Mixture (Roche Applied Science)) and incubated on ice for 10 min. NaCl was added to the final concentration of 150 mM, and the lysates were incubated on ice for a further 5 min. After pelleting the insoluble material (15 min at 16,000 \times g, 8 $^{\circ}$ C), a total lysate sample was removed from each supernatant.

Antibody-conjugated agarose beads (original slurry volume 10 μ l) were prewashed twice with NET-2 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Triton X-100), then combined to 170 μ l of cleared lysate, and rotated overnight at 8 $^{\circ}$ C. The beads were collected by centrifugation (2 min at 82 \times g, 8 $^{\circ}$ C) and washed three to eight times with 500 μ l of ice-cold NET-2. The immunoprecipitated proteins were eluted in 25 μ l of 2 \times SDS sample buffer by heating 5 min at 95 $^{\circ}$ C. The eluates and total lysate samples were analyzed by Western blotting. Chemiluminescent detection was performed with either Immuno-Star HRP substrate (Bio-Rad) or Pierce SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL).

CAPN3-Myospryn Coexpression Studies—For coexpression studies of CAPN3 and myospryn, 911 cells (human retinoblasts) were seeded on 6-well plates at 200,000 cells per well and cultured in DMEM containing 10% FCS. After 24 h, the cells were cotransfected with a total of 3 μ g of plasmid constructs using FuGENE 6 transfection reagent and cultured for 24 h.

Cells were lysed for 30 min in 40 μ l of lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 0.1% Triton X-100, 1 \times Complete Protease Inhibitor Mixture, 2 μ M E64 (Sigma)). The lysate was centrifuged for 10 min at 14,000 \times g in 4 $^{\circ}$ C. The supernatant was mixed with LDS NuPAGE buffer (Invitrogen) supplemented with 100 mM DTT and denatured 10 min at 70 $^{\circ}$ C.

Fifty micrograms of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. The membranes were blocked with Odyssey blocking buffer (LI-COR Biosciences) diluted 1:1 in PBS, probed with appropriate primary and IRDye-

labeled secondary antibodies, and visualized using an Odyssey Infrared Laser Imaging System (LI-COR Biosciences).

Neonatal Rat Cardiomyocyte Cultures—Primary cardiomyocyte cultures from neonatal rat hearts were isolated using the neonatal cardiomyocyte isolation system (Worthington). Cell culture and transient transfections using the Escort III reagent (Sigma) were performed as described previously (36). The cells were transfected with four different myospryn constructs (Myc-CMYA5^{3811-CT}, GFP-CMYA5^{3811-CT}, Myc-MD9, and GFP-MD9) and the titin construct HA-is6-M10, either alone or in different myospryn/titin combinations.

After transfection, the cells were cultured for 1–5 days either in maintenance medium (74.7% DMEM, 18.6% medium M199, 3.8% horse serum, penicillin/streptomycin, 4 mM L-glutamine, 100 μ M phenylephrine, 10 μ M AraC for 1- or 2-day cultures) or in transfection medium with antibiotics (73% DBSS-K medium, 21% medium M199, 4% horse serum, 4 mM L-glutamine, penicillin/streptomycin for 5-day cultures). The cells were fixed on culture dishes with 4% PFA/PBS for 10 min at room temperature.

Muscle Material and Immunofluorescence Stainings—Hind limb muscles (tibialis cranialis, soleus, and gastrocnemius) were dissected from wild-type C57BL/6 mice sacrificed for other experimental purposes. Muscles were prepared for IF staining as described by Locke *et al.* (37), with slight modifications. Briefly, the muscles were stretched to 1.5 \times length to increase sarcomeric resolution, pinned on cork, fixed by immersion in 4% PFA/PBS for 30 min at room temperature, and cryoprotected at 8 $^{\circ}$ C in increasing concentrations of glucose in PBS (10% for 1 h, 20% for 1 h, and 30% overnight). The muscles were embedded in Tissue-Tek O.C.T. medium (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, The Netherlands), snap-frozen in liquid-nitrogen-chilled isopentane, and cut into 8- μ m longitudinal sections. The sections were air-dried for 20 min room temperature before immunofluorescence staining.

Human control muscle (tibialis anterior) was obtained from an amputated leg, with informed consent from the donor. The muscle pieces, held in stretched position with Alm retractors, were immersion-fixed and cryoprotected as described above for the mouse muscles and then frozen and sectioned. Optionally, sections were postfixed in 4% PFA/PBS for 10 min at room temperature prior to immunofluorescence staining.

For nonstretched samples, skeletal muscle biopsies were obtained from control and LGMD2J patients. The samples were freshly embedded in Tissue-Tek, frozen in liquid nitrogen-chilled isopentane, and cut into 8- μ m longitudinal sections. Prior to immunofluorescence staining, the sections were fixed in 4% PFA/PBS for 10 min at room temperature.

All muscle sections were permeabilized with 0.2% Triton X-100/PBS for 10 min, blocked with 5% BSA/PBS for 30 min, and subjected to indirect immunofluorescence staining with appropriate antibodies diluted in 1% BSA/PBS. Cultured neonatal rat cardiomyocytes, fixed onto culture dishes, were permeabilized with 0.2% Triton X-100/PBS for 5 min, washed with PBS, and stained with antibodies diluted in 1% BSA/Gold buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 155 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂).

All antibody incubations were performed in a humid chamber for 1–2 h at room temperature or overnight at 4 $^{\circ}$ C, followed by washes with PBS. In addition to antibodies, phalloidin conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen) was used for visualizing the actin cytoskeleton and DAPI for nuclear staining. After staining, the samples were mounted in Gel Mount (Sigma; for tissue sections) or Lisbeth's mounting medium (30 mM Tris-HCl, pH 9.5, 70% glycerol, 5% *n*-propyl gallate; for cardiomyocytes).

Proximity Ligation Assays—For *in situ* PLA, mouse muscle sections were prepared and permeabilized as for immunofluorescence stainings. PLA experiments were then performed with the Duolink kit (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the sections were blocked with Duolink blocking reagent, incubated with appropriate primary antibodies (Des122 alone or together with T51 or T41) for 1–2 h room temperature, probed with anti-rabbit plus and anti-mouse minus PLA probes (at 1:10) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, and stained with the Duolink fluorescent detection kit 563. Primary antibodies and PLA probes were diluted in Duolink antibody dilution buffer. Washes were done in low buffered TBST (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4). In negative control experiments performed in parallel, either one or both primary antibodies were omitted. Alexa Fluor 488-conjugated phalloidin, added 1:100 to the primary antibody solution, served as a counterstain.

Confocal Microscopy—Confocal microscopy was performed using LSM 510 Meta confocal microscopes equipped with diode, argon, and HeNe lasers, and 63 \times /NA 1.4 and 40 \times /NA 1.3 objectives (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Germany). Image processing and analysis were done using the LSM 510 Meta 3.2 software (Carl Zeiss MicroImaging), Adobe Photoshop CS2 9.0.2 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA), and ImageJ 1.41o (W. S. Rasband, ImageJ, rsb.info.nih.gov/ij).

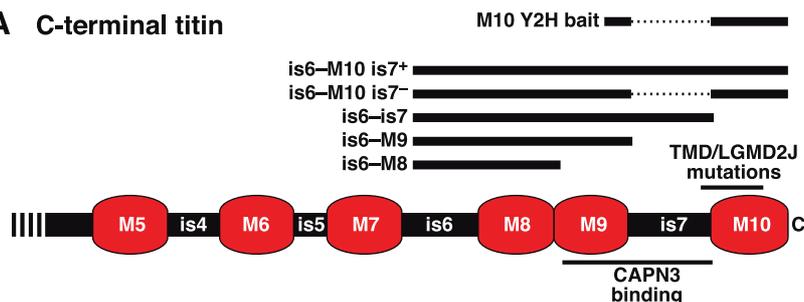
Protein Modeling—A structural model of the C-terminal FN3 domain of myospryn was generated by homology modeling at the Swiss-Model workspace (38), using the Protein Data Bank structure 2dmk as template.

RESULTS

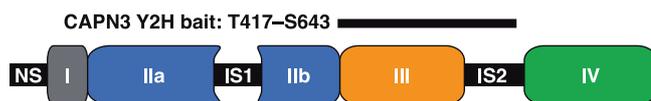
Myospryn Interacts with C-terminal Titin in the Yeast Two-hybrid System—To identify proteins interacting with M-band titin, we performed a yeast two-hybrid interaction screen on a skeletal muscle cDNA library using the ultimate C terminus of titin (construct pGBKT7-M10 WT) as bait. Screening of 10.56 million colonies yielded 84 interacting prey clones, coding for 21 different proteins. Six known proteins were represented by more than one in-frame prey clone as follows: myospryn (CMYA5), phosphoglucosyltransferase 1 (PGM1), Ran-binding protein M (RanBPM), RING finger protein 1 (RING1), formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1), and kinectin 1 (KTN1). These were regarded as the most plausible titin ligands and chosen for further yeast two-hybrid and coimmunoprecipitation studies. Conclusive supporting evidence was obtained for myospryn (see below), and PGM1 is currently under investigation. The four others were judged as probable false-positive hits.

Myospryn Interacts with Titin and Calpain 3

A C-terminal titin



B CAPN3



C Myospryn

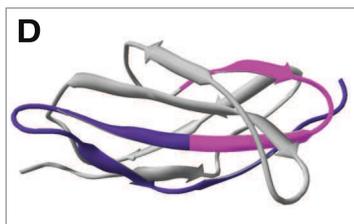
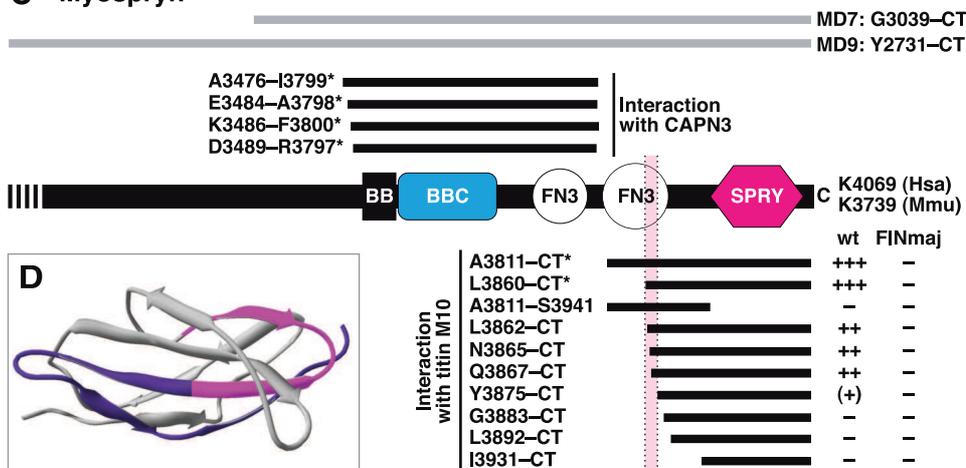


FIGURE 1. Schematic structures of M-band titin, CAPN3, and myospryn and regions covered by the protein constructs. *A*, C-terminal part of M-band titin, showing the Ig-like domains M5–M10 and intervening sequence regions is4–is7. *Thick bars* indicate the regions covered by the Y2H and mammalian expression constructs used. *Thin bars* show the CAPN3-binding site and the region harboring the known TMD/LGMD2J mutations. *B*, CAPN3 is composed of domains I, II (split into IIa and IIb), III, and IV, common to all calpains, and CAPN3-specific sequence regions NS, IS1, and IS2. The *bar* indicates the bait region used in the Y2H screen. *C*, the C-terminal part of myospryn contains a BBox' zinc finger domain (designated BB), a BBC (BBox C-terminal coiled coil) domain, two FN3 (fibronectin type 3-like) domains, and a SPRY (SPIA and RYanodine receptor) domain. Numbers at the C terminus indicate the C-terminal amino acid residues in human (*Hsa*) and mouse (*Mmu*) myospryn. *Gray bars* show the MD7 and MD9 constructs used in coimmunoprecipitation and cardiomyocyte transfection studies; *numbers* indicate the amino acid range covered in mouse myospryn. *Black bars*, specified by the amino acid ranges covered in human myospryn, represent regions tested in Y2H for interaction with titin M10 or CAPN3. *Asterisks* indicate the interacting prey clones originally identified in the Y2H screens. For titin interactions, the strength of Y2H reporter signals indicating the interaction with wild-type (*wt*) and FINmaj mutant M10 bait is scored from – (no signal) to +++ (moderate signal). *Pink shading* indicates a region that may directly participate in titin M10 binding, corresponding to the *pink highlighting* in *D*. *D*, structural model of the C-terminal FN3 domain of myospryn. According to Y2H, the C-terminal half of the domain (colored *pink* and *blue*) is required for the interaction with titin M10. Amino acid residues directly participating in titin binding may be situated in the region Leu³⁸⁶²–Tyr³⁸⁷⁵, shown in *pink* (compare with Figs. 1C and 2B).

Myospryn was encoded by two prey clones interacting with the titin M10 bait. The longer one (CMYA5^{3811–CT}) included the 259 C-terminal amino acid residues, covering the latter of the two fibronectin type 3-like (FN3) domains and the SPRY domain. The shorter clone (CMYA5^{3860–CT}) of 210 amino acids covered the C-terminal half of the FN3 domain followed by SPRY (Fig. 1C).

In pairwise Y2H studies, prey constructs pGADT7-CMYA5^{3811–CT} and pGADT7-CMYA5^{3860–CT}, corresponding to the originally identified myospryn clones, were tested against wild-type and FINmaj mutant versions of the pGBKT7-M10 bait construct. Both myospryn preys produced reporter signals

of similar intensities with the wild-type bait, but not with the mutant (Fig. 2A), suggesting that the signal resulted from a specific interaction between myospryn and the M10 domain. In negative control experiments, testing the bait constructs against the empty prey vectors or vice versa produced no reporter signals, demonstrating that the observed signals resulted from an interaction between the titin and myospryn moieties of the constructs rather than autoactivation.

Additional pairwise Y2H studies with a series of shorter myospryn prey constructs served to define the myospryn region involved in the interaction with titin M10 (Figs. 1C and 2B). The three constructs N-terminally up to seven amino acids shorter than the original clone 3860–CT all showed reporter signals similar to the original prey clones but weaker. Further N-terminal shortening (construct 3875–CT) resulted in an even weaker signal, barely distinguishable from the background. None of the other constructs produced a detectable signal. These findings indicate that both the C-terminal part (Gln³⁸⁶⁷–CT) of the latter FN3 domain and the SPRY domain of myospryn are needed for titin M10 binding. In addition, the weaker reporter signals obtained with some of the constructs suggest that some amino acid residues directly involved in the interaction are situated between Leu³⁸⁶² and Tyr³⁸⁷⁵, a region that according to protein modeling forms a surface loop flanked by stretches of the β -strand (Fig. 1D).

Myospryn Interacts with Calpain 3 in the Yeast Two-hybrid System—

To identify proteins interacting with CAPN3, another yeast two-hybrid screen was performed with a bait encompassing the domain III and is2 of human CAPN3. Screening of 106 million prey clones produced 76 interacting clones, 6 of which encoded myospryn fragments. These clones, differing only slightly in length, covered the BBox', coiled coil, and the first FN3 domains of myospryn (Fig. 1C).

Coimmunoprecipitation Confirms the Interactions of Myospryn with Titin and CAPN3—To verify the interactions of titin and calpain 3 with myospryn *in vitro*, we performed coimmunoprecipitation (CoIP) of proteins coexpressed in COS-1 cells. Epitope-tagged bait proteins were immunoprecipitated with aga-

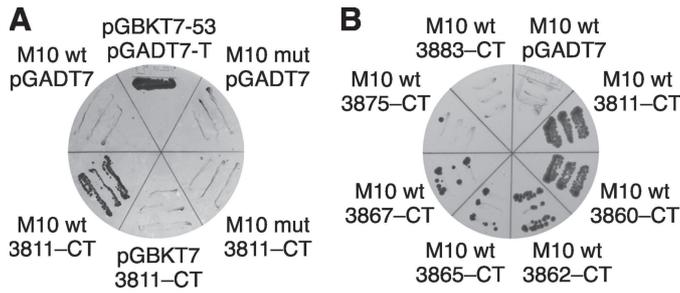


FIGURE 2. Yeast two-hybrid studies of titin and myospryn. *A*, myospryn prey construct pGADT7-CMYA5^{3811-CT} (3811-CT) was tested against wild-type (*wt*) and FINmaj mutant (*mut*) titin M10 baits on an SD-LWHA plate cultured for 4 days. Yeast growth, indicating activity of *HIS3* and *ADE2* reporter genes, demonstrated interaction with wild type but not with FINmaj bait. In negative controls, where the same constructs were tested against empty bait (pGBKT7) and prey (pGADT7) vectors, no yeast growth was visible. Yeast carrying pGBKT7-53 and pGADT7-T served as a positive control. *B*, various myospryn prey constructs were tested in Y2H against the wild-type (*wt*) titin M10 bait. On an SD-LWHA plate cultured for 11 days, CMYA5^{3811-CT} and CMYA5^{3860-CT} displayed comparable reporter signals, whereas the shorter constructs (3862-CT, 3865-CT, and 3867-CT) showed signals of lower intensities, correlating with construct length (compare with Fig. 1C). CMYA5^{3875-CT} showed a marginally detectable signal, and CMYA5^{3883-CT} did not allow any yeast growth. None of the prey constructs allowed yeast growth when tested against the FINmaj mutant M10 bait or the empty bait vector pGBKT7 (data not shown).

rose-coupled antibodies, and related protein constructs not recognized by the antibodies served as negative control baits.

The C-terminally V5-tagged titin construct is6-M10-V5 is7⁺ WT efficiently coimmunoprecipitated the myospryn construct Myc-MD9 (Fig. 3A). In the reverse experiment, Myc-MD9 coimmunoprecipitated is6-M10-V5 is7⁺ WT and the corresponding untagged construct at a similar efficiency (data not shown), demonstrating that the interaction in CoIP depended on the titin moiety of the constructs and not on the epitope tag. Also, the other myospryn constructs Myc-MD7 and Myc-CMYA5^{3811-CT} showed binding to is6-M10-V5 is7⁺ WT (Fig. 3, C and D). Myc-MD7 was more efficiently precipitated than Myc-MD9, although their amounts in the lysates were comparable. The short Myc-CMYA5^{3811-CT} construct performed variably, probably due to its lower solubility.

The GFP-M10 construct, including only the M10 domain of titin, did not conclusively show binding to myospryn constructs in the same CoIP conditions that allowed the interaction for is6-M10 is7⁺ (data not shown), suggesting that the myospryn interaction was not restricted to the M10 domain. Therefore, we tested binding of Myc-MD9 to a series of V5-tagged titin constructs of different lengths. The three longest constructs, is6-M10-V5 is7⁺, is6-M10-V5 is7⁻, and is6-is7-V5, all bound Myc-MD9 at comparable efficiencies, whereas the shorter constructs is6-M9-V5 and is6-M8-V5 only showed marginal or no binding (Fig. 3, A and B). This indicates that both M9 and is7, in addition to the M10 domain, participate in the interaction with myospryn.

To determine the effect of the FINmaj titin mutation on the interaction with myospryn *in vitro*, we compared the wild-type and FINmaj versions of the is6-M10-V5 (is7⁺ and is7⁻) constructs in CoIP. In contrast to our Y2H results, the mutation was not able to prevent coimmunoprecipitation of the titin and myospryn constructs (data not shown). Rather, the mutant constructs precipitated the different myospryn fragments more efficiently than the wild-type constructs and were also more efficiently coimmunoprecipitated by Myc-MD9 in the reverse experiments.

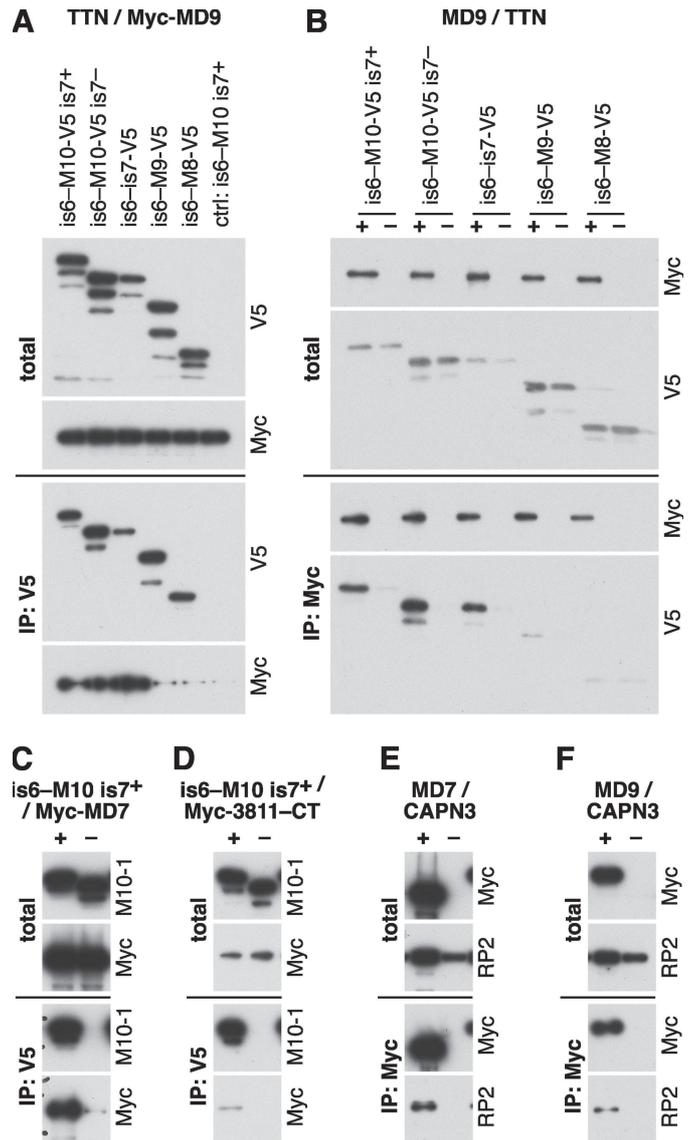


FIGURE 3. Coimmunoprecipitation studies of myospryn with titin and CAPN3. Titin, myospryn, and CAPN3 constructs were expressed in COS-1 cells and immunoprecipitated (IP) with V5 or Myc epitope tag antibodies. Samples of total cell lysates and immunoprecipitates were analyzed by Western blotting using antibodies against V5 and Myc tags, titin M10 (M10-1), and CAPN3 (RP2). *A* and *B*, titin constructs covering the regions is6-M10 (is7⁺ and is7⁻ isoforms), is6-is7, is6-M9, and is6-M8 tested against myospryn MD9. *A*, V5-tagged titin constructs and the untagged is6-M10 is7⁺ construct (negative control) coexpressed with Myc-MD9 and immunoprecipitated with V5 antibodies. *B*, MD9 constructs with a Myc (+) or GFP (-) tag coexpressed with V5-tagged titin constructs and immunoprecipitated with Myc antibodies. Myc-MD9 showed binding to the three longest titin constructs in both setups. *C* and *D*, titin constructs is6-M10-V5 is7⁺ WT (+) or is6-M10 is7⁺ WT (-) coexpressed with Myc-MD7 (*C*) or Myc-CMYA5^{3811-CT} (*D*) and immunoprecipitated with V5 antibodies. Both myospryn constructs were coimmunoprecipitated with the tagged titin construct. *E* and *F*, Myospryn constructs MD7 (*E*) or MD9 (*F*) with a Myc (+) or GFP (-) tag, coexpressed with CAPN3^{C129S} and immunoprecipitated with Myc antibodies. CAPN3^{C129S} was coimmunoprecipitated with both myospryn constructs.

In a similar CoIP setup, myospryn was tested against the proteolytically inactive calpain 3 mutant C129S. Both the Myc-MD7 and Myc-MD9 constructs were able to coimmunoprecipitate CAPN3^{C129S} from cell lysates, supporting the interaction of myospryn with calpain 3 (Fig. 3, E and F).

Myospryn Interacts with Titin and Calpain 3

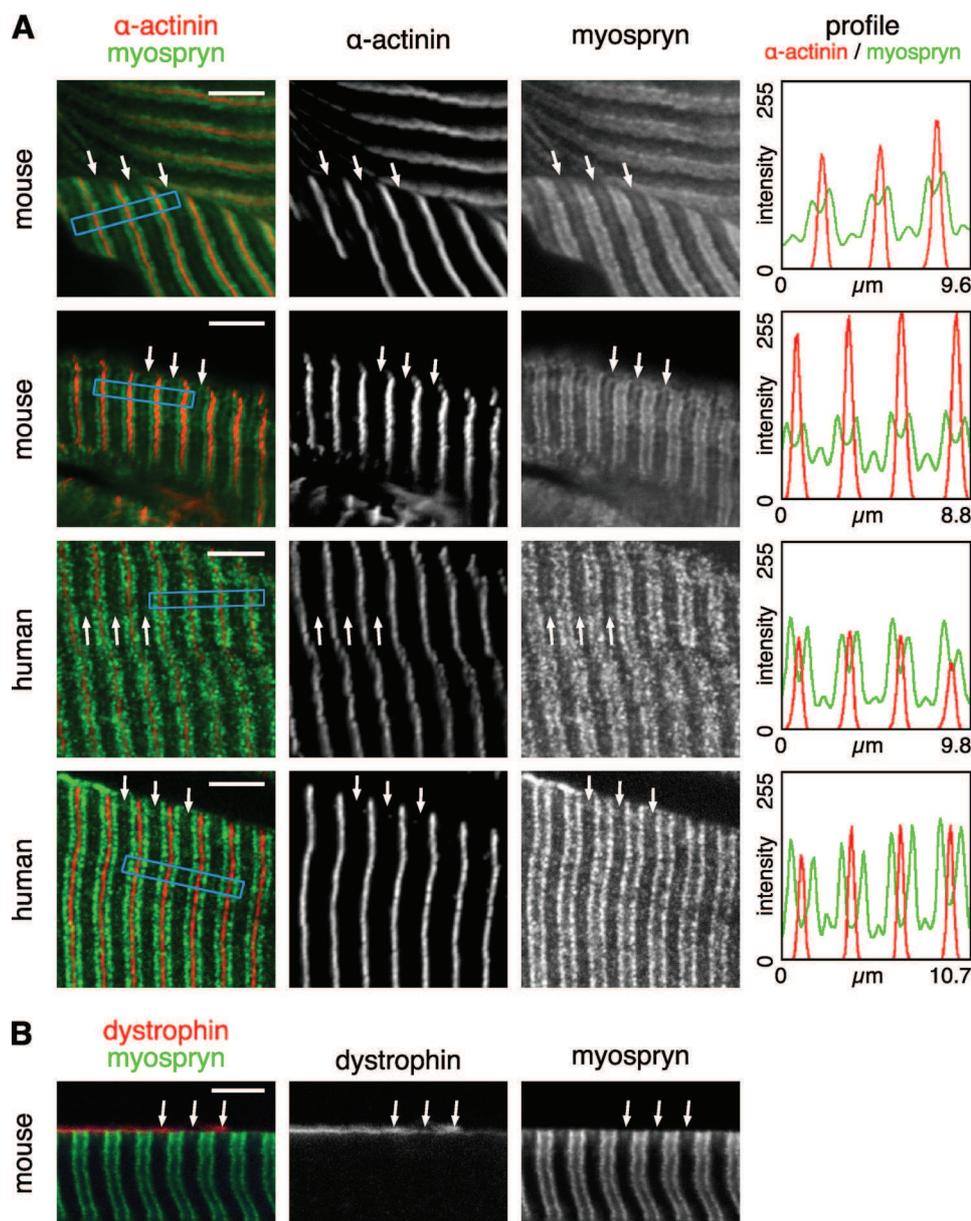


FIGURE 4. Immunofluorescence staining of muscle sections. Cryosections from stretched and immersion-fixed mouse and human muscles were stained for myospryn, α -actinin, and dystrophin and analyzed by confocal microscopy. *A*, in both mouse and human muscle, myospryn was predominantly localized as doublet bands flanking the Z-disc (marked by α -actinin). A fainter signal was variably present at the M-band level (arrows). Staining profiles of α -actinin (red) and myospryn (green), measured from the regions boxed with blue in the merged images, demonstrate periodic myospryn staining flanking the Z-discs and at the M-bands. The images show single optical sections of $0.78\ \mu\text{m}$. *B*, as demonstrated by the double staining with dystrophin, the M-band myospryn stripes (arrows) were most prominent at the subsarcolemmal level. The images show a single optical section of $1.05\ \mu\text{m}$. Scale bars, $5\ \mu\text{m}$.

Myospryn Is Partly Localized at the M-band Level in Skeletal Muscle Sections—Confocal microscopy of longitudinal sections from stretched and immersion-fixed mouse and human muscles showed myospryn predominantly localized as broad doublet bands flanking the Z-discs. In addition, a fainter striation was occasionally present at the M-band level (Fig. 4A). The observed staining pattern was similar to that previously seen with the same antibody and protocol.⁴ Costaining for dystrophin showed that the M-band myo-

⁴ M. Benson and D. Blake, personal communication.

spryn stripes were most prominent at, but not restricted to, the subsarcolemmal level (Fig. 4B). Such a trend was not apparent with the major, Z-disc-flanking, myospryn striations.

To determine whether myospryn localization was affected by the homozygous titin mutation in LGMD2J, we compared muscle biopsies from healthy humans and LGMD2J patients (data not shown). The overall myospryn staining pattern resembled that seen in the immersion-fixed muscles and showed no obvious difference between control and LGMD2J muscles. However, in all these biopsy samples, the major doublet bands appeared fuzzier, and we were unable to discern the weak M-band myospryn stripes, which may reflect a lower resolution of the non-stretched samples or better preservation of the fine structure in the immersion-fixed muscle. Hence, subtle alterations of myospryn localization in LGMD2J muscles, especially in the M-band region, could not be reliably assayed from the material available.

To obtain further evidence for the localization of myospryn at M-bands and for its interaction with titin, we studied mouse muscle sections with *in situ* PLA, a technique that allows the detection of the physical proximity of antibody-binding sites. The combination of the myospryn ab Des122 with either of the titin antibodies (T51 or T41) produced more PLA signals than seen in negative controls, demonstrating close proximity ($<40\ \text{nm}$) of myospryn and M-band titin. The PLA signals appeared predominantly at the fiber periphery, and occasionally they showed a clear striated pattern with a spacing matching the sarcomeric length (Fig. 5). The fact that these striations arose in PLA assays with M-band-specific titin antibodies strongly suggests that they were localized at the M-band level.

Transfected Myospryn Can Localize to M-bands in Cultured Cardiomyocytes—As a complementary approach, we used cultured neonatal rat cardiomyocytes for studying the localization of endogenous and transfected myospryn and their possible colocalization with M-band titin. Neonatal rat cardiomyocytes represent a fully differentiated and transfectable muscle cell *in*

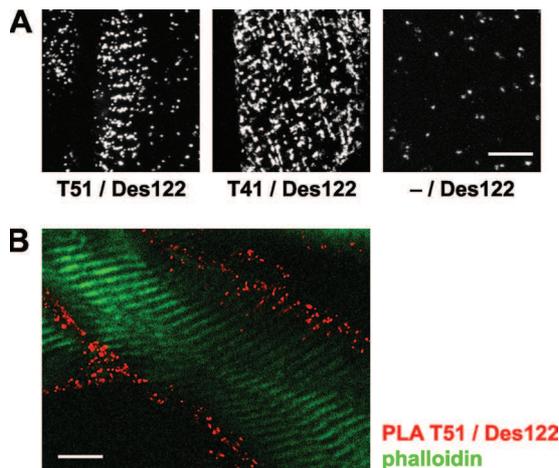


FIGURE 5. *In situ* proximity ligation assays. Mouse muscle sections were subjected to PLA stainings with the antibodies T51 or T41 against M-band titin and Des122 against myospryn and analyzed by confocal microscopy. Punctate fluorescent signals indicate physical proximity of the two different primary antibodies. *A*, antibody combinations T51/Des122 and T41/Des122 produced striated patterns of PLA signals, indicating periodic localization of myospryn in close proximity to M-band titin. Fewer PLA signals were produced in the negative control staining without the titin antibody (–/Des122). The images are maximum intensity projections through 13 optical sections of 0.78 μm . *B*, PLA signals between M-band titin and myospryn were most abundant at the fiber periphery, as shown here for the antibody pair T51/Des122 (red). Phalloidin counterstain (green) visualizes the thin filaments. The image shows a single optical section of 0.78 μm . Scale bars, 10 μm .

in vitro, thus providing a good cell model for localization studies of myofibrillar proteins.

Endogenous myospryn, detected with the Des122 antibody in untransfected cells, typically showed reticular localization, possibly associated with SR, together with sarcomeric striations of variable intensity (Fig. 6, *A–C*). The sarcomeric localization was most prominent at the Z-discs, but in a small subset of cells a weaker striation, colocalizing with C-terminal titin, was present at the M-bands (Fig. 6, *D–G*).

The myospryn constructs of two different lengths (3811–CT and MD9) differed clearly in their localization. Although there was cell-to-cell variation within the transfection experiments, typical localization patterns for each construct were discernible. The shorter CMYA5^{3811–CT} constructs were predominantly targeted to the sarcomeric Z-discs, stress fiber-like structures (regions of developing sarcomeres) and intercalated discs (Fig. 6, *H–J*). The degree of Z-disc localization varied considerably, with almost exclusive Z-disc staining in some cells and a less defined localization in others. The Z-disc pattern was clearest in short term cultures (fixed one or 2 days post-transfection). After 5 days in culture, some cells showed a similar pattern, whereas others exhibited abnormal morphology possibly due to toxic effects of the overexpressed protein.

The longer MD9 constructs typically adopted a reticular pattern with somewhat denser staining in the perinuclear region. In some cells, striations were evident as well, and where present, these were comparably strong in the Z-discs and M-bands (Fig. 6, *K–N*). The striated patterns seemed to become clearer and more frequent during the culture, with the striations most conspicuous 2–5 days after transfection.

The Myc- and GFP-tagged versions of both myospryn constructs behaved essentially in a similar fashion, demonstrating

that the tags did not have a major effect on protein localization. Cells expressing GFP-tagged constructs did beat normally, indicating that the overexpression of C-terminal myospryn did not have a dramatic harmful effect on sarcomeric function. In the long term cultures, however, some transfected cells showed signs of cytotoxic effects.

To find out whether overexpression of C-terminal titin could affect the localization of myospryn or vice versa, we transfected cardiomyocytes with the HA-tagged titin construct HA-is6-M10 alone or together with the different myospryn constructs. As judged on a relatively high number of dead transfected cells, HA-is6-M10 overexpression seemed to have toxic effects, perhaps on the cells expressing the construct at the highest levels. Healthy-looking transfected cells could be found as well; in those, expression of the titin construct did not have any obvious effect on the localization of transfected or endogenous myospryn nor on the general appearance of sarcomeric markers.

In singly transfected cells cultured 1–2 days, HA-is6-M10 showed a diffuse localization throughout the cell and occasional association with actin filaments, but typically without striated sarcomeric staining (Fig. 6, *O–R*). By contrast, in cells cotransfected with the Z-disc-targeting CMYA5^{3811–CT} construct, HA-is6-M10 did show increased association with the Z-discs (Fig. 6, *S–V*). Although not directly reflecting a natural situation, this ability of myospryn to modulate the localization of the titin construct further supports a direct interaction of the proteins. Also in general, the titin and myospryn constructs in double-transfected cells seemed to adopt similar localization patterns, suggesting a tendency for the proteins to associate.

Myospryn Is a CAPN3 Substrate and May Stabilize CAPN3 in Vitro—To study the functional consequences of the CAPN3-myospryn interaction, we coexpressed Myc-tagged myospryn constructs MD7 and MD9 with wild-type or inactive C129S versions of YFP/CFP-tagged CAPN3 in 911 cells.

When coexpressed with the inactive CAPN3^{C129S}, Myc-MD9 was detected in cell lysates as expected (Fig. 7*A*). Coexpression with the proteolytically active construct, however, resulted in the disappearance of full-length Myc-MD9 from lysates, accompanied by the appearance of a smaller (~40 kDa) N-terminal protein fragment. In contrast, the shorter Myc-MD7 construct was unaffected by CAPN3 coexpression. This demonstrates proteolytic cleavage of myospryn MD9 but not MD7 by CAPN3.

Proteolytically active CAPN3 normally undergoes rapid autolytic activation, which was demonstrated by a low level of the full-length CAPN3 construct and presence of autolytic calpain fragments in the cell lysates. However, in cells cotransfected with Myc-MD9, the total amount of full-length CAPN3 construct and its ratio to the 80-kDa autolytic fragment were higher, suggesting increased stability of CAPN3 (Fig. 7, *B* and *C*). Again, the effect was only observed with Myc-MD9 and not Myc-MD7.

DISCUSSION

Our results demonstrate direct molecular interactions of myospryn with the M-band part of the sarcomeric protein titin and with the skeletal muscle-specific protease calpain 3. We also show localization of endogenous and transfected myo-

Myospryn Interacts with Titin and Calpain 3

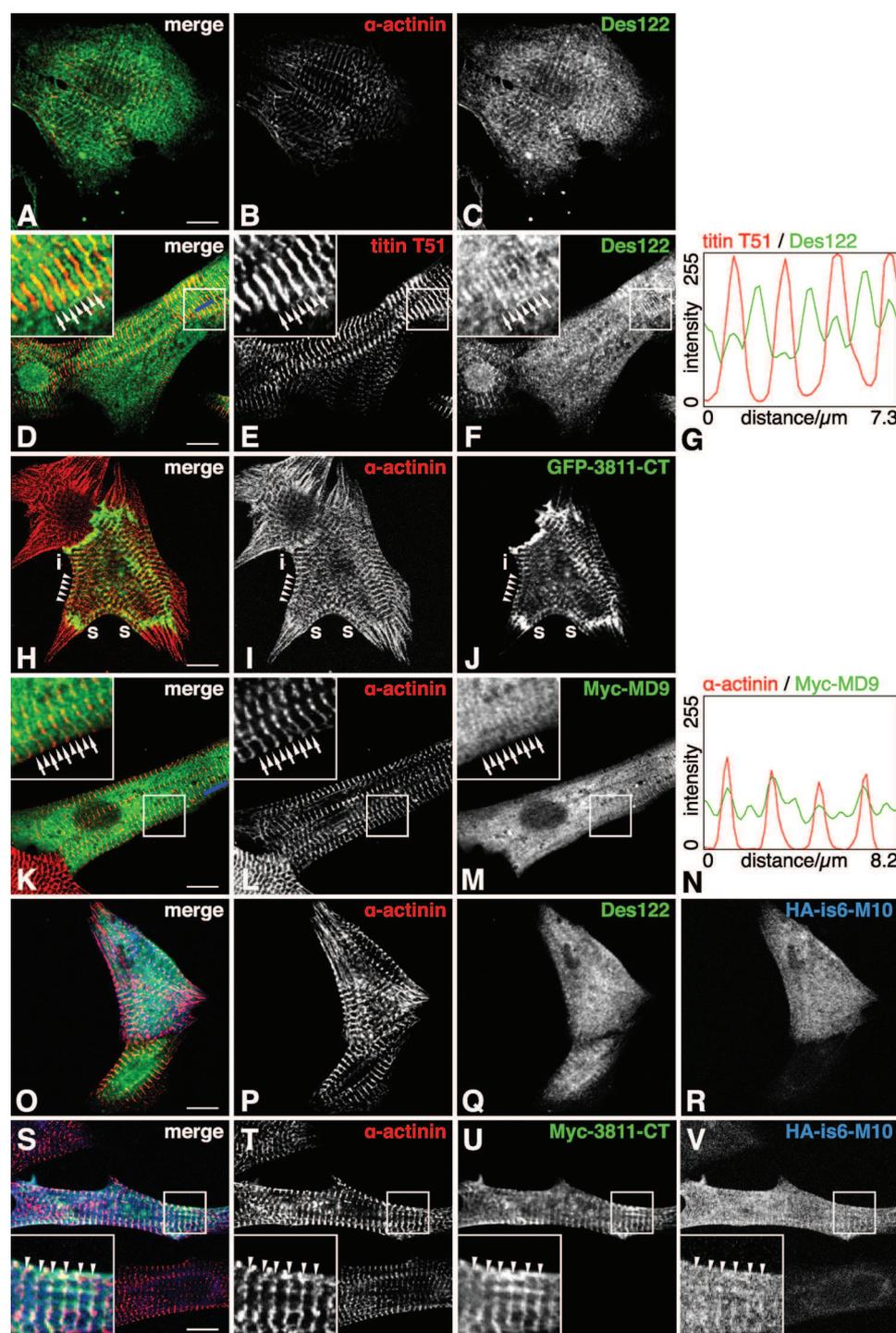


FIGURE 6. Confocal microscopy of neonatal rat cardiomyocytes. Neonatal rat cardiomyocytes, either transfected with different myospryn and titin constructs or untransfected, were stained with antibodies against sarcomeric α -actinin, myospryn, C-terminal titin, or epitope tags. *A–C*, in untransfected cells cultured for 3 days, endogenous myospryn localized typically in a reticular pattern with a variable degree of Z-disc striations (*A*, merge; *B*, α -actinin; *C*, myospryn Des122). *D–G*, in some cells, endogenous myospryn was seen at the M-bands (arrows) as well as Z-discs (arrowheads) (*D*, merge; *E*, titin T51; *F*, myospryn Des122; *G*, staining profile measured along the blue bar in *D*). *H–J*, GFP-CMYA5^{3811-CT} localized typically at the Z-discs (arrowheads), stress-fiber-like structures (*s*), and intercalated discs (*i*) (*H*, merge; *I*, α -actinin; *J*, GFP). *K–N*, Myc-MD9 showed reticular localization with comparably strong striations at the Z-discs and M-bands (*K*, merge; *L*, α -actinin; *M*, Myc; *N*, staining profile measured along the blue bar in *K*). *O–R*, in cells transfected with HA-is6-M10 alone, the titin construct typically showed a diffuse localization (*O*, merge; *P*, α -actinin; *Q*, myospryn Des122; *R*, HA). *S–V*, in cotransfections, HA-is6-M10 sometimes showed partial colocalization with the CMYA5^{3811-CT} constructs at the Z-discs (arrowheads), as shown here by Myc-CMYA5^{3811-CT} and HA-is6-M10 (*S*, merge; *T*, α -actinin; *U*, Myc; *V*, HA). (*D–G*, *H–J*, *O–R*, and *S–V*, 1 day post-transfection; *K–N*, 2 days post-transfection). Scale bars, 10 μ m.

spryn at the M-band level, compatible with the suggested interaction with M-band titin. Fig. 8 places the novel interactions in the context of the known interaction networks of titin and myospryn.

Both of the novel interactions take place at the evolutionarily conserved C-terminal tripartite motif-like part of myospryn, a region previously reported to interact with dysbindin (21), α -actinin (23), desmin (24), and dystrophin (27), and to be involved in myospryn self-association (21). We did not look into whether these interactions can take place simultaneously, but given the large number of reported binding partners, some of the interactions may be mutually exclusive.

The reported self-association (21) and the presence of a coiled-coil region suggest that myospryn could act as a dimer. Although our interaction results should be equally valid for myospryn monomers and dimers, a different dimerization propensity could account for some of the differences seen between the long and short myospryn constructs in CoIP and transfection studies.

Titin-Myospryn Interaction—The minimal protein regions needed for the titin-myospryn interaction in Y2H are the M10 domain of titin and a C-terminal part of myospryn comprising a partial FN3 and the SPRY domain. According to our CoIP studies, however, the entire region M9-is7-M10 can participate in myospryn binding, and the interacting region might extend even more N-terminally. The location of the minimal binding regions in the C-terminal ends of titin and myospryn could thus place the interacting molecules side-by-side in a parallel fashion. It should be noted that although the titin is7 region does seem to have myospryn-binding potential, efficient binding of both is7⁺ and is7⁻ constructs to myospryn in CoIP shows that the interaction is not isoform-specific.

Immunofluorescence microscopy and PLA experiments suggest that the interaction between M-band titin and

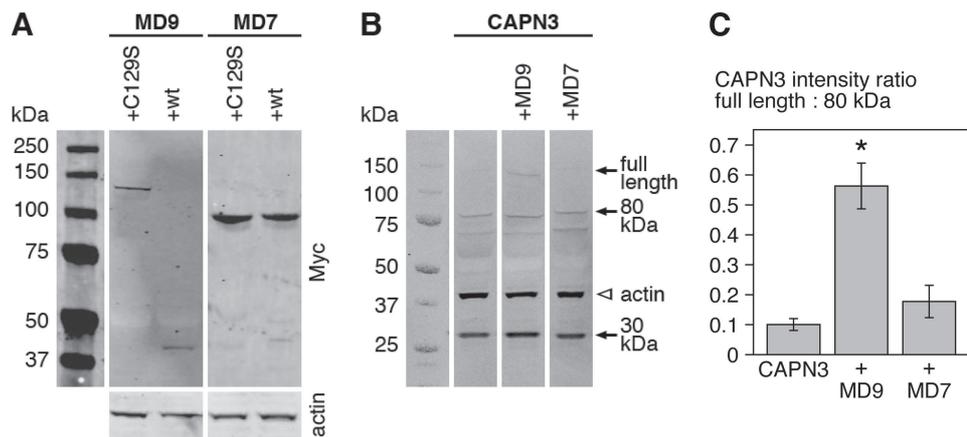


FIGURE 7. Myospryn-CAPN3 coexpression studies. Myc-tagged myospryn constructs MD9 and MD7 were coexpressed with active (WT) or inactive (C129S) YFP/CFP-tagged CAPN3 in 911 cells. Samples of cell lysates were analyzed by Western blotting using antibodies against Myc, GFP, and actin. *A*, coexpression of active CAPN3 with Myc-MD9 resulted in the disappearance of full-length Myc-MD9 and appearance of a 40-kDa N-terminal MD9 fragment, demonstrating cleavage of MD9 by CAPN3. The MD7 construct was unaffected by CAPN3. *B*, compared with cells expressing CAPN3 alone or together with Myc-MD7, cells coexpressing Myc-MD9 showed a higher amount of the full-length calpain construct, suggesting attenuated autolysis of CAPN3. In the blot, several N- and C-terminal autolytic fragments of the calpain construct are visible, as the GFP antibody recognizes the fluorescent protein tags at both ends of the construct. Arrows indicate the full-length calpain construct at ~140 kDa (corresponding to CAPN3 of 94 kDa plus the two tags) and the most prominent autolytic fragments at 80 and 30 kDa. The 80-kDa band results from cleavage at the IS1 region and corresponds to the 55-kDa autolytic fragment of CAPN3 (31) with the C-terminal CFP tag. The 30-kDa fragment, resulting from cleavage at the NS region, includes a short N-terminal calpain peptide preceded by the YFP tag. Actin is shown as a loading control. *C*, intensity ratios of the full-length CAPN3 construct to the 80-kDa autolytic fragment were quantified from cells expressing CAPN3 construct alone or together with the myospryn constructs. Cells coexpressing Myc-MD9 showed a significantly higher ratio ($p = 0.0495$, Mann-Whitney U test), suggesting stabilization of CAPN3. Mean ratios \pm S.E. are shown; $n = 3$ for each group.

myospryn takes place primarily at the myofiber periphery. This is in accordance with the predominantly subsarcolemmal localization of myospryn (21). As myospryn has been reported to associate with costameres (23, 24), the interaction of titin with myospryn could provide a link between the peripheral myofibrils and the costamere-like structures present at the M-band level (39). The nature of this interaction could be either structural or regulatory. Partial localization of the PKA RII subunits to the M-band level (26) suggests that the role of myospryn there could be related to its protein kinase A-anchoring protein function.

CAPN3-Myospryn Interaction—The interaction with myospryn involves the domain III and is2 of CAPN3, regions thought to be important for substrate recognition. Indeed, our coexpression studies indicated proteolysis of the myospryn construct MD9 by CAPN3 *in vitro*. The size of the N-terminal fragment places the cleavage site at 70–80 kDa from the myospryn C terminus, ~40–140 amino acid residues N-terminally from the BBox' domain. The MD7 construct might just be short enough to escape the cleavage, which would explain the different behavior of the two myospryn constructs. Cleavage by CAPN3 could serve to regulate the turnover, interactions, localization, or activity of myospryn. However, for most of the CAPN3 substrates identified *in vitro*, there is no evidence for cleavage in physiological conditions. Whether CAPN3 actually cleaves myospryn *in vivo* remains to be elucidated.

Stabilization of CAPN3 by MD9, suggested by our coexpression studies, provides additional support for the interaction of the proteins, and it also implies possible regulation of CAPN3 by myospryn. A plausible mechanism would be that anchoring to myospryn directly protects CAPN3 from autolysis, as has

previously been shown for binding of CAPN3 to titin (12, 40). Alternatively, the stabilization could be indirectly mediated, for example by PKA.

The predominant localization pattern of myospryn (doublet bands flanking the Z-disc in skeletal muscle and a single Z-disc-overlapping band in cardiomyocytes) correlates with the position of the T-tubules, and localization of myospryn in this region has been suggested (41). CAPN3 was recently reported to have a structural, nonproteolytic role in the calcium release complex at the triads, the contact sites of T-tubules and SR (42). Localization of both myospryn and CAPN3 in this compartment hints that their interaction could take place there. Another attractive possibility is that the proximity of the CAPN3- and myospryn-binding sites in titin reflects a ternary interaction between the proteins in the M-band region.

Implications for Muscular Dystrophies—The involvement of myospryn and the PKA pathway in Duchenne muscular dystrophy has already indicated that myospryn may play a role in the pathomechanism of one type of muscular dystrophy. The novel interactions of myospryn with M-band titin and CAPN3, proteins associated with TMD/LGMD2J and LGMD2A, may suggest that myospryn could be of wider importance in the pathogenesis of muscle disease.

Y2H suggested that the FINmaj titin mutation could directly affect the interaction with myospryn. In light of our CoIP results, direct disruption of the binding is not likely, probably because the interaction is not limited to the mutated M10 domain. The loss of C-terminal titin epitopes and the secondary CAPN3 deficiency in LGMD2J muscle suggests, however, that the TMD/LGMD2J-causing mutations ultimately lead to the absence of the entire titin C terminus. This will obviously compromise any protein interactions taking place in the region, including that with myospryn, whether or not they are directly affected by the mutation. Downstream consequences of the altered titin-myospryn interaction could be relevant for the pathogenesis of titinopathies.

Besides CAPN3 and myospryn, the titinopathy mutations are known to affect the giant structural and signaling protein obscurin (OBSCN) and its smaller homologue obscurin-like 1 (OBSL1). Ternary interactions with the titin M10 domain and the M-band cross-linking protein myomesin are required for the proper localization of OBSCN/OBSL1 at the M-band. TMD/LGMD2J mutations directly disrupt these interactions, and obscurin is mislocalized in LGMD2J muscle (30). The role of these interactions in the pathomecha-

Myospryn Interacts with Titin and Calpain 3

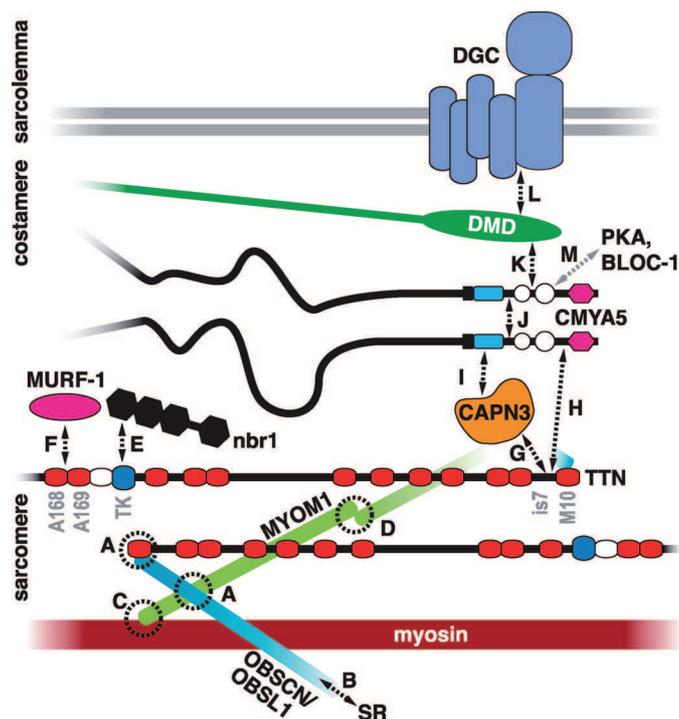


FIGURE 8. Interaction network of M-band titin. The figure models the layout of titin and its associated proteins in the M-band and summarizes the molecular interaction network centered at M-band titin in skeletal muscle. The C termini of titin molecules from the adjacent half-sarcomeres overlap in the M-band. Interactions between the titin M10 domain, obscurin/obscurin-like 1 (*OBSCN/OBSL1*) and myomesin 1 (*MYOM1*), connect the three proteins as a ternary complex (A) (30). C-terminal obscurin links the myofibrils to the SR via ankyrin (B) (43). Myomesin 1 cross-links the thick filaments through its interaction with myosin (C) (44) and homodimerization (D) (45). The other members of the myomesin family (myomesin 2 or M-protein, and myomesin 3) also localize to the M-band, but their possible interactions with titin are not clarified. The known signaling functions of M-band titin reside at the M-band periphery. Nbr1 binds to the titin kinase (TK) domain and transmits information about the mechanical activity of titin to pathways controlling protein turnover (E) (3). The muscle ring finger protein MURF-1 binds the titin domains A168–A169 (F); this interaction has been proposed to have both regulatory and structural functions (46, 47). CAPN3 binds titin through the is7 region (G) (12). As shown in this study, both C-terminal titin (H) and CAPN3 (I) can bind myospryn (CMYA5), but it remains to be determined whether these interactions take place simultaneously at the M-band. Myospryn self-associates (J) (21), suggesting that it may act as a dimer. At the costamere level, myospryn interacts with dystrophin (K) (27), which in turn connects to the dystrophin-associated glycoprotein complex (DGC) at the sarcolemma (L) (48). Also protein kinase A (PKA) and the dysbindin subunit of the biogenesis of lysosome-related organelles-complex 1 (*BLOC-1*) are reported myospryn ligands that may interact with myospryn at the M-band level (M) (21, 26). The model for the organization of titin, myomesin, obscurin was adapted from Fukuzawa *et al.* (30).

nisms of TMD and LGMD2J needs to be addressed by further studies.

For LGMD2A, impaired cleavage of CAPN3 substrates is thought to be the most important pathogenetic factor (16), but involvement of the nonproteolytic functions of CAPN3 has been also suggested (42). The substrate(s) important for the pathogenesis are unknown. If myospryn is a proteolytic target for CAPN3 *in vivo*, loss of its cleavage may be one contributing factor in the molecular pathogenesis of calpainopathy. On the other hand, if myospryn acts upstream of calpain 3, its perturbation may have even more profound effects on the calpain-mediated regulatory proteolysis in muscle.

Acknowledgments—We thank Prof. Derek Blake (Cardiff University) and Dr. Matthew Benson (University of Oxford) for providing the Des122 antibody and the original MD7 and MD9 constructs and for helpful discussions; Prof. Mathias Gautel (King's College London) for critical reading of the manuscript; Dr. Atsushi Fukuzawa (King's College London) for the pEGFP-M10 construct; Kirsi Mänttari and Outi Kokkonen (Biocentrum Helsinki Two-hybrid Facility, University of Helsinki) for performing the M10 interaction screen; Prof. Tomi Mäkelä (University of Helsinki) for the pAMC and pAHC vectors; Sanna Huovinen, Hanna-Liisa Kojo, and Sini Penttilä for help with the muscle samples; and Marjut Ritala, Katri Leinonen, Anni Riihiaho, pH Jonson, and Helena Luque for technical assistance. Confocal microscopy was partly carried out at the Molecular Imaging Unit, University of Helsinki.

REFERENCES

- Fürst, D. O., Osborn, M., Nave, R., and Weber, K. (1988) *J. Cell Biol.* **106**, 1563–1572
- Granzier, H., and Labeit, S. (2007) *Muscle Nerve* **36**, 740–755
- Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L. G., Hughes, S. M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edström, L., Ehler, E., Udd, B., and Gautel, M. (2005) *Science* **308**, 1599–1603
- Knöll, R., Hoshijima, M., Hoffman, H. M., Person, V., Lorenzen-Schmidt, I., Bang, M. L., Hayashi, T., Shiga, N., Yasukawa, H., Schaper, W., McKenna, W., Yokoyama, M., Schork, N. J., Omens, J. H., McCulloch, A. D., Kimura, A., Gregorio, C. C., Poller, W., Schaper, J., Schultheiss, H. P., and Chien, K. R. (2002) *Cell* **111**, 943–955
- Miller, M. K., Bang, M. L., Witt, C. C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A. S., Gregorio, C. C., and Labeit, S. (2003) *J. Mol. Biol.* **333**, 951–964
- Hackman, P., Vihola, A., Haravuori, H., Marchand, S., Sarparanta, J., De Seze, J., Labeit, S., Witt, C., Peltonen, L., Richard, I., and Udd, B. (2002) *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 492–500
- Udd, B., Kääriäinen, H., and Somer, H. (1991) *Muscle Nerve* **14**, 1050–1058
- Udd, B., Vihola, A., Sarparanta, J., Richard, I., and Hackman, P. (2005) *Neurology* **64**, 636–642
- Van den Bergh, P. Y., Bouquiaux, O., Verellen, C., Marchand, S., Richard, I., Hackman, P., and Udd, B. (2003) *Ann. Neurol.* **54**, 248–251
- Hackman, P., Marchand, S., Sarparanta, J., Vihola, A., Pénilsson-Besnier, I., Eymard, B., Pardo-Fernández, J. M., Hammouda, el-H., Richard, I., Illa, I., and Udd, B. (2008) *Neuromuscul. Disord.* **18**, 922–928
- Udd, B., Partanen, J., Halonen, P., Falck, B., Hakamies, L., Heikkilä, H., Ingo, S., Kalimo, H., Kääriäinen, H., Laulumaa, V., Paljärvi, L., Rapola, J., Reunanen, M., Sonninen, V., and Somer, H. (1993) *Arch. Neurol.* **50**, 604–608
- Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., Takahashi, M., Ishiura, S., Sasagawa, N., Sorimachi, N., Shimada, H., Tagawa, K., and Maruyama, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 31158–31162
- Kinbara, K., Sorimachi, H., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.* **342**, 99–107
- Haravuori, H., Vihola, A., Straub, V., Auranen, M., Richard, I., Marchand, S., Voit, T., Labeit, S., Somer, H., Peltonen, L., Beckmann, J. S., and Udd, B. (2001) *Neurology* **56**, 869–877
- Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., and Sorimachi, H. (2004) *Diabetes* **53**, S12–S18
- Duguez, S., Bartoli, M., and Richard, I. (2006) *FEBS J.* **273**, 3427–3436
- Kramerova, I., Kudryashova, E., Venkatraman, G., and Spencer, M. J. (2005) *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2125–2134
- Huang, Y., de Morrée, A., van Remoortere, A., Bushby, K., Frants, R. R., Dunnen, J. T., and van der Maarel, S. M. (2008) *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1855–1866
- Ojima, K., Ono, Y., Hata, S., Koyama, S., Doi, N., and Sorimachi, H. (2005) *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **26**, 409–417
- Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougereousse, F., Chiannikulchai, N.,

- Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., Hillaire, D., Passos-Bueno, M. R., Zatz, M., Tischfield, J. A., Fardeau, M., Jackson, C. E., Cohen, D., and Beckmann, J. S. (1995) *Cell* **81**, 27–40
21. Benson, M. A., Tinsley, C. L., and Blake, D. J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 10450–10458
 22. Tkatchenko, A. V., Piétu, G., Cros, N., Gannoun-Zaki, L., Auffray, C., Léger, J. J., and Dechesne, C. A. (2001) *Neuromuscul. Disord.* **11**, 269–277
 23. Durham, J. T., Brand, O. M., Arnold, M., Reynolds, J. G., Muthukumar, L., Weiler, H., Richardson, J. A., and Naya, F. J. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 6841–6849
 24. Kouloumenta, A., Mavroidis, M., and Capetanaki, Y. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 35211–35221
 25. Sarparanta, J. (2008) *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **29**, 177–180
 26. Reynolds, J. G., McCalmon, S. A., Tomczyk, T., and Naya, F. J. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 891–902
 27. Reynolds, J. G., McCalmon, S. A., Donaghey, J. A., and Naya, F. J. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 8070–8074
 28. Formstecher, E., Aresta, S., Collura, V., Hamburger, A., Meil, A., Trehin, A., Reverdy, C., Betin, V., Maire, S., Brun, C., Jacq, B., Arpin, M., Bellaiche, Y., Bellusci, S., Benaroch, P., Bornens, M., Chanet, R., Chavrier, P., Delattre, O., Doye, V., Fehon, R., Faye, G., Galli, T., Girault, J. A., Goud, B., de Gunzburg, J., Johannes, L., Junier, M. P., Mirouse, V., Mukherjee, A., Papadopoulos, D., Perez, F., Plessis, A., Rossé, C., Saule, S., Stoppa-Lyonnet, D., Vincent, A., White, M., Legrain, P., Wojcik, J., Camonis, J., and Daviet, L. (2005) *Genome Res.* **15**, 376–384
 29. Tiainen, M., Ylikorkala, A., and Mäkelä, T. P. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9248–9251
 30. Fukuzawa, A., Lange, S., Holt, M., Vihola, A., Carmignac, V., Ferreira, A., Udd, B., and Gautel, M. (2008) *J. Cell Sci.* **121**, 1841–1851
 31. Taveau, M., Bourg, N., Sillon, G., Roudaut, C., Bartoli, M., and Richard, I. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9127–9135
 32. Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T. C., Beckmann, J. S., Ishiura, S., and Suzuki, K. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 17073–17078
 33. Obermann, W. M., Gautel, M., Steiner, F., van der Ven, P. F., Weber, K., and Fürst, D. O. (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 1441–1453
 34. van der Ven, P. F., Obermann, W. M., Lemke, B., Gautel, M., Weber, K., and Fürst, D. O. (2000) *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**, 149–162
 35. Lykke-Andersen, J. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8114–8121
 36. Lange, S., Auerbach, D., McLoughlin, P., Perriard, E., Schäfer, B. W., Perriard, J. C., and Ehler, E. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 4925–4936
 37. Locke, M., Tinsley, C. L., Benson, M. A., and Blake, D. J. (2009) *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2344–2358
 38. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006) *Bioinformatics* **22**, 195–201
 39. Porter, G. A., Dmytrenko, G. M., Winkelmann, J. C., and Bloch, R. J. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 997–1005
 40. Ono, Y., Torii, F., Ojima, K., Doi, N., Yoshioka, K., Kawabata, Y., Labeit, D., Labeit, S., Suzuki, K., Abe, K., Maeda, T., and Sorimachi, H. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 18519–18531
 41. Tinsley, C. L., Esapa, C. T., Benson, M. A., Waite, A. J., Locke, M., and Blake, D. J. (2005) *Neuromuscul. Disord.* **15**, 717
 42. Kramerova, I., Kudryashova, E., Wu, B., Ottenheijm, C., Granzier, H., and Spencer, M. J. (2008) *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3271–3280
 43. Bagnato, P., Barone, V., Giacomello, E., Rossi, D., and Sorrentino, V. (2003) *J. Cell Biol.* **160**, 245–253
 44. Obermann, W. M., Gautel, M., Weber, K., and Fürst, D. O. (1997) *EMBO J.* **16**, 211–220
 45. Lange, S., Himmel, M., Auerbach, D., Agarkova, I., Hayess, K., Fürst, D. O., Perriard, J. C., and Ehler, E. (2005) *J. Mol. Biol.* **345**, 289–298
 46. Centner, T., Yano, J., Kimura, E., McElhinny, A. S., Pelin, K., Witt, C. C., Bang, M. L., Trombitas, K., Granzier, H., Gregorio, C. C., Sorimachi, H., and Labeit, S. (2001) *J. Mol. Biol.* **306**, 717–726
 47. McElhinny, A. S., Kakinuma, K., Sorimachi, H., Labeit, S., and Gregorio, C. C. (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 125–136
 48. Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., and Ozawa, E. (1994) *Eur. J. Biochem.* **220**, 283–292

Présentations et Posters

18-22 juillet 2010: ICNMD 2010, Naples (Italie), présentation orale:

« A mouse model reproducing the FINmaj titin mutation exhibits TMD and LGMD2J».

Prix de la meilleure présentation orale

1^{er} et 2 juillet 2010 : Colloque Jeunes Chercheurs, Evry (France), présentation d'un poster :

«Physiopathology and therapeutic approach by trans-splicing for TMD and LGMD2J»

21-25 novembre 2009 : ESGCT 2009, Hanovre (Allemagne), Présentation d'un poster :

« Therapeutic approach by trans-splicing for TMD and LGMD2J»

1^{er} et 2 juillet 2009 : Colloque Jeunes Chercheurs, Evry (France), présentation orale :

«Physiopathology and therapeutic approach by trans-splicing for TMD and LGMD2J»

21-23 juin 2009: SFTCG 2009, Paris (75): présentation d'un poster :

«Physiopathologie et approche thérapeutique par trans-épissage pour la TMD et la LGMD2J»

24-29 mai 2008 : Myology 2008, Marseille (13, présentation d'un poster :

« A mouse model reproducing the FINmaj titin mutation exhibits TMD and LGMD2J»

7-8 juin 2007 : Club Myogénèse VIII, Cassis (13), présentation orale:

« Un déficit de signalisation de la voie calpaïne 3 participe à l'apparition du phénotype LGMD2J »

BIBLIOGRAPHIE

- AKIVA, P., TOPORIK, A., EDELHEIT, S., PERETZ, Y., DIBER, A., SHEMESH, R., NOVIK, A., and SOREK, R. (2006). Transcription-mediated gene fusion in the human genome. *Genome Res* **16**, 30-36.
- 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.
- ALLEN, D.L., HARRISON, B.C., SARTORIUS, C., BYRNES, W.C., and LEINWAND, L.A. (2001). Mutation of the IIB myosin heavy chain gene results in muscle fiber loss and compensatory hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C637-645.
- AMODEO, P., CASTIGLIONE MORELLI, M.A., STRAZZULLO, G., FUCILE, P., GAUTEL, M., and MOTTA, A. (2001). Kinase recognition by calmodulin: modeling the interaction with the autoinhibitory region of human cardiac titin kinase. *J Mol Biol* **306**, 81-95.
- ARIMURA, T., HAYASHI, T., MATSUMOTO, Y., SHIBATA, H., HIROI, S., NAKAMURA, T., INAGAKI, N., HINOHARA, K., TAKAHASHI, M., MANATSU, S.I., SASAOKA, T., IZUMI, T., BONNE, G., SCHWARTZ, K., and KIMURA, A. (2007). Structural analysis of four and half LIM protein-2 in dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 162-167.
- ARMANI, A., GALLI, S., GIACOMELLO, E., BAGNATO, P., BARONE, V., ROSSI, D., and SORRENTINO, V. (2006). Molecular interactions with obscurin are involved in the localization of muscle-specific small ankyrin1 isoforms to subcompartments of the sarcoplasmic reticulum. *Exp Cell Res* **312**, 3546-3558.
- ASTIER, C., LABBE, J.P., ROUSTAN, C., and BENYAMIN, Y. (1991). Sarcomeric disorganization in post-mortem fish muscles. *Comp Biochem Physiol B* **100**, 459-465.
- ATKINSON, R.A., JOSEPH, C., DAL PIAZ, F., BIROLO, L., STIER, G., PUCCI, P., and PASTORE, A. (2000). Binding of alpha-actinin to titin: implications for Z-disk assembly. *Biochemistry* **39**, 5255-5264.
- BABCOCK, G.G., and FOWLER, V.M. (1994). Isoform-specific interaction of tropomodulin with skeletal muscle and erythrocyte tropomyosins. *J Biol Chem* **269**, 27510-27518.
- BAGHDIGUIAN, S., MARTIN, M., RICHARD, I., PONS, F., ASTIER, C., BOURG, N., HAY, R.T., CHEMALY, R., HALABY, G., LOISELET, J., ANDERSON, L.V., LOPEZ DE MUNAIN, A., FARDEAU, M., MANGEAT, P., BECKMANN, J.S., and LEFRANC, G. (1999). Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* **5**, 503-511.
- BAGNATO, P., BARONE, V., GIACOMELLO, E., ROSSI, D., and SORRENTINO, V. (2003). Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J Cell Biol* **160**, 245-253.
- BANG, M.L., CENTNER, T., FORNOFF, F., GEACH, A.J., GOTTHARDT, M., MCNABB, M., WITT, C.C., LABEIT, D., GREGORIO, C.C., GRANZIER, H., and LABEIT, S. (2001). The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* **89**, 1065-1072.
- BANG, M.L., LI, X., LITTLEFIELD, R., BREMNER, S., THOR, A., KNOWLTON, K.U., LIEBER, R.L., and CHEN, J. (2006). Nebulin-deficient mice exhibit shorter thin filament lengths and reduced contractile function in skeletal muscle. *J Cell Biol* **173**, 905-916.
- BARNOY, S., GLASER, T., and KOSOWER, N.S. (1998). The calpain-calpastatin system and protein degradation in fusing myoblasts. *Biochim Biophys Acta* **1402**, 52-60.
- BARTOLI, M., ROUDAUT, C., MARTIN, S., FOUGEROUSSE, F., SUEL, L., POUPIOT, J., GICQUEL, E., NOULET, F., DANOS, O., and RICHARD, I. (2006). Safety and efficacy of AAV-mediated calpain 3 gene transfer in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Mol Ther* **13**, 250-259.
- BAUGHAN, T.D., DICKSON, A., OSMAN, E.Y., and LORSON, C.L. (2009). Delivery of bifunctional RNAs that target an intronic repressor and increase SMN levels in an animal model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* **18**, 1600-1611.
- BENIAN, G.M., KIFF, J.E., NECKELMANN, N., MOERMAN, D.G., and WATERSTON, R.H. (1989). Sequence of an unusually large protein implicated in regulation of myosin activity in *C. elegans*. *Nature* **342**, 45-50.
- BENSON, M.A., TINSLEY, C.L., and BLAKE, D.J. (2004). Myosprryn is a novel binding partner for dysbindin in muscle. *J Biol Chem* **279**, 10450-10458.
- BERGET, S.M., MOORE, C., and SHARP, P.A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3171-3175.
- BERS, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205.

- BERTIPAGLIA, I., BOURG, N., RICHARD, I., PAHLMAN, A.K., ANDERSSON, L., JAMES, P., and CARAFOLI, E. (2009). A proteomic study of calpain-3 and its involvement in limb girdle muscular dystrophy type 2a. *Cell Calcium* **46**, 356-363.
- BHAUMIK, S., WALLS, Z., PUTTARAJU, M., MITCHELL, L.G., and GAMBHIR, S.S. (2004). Molecular imaging of gene expression in living subjects by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8693-8698.
- BIANCO, P., NAGY, A., KENGYEL, A., SZATMARI, D., MARTONFALVI, Z., HUBER, T., and KELLERMAYER, M.S. (2007). Interaction forces between F-actin and titin PEVK domain measured with optical tweezers. *Biophys J* **93**, 2102-2109.
- BOLOGNANI, F., and PERRONE-BIZZOZERO, N.I. (2008). RNA-protein interactions and control of mRNA stability in neurons. *J Neurosci Res* **86**, 481-489.
- BORISOV, A.B., KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, A., BLOCH, R.J., WESTFALL, M.V., and RUSSELL, M.W. (2004). Dynamics of obscurin localization during differentiation and remodeling of cardiac myocytes: obscurin as an integrator of myofibrillar structure. *J Histochem Cytochem* **52**, 1117-1127.
- BORISOV, A.B., SUTTER, S.B., KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, A., BLOCH, R.J., WESTFALL, M.V., and RUSSELL, M.W. (2006). Essential role of obscurin in cardiac myofibrillogenesis and hypertrophic response: evidence from small interfering RNA-mediated gene silencing. *Histochem Cell Biol* **125**, 227-238.
- BROOKS, Y.S., WANG, G., YANG, Z., SMITH, K.K., BIEBERICH, E., and KO, L. (2009). Functional pre-mRNA trans-splicing of coactivator CoAA and corepressor RBM4 during stem/progenitor cell differentiation. *J Biol Chem* **284**, 18033-18046.
- BULLARD, B., FERGUSON, C., MINAJEVA, A., LEAKE, M.C., GAUTEL, M., LABEIT, D., DING, L., LABEIT, S., HORWITZ, J., LEONARD, K.R., and LINKE, W.A. (2004). Association of the chaperone alphaB-crystallin with titin in heart muscle. *J Biol Chem* **279**, 7917-7924.
- BURKE, R.E., LEVINE, D.N., and ZAJAC, F.E., 3RD. (1971). Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science* **174**, 709-712.
- CANKI-KLAIN, N., MILIC, A., KOVAC, B., TRLAJA, A., GRGICEVIC, D., ZURAK, N., FARDEAU, M., LETURCQ, F., KAPLAN, J.C., URTIZBEREA, J.A., POLITANO, L., PILUSO, G., and FEINGOLD, J. (2004). Prevalence of the 550delA mutation in calpainopathy (LGMD 2A) in Croatia. *Am J Med Genet A* **125A**, 152-156.
- CARLSON, C.G., and MAKIEJUS, R.V. (1990). A noninvasive procedure to detect muscle weakness in the mdx mouse. *Muscle Nerve* **13**, 480-484.
- CARLSSON, E., and THORNELL, L.E. (1987). Diversification of the myofibrillar M-band in rat skeletal muscle during postnatal development. *Cell Tissue Res* **248**, 169-180.
- CARMIGNAC, V., SALIH, M.A., QUIJANO-ROY, S., MARCHAND, S., AL RAYESS, M.M., MUKHTAR, M.M., URTIZBEREA, J.A., LABEIT, S., GUICHENEY, P., LETURCQ, F., GAUTEL, M., FARDEAU, M., CAMPBELL, K.P., RICHARD, I., ESTOURNET, B., and FERREIRO, A. (2007). C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy. *Ann Neurol* **61**, 340-351.
- CARTEGNI, L., CHEW, S.L., and KRAINER, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* **3**, 285-298.
- CASTLE, J.C., ZHANG, C., SHAH, J.K., KULKARNI, A.V., KALSOTRA, A., COOPER, T.A., and JOHNSON, J.M. (2008). Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. *Nat Genet* **40**, 1416-1425.
- CAVNAR, P.J., OLENYCH, S.G., and KELLER, T.C., 3RD. (2007). Molecular identification and localization of cellular titin, a novel titin isoform in the fibroblast stress fiber. *Cell Motil Cytoskeleton* **64**, 418-433.
- CAZORLA, O., FREIBURG, A., HELMES, M., CENTNER, T., MCNABB, M., WU, Y., TROMBITAS, K., LABEIT, S., and GRANZIER, H. (2000). Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res* **86**, 59-67.
- CAZORLA, O., WU, Y., IRVING, T.C., and GRANZIER, H. (2001). Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes. *Circ Res* **88**, 1028-1035.
- CENTNER, T., YANO, J., KIMURA, E., MCELHINNY, A.S., PELIN, K., WITT, C.C., BANG, M.L., TROMBITAS, K., GRANZIER, H., GREGORIO, C.C., SORIMACHI, H., and LABEIT, S. (2001). Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol* **306**, 717-726.
- CHAO, H., MANSFIELD, S.G., BARTEL, R.C., HIRIYANNA, S., MITCHELL, L.G., GARCIA-BLANCO, M.A., and WALSH, C.E. (2003). Phenotype correction of hemophilia A mice by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Nat Med* **9**, 1015-1019.

- CHEN, H.Y., KATHIRVEL, P., YEE, W.C., and LAI, P.S. (2009). Correction of dystrophin myotonia type 1 pre-mRNA transcripts by artificial trans-splicing. *Gene Ther* **16**, 211-217.
- CHUA, B.T., GUO, K., and LI, P. (2000). Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* **275**, 5131-5135.
- COADY, T.H., BAUGHAN, T.D., SHABABI, M., PASSINI, M.A., and LORSON, C.L. (2008). Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts. *PLoS One* **3**, e3468.
- COADY, T.H., and LORSON, C.L. (2010). Trans-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy. *J Neurosci* **30**, 126-130.
- COADY, T.H., SHABABI, M., TULLIS, G.E., and LORSON, C.L. (2007). Restoration of SMN function: delivery of a trans-splicing RNA re-directs SMN2 pre-mRNA splicing. *Mol Ther* **15**, 1471-1478.
- COHEN, N., KUDRYASHOVA, E., KRAMEROVA, I., ANDERSON, L.V., BECKMANN, J.S., BUSHBY, K., and SPENCER, M.J. (2006). Identification of putative in vivo substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics* **6**, 6075-6084.
- CORDIER, L., GAO, G.P., HACK, A.A., MCNALLY, E.M., WILSON, J.M., CHIRMULE, N., and SWEENEY, H.L. (2001). Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther* **12**, 205-215.
- CORDIER, L., HACK, A.A., SCOTT, M.O., BARTON-DAVIS, E.R., GAO, G., WILSON, J.M., MCNALLY, E.M., and SWEENEY, H.L. (2000). Rescue of skeletal muscles of gamma-sarcoglycan-deficient mice with adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Mol Ther* **1**, 119-129.
- DALLINGER, G., PUTTARAJU, M., MITCHELL, L.G., YANCEY, K.B., HINTNER, H., and BAUER, J.W. (2000). Collagen 17A1 gene correction using spliceosome mediated RNA trans-splicing (SMaRTtrade mark) technology. *J Invest Dermatol* **115**, 332.
- DALLINGER, G., PUTTARAJU, M., MITCHELL, L.G., YANCEY, K.B., YEE, C., KLAUSEGGER, A., HINTNER, H., and BAUER, J.W. (2003). Development of spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) for the correction of inherited skin diseases. *Exp Dermatol* **12**, 37-46.
- DE MORREE, A., LUTJE HULSIK, D., IMPAGLIAZZO, A., VAN HAAGEN, H.H., DE GALAN, P., VAN REMOORTERE, A., T HOEN, P.A., VAN OMMEN, G.B., FRANTS, R.R., and VAN DER MAAREL, S.M. (2010). Calpain 3 is a rapid-action, unidirectional proteolytic switch central to muscle remodeling. *PLoS One* **5**.
- DE SEZE, J., UDD, B., and VERMERSCH, P. (1999). [Tibial muscular dystrophy. A rare form of distal myopathy]. *Rev Neurol (Paris)* **155**, 296-305.
- DEAR, T.N., MOLLER, A., and BOEHM, T. (1999). CAPN11: A calpain with high mRNA levels in testis and located on chromosome 6. *Genomics* **59**, 243-247.
- DELGADO, E.F., GEESINK, G.H., MARCHELLO, J.A., GOLL, D.E., and KOOHMARAIE, M. (2001). Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. *J Anim Sci* **79**, 2097-2107.
- DIAZ, B.G., MOLDOVEANU, T., KUIPER, M.J., CAMPBELL, R.L., and DAVIES, P.L. (2004). Insertion sequence 1 of muscle-specific calpain, p94, acts as an internal propeptide. *J Biol Chem* **279**, 27656-27666.
- DICKSON, A., OSMAN, E., and LORSON, C.L. (2008). A negatively acting bifunctional RNA increases survival motor neuron both in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* **19**, 1307-1315.
- DONG, J.Y., FAN, P.D., and FRIZZELL, R.A. (1996). Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* **7**, 2101-2112.
- DORN, R., REUTER, G., and LOEWENDORF, A. (2001). Transgene analysis proves mRNA trans-splicing at the complex mod(mdg4) locus in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9724-9729.
- DRESSMAN, D., ARAISHI, K., IMAMURA, M., SASAOKA, T., LIU, L.A., ENGVALL, E., and HOFFMAN, E.P. (2002). Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther* **13**, 1631-1646.
- DUGUEZ, S., BARTOLI, M., and RICHARD, I. (2006). Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *Febs J* **273**, 3427-3436.
- DURHAM, J.T., BRAND, O.M., ARNOLD, M., REYNOLDS, J.G., MUTHUKUMAR, L., WEILER, H., RICHARDSON, J.A., and NAYA, F.J. (2006). Myospryn is a direct transcriptional target for MEF2A that encodes a striated muscle, alpha-actinin-interacting, costamere-localized protein. *J Biol Chem* **281**, 6841-6849.
- EBASHI, S., and KODAMA, A. (1966). Interaction of troponin with F-actin in the presence of tropomyosin. *J Biochem* **59**, 425-426.
- EDSTROM, L., THORNELL, L.E., ALBO, J., LANDIN, S., and SAMUELSSON, M. (1990). Myopathy with respiratory failure and typical myofibrillar lesions. *J Neurol Sci* **96**, 211-228.
- EUL, J., GRAESSMANN, M., and GRAESSMANN, A. (1995). Experimental evidence for RNA trans-splicing in mammalian cells. *Embo J* **14**, 3226-3235.

- FABIAN, L., XIA, X., VENKITARAMANI, D.V., JOHANSEN, K.M., JOHANSEN, J., ANDREW, D.J., and FORER, A. (2007). Titin in insect spermatocyte spindle fibers associates with microtubules, actin, myosin and the matrix proteins skeletor, megator and chromator. *J Cell Sci* **120**, 2190-2204.
- FARDEAU, M., EYMARD, B., MIGNARD, C., TOME, F.M., RICHARD, I., and BECKMANN, J.S. (1996). Chromosome 15-linked limb-girdle muscular dystrophy: clinical phenotypes in Reunion Island and French metropolitan communities. *Neuromuscul Disord* **6**, 447-453.
- FINN, B.E., EVENAS, J., DRAKENBERG, T., WALTHO, J.P., THULIN, E., and FORSEN, S. (1995). Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin. *Nat Struct Biol* **2**, 777-783.
- FINN, B.E., and FORSEN, S. (1995). The evolving model of calmodulin structure, function and activation. *Structure* **3**, 7-11.
- FINTA, C., and ZAPHIROPOULOS, P.G. (2002). Intergenic mRNA molecules resulting from trans-splicing. *J Biol Chem* **277**, 5882-5890.
- 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.
- FOUGEROUSSE, F., ANDERSON, L.V., DELEZOIDE, A.L., SUEL, L., DURAND, M., and BECKMANN, J.S. (2000). Calpain3 expression during human cardiogenesis. *Neuromuscul Disord* **10**, 251-256.
- FOUGEROUSSE, F., BARTOLI, M., POUPIOT, J., ARANDEL, L., DURAND, M., GUERCHET, N., GICQUEL, E., DANOS, O., and RICHARD, I. (2007). Phenotypic correction of alpha-sarcoglycan deficiency by intra-arterial injection of a muscle-specific serotype 1 rAAV vector. *Mol Ther* **15**, 53-61.
- FOUGEROUSSE, F., DURAND, M., SUEL, L., POURQUIE, O., DELEZOIDE, A.L., ROMERO, N.B., ABITBOL, M., and BECKMANN, J.S. (1998). Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. *Genomics* **48**, 145-156.
- FOUGEROUSSE, F., GONIN, P., DURAND, M., RICHARD, I., and RAYMACKERS, J.M. (2003). Force impairment in calpain 3-deficient mice is not correlated with mechanical disruption. *Muscle Nerve* **27**, 616-623.
- FREIBURG, A., TROMBITAS, K., HELL, W., CAZORLA, O., FOUGEROUSSE, F., CENTNER, T., KOLMERER, B., WITT, C., BECKMANN, J.S., GREGORIO, C.C., GRANZIER, H., and LABEIT, S. (2000). Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* **86**, 1114-1121.
- FUKUDA, N., GRANZIER, H.L., ISHIWATA, S., and KURIHARA, S. (2008). Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J Physiol Sci* **58**, 151-159.
- FUKUDA, N., WU, Y., FARMAN, G., IRVING, T.C., and GRANZIER, H. (2003). Titin isoform variance and length dependence of activation in skinned bovine cardiac muscle. *J Physiol* **553**, 147-154.
- FUKUZAWA, A., LANGE, S., HOLT, M., VIHOLA, A., CARMIGNAC, V., FERREIRO, A., UDD, B., and GAUTEL, M. (2008). Interactions with titin and myomesin target obscurin and obscurin-like 1 to the M-band: implications for hereditary myopathies. *J Cell Sci* **121**, 1841-1851.
- FURST, D.O., OBERMANN, W.M., and VAN DER VEN, P.F. (1999). Structure and assembly of the sarcomeric M band. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **138**, 163-202.
- FURST, D.O., OSBORN, M., NAVE, R., and WEBER, K. (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol* **106**, 1563-1572.
- FURST, D.O., OSBORN, M., and WEBER, K. (1989). Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J Cell Biol* **109**, 517-527.
- GARVEY, S.M., RAJAN, C., LERNER, A.P., FRANKEL, W.N., and COX, G.A. (2002). The muscular dystrophy with myositis (mdm) mouse mutation disrupts a skeletal muscle-specific domain of titin. *Genomics* **79**, 146-149.
- GAUTEL, M., CASTIGLIONE MORELLI, M.A., PFUHL, M., MOTTA, A., and PASTORE, A. (1995). A calmodulin-binding sequence in the C-terminus of human cardiac titin kinase. *Eur J Biochem* **230**, 752-759.
- GAUTEL, M., GOULDING, D., BULLARD, B., WEBER, K., and FURST, D.O. (1996a). The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci* **109** (Pt 11), 2747-2754.
- GAUTEL, M., LEHTONEN, E., and PIETRUSCHKA, F. (1996b). Assembly of the cardiac I-band region of titin/connectin: expression of the cardiac-specific regions and their structural relation to the elastic segments. *J Muscle Res Cell Motil* **17**, 449-461.
- GAUTEL, M., LEONARD, K., and LABEIT, S. (1993). Phosphorylation of KSP motifs in the C-terminal region of titin in differentiating myoblasts. *Embo J* **12**, 3827-3834.

- GEISLER, S.B., ROBINSON, D., HAURINGA, M., RAEKER, M.O., BORISOV, A.B., WESTFALL, M.V., and RUSSELL, M.W. (2007). Obscurin-like 1, OBSL1, is a novel cytoskeletal protein related to obscurin. *Genomics* **89**, 521-531.
- GERULL, B., GRAMLICH, M., ATHERTON, J., MCNABB, M., TROMBITAS, K., SASSE-KLAASSEN, S., SEIDMAN, J.G., SEIDMAN, C., GRANZIER, H., LABEIT, S., FRENNEAUX, M., and THIERFELDER, L. (2002). Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet* **30**, 201-204.
- GINGERAS, T.R. (2009). Implications of chimaeric non-co-linear transcripts. *Nature* **461**, 206-211.
- GOLENHOFEN, N., ARBEITER, A., KOOB, R., and DRENCKHAHN, D. (2002). Ischemia-induced association of the stress protein alpha B-crystallin with I-band portion of cardiac titin. *J Mol Cell Cardiol* **34**, 309-319.
- GOLL, C.M., PASTORE, A., and NILGES, M. (1998). The three-dimensional structure of a type I module from titin: a prototype of intracellular fibronectin type III domains. *Structure* **6**, 1291-1302.
- GOTTHARDT, M., HAMMER, R.E., HUBNER, N., MONTI, J., WITT, C.C., MCNABB, M., RICHARDSON, J.A., GRANZIER, H., LABEIT, S., and HERZ, J. (2003). Conditional expression of mutant M-line titins results in cardiomyopathy with altered sarcomere structure. *J Biol Chem* **278**, 6059-6065.
- GRAMLICH, M., MICHELY, B., KROHNE, C., HEUSER, A., ERDMANN, B., KLAASSEN, S., HUDSON, B., MAGARIN, M., KIRCHNER, F., TODIRAS, M., GRANZIER, H., LABEIT, S., THIERFELDER, L., and GERULL, B. (2009). Stress-induced dilated cardiomyopathy in a knock-in mouse model mimicking human titin-based disease. *J Mol Cell Cardiol*.
- GRANZIER, H.L., and LABEIT, S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res* **94**, 284-295.
- GRANZIER, H.L., and LABEIT, S. (2005). Titin and its associated proteins: the third myofilament system of the sarcomere. *Adv Protein Chem* **71**, 89-119.
- GRATER, F., SHEN, J., JIANG, H., GAUTEL, M., and GRUBMULLER, H. (2005). Mechanically induced titin kinase activation studied by force-probe molecular dynamics simulations. *Biophys J* **88**, 790-804.
- GRAVELEY, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* **6**, 1197-1211.
- GREASER, M. (2001). Identification of new repeating motifs in titin. *Proteins* **43**, 145-149.
- GREASER, M.L., WARREN, C.M., ESBONA, K., GUO, W., DUAN, Y., PARRISH, A.M., KRZESINSKI, P.R., NORMAN, H.S., DUNNING, S., FITZSIMONS, D.P., and MOSS, R.L. (2008). Mutation that dramatically alters rat titin isoform expression and cardiomyocyte passive tension. *J Mol Cell Cardiol* **44**, 983-991.
- GREGORIO, C.C., GRANZIER, H., SORIMACHI, H., and LABEIT, S. (1999). Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol* **11**, 18-25.
- GREGORIO, C.C., PERRY, C.N., and MCELHINNY, A.S. (2005). Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 389-400.
- GREGORIO, C.C., TROMBITAS, K., CENTNER, T., KOLMERER, B., STIER, G., KUNKE, K., SUZUKI, K., OBERMAYR, F., HERRMANN, B., GRANZIER, H., SORIMACHI, H., and LABEIT, S. (1998). The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol* **143**, 1013-1027.
- GROVE, B.K., CERNY, L., PERRIARD, J.C., and EPPENBERGER, H.M. (1985). Myomesin and M-protein: expression of two M-band proteins in pectoral muscle and heart during development. *J Cell Biol* **101**, 1413-1421.
- GROVE, B.K., HOLMBOM, B., and THORNELL, L.E. (1987). Myomesin and M protein: differential expression in embryonic fibers during pectoral muscle development. *Differentiation* **34**, 106-114.
- GROVE, B.K., KURER, V., LEHNER, C., DOETSCHMAN, T.C., PERRIARD, J.C., and EPPENBERGER, H.M. (1984). A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J Cell Biol* **98**, 518-524.
- GUTIERREZ-CRUZ, G., VAN HEERDEN, A.H., and WANG, K. (2001). Modular motif, structural folds and affinity profiles of the PEVK segment of human fetal skeletal muscle titin. *J Biol Chem* **276**, 7442-7449.
- GUYON, J.R., KUDRYASHOVA, E., POTTS, A., DALKILIC, I., BROSIUS, M.A., THOMPSON, T.G., BECKMANN, J.S., KUNKEL, L.M., and SPENCER, M.J. (2003). Calpain 3 cleaves filamin C and regulates its ability to interact with gamma- and delta-sarcoglycans. *Muscle Nerve* **28**, 472-483.
- HACKMAN, P., MARCHAND, S., SARPARANTA, J., VIHOLA, A., PENISSON-BESNIER, I., EYMARD, B., PARDAL-FERNANDEZ, J.M., HAMMOUDA EL, H., RICHARD, I., ILLA, I., and UDD, B. (2008). Truncating mutations in C-terminal titin may cause more severe tibial muscular dystrophy (TMD). *Neuromuscul Disord* **18**, 922-928.

- HACKMAN, P., VIHOLA, A., HARAVUORI, H., MARCHAND, S., SARPARANTA, J., DE SEZE, J., LABELIT, S., WITT, C., PELTONEN, L., RICHARD, I., and UDD, B. (2002). Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *Am J Hum Genet* **71**, 492-500.
- HARAVUORI, H., VIHOLA, A., STRAUB, V., AURANEN, M., RICHARD, I., MARCHAND, S., VOIT, T., LABELIT, S., SOMER, H., PELTONEN, L., BECKMANN, J.S., and UDD, B. (2001). Secondary calpain3 deficiency in 2q-linked muscular dystrophy: titin is the candidate gene. *Neurology* **56**, 869-877.
- HAYASHI, C., ONO, Y., DOI, N., KITAMURA, F., TAGAMI, M., MINEKI, R., ARAI, T., TAGUCHI, H., YANAGIDA, M., HIRNER, S., LABELIT, D., LABELIT, S., and SORIMACHI, H. (2008). Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* **283**, 14801-14814.
- HELMES, M., TROMBITAS, K., CENTNER, T., KELLERMAYER, M., LABELIT, S., LINKE, W.A., and GRANZIER, H. (1999). Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin's unique N2B sequence: titin is an adjustable spring. *Circ Res* **84**, 1339-1352.
- HERASSE, M., ONO, Y., FOUGEROUSSE, F., KIMURA, E., STOCKHOLM, D., BELEY, C., MONTARRAS, D., PINSET, C., SORIMACHI, H., SUZUKI, K., BECKMANN, J.S., and RICHARD, I. (1999). Expression and functional characteristics of calpain 3 isoforms generated through tissue-specific transcriptional and posttranscriptional events. *Mol Cell Biol* **19**, 4047-4055.
- HEYDEMANN, A., HUBER, J.M., DEMONBREUN, A., HADHAZY, M., and MCNALLY, E.M. (2005). Genetic background influences muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **15**, 601-609.
- HIRAI, S., KAWASAKI, H., YANIV, M., and SUZUKI, K. (1991). Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Lett* **287**, 57-61.
- HOANG, M.V., SMITH, L.E., and SENGER, D.R. Calpain inhibitors reduce retinal hypoxia in ischemic retinopathy by improving neovascular architecture and functional perfusion. *Biochim Biophys Acta*.
- HORIUCHI, T., and AIGAKI, T. (2006). Alternative trans-splicing: a novel mode of pre-mRNA processing. *Biol Cell* **98**, 135-140.
- HOUCHEMANDZADEH, B., and DIMITROV, S. (1999). Elasticity measurements show the existence of thin rigid cores inside mitotic chromosomes. *J Cell Biol* **145**, 215-223.
- HUANG, Y., DE MORREE, A., VAN REMOORTERE, A., BUSHBY, K., FRANTS, R.R., DUNNEN, J.T., and VAN DER MAAREL, S.M. (2008). Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* **17**, 1855-1866.
- HUEBSCH, K.A., KUDRYASHOVA, E., WOOLEY, C.M., SHER, R.B., SEBURN, K.L., SPENCER, M.J., and COX, G.A. (2005). Mdm muscular dystrophy: interactions with calpain 3 and a novel functional role for titin's N2A domain. *Hum Mol Genet* **14**, 2801-2811.
- HUFF-LONERGAN, E., MITSUHASHI, T., BEEKMAN, D.D., PARRISH, F.C., JR., OLSON, D.G., and ROBSON, R.M. (1996). Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *J Anim Sci* **74**, 993-1008.
- HUXLEY, H.E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* **164**, 1356-1365.
- IMPROTA, S., KRUEGER, J.K., GAUTEL, M., ATKINSON, R.A., LEFEVRE, J.F., MOULTON, S., TREWHELLA, J., and PASTORE, A. (1998). The assembly of immunoglobulin-like modules in titin: implications for muscle elasticity. *J Mol Biol* **284**, 761-777.
- ISAACS, W.B., KIM, I.S., STRUVE, A., and FULTON, A.B. (1992). Association of titin and myosin heavy chain in developing skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7496-7500.
- ITOH-SATO, M., HAYASHI, T., NISHI, H., KOGA, Y., ARIMURA, T., KOYANAGI, T., TAKAHASHI, M., HOHDA, S., UEDA, K., NOUCHI, T., HIROE, M., MARUMO, F., IMAIZUMI, T., YASUNAMI, M., and KIMURA, A. (2002). Titin mutations as the molecular basis for dilated cardiomyopathy. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 385-393.
- IWASAKI, R., KIUCHI, H., IHARA, M., MORI, T., KAWAKAMI, M., and UEDA, H. (2009). Trans-splicing as a novel method to rapidly produce antibody fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **384**, 316-321.
- KEDAR, V., MCDONOUGH, H., ARYA, R., LI, H.H., ROCKMAN, H.A., and PATTERSON, C. (2004). Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18135-18140.
- KEIRA, Y., NOGUCHI, S., MINAMI, N., HAYASHI, Y.K., and NISHINO, I. (2003). Localization of calpain 3 in human skeletal muscle and its alteration in limb-girdle muscular dystrophy 2A muscle. *J Biochem* **133**, 659-664.
- KELLERMAYER, M.S., SMITH, S.B., GRANZIER, H.L., and BUSTAMANTE, C. (1997). Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science* **276**, 1112-1116.

- KIERLIN-DUNCAN, M.N., and SULLENGER, B.A. (2007). Using 5'-PTMs to repair mutant beta-globin transcripts. *Rna* **13**, 1317-1327.
- KIKUMORI, T., COTE, G.J., and GAGEL, R.F. (2001). Promiscuity of pre-mRNA spliceosome-mediated trans splicing: a problem for gene therapy? *Hum Gene Ther* **12**, 1429-1441.
- KINALI, M., ARECHAVALA-GOMEZA, V., FENG, L., CIRAK, S., HUNT, D., ADKIN, C., GUGLIERI, M., ASHTON, E., ABBS, S., NIHOYANNOPOULOS, P., GARRALDA, M.E., RUTHERFORD, M., MCCULLEY, C., POPPLEWELL, L., GRAHAM, I.R., DICKSON, G., WOOD, M.J., WELLS, D.J., WILTON, S.D., KOLE, R., STRAUB, V., BUSHBY, K., SEWRY, C., MORGAN, J.E., and MUNTONI, F. (2009). Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol* **8**, 918-928.
- KINBARA, K., ISHIURA, S., TOMIOKA, S., SORIMACHI, H., JEONG, S.Y., AMANO, S., KAWASAKI, H., KOLMERER, B., KIMURA, S., LABEIT, S., and SUZUKI, K. (1998). Purification of native p94, a muscle-specific calpain, and characterization of its autolysis. *Biochem J* **335** (Pt 3), 589-596.
- KINBARA, K., SORIMACHI, H., ISHIURA, S., and SUZUKI, K. (1997). Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch Biochem Biophys* **342**, 99-107.
- KING, L., and JHOU, C.R. (2010). Nuclear titin interacts with histones. *Chang Gung Med J* **33**, 201-210.
- KOBE, B., HEIERHORST, J., FEIL, S.C., PARKER, M.W., BENIAN, G.M., WEISS, K.R., and KEMP, B.E. (1996). Giant protein kinases: domain interactions and structural basis of autoregulation. *Embo J* **15**, 6810-6821.
- KOLMERER, B., OLIVIERI, N., WITT, C.C., HERRMANN, B.G., and LABEIT, S. (1996). Genomic organization of M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J Mol Biol* **256**, 556-563.
- KOLMERER, B., WITT, C.C., FREIBURG, A., MILLEVOI, S., STIER, G., SORIMACHI, H., PELIN, K., CARRIER, L., SCHWARTZ, K., LABEIT, D., GREGORIO, C.C., LINKE, W.A., and LABEIT, S. (1999). The titin cDNA sequence and partial genomic sequences: insights into the molecular genetics, cell biology and physiology of the titin filament system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **138**, 19-55.
- KONIG, N., RAYNAUD, F., FEANE, H., DURAND, M., MESTRE-FRANCES, N., ROSSEL, M., OUALI, A., and BENYAMIN, Y. (2003). Calpain 3 is expressed in astrocytes of rat and *Microcebus* brain. *J Chem Neuroanat* **25**, 129-136.
- KONTROGIANNI-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.
- KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, A., and BLOCH, R.J. (2003). The hydrophilic domain of small ankyrin-1 interacts with the two N-terminal immunoglobulin domains of titin. *J Biol Chem* **278**, 3985-3991.
- KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, A., CATINO, D.H., STRONG, J.C., and BLOCH, R.J. (2006a). De novo myofibrillogenesis in C2C12 cells: evidence for the independent assembly of M bands and Z disks. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C626-637.
- KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, A., CATINO, D.H., STRONG, J.C., SUTTER, S., BORISOV, A.B., PUMPLIN, D.W., RUSSELL, M.W., and BLOCH, R.J. (2006b). Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *Faseb J* **20**, 2102-2111.
- KOULOUMENTA, A., MAVROIDIS, M., and CAPETANAKI, Y. (2007). Proper perinuclear localization of the TRIM-like protein myospryn requires its binding partner desmin. *J Biol Chem* **282**, 35211-35221.
- KRAMEROVA, I., KUDRYASHOVA, E., TIDBALL, J.G., and SPENCER, M.J. (2004). Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet* **13**, 1373-1388.
- KRAMEROVA, I., KUDRYASHOVA, E., VENKATRAMAN, G., and SPENCER, M.J. (2005). Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet* **14**, 2125-2134.
- KRAMEROVA, I., KUDRYASHOVA, E., WU, B., GERMAIN, S., VANDENBORNE, K., ROMAIN, N., HALLER, R.G., VERITY, M.A., and SPENCER, M.J. (2009). Mitochondrial abnormalities, energy deficit and oxidative stress are features of calpain 3 deficiency in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* **18**, 3194-3205.
- KRAMEROVA, I., KUDRYASHOVA, E., WU, B., OTTENHEIJM, C., GRANZIER, H., and SPENCER, M.J. (2008). Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* **17**, 3271-3280.

- KRAMEROVA, I., KUDRYASHOVA, E., WU, B., and SPENCER, M.J. (2006). Regulation of the M-cadherin-beta-catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* **26**, 8437-8447.
- KRAUSE, M., and HIRSH, D. (1987). A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell* **49**, 753-761.
- KRUGER, M., KOTTER, S., GRUTZNER, A., LANG, P., ANDRESEN, C., REDFIELD, M.M., BUTT, E., DOS REMEDIOS, C.G., and LINKE, W.A. (2009). Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* **104**, 87-94.
- KRUGER, M., WRIGHT, J., and WANG, K. (1991). Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile. *J Cell Biol* **115**, 97-107.
- KWAK, K.B., CHUNG, S.S., KIM, O.M., KANG, M.S., HA, D.B., and CHUNG, C.H. (1993). Increase in the level of m-calpain correlates with the elevated cleavage of filamin during myogenic differentiation of embryonic muscle cells. *Biochim Biophys Acta* **1175**, 243-249.
- LABEIT, S., GAUTEL, M., LAKEY, A., and TRINICK, J. (1992). Towards a molecular understanding of titin. *Embo J* **11**, 1711-1716.
- LABEIT, S., GIBSON, T., LAKEY, A., LEONARD, K., ZEVIANI, M., KNIGHT, P., WARDALE, J., and TRINICK, J. (1991). Evidence that nebulin is a protein-ruler in muscle thin filaments. *FEBS Lett* **282**, 313-316.
- LABEIT, S., and KOLMERER, B. (1995a). The complete primary structure of human nebulin and its correlation to muscle structure. *J Mol Biol* **248**, 308-315.
- LABEIT, S., and KOLMERER, B. (1995b). Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 293-296.
- LABEIT, S., LAHMERS, S., BURKART, C., FONG, C., MCNABB, M., WITT, S., WITT, C., LABEIT, D., and GRANZIER, H. (2006). Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol* **362**, 664-681.
- LAHMERS, S., WU, Y., CALL, D.R., LABEIT, S., and GRANZIER, H. (2004). Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res* **94**, 505-513.
- LAI, Y., YUE, Y., LIU, M., GHOSH, A., ENGELHARDT, J.F., CHAMBERLAIN, J.S., and DUAN, D. (2005). Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol* **23**, 1435-1439.
- LANGE, S., AUERBACH, D., MCLOUGHLIN, P., PERRIARD, E., SCHAFFER, B.W., PERRIARD, J.C., and EHLER, E. (2002). Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J Cell Sci* **115**, 4925-4936.
- LANGE, S., OUYANG, K., MEYER, G., CUI, L., CHENG, H., LIEBER, R.L., and CHEN, J. (2009a). Obscurin determines the architecture of the longitudinal sarcoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **122**, 2640-2650.
- LANGE, S., OUYANG, K., MEYER, G., CUI, L., CHENG, H., LIEBER, R.L., and CHEN, J. (2009b). Obscurin determines the architecture of the longitudinal sarcoplasmic reticulum. *J Cell Sci*.
- LANGE, S., XIANG, F., YAKOVENKO, A., VIHOLA, A., HACKMAN, P., ROSTKOVA, E., KRISTENSEN, J., BRANDMEIER, B., FRANZEN, G., HEDBERG, B., GUNNARSSON, L.G., HUGHES, S.M., MARCHAND, S., SEJERSEN, T., RICHARD, I., EDSTROM, L., EHLER, E., UDD, B., and GAUTEL, M. (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* **308**, 1599-1603.
- LANGLOIS, M.A., LEE, N.S., ROSSI, J.J., and PUYMIRAT, J. (2003). Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol Ther* **7**, 670-680.
- LAURE, L., SUEL, L., ROUDAUT, C., BOURG, N., OUALI, A., BARTOLI, M., RICHARD, I., and DANIELE, N. (2009). Cardiac ankyrin repeat protein is a marker of skeletal muscle pathological remodelling. *Febs J* **276**, 669-684.
- LE ROY, F., CHARTON, K., LORSON, C.L., and RICHARD, I. (2009). RNA-targeting approaches for neuromuscular diseases. *Trends Mol Med*.
- LI, H., WANG, J., MA, X., and SKLAR, J. (2009). Gene fusions and RNA trans-splicing in normal and neoplastic human cells. *Cell Cycle* **8**, 218-222.
- LINKE, W.A., IVEMEYER, M., MUNDEL, P., STOCKMEIER, M.R., and KOLMERER, B. (1998). Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8052-8057.
- LINKE, W.A., KULKE, M., LI, H., FUJITA-BECKER, S., NEAGOE, C., MANSTEIN, D.J., GAUTEL, M., and FERNANDEZ, J.M. (2002). PEVK domain of titin: an entropic spring with actin-binding properties. *J Struct Biol* **137**, 194-205.
- LINKE, W.A., RUDY, D.E., CENTNER, T., GAUTEL, M., WITT, C., LABEIT, S., and GREGORIO, C.C. (1999). I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol* **146**, 631-644.

- LIU, H.X., ZHANG, M., and KRAINER, A.R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* **12**, 1998-2012.
- LIU, M., YUE, Y., HARPER, S.Q., GRANGE, R.W., CHAMBERLAIN, J.S., and DUAN, D. (2005a). Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol Ther* **11**, 245-256.
- 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.
- LIU, X., LUO, M., ZHANG, L.N., YAN, Z., ZAK, R., DING, W., MANSFIELD, S.G., MITCHELL, L.G., and ENGELHARDT, J.F. (2005b). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* **16**, 1116-1123.
- LIVERSAGE, A.D., HOLMES, D., KNIGHT, P.J., TSKHOVREBOVA, L., and TRINICK, J. (2001). Titin and the sarcomere symmetry paradox. *J Mol Biol* **305**, 401-409.
- LOPEZ, M.A., MAYER, U., HWANG, W., TAYLOR, T., HASHMI, M.A., JANNAPUREDDY, S.R., and BORIEK, A.M. (2005). Force transmission, compliance, and viscoelasticity are altered in the alpha7-integrin-null mouse diaphragm. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C282-289.
- LORAIN, S., PECCATE, C., LE HIR, M., and GARCIA, L. (2010). Exon exchange approach to repair Duchenne dystrophin transcripts. *PLoS One* **5**, e10894.
- LOSTAL, W., BARTOLI, M., BOURG, N., ROUDAUT, C., BENTAIB, A., MIYAKE, K., GUERCHET, N., FOUGEROUSSE, 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.
- LUTHER, P.K. (2000). Three-dimensional structure of a vertebrate muscle Z-band: implications for titin and alpha-actinin binding. *J Struct Biol* **129**, 1-16.
- LUTHER, P.K., PADRON, R., RITTER, S., CRAIG, R., and SQUIRE, J.M. (2003). Heterogeneity of Z-band structure within a single muscle sarcomere: implications for sarcomere assembly. *J Mol Biol* **332**, 161-169.
- LUTHER, P.K., and SQUIRE, J.M. (2002). Muscle Z-band ultrastructure: titin Z-repeats and Z-band periodicities do not match. *J Mol Biol* **319**, 1157-1164.
- MA, H., FUKIAGE, C., AZUMA, M., and SHEARER, T.R. (1998). Cloning and expression of mRNA for calpain Lp82 from rat lens: splice variant of p94. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 454-461.
- MA, K., and WANG, K. (2002). Interaction of nebulin SH3 domain with titin PEVK and myopalladin: implications for the signaling and assembly role of titin and nebulin. *FEBS Lett* **532**, 273-278.
- MA, K., and WANG, K. (2003). Malleable conformation of the elastic PEVK segment of titin: non-co-operative interconversion of polyproline II helix, beta-turn and unordered structures. *Biochem J* **374**, 687-695.
- MACHADO, C., and ANDREW, D.J. (2000a). D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J Cell Biol* **151**, 639-652.
- MACHADO, C., and ANDREW, D.J. (2000b). Titin as a chromosomal protein. *Adv Exp Med Biol* **481**, 221-232; discussion 232-226.
- MACHADO, C., SUNKEL, C.E., and ANDREW, D.J. (1998). Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *J Cell Biol* **141**, 321-333.
- MANSFIELD, S.G., CLARK, R.H., PUTTARAJU, M., KOLE, J., COHN, J.A., MITCHELL, L.G., and GARCIA-BLANCO, M.A. (2003). 5' exon replacement and repair by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Rna* **9**, 1290-1297.
- MANSFIELD, S.G., KOLE, J., PUTTARAJU, M., YANG, C.C., GARCIA-BLANCO, M.A., COHN, J.A., and MITCHELL, L.G. (2000). Repair of CFTR mRNA by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Gene Ther* **7**, 1885-1895.
- MARQUIS, J., MEYER, K., ANGEHRN, L., KAMPFER, S.S., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., and SCHUMPERLI, D. (2007). Spinal muscular atrophy: SMN2 pre-mRNA splicing corrected by a U7 snRNA derivative carrying a splicing enhancer sequence. *Mol Ther* **15**, 1479-1486.
- MARUYAMA, K., KIMURA, S., KURODA, M., and HANDA, S. (1977). Connectin, an elastic protein of muscle. Its abundance in cardiac myofibrils. *J Biochem* **82**, 347-350.
- MATSUMOTO, Y., HAYASHI, T., INAGAKI, N., TAKAHASHI, M., HIROI, S., NAKAMURA, T., ARIMURA, T., NAKAMURA, K., ASHIZAWA, N., YASUNAMI, M., OHE, T., YANO, K., and KIMURA, A. (2005). Functional analysis of titin/connectin N2-B mutations found in cardiomyopathy. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 367-374.
- MAY, S.R., STEWART, N.J., CHANG, W., and PETERSON, A.S. (2004). A Titin mutation defines roles for circulation in endothelial morphogenesis. *Dev Biol* **270**, 31-46.

- MAYANS, O., VAN DER VEN, P.F., WILM, M., MUES, A., YOUNG, P., FURST, D.O., WILMANN, M., and GAUTEL, M. (1998). Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature* **395**, 863-869.
- MCELHINNY, A.S., KAKINUMA, K., SORIMACHI, H., LABEIT, S., and GREGORIO, C.C. (2002). Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J Cell Biol* **157**, 125-136.
- MCELHINNY, A.S., KAZMIERSKI, S.T., LABEIT, S., and GREGORIO, C.C. (2003). Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle. *Trends Cardiovasc Med* **13**, 195-201.
- MEANS, A.R. (1998). The clash in titin. *Nature* **395**, 846-847.
- MELZER, W., HERRMANN-FRANK, A., and LUTTGAW, H.C. (1995). The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim Biophys Acta* **1241**, 59-116.
- MEYER, K., MARQUIS, J., TRUB, J., NLEND NLEND, R., VERP, S., RUEPP, M.D., IMBODEN, H., BARDE, I., TRONO, D., and SCHUMPERLI, D. (2009). Rescue of a severe mouse model for spinal muscular atrophy by U7 snRNA-mediated splicing modulation. *Hum Mol Genet* **18**, 546-555.
- MILIC, A., DANIELE, N., LOCHMULLER, H., MORA, M., COMI, G.P., MOGGIO, M., NOULET, F., WALTER, M.C., MORANDI, L., POUPIOT, J., ROUDAUT, C., BITTNER, R.E., BARTOLI, M., and RICHARD, I. (2007). A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an in vitro assay. *Neuromuscul Disord* **17**, 148-156.
- MILLER, M.K., BANG, M.L., WITT, C.C., LABEIT, D., TROMBITAS, C., WATANABE, K., GRANZIER, H., MCELHINNY, A.S., GREGORIO, C.C., and LABEIT, S. (2003). The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol* **333**, 951-964.
- MILLER, M.K., GRANZIER, H., EHLER, E., and GREGORIO, C.C. (2004). The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol* **14**, 119-126.
- MILLEVOI, S., TROMBITAS, K., KOLMERER, B., KOSTIN, S., SCHAPER, J., PELIN, K., GRANZIER, H., and LABEIT, S. (1998). Characterization of nebulin and nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. *J Mol Biol* **282**, 111-123.
- MORACZEWSKI, J., PIEKARSKA, E., BONAUAUD, S., WOSINSKA, K., CHAZAUD, B., and BARLOVATZ-MEIMON, G. (1996). Differential intracellular distribution and activities of mu- and m-calpains during the differentiation of human myogenic cells in culture. *C R Acad Sci III* **319**, 681-686.
- MOYEN, C., GOUDENEGE, S., POUSSARD, S., SASSI, A.H., BRUSTIS, J.J., and COTTIN, P. (2004). Involvement of micro-calpain (CAPN 1) in muscle cell differentiation. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 728-743.
- MUES, A., VAN DER VEN, P.F., YOUNG, P., FURST, D.O., and GAUTEL, M. (1998). Two immunoglobulin-like domains of the Z-disc portion of titin interact in a conformation-dependent way with telethonin. *FEBS Lett* **428**, 111-114.
- MULDERS, S.A., VAN DEN BROEK, W.J., WHEELER, T.M., CROES, H.J., VAN KUIK-ROMEIJN, P., DE KIMPE, S.J., FURLING, D., PLATENBURG, G.J., GOURDON, G., THORNTON, C.A., WIERINGA, B., and WANSINK, D.G. (2009). Triplet-repeat oligonucleotide-mediated reversal of RNA toxicity in myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13915-13920.
- NAGY, A., GRAMA, L., HUBER, T., BIANCO, P., TROMBITAS, K., GRANZIER, H.L., and KELLERMAYER, M.S. (2005). Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin. *Biophys J* **89**, 329-336.
- NAVE, R., FURST, D.O., and WEBER, K. (1989). Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *J Cell Biol* **109**, 2177-2187.
- NICOLAO, P., XIANG, F., GUNNARSSON, L.G., GIOMETTO, B., EDSTROM, L., ANVRET, M., and ZHANG, Z. (1999). Autosomal dominant myopathy with proximal weakness and early respiratory muscle involvement maps to chromosome 2q. *Am J Hum Genet* **64**, 788-792.
- NOGUCHI, J., YANAGISAWA, M., IMAMURA, M., KASUYA, Y., SAKURAI, T., TANAKA, T., and MASAKI, T. (1992). Complete primary structure and tissue expression of chicken pectoralis M-protein. *J Biol Chem* **267**, 20302-20310.
- OBERMANN, W.M., GAUTEL, M., STEINER, F., VAN DER VEN, P.F., WEBER, K., and FURST, D.O. (1996). The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* **134**, 1441-1453.
- OBERMANN, W.M., GAUTEL, M., WEBER, K., and FURST, D.O. (1997). Molecular structure of the sarcomeric M band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *Embo J* **16**, 211-220.

- OHTSUKA, H., YAJIMA, H., MARUYAMA, K., and KIMURA, S. (1997a). Binding of the N-terminal 63 kDa portion of connectin/titin to alpha-actinin as revealed by the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett* **401**, 65-67.
- OHTSUKA, H., YAJIMA, H., MARUYAMA, K., and KIMURA, S. (1997b). The N-terminal Z repeat 5 of connectin/titin binds to the C-terminal region of alpha-actinin. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 1-3.
- ONO, Y., SHIMADA, H., SORIMACHI, H., RICHARD, I., SAIDO, T.C., BECKMANN, J.S., ISHIURA, S., and SUZUKI, K. (1998). Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *J Biol Chem* **273**, 17073-17078.
- ONO, Y., TORII, F., OJIMA, K., DOI, N., YOSHIOKA, K., KAWABATA, Y., LABEIT, D., LABEIT, S., SUZUKI, K., ABE, K., MAEDA, T., and SORIMACHI, H. (2006). Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 by N2A connectin/titin in a genetic reporter system. *J Biol Chem* **281**, 18519-18531.
- OTTENHEIJM, C.A., KNOTTNERUS, A.M., BUCK, D., LUO, X., GREER, K., HOYING, A., LABEIT, S., and GRANZIER, H. (2009). Tuning passive mechanics through differential splicing of titin during skeletal muscle development. *Biophys J* **97**, 2277-2286.
- PABON, G., and AMZEL, L.M. (2006). Mechanism of titin unfolding by force: insight from quasi-equilibrium molecular dynamics calculations. *Biophys J* **91**, 467-472.
- PACAK, C.A., WALTER, G.A., GAIDOSH, G., BRYANT, N., LEWIS, M.A., GERMAIN, S., MAH, C.S., CAMPBELL, K.P., and BYRNE, B.J. (2007). Long-term skeletal muscle protection after gene transfer in a mouse model of LGMD-2D. *Mol Ther* **15**, 1775-1781.
- PARSONS, M., NELSON, R.G., WATKINS, K.P., and AGABIAN, N. (1984). Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell* **38**, 309-316.
- PARTANEN, J., LAULUMAA, V., PALJARVI, L., PARTANEN, K., and NAUKKARINEN, A. (1994). Late onset foot-drop muscular dystrophy with rimmed vacuoles. *J Neurol Sci* **125**, 158-167.
- PASK, H.T., JONES, K.L., LUTHER, P.K., and SQUIRE, J.M. (1994). M-band structure, M-bridge interactions and contraction speed in vertebrate cardiac muscles. *J Muscle Res Cell Motil* **15**, 633-645.
- PECKHAM, M., YOUNG, P., and GAUTEL, M. (1997). Constitutive and variable regions of Z-disk titin/connectin in myofibril formation: a dominant-negative screen. *Cell Struct Funct* **22**, 95-101.
- PENG, J., RADDATZ, K., LABEIT, S., GRANZIER, H., and GOTTHARDT, M. (2005). Muscle atrophy in titin M-line deficient mice. *J Muscle Res Cell Motil* **26**, 381-388.
- PENISSON-BESNIER, I., HACKMAN, P., SUOMINEN, T., SARPARANTA, J., HUOVINEN, S., RICHARD-CREMIEUX, I., and UDD, B. (2010). Myopathies caused by homozygous titin mutations: limb-girdle muscular dystrophy 2J and variations of phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- PÉNISSON-BESNIER, I., HACKMAN, P., SUOMINEN, T., SARPARANTA, J., HUOVINEN, S., RICHARD-CRÉMIEUX, I., UDD, B. (In press). Homozygous c-terminal titin mutations – LGMD2J and variations of the phenotype. *Can J Appl Physiol*.
- PERNIGO, S., FUKUZAWA, A., BERTZ, M., HOLT, M., RIEF, M., STEINER, R.A., and GAUTEL, M. Structural insight into M-band assembly and mechanics from the titin-obscurin-like-1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- PERNIGO, S., FUKUZAWA, A., BERTZ, M., HOLT, M., RIEF, M., STEINER, R.A., and GAUTEL, M. (2010). Structural insight into M-band assembly and mechanics from the titin-obscurin-like-1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2908-2913.
- PERSON, V., KOSTIN, S., SUZUKI, K., LABEIT, S., and SCHAPER, J. (2000). Antisense oligonucleotide experiments elucidate the essential role of titin in sarcomerogenesis in adult rat cardiomyocytes in long-term culture. *J Cell Sci* **113 Pt 21**, 3851-3859.
- PINOTSIS, N., PETOUKHOV, M., LANGE, S., SVERGUN, D., ZOU, P., GAUTEL, M., and WILMANN, M. (2006). Evidence for a dimeric assembly of two titin/telethonin complexes induced by the telethonin C-terminus. *J Struct Biol* **155**, 239-250.
- PIZON, V., IAKOVENKO, A., VAN DER VEN, P.F., KELLY, R., FATU, C., FURST, D.O., KARSENTI, E., and GAUTEL, M. (2002). Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J Cell Sci* **115**, 4469-4482.
- POLITOU, A.S., THOMAS, D.J., and PASTORE, A. (1995). The folding and stability of titin immunoglobulin-like modules, with implications for the mechanism of elasticity. *Biophys J* **69**, 2601-2610.
- POLLAZZON, M., SUOMINEN, T., PENTTILA, S., MALANDRINI, A., CARLUCCIO, M.A., MONDELLI, M., MAROZZA, A., FEDERICO, A., RENIERI, A., HACKMAN, P., DOTTI, M.T., and UDD, B. The first Italian family with tibial muscular dystrophy caused by a novel titin mutation. *J Neurol* **257**, 575-579.
- POLLAZZON, M., SUOMINEN, T., PENTTILA, S., MALANDRINI, A., CARLUCCIO, M.A., MONDELLI, M., MAROZZA, A., FEDERICO, A., RENIERI, A., HACKMAN, P., DOTTI, M.T., and UDD, B.

- (2009). The first Italian family with tibial muscular dystrophy caused by a novel titin mutation. *J Neurol*.
- PUCHNER, E.M., ALEXANDROVICH, A., KHO, A.L., HENSEN, U., SCHAFER, L.V., BRANDMEIER, B., GRATER, F., GRUBMULLER, H., GAUB, H.E., and GAUTEL, M. (2008). Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13385-13390.
- PUDLES, J., MOUDJOU, M., HISANAGA, S., MARUYAMA, K., and SAKAI, H. (1990). Isolation, characterization, and immunochemical properties of a giant protein from sea urchin egg cytomatrix. *Exp Cell Res* **189**, 253-260.
- PUSZKIN, S., PUSZKIN, E., MAIMON, J., ROUAULT, C., SCHOOK, W., ORES, C., KOCHWA, S., and ROSENFELD, R. (1977). alpha-Actinin and tropomyosin interactions with a hybrid complex of erythrocyte-actin and muscle-myosin. *J Biol Chem* **252**, 5529-5537.
- 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* **4**, 105-114.
- PUTTARAJU, M., JAMISON, S.F., MANSFIELD, S.G., GARCIA-BLANCO, M.A., and MITCHELL, L.G. (1999). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol* **17**, 246-252.
- RADKE, M.H., PENG, J., WU, Y., MCNABB, M., NELSON, O.L., GRANZIER, H., and GOTTHARDT, M. (2007). Targeted deletion of titin N2B region leads to diastolic dysfunction and cardiac atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3444-3449.
- RAJKOVIC, A., DAVIS, R.E., SIMONSEN, J.N., and ROTTMAN, F.M. (1990). A spliced leader is present on a subset of mRNAs from the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8879-8883.
- RAYNAUD, F., ASTIER, C., and BENYAMIN, Y. (2004a). Evidence for a direct but sequential binding of titin to tropomyosin and actin filaments. *Biochim Biophys Acta* **1700**, 171-178.
- RAYNAUD, F., CARNAC, G., MARCILHAC, A., and BENYAMIN, Y. (2004b). m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp Cell Res* **298**, 48-57.
- RAYNAUD, F., FERNANDEZ, E., COULIS, G., AUBRY, L., VIGNON, X., BLEIMLING, N., GAUTEL, M., BENYAMIN, Y., and OUALI, A. (2005). Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the Z-band edges and in the N2-line region within the skeletal myofibril. *Febs J* **272**, 2578-2590.
- REYNOLDS, J.G., MCCALMON, S.A., DONAGHEY, J.A., and NAYA, F.J. (2008). Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy. *J Biol Chem* **283**, 8070-8074.
- RICHARD, I., BROUX, O., ALLAMAND, V., FOUGEROUSSE, F., CHIANNILKULCHAI, N., BOURG, N., BRENGUIER, L., DEVAUD, C., PASTURAUD, P., ROUDAUT, C., and ET AL. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* **81**, 27-40.
- RICHARD, I., ROUDAUT, C., MARCHAND, S., BAGHDIGUIAN, S., HERASSE, M., STOCKHOLM, D., ONO, Y., SUEL, L., BOURG, N., SORIMACHI, H., LEFRANC, G., FARDEAU, M., SEBILLE, A., and BECKMANN, J.S. (2000). Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated IkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J Cell Biol* **151**, 1583-1590.
- RICHARDSON, P.J. (1996). Assessment of myocardial damage in dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* **17**, 489-490.
- RIEF, M., GAUTEL, M., OESTERHELT, F., FERNANDEZ, J.M., and GAUB, H.E. (1997). Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* **276**, 1109-1112.
- ROBBERSON, B.L., COTE, G.J., and BERGET, S.M. (1990). Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* **10**, 84-94.
- ROBERTS, M.L., WELLS, D.J., GRAHAM, I.R., FABB, S.A., HILL, V.J., DUISIT, G., YUASA, K., TAKEDA, S., COSSET, F.L., and DICKSON, G. (2002). Stable micro-dystrophin gene transfer using an integrating adeno-retroviral hybrid vector ameliorates the dystrophic pathology in mdx mouse muscle. *Hum Mol Genet* **11**, 1719-1730.
- RODRIGUEZ-MARTIN, T., ANTHONY, K., GARCIA-BLANCO, M.A., MANSFIELD, S.G., and GALLO, J.M. (2009). Correction of tau mis-splicing caused by FTDP-17 MAPT mutations by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Hum Mol Genet*.
- 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.
- ROMANI, A., GUERRA, E., TREROTOLA, M., and ALBERTI, S. (2003). Detection and analysis of spliced chimeric mRNAs in sequence databanks. *Nucleic Acids Res* **31**, e17.

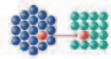
- RUSSELL, M.W., RAEKER, M.O., KORYTKOWSKI, K.A., and SONNEMAN, K.J. (2002). Identification, tissue expression and chromosomal localization of human Obscurin-MLCK, a member of the titin and Dbl families of myosin light chain kinases. *Gene* **282**, 237-246.
- SAENZ, A., AZPITARTE, M., ARMANANZAS, R., LETURCQ, F., ALZUALDE, A., INZA, I., GARCIA-BRAGADO, F., DE LA HERRAN, G., CORCUERA, J., CABELLO, A., NAVARRO, C., DE LA TORRE, C., GALLARDO, E., ILLA, I., and LOPEZ DE MUNAIN, A. (2008). Gene expression profiling in limb-girdle muscular dystrophy 2A. *PLoS One* **3**, e3750.
- SALIH, M.A., AL RAYESS, M., CUTSHALL, S., URTIZBEREA, J.A., AL-TURAIKI, M.H., OZO, C.O., STRAUB, V., AKBAR, M., ABID, M., ANDEEJANI, A., and CAMPBELL, K.P. (1998). A novel form of familial congenital muscular dystrophy in two adolescents. *Neuropediatrics* **29**, 289-293.
- SANFORD, J.R., and CACERES, J.F. (2004). Pre-mRNA splicing: life at the centre of the central dogma. *J Cell Sci* **117**, 6261-6263.
- SANTELLA, L., KYOZUKA, K., DE RISO, L., and CARAFOLI, E. (1998). Calcium, protease action, and the regulation of the cell cycle. *Cell Calcium* **23**, 123-130.
- SARPARANTA, J., BLANDIN, G., CHARTON, K., VIHOLA, A., MARCHAND, S., MILIC, A., HACKMAN, P., EHLER, E., RICHARD, I., and UDD, B. (2010). Interactions with M-band titin and calpain 3 link myospryn (CMYA5) to tibial and limb-girdle muscular dystrophies. *J Biol Chem*.
- SATOH, M., TAKAHASHI, M., SAKAMOTO, T., HIROE, M., MARUMO, F., and KIMURA, A. (1999). Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun* **262**, 411-417.
- SAUER, F., VAHOKOSKI, J., SONG, Y.H., and WILMANN, M. (2010). Molecular basis of the head-to-tail assembly of giant muscle proteins obscurin-like 1 and titin. *EMBO Rep*.
- SCHAART, G., VIEBAHN, C., LANGMANN, W., and RAMAEKERS, F. (1989). Desmin and titin expression in early postimplantation mouse embryos. *Development* **107**, 585-596.
- SCHILLER, N.B., SHAH, P.M., CRAWFORD, M., DEMARIA, A., DEVEREUX, R., FEIGENBAUM, H., GUTGESELL, H., REICHEK, N., SAHN, D., SCHNITTGER, I., and ET AL. (1989). Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* **2**, 358-367.
- SCHOLLMEYER, J.E. (1988). Calpain II involvement in mitosis. *Science* **240**, 911-913.
- SENAPATHY, P., SHAPIRO, M.B., and HARRIS, N.L. (1990). Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* **183**, 252-278.
- SHABARCHIN, A.A., and TSATURYAN, A.K. (2010). Proposed role of the M-band in sarcomere mechanics and mechano-sensing: a model study. *Biomech Model Mechanobiol* **9**, 163-175.
- SINGH, N.K., SINGH, N.N., ANDROPHY, E.J., and SINGH, R.N. (2006). Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. *Mol Cell Biol* **26**, 1333-1346.
- SINGH, N.N., SHISHIMOROVA, M., CAO, L.C., GANGWANI, L., and SINGH, R.N. (2009). A short antisense oligonucleotide masking a unique intronic motif prevents skipping of a critical exon in spinal muscular atrophy. *RNA Biol* **6**, 341-350.
- SKORDIS, L.A., DUNCKLEY, M.G., YUE, B., EPERON, I.C., and MUNTONI, F. (2003). Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4114-4119.
- SORIMACHI, H., FREIBURG, A., KOLMERER, B., ISHIURA, S., STIER, G., GREGORIO, C.C., LABEIT, D., LINKE, W.A., SUZUKI, K., and LABEIT, S. (1997a). Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol* **270**, 688-695.
- SORIMACHI, H., IMAJOH-OHMI, S., EMORI, Y., KAWASAKI, H., OHNO, S., MINAMI, Y., and SUZUKI, K. (1989). Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* **264**, 20106-20111.
- SORIMACHI, H., ISHIURA, S., and SUZUKI, K. (1997b). Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **328 (Pt 3)**, 721-732.
- SORIMACHI, H., KINBARA, K., KIMURA, S., TAKAHASHI, M., ISHIURA, S., SASAGAWA, N., SORIMACHI, N., SHIMADA, H., TAGAWA, K., MARUYAMA, K., and ET AL. (1995). Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem* **270**, 31158-31162.
- SORIMACHI, H., OHMI, S., EMORI, Y., KAWASAKI, H., SAIDO, T.C., OHNO, S., MINAMI, Y., and SUZUKI, K. (1990). A novel member of the calcium-dependent cysteine protease family. *Biol Chem Hoppe Seyler* **371 Suppl**, 171-176.

- SORIMACHI, H., TOYAMA-SORIMACHI, N., SAIDO, T.C., KAWASAKI, H., SUGITA, H., MIYASAKA, M., ARAHATA, K., ISHIURA, S., and SUZUKI, K. (1993). Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *J Biol Chem* **268**, 10593-10605.
- SPENCER, J.A., ELIAZER, S., ILARIA, R.L., JR., RICHARDSON, J.A., and OLSON, E.N. (2000). Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol* **150**, 771-784.
- 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.
- STARON, R.S. (1997). Human skeletal muscle fiber types: delineation, development, and distribution. *Can J Appl Physiol* **22**, 307-327.
- STEFFEN, L.S., GUYON, J.R., VOGEL, E.D., HOWELL, M.H., ZHOU, Y., WEBER, G.J., ZON, L.I., and KUNKEL, L.M. (2007). The zebrafish runzel muscular dystrophy is linked to the titin gene. *Dev Biol* **309**, 180-192.
- STOCKHOLM, D., BARBAUD, C., MARCHAND, S., AMMARGUELLAT, F., BARRITAU, D., RICHARD, I., BECKMANN, J., and MARTELLY, I. (1999). Studies on calpain expression during differentiation of rat satellite cells in primary cultures in the presence of heparin or a mimic compound. *Exp Cell Res* **252**, 392-400.
- STOJDL, D.F., and BELL, J.C. (1999). SR protein kinases: the splice of life. *Biochem Cell Biol* **77**, 293-298.
- SUBAHI, S.A. (2001). Distinguishing cardiac features of a novel form of congenital muscular dystrophy (Salih cmd). *Pediatr Cardiol* **22**, 297-301.
- TAHARA, M., PERGOLIZZI, R.G., KOBAYASHI, H., KRAUSE, A., LUETTICH, K., LESSER, M.L., and CRYSTAL, R.G. (2004). Trans-splicing repair of CD40 ligand deficiency results in naturally regulated correction of a mouse model of hyper-IgM X-linked immunodeficiency. *Nat Med* **10**, 835-841.
- TARN, W.Y., and STEITZ, J.A. (1996). Highly diverged U4 and U6 small nuclear RNAs required for splicing rare AT-AC introns. *Science* **273**, 1824-1832.
- TAVEAU, M., BOURG, N., SILLON, G., ROUDAUT, C., BARTOLI, M., and RICHARD, I. (2003). Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol* **23**, 9127-9135.
- TESSIER, L.H., KELLER, M., CHAN, R.L., FOURNIER, R., WEIL, J.H., and IMBAULT, P. (1991). Short leader sequences may be transferred from small RNAs to pre-mature mRNAs by trans-splicing in *Euglena*. *Embo J* **10**, 2621-2625.
- THEILER, K. (1989). *The House Mouse. Atlas of embryonic development*. (Springer-Verlag, New York).
- THORNELL, L.E., CARLSSON, E., KUGELBERG, E., and GROVE, B.K. (1987). Myofibrillar M-band structure and composition of physiologically defined rat motor units. *Am J Physiol* **253**, C456-468.
- TRINICK, J. (1994). Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends Biochem Sci* **19**, 405-409.
- TROLLET, C., ATHANASOPOULOS, T., POPPLEWELL, L., MALERBA, A., and DICKSON, G. (2009). Gene therapy for muscular dystrophy: current progress and future prospects. *Expert Opin Biol Ther* **9**, 849-866.
- TROMBITAS, K., FREIBURG, A., CENTNER, T., LABEIT, S., and GRANZIER, H. (1999). Molecular dissection of N2B cardiac titin's extensibility. *Biophys J* **77**, 3189-3196.
- TROMBITAS, K., WU, Y., LABEIT, D., LABEIT, S., and GRANZIER, H. (2001). Cardiac titin isoforms are coexpressed in the half-sarcomere and extend independently. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H1793-1799.
- TSKHOVREBOVA, L., and TRINICK, J. (2003). Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 679-689.
- TSKHOVREBOVA, L., and TRINICK, J. (2005). Muscle disease: a giant feels the strain. *Nat Med* **11**, 478-479.
- TSKHOVREBOVA, L., TRINICK, J., SLEEP, J.A., and SIMMONS, R.M. (1997). Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature* **387**, 308-312.
- TURNACIOGLU, K.K., MITTAL, B., DABIRI, G.A., SANGER, J.M., and SANGER, J.W. (1997). Zeugmatin is part of the Z-band targeting region of titin. *Cell Struct Funct* **22**, 73-82.
- UDD, B. (1992). Limb-girdle type muscular dystrophy in a large family with distal myopathy: homozygous manifestation of a dominant gene? *J Med Genet* **29**, 383-389.
- UDD, B., HARAVUORI, H., KALIMO, H., PARTANEN, J., PULKKINEN, L., PAETAU, A., PELTONEN, L., and SOMER, H. (1998). Tibial muscular dystrophy--from clinical description to linkage on chromosome 2q31. *Neuromuscul Disord* **8**, 327-332.
- UDD, B., KAARIANEN, H., and SOMER, H. (1991). Muscular dystrophy with separate clinical phenotypes in a large family. *Muscle Nerve* **14**, 1050-1058.

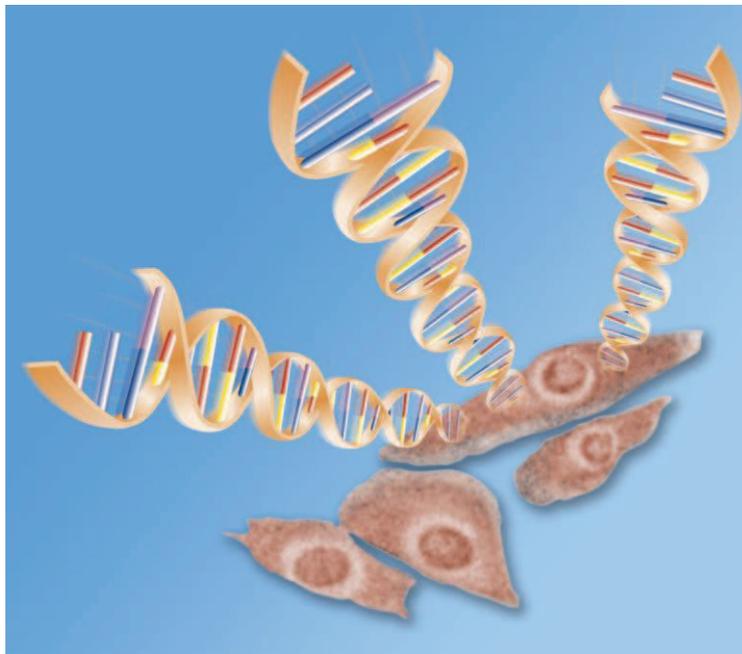
- UDD, B., PARTANEN, J., HALONEN, P., FALCK, B., HAKAMIES, L., HEIKKILA, H., INGO, S., KALIMO, H., KAARIAINEN, H., LAULUMAA, V., and ET AL. (1993). Tibial muscular dystrophy. Late adult-onset distal myopathy in 66 Finnish patients. *Arch Neurol* **50**, 604-608.
- UDD, B., PARTANEN, J., HALONEN, P., SOMER, H., FALCK, B., HAKAMIES, L., HEIKKILA, H., INGO, S., KALIMO, H., LAULUMAA, V., and ET AL. (1992). [Peripheral myopathies in Finland--a new kind of muscular dystrophy in the leg]. *Duodecim* **108**, 1331-1338.
- UDD, B., VIHOLA, A., SARPARANTA, J., RICHARD, I., and HACKMAN, P. (2005). Titinopathies and extension of the M-line mutation phenotype beyond distal myopathy and LGMD2J. *Neurology* **64**, 636-642.
- VAINZOF, M., MOREIRA, E.S., SUZUKI, O.T., FAULKNER, G., VALLE, G., BEGGS, A.H., CARPEN, O., RIBEIRO, A.F., ZANOTELI, E., GURGEL-GIANNETI, J., TSANACLIS, A.M., SILVA, H.C., PASSOS-BUENO, M.R., and ZATZ, M. (2002). Telethonin protein expression in neuromuscular disorders. *Biochim Biophys Acta* **1588**, 33-40.
- VAN DEN BERGH, P.Y., BOUQUIAUX, O., VERELLEN, C., MARCHAND, S., RICHARD, I., HACKMAN, P., and UDD, B. (2003). Tibial muscular dystrophy in a Belgian family. *Ann Neurol* **54**, 248-251.
- VAN DER VEN, P.F., BARTSCH, J.W., GAUTEL, M., JOCKUSCH, H., and FURST, D.O. (2000). A functional knock-out of titin results in defective myofibril assembly. *J Cell Sci* **113 (Pt 8)**, 1405-1414.
- VAN DER VEN, P.F., and FURST, D.O. (1997). Assembly of titin, myomesin and M-protein into the sarcomeric M band in differentiating human skeletal muscle cells in vitro. *Cell Struct Funct* **22**, 163-171.
- VINKEMEIER, U., OBERMANN, W., WEBER, K., and FURST, D.O. (1993). The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J Cell Sci* **106 (Pt 1)**, 319-330.
- VOGEL, H.J., and ZHANG, M. (1995). Protein engineering and NMR studies of calmodulin. *Mol Cell Biochem* **149-150**, 3-15.
- WAKELING, J.M., KAYA, M., TEMPLE, G.K., JOHNSTON, I.A., and HERZOG, W. (2002). Determining patterns of motor recruitment during locomotion. *J Exp Biol* **205**, 359-369.
- WALLGREN-PETTERSSON, C., LEHTOKARI, V.L., KALIMO, H., PAETAU, A., NUUTINEN, E., HACKMAN, P., SEWRY, C., PELIN, K., and UDD, B. (2007). Distal myopathy caused by homozygous missense mutations in the nebulin gene. *Brain* **130**, 1465-1476.
- WALLS, Z.F., PUTTARAJU, M., TEMPLE, G.F., and GAMBHIR, S.S. (2008). A generalizable strategy for imaging pre-mRNA levels in living subjects using spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *J Nucl Med* **49**, 1146-1154.
- WALLY, V., KLAUSEGGER, A., KOLLER, U., LOCHMULLER, H., KRAUSE, S., WICHE, G., MITCHELL, L.G., HINTNER, H., and BAUER, J.W. (2008). 5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene. *J Invest Dermatol* **128**, 568-574.
- WANG, B., LI, J., and XIAO, X. (2000). Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13714-13719.
- WANG, E.T., SANDBERG, R., LUO, S., KHREBTUKOVA, I., ZHANG, L., MAYR, C., KINGSMORE, S.F., SCHROTH, G.P., and BURGE, C.B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**, 470-476.
- WANG, J., MANSFIELD, S.G., COTE, C.A., JIANG, P.D., WENG, K., AMAR, M.J., BREWER, B.H., JR., REMALEY, A.T., MCGARRITY, G.J., GARCIA-BLANCO, M.A., and PUTTARAJU, M. (2009). Trans-splicing into highly abundant albumin transcripts for production of therapeutic proteins in vivo. *Mol Ther* **17**, 343-351.
- WANG, K., MCCLURE, J., and TU, A. (1979). Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 3698-3702.
- WANG, Z., and BURGE, C.B. (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *Rna* **14**, 802-813.
- WATCHKO, J., O'DAY, T., WANG, B., ZHOU, L., TANG, Y., LI, J., and XIAO, X. (2002). Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice. *Hum Gene Ther* **13**, 1451-1460.
- WEGNER, A. (1979). Equilibrium of the actin-tropomyosin interaction. *J Mol Biol* **131**, 839-853.
- WEINERT, S., BERGMANN, N., LUO, X., ERDMANN, B., and GOTTHARDT, M. (2006). M line-deficient titin causes cardiac lethality through impaired maturation of the sarcomere. *J Cell Biol* **173**, 559-570.
- WILLIAMS, J.H., SCHRAY, R.C., PATTERSON, C.A., AYITEY, S.O., TALLENT, M.K., and LUTZ, G.J. (2009). Oligonucleotide-mediated survival of motor neuron protein expression in CNS improves phenotype in a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Neurosci* **29**, 7633-7638.

- WITT, C.C., BURKART, C., LABEIT, D., MCNABB, M., WU, Y., GRANZIER, H., and LABEIT, S. (2006). Nebulin regulates thin filament length, contractility, and Z-disk structure in vivo. *Embo J* **25**, 3843-3855.
- WITT, S.H., GRANZIER, H., WITT, C.C., and LABEIT, S. (2005). MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol* **350**, 713-722.
- WOOD, M., YIN, H., and MCCLOREY, G. (2007). Modulating the expression of disease genes with RNA-based therapy. *PLoS Genet* **3**, e109.
- XU, X., MEILER, S.E., ZHONG, T.P., MOHIDEEN, M., CROSSLEY, D.A., BURGGREN, W.W., and FISHMAN, M.C. (2002). Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nat Genet* **30**, 205-209.
- YOSHIMURA, M., SAKAMOTO, M., IKEMOTO, M., MOCHIZUKI, Y., YUASA, K., MIYAGOE-SUZUKI, Y., and TAKEDA, S. (2004). AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Mol Ther* **10**, 821-828.
- YOUNG, P., EHLER, E., and GAUTEL, M. (2001). Obscurin, a giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J Cell Biol* **154**, 123-136.
- YOUNG, P., FERGUSON, C., BANUELOS, S., and GAUTEL, M. (1998). Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *Embo J* **17**, 1614-1624.
- YOUNG, P., and GAUTEL, M. (2000). The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *Embo J* **19**, 6331-6340.
- ZASTROW, M.S., FLAHERTY, D.B., BENIAN, G.M., and WILSON, K.L. (2006). Nuclear titin interacts with A- and B-type lamins in vitro and in vivo. *J Cell Sci* **119**, 239-249.
- ZAYED, H., XIA, L., YERICH, A., YANT, S.R., KAY, M.A., PUTTARAJU, M., MCGARRITY, G.J., WIEST, D.L., MCIVOR, R.S., TOLAR, J., and BLAZAR, B.R. (2007). Correction of DNA protein kinase deficiency by spliceosome-mediated RNA trans-splicing and sleeping beauty transposon delivery. *Mol Ther* **15**, 1273-1279.
- ZHANG, R., YANG, J., ZHU, J., and XU, X. (2009). Depletion of zebrafish Tcap leads to muscular dystrophy via disrupting sarcomere-membrane interaction, not sarcomere assembly. *Hum Mol Genet* **18**, 4130-4140.
- ZHANG, X.H., and CHASIN, L.A. (2004). Computational definition of sequence motifs governing constitutive exon splicing. *Genes Dev* **18**, 1241-1250.
- ZHOU, D., BIRKENMEIER, C.S., WILLIAMS, M.W., SHARP, J.J., BARKER, J.E., and BLOCH, R.J. (1997). Small, membrane-bound, alternatively spliced forms of ankyrin 1 associated with the sarcoplasmic reticulum of mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol* **136**, 621-631.
- ZHOU, Y.Q., FOSTER, F.S., NIEMAN, B.J., DAVIDSON, L., CHEN, X.J., and HENKELMAN, R.M. (2004). Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic resonance imaging. *Physiol Genomics* **18**, 232-244.
- ZOU, P., PINOTSIS, N., LANGE, S., SONG, Y.H., POPOV, A., MAVRIDIS, I., MAYANS, O.M., GAUTEL, M., and WILMANN, M. (2006). Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* **439**, 229-233.

*NOUVEAU
CHAPITRE DE LA
THESE*



Association Bernard Gregory
De la thèse à l'emploi



NOUVEAU CHAPITRE DE LA THÈSE

Sujet de thèse :

Etude d'une mutation génétique entraînant deux types de myopathies rares (la dystrophie musculaire tibiale et la dystrophie des ceintures 2J) et recherche d'approches thérapeutiques

Doctorante : Karine Charton

Directeur de thèse : Isabelle Richard

Mentor : Barbara Filler

**« La vie est trop courte pour
travailler triste »**

Jacques Séguéla

SOMMAIRE

SOMMAIRE	3
1. CADRE GENERAL ET ENJEUX DE MA THESE	4
1.1 Présentation.....	4
1.2 Les enjeux de cette thèse.....	5
1.3 Le contexte de ma thèse	6
1.3.1 Général.....	6
1.3.2 Moi dans ce contexte.....	7
2. GESTION DE MON PROJET DE THESE	8
2.1 Préparation et cadrage.....	8
2.2 Conduite du projet.....	9
2.3 Gestion budgétaire.....	12
3. ACQUIS : COMPETENCES, SAVOIR-FAIRE & QUALITES	14
3.1 Compétences techniques et scientifiques	14
3.2 Compétences liées à la gestion de projet.....	16
3.3 La gestion de projets parallèlement à la thèse.....	20
3.3 Qualités personnelles qui m’ont été nécessaire dans le cadre de mon projet.....	20
4. L’IMPACT DE LA THESE ET PERSPECTIVE PROFESSIONNELLE	21
4.1 Résultats.....	21
4.2 Impact pour le laboratoire, les partenaires, l’AFM, les malades.....	22
4.3 Impact pour moi-même, ma carrière, ma vie et mes choix.....	22
4.4 Perspectives	22
CONCLUSION ET REMERCIEMENTS	23
ANNEXES	
A. Logigramme de la thèse.....	24
B. Bilan financier de la thèse.....	25

1. CADRE GENERAL ET ENJEUX DE MA THESE

1.1 Présentation

L'équipe dans laquelle je réalise ma thèse travaille sur la **recherche d'approches thérapeutiques par thérapie génique pour les dystrophies des ceintures (DDCs)**. Ces DDCs sont des maladies génétiques **rares** et graves touchant les muscles et pour lesquelles il n'existe à l'heure actuelle **aucun traitement**.

Les dystrophies des ceintures, dont il existe au moins 20 formes, peuvent être classées en fonction de leur mode de transmission : les Dystrophies Des Ceintures de **type I** qui désignent les formes dominantes (erreur sur un seul des allèles chromosomiques reçu du père ou de la mère) et les Dystrophies Des Ceintures de **type II** qui sont récessives (erreur sur les deux allèles reçu du père et de la mère). Un grand nombre de gènes responsables de ces dystrophies ont été identifiés à ce jour, mais pas tous. Le laboratoire s'intéresse principalement aux **Dystrophies Des Ceintures de type II** dont 13 sont connues à ce jour : DDC2A à 2M selon la protéine en cause.

Le nombre de patients atteints de dystrophie musculaire dans le monde est évalué **1 cas pour 100000** personnes. Ceci ne compte pas les patients qui n'ont pas encore de diagnostic (dont le gène en cause n'est pas identifié). Ces pathologies sont caractérisées par une **atrophie** et une **faiblesse progressive des muscles proximaux des ceintures pelvienne et scapulaire** entraînant la **perte de la marche** chez les sujets jeunes et un décès précoce.

Les financements de l'équipe Dystrophies Des Ceintures sont en grande partie supportés par **Généthon** qui est une organisation de biothérapie à but non lucratif financée à plus de 90% par **l'Association Française contre les Myopathies (AFM)** avec les dons du Téléthon.

L'équipe travaille sur différentes approches, principalement la recherche de **preuves de principes** par thérapie génique pour les dystrophies des ceintures **en cellules (*in vitro*)** dans un premier temps, puis **sur des** modèles murins des pathologies étudiées (*in vivo*). **La thérapie génique** consiste à modifier les erreurs inscrites dans notre code génétique à la source ; Pour cela, le gène où se trouve l'erreur est modifié grâce à une séquence saine. Cette séquence est introduite dans les cellules malades grâce à des **vecteurs** qui ont la propriété de rentrer dans les **cellules**. Ces vecteurs sont en réalité **des virus** (qui ont naturellement cette compétence) dont on a conservé uniquement leur capacité infectieuse et non virulente. D'autres activités consistent à **déterminer les gènes** en cause dans d'autres dystrophies des ceintures pour lesquelles il n'y a à l'heure actuelle **aucun diagnostic** et enfin une activité de **compréhension de la physiopathologie** de ces maladies, afin de mieux les comprendre et donc de mieux les traiter.

Dans le cadre de ma thèse, je travaille sur la caractérisation d'un modèle de souris reproduisant une mutation très répandue en Finlande sur le gène de la **titine** et qui entraîne deux pathologies : **la dystrophie musculaire tibiale (TMD) ou une dystrophie des ceintures de type 2J (DDC2J)**. Le but de ma thèse est de déterminer si ce modèle **reproduit bien la pathologie humaine** et de tester **une approche thérapeutique** sur celles-ci par thérapie génique ; Dans le cadre de ce projet, le gène muté

étant trop gros pour le faire entrer dans les cellules malades, nous avons mis en place une stratégie de trans-épissage qui permet de n'apporter qu'une partie de ce gène.

1.2 Les enjeux de cette thèse

Economique :

Dans le cas d'une mise en évidence d'une bonne efficacité de la méthode utilisée en thérapie génique sur les animaux il est possible d'envisager **un dépôt de brevet**. De plus, ceci pourrait entraîner à terme la désignation d'un **médicament orphelin** qui pourrait être produit dans le centre de production de Généthon, et permettrait de conduire à sa mise sur le marché, une fois le programme de développement clinique achevé. Toutefois, il n'y a pas de rentabilité financière pour les médicaments produit pour ces pathologies rares.

Technique

- L'enjeu principal est d'avoir un modèle de souris reproduisant correctement la pathologie humaine permettant de **tester les nouveaux traitements** pour ces pathologies et à terme les envisager chez l'Homme.
- La thérapie génique peut traiter un certain nombre de pathologies voire toutes dans la théorie, or le fait de devoir faire rentrer notre produit thérapeutique dans les cellules nous amène à utiliser des vecteurs qui eux ne peuvent pas TOUT transporter car limités en taille. **Les gènes de grande taille** (comme dans notre cas) **ne peuvent pas être apportés de cette façon**. Il est donc clair qu'il faut trouver une autre approche. D'où l'intérêt pour un certain nombre de pathologies d'envisager cette approche de **trans-épissage** qui consiste à n'apporter que la zone déficiente en utilisant la capacité naturelle de la cellule de rabouter les deux parties. Cette technique a déjà montré ses preuves auparavant avec d'autres équipes, mais il nous faut prouver ici que dans le muscle elle est suffisante pour améliorer l'état des muscles atteints.

Scientifiques :

- La caractérisation du modèle murin comme la mise en place de la stratégie thérapeutique amène à l'écriture de **papiers et revues** nécessaires au monde scientifique.
- De plus, la caractérisation de ce modèle est très riche en enseignement au niveau de pathologies TMD et DDC, elle nous amène à une **meilleure connaissance** de celles-ci et mieux comprendre ces maladies c'est aussi mieux les **traiter** et les **diagnostiquer**.
- Tous les gènes peuvent nécessiter une telle approche (trans-épissage), il est important d'en **connaître mieux les règles et le fonctionnement** de cette technique de thérapie génique, c'est pourquoi nous testons un maximum de possibilités pour en tirer le maximum

d'enseignements et pouvoir ensuite adapter ces règles à d'autres pathologies et dans notre cas à d'autres DDCs pouvant nécessiter elles aussi ce genre d'approche.

Sociétaux

L'enjeu principal de cette étude au niveau sociétal est le **traitement des patients** atteints de ces pathologies et qui représente (bien que rare) tout de même **1/10000 habitant en Finlande pour la dystrophie musculaire tibiale** et beaucoup plus rare pour la DDDC2J, bien que beaucoup plus grave. J'ai étudié une des mutations connue et répandue en Finlande mais peu à peu de nouveaux malades (notamment français et espagnols) sont diagnostiqués et se montrent porteurs d'autres mutations. Nous ne connaissons pas les **chiffres exacts** du nombre de patients atteints pour les pathologies étudiées du fait de l'incertitude sur tous les patients qui ne sont pas encore diagnostiqués.

De la thèse

Du moment où la mutation pour ces pathologies a été découverte le début de l'histoire a commencé : il faut essayer de **mieux comprendre la pathologie et de la traiter**. Maintenant que l'on comprend mieux d'où vient le problème, notamment grâce à l'étude d'une souris les reproduisant, mais aussi en étudiant la protéine en cause dans le détail, il est possible d'envisager des approches thérapeutiques grâce à la meilleure connaissance de ces pathologies. Enfin, il faut prouver **la faisabilité de ces stratégies** *in vitro* puis *in vivo*.

J'ai eu l'occasion de **rencontrer des patients** atteints d'une de ces maladies, ceci déclenche forcément un enjeu encore plus présent et l'envie que ce projet se déroule au mieux et aboutisse.

1.3 Le contexte de ma thèse

1. Général

Le laboratoire Dystrophies Des Ceintures recherche des thérapies pour toutes les Dystrophies Des Ceintures de type II. Cette équipe est constituée en moyenne de 15 personnes, dirigées par le Dr Isabelle RICHARD. Tous travaillent sur différentes pathologies avec des projets phares qui sont les dystrophies des ceintures 2A, 2B, 2D et 2J. Ce laboratoire est présent depuis les débuts de la création de Généthon dans sa partie Recherche. Généthon, depuis 2003, se consacre aux **applications cliniques et s'engage sur la voie des thérapies génique et cellulaire**. Elle est depuis 2007, une organisation de biothérapie à but non lucratif se consacrant à la mise au point des thérapeutiques innovantes pour le traitement de maladies génétiques orphelines.

Généthon permet dans notre travail d'avoir de nombreuses **compétences scientifiques, techniques et humaines** à disposition. En effet un certain nombre de plates-formes permettent de travailler avec des personnes expertes dans les techniques que nous utilisons régulièrement. Généthon a mis en place un nombre important de collaborations à long terme et notamment sur des projets européens de grande envergure.

L'équipe Dystrophies Des Ceintures a un **réseau important de collaboration** avec un grand nombre d'équipes internationales sur toutes les pathologies sur lesquelles l'équipe travaille. Ceci permet d'échanger sur ces pathologies auxquelles souvent peu d'équipes dans le monde s'intéressent.

Le projet sur lequel j'évolue s'inscrit très bien dans le projet global de l'équipe puisqu'il m'amène à étudier des pathologies dont on a découvert la mutation avant mon arrivée au sein de l'équipe et qui entraînent des maladies rares (notamment une dystrophie des ceintures) et pour lesquelles il n'existe aucun traitement. Je dois travailler sur la mise en place de thérapies plus particulièrement géniques pour celles-ci et tester leurs faisabilités.

Le point de départ de mon travail de thèse a été **la découverte** (par mon équipe d'accueil, en collaboration avec l'équipe du Dr UDD en Finlande, avant mon arrivée) **des mutations sur le gène de la titine** qui est une protéine de structure essentielle du muscle. Cette mutation sur le gène de la titine peut **entraîner deux pathologies distinctes**: la Dystrophie Musculaire Tibiale (TMD) et la dystrophie des ceintures 2J (DDC2J). Lorsque la mutation est présente sur un seul allèle (apporté par le père ou la mère), cette mutation entraîne une pathologie (TMD) qui touche principalement **le muscle du tibia** avec des difficultés pour **marcher** qui arrivent relativement tard, vers l'âge de 30-40 ans, elle touche 1 finlandais sur 10000. Dans le cas où la mutation du gène de la titine est portée par les deux allèles (c'est-à-dire reçu des deux parents), la pathologie développée est une Dystrophie Des Ceintures de type 2J, celle-ci est beaucoup **plus sévère** avec une perte de la marche vers l'âge de 10 ans et une **perte de la masse musculaire** rapide et importante.

A terme, le but de cette étude est de déterminer une **stratégie thérapeutique** pour ces pathologies nouvellement diagnostiquées et la **tester *in vitro* puis *in vivo*** afin de proposer une **thérapie utilisable chez l'Homme**.

Dans ce contexte j'ai étudié pendant ma thèse ces pathologies via **la caractérisation d'un modèle de souris** portant la mutation la plus répandue retrouvée chez les patients atteints de TMD ou de DDC2J en Finlande. J'ai pu montrer que celle-ci **reproduit plutôt bien la pathologie humaine** au niveau des muscles mais aussi des spécificités de chacune des deux pathologies (atteinte tardive et localisée chez les TMD, et précoce et touchant un grand nombre de muscles dans les DDC2J) et de **proposer plusieurs hypothèses** qui expliqueraient l'apparition de cette pathologie.

Enfin, l'idée de la **thérapie génique innovante** par apport d'un morceau du gène et non de la totalité (le trans-épissage) pensée par ma directrice de thèse a en partie montré ces preuves *in vitro* mais doit être améliorée pour le passage *in vivo*; de plus **d'autres approches de thérapies** ont pu être imaginées grâce à la **meilleure compréhension de cette pathologie** lors de l'étude de la souris reproduisant ces pathologies.

En deuxième et troisième année j'ai encadré un technicien et une stagiaire de MII grâce à ma directrice de thèse et à ma demande sur ce projet.

2. Moi dans ce contexte

Mon parcours un peu inhabituel met bien en évidence les différentes raisons qui m'ont poussée à faire **une thèse**; En effet après le BAC, je suis rentrée en **classe préparatoire de biologie**, ce qui m'a appris à **travailler beaucoup et vite**, intégrer un nombre de connaissance

importante dans tous les domaines scientifiques, et à résister au stress. Ces deux années nous préparent à rentrer en école d'ingénieur, or ces deux années m'ont aussi fait comprendre que **la recherche en biologie** était ce qui m'attirait le plus. Après la réussite des concours, je me suis tout de même dirigée vers **l'université** pour passer une Licence de Biologie, mais bien que les cours étaient à la hauteur de ce que j'attendais, le contexte d'étude (peu de travail de groupe, peu d'encadrement, trop d'étudiants...) était bien loin de mes attentes. Après l'obtention de la **Licence** je me suis dirigée vers une **école d'ingénieur en Biologie**. Je suis alors rentrée au Centre Universitaire des Sciences et Techniques (actuellement Polytech' Clermont-Ferrand). J'ai alors travaillé dans un contexte d'encadrement et de multidisciplinarités qui me plaisait tout en ayant la possibilité de réaliser un **Master II** à l'université en parallèle. J'avais alors tout ce que je recherchais : faire de la technique, de l'appliqué, travailler en groupe, et me diriger vers la Recherche. Appréciant énormément la **génétique**, j'ai demandé un stage à **Généthon**. Je suis alors rentrée dans le laboratoire DDC dirigé par Isabelle RICHARD. Pendant ce stage je n'ai pas travaillé sur mon projet de thèse mais sur une autre pathologie étudiée par l'équipe la DDC2A.

Le choix de faire une thèse s'est présenté à moi comme la possibilité de prendre la **gestion d'un projet** sur lequel peu de choses avaient été faites. Le choix de la conduire dans ce laboratoire a tenu beaucoup au fait du sujet proposé qui allie une **recherche appliquée et fondamentale**, et à une **équipe vivante**. De plus, j'ai beaucoup apprécié lors de mon stage l'important apport humain et matériel mis à disposition par Généthon qui permet de travailler vite et avec les meilleures ressources possibles. Enfin, le grand nombre de séminaires proposés est très enrichissant d'un point de vue scientifique et intellectuel. Tout ceci a penché en la faveur de ma décision de continuer en thèse dans le même laboratoire.

3. Le sujet de thèse

Le sujet de la thèse a été **pensé et proposé** par Isabelle Richard, directrice du laboratoire Dystrophies Des Ceintures à Généthon suite à la mise en évidence de la mutation de la TMD et de la DDC2J, puis tout au long de ce travail de thèse, j'ai proposé des approches différentes pour les thérapeutiques envisageables et des points de vue qui nous permettent de mieux comprendre ces pathologies.

2. **Gestion de mon projet de thèse**

2.1 Préparation et cadrage du projet

Evaluation des facteurs de risques et de succès:

Le point de départ du projet fut la construction de la souris portant la mutation humaine découverte dans le cas de la dystrophie musculaire tibiale et la dystrophie des ceintures 2J déterminée sur des patients Finlandais. Comme toute construction de souris, on ne peut pas savoir si celles-ci **reproduiront** une pathologie comme chez l'Homme, leurs systèmes biologiques n'étant pas identiques à l'Homme. Si ce modèle ne s'était pas révélé reproduire ces pathologies, d'autres

stratégies auraient du être envisagées pour à la fois étudier cette pathologie et essayer des stratégies thérapeutiques.

Les risques toujours actuels sont au niveau des **stratégies thérapeutiques** pensées pour ces pathologies, en effet, il n'est jamais certain que celles-ci aient un **effet suffisant pour reverser les symptômes** de ces pathologies. Ce risque est présent pour toute mise au point de procédé thérapeutique, même si celles-ci donnent de bon résultats bien que pas suffisamment on peut toujours essayer de les améliorer. Ceci dit, il faut toujours garder à l'esprit qu'une ou plusieurs stratégies peuvent échouer à terme, pour des dizaines de raisons (effet non suffisant *in vivo*, effets secondaires, ...): le chemin pour arriver à la thérapie pour l'Homme est long. Il est aussi important d'essayer de tout faire pour contourner ces problèmes.

Les facteurs de succès sont en grande partie liés au fait que ces pathologies et cette protéine sur lesquelles je travaille sont peu étudiées et que peu de choses sont connues sur ce sujet, ce qui en fait un très bon terrain de **découvertes** ! Nous sommes la seule équipe à avoir un modèle murin pour ces pathologies, et la seule à ma connaissance qui teste des approches thérapeutiques pour ces pathologies.

Partenaires et collaborateurs :

Nous sommes en étroite collaboration sur l'étude des pathologies TMD et DDC2J avec le laboratoire finlandais travaillant sur ces TMD et LGMD2J dirigé par le Dr. UDD.

Les équipes de Généthon qui ont pu m'aider à l'avancement de ce projet sont l'équipe de bioexpérimentation pour le travail sur animaux, l'équipe d'imagerie pour l'utilisation des différents microscopes, l'équipe de production de vecteurs, d'évaluation fonctionnelle, de construction de plasmides et de séquençage.

Financements :

Le modèle murin à été **cofinancé par le laboratoire du Dr UDD en Finlande** qui travaille sur ces mêmes pathologies. Généthon est le principal financeur de cette étude, donc indirectement l'AFM (Association Française contre les Myopathies).

La quasi-totalité des achats est pris en charge par un service dédié à cela.

2.2 Conduite de projet (annexe A)

Lors de mon stage de fin d'année d'école d'ingénieur et de MII Recherche, j'ai réalisé mon **stage** sur la Dystrophie Des Ceintures de type 2A, mon sujet consistait notamment à mieux comprendre le fonctionnement de la protéine en cause dans cette pathologie par différentes approches. L'étude de cette protéine s'est avérée particulièrement délicate dans les modèles *in vitro* que nous avons mis en place. Cette étude n'a par la suite pas été continuée bien que j'ai essayé de l'avancer pendant les premiers mois en parallèle de ma thèse, le projet a avorté.

Par contre, quelques mois avant mon arrivée à Généthon, le laboratoire avait mis en évidence la présence d'une mutation chez un certain nombre de familles finlandaises qui montraient au sein d'une

même famille des patients atteints d'une dystrophie musculaire tibiale et des patients atteints d'une dystrophie des ceintures de type 2J. Isabelle RICHARD m'a alors proposée de réaliser **ma thèse** sur ces pathologies avec l'étude d'une lignée de souris reproduisant la mutation découverte et une approche thérapeutique pour celle-ci. J'ai alors présenté ce projet au jury pour **les bourses MENRT** afin d'obtenir le financement de cette thèse, que j'ai obtenu.

Très rapidement après la découverte de la mutation, le laboratoire a fait construire une souris portant la mutation déterminée chez les patients finlandais.

Pendant les deux premières années de ma thèse je fus encadrée par le docteur Nathalie Danièle avec une réunion d'état des expériences et des résultats environ une fois par semaine.

Dans un premier temps, j'ai réalisé **une veille scientifique** sur tout ce qui était connu de ces pathologies. Ceci, a fait l'objet d'une **présentation orale** pour expliquer l'enjeu de mon sujet de thèse à une réunion des laboratoires de Généthon.

La lignée de souris est arrivée au commencement de ma thèse. J'ai alors dans un premier temps pris en charge la **gestion des stocks** de ces souris qui sont hébergées dans une animalerie que Généthon sous-traite (faute de place dans l'animalerie de Généthon). Je suis en contact très régulièrement avec eux pour la gestion des accouplements, la gestion des naissances, la détermination de quels animaux présentent la mutation (par PCR et séquençage (réalisé par un service plate-forme)). La première chose qui devait être réalisée était de vérifier que ces souris **reproduisent la pathologie humaine**, or pour ceci il me fallait des souris ayant la mutation sur un allèle (hétérozygote) et sur deux allèles (homozygote) pour être dans les mêmes conditions que ce qui est constaté chez l'Homme. Or au bout de quelques semaines je me suis rendue compte **que les souris homozygotes ne naissaient pas**. La première hypothèse fut que ces souris n'étaient pas viables, mais après un certain temps, une souris a fait son apparition! **La mutation à l'état homozygote n'est donc pas létale** mais par contre le ratio de naissance attendu pour ces souris avec la mutation n'est pas normal. Ceci a entraîné trois conséquences majeures : caractériser ces souris nécessite **un grand nombre d'animaux** à différents âges, il a fallu que je **multiplie les accouplements** pour pallier à ce problème, le second problème est que **beaucoup plus de temps** que prévu fut nécessaire pour réunir tous les animaux à cette caractérisation et réaliser des protocoles. Enfin, ce résultat est somme toute très intéressant, car ceci implique que cette protéine que l'on a modifiée a probablement **un rôle très important dans le développement embryonnaire des souris ou dans la structure des gamètes** de celles-ci. Suite à ces résultats j'ai alors essayé de trouver des solutions pour mettre en évidence une telle implication de la protéine étudiée dans les gamètes ou les embryons: on a alors appris au laboratoire (par plusieurs essais en collaboration avec l'équipe de bioexpérimentation animale de Généthon) **à prélever le sperme des souris mâles**, mais aussi à **prélever les embryons** chez des souris gestante de 9 jours. **Ces techniques sont maintenant maîtrisées**, mais n'ont pour le moment pas donné de résultats.

Ce travail sur les souris a nécessité que j'assiste à une formation d'une semaine et d'un examen **d'expérimentation animale de niveau II**, qui me permet de travailler sur des petits animaux de façon la plus éthique possible.

Une fois le nombre de souris portant la mutation à l'état hétéro et homozygote suffisant, j'ai réalisé des **protocoles** de plusieurs souris de chaque en comparaison avec des souris saines. J'ai caractérisé ces souris à différents âges : 1 mois, 4 mois, 6 mois, 9 mois et 12 mois. Cette étude a pris énormément de temps (deux premières années) et a nécessité que j'apprenne à prélever un **grand nombre de muscles** sur ces souris, nous avons travaillé à plusieurs pour réaliser le prélèvement de toutes ces souris. Ces souris ont montré des signes d'atteintes musculaires à partir de 9 mois pour les hétérozygotes, et de façon très précoce pour les souris homozygotes. **Ceci correspond assez bien aux symptômes des Hommes TMD et LGMD2J**, bien que le fait de ne rien voir chez les hétérozygotes avant 9 mois a paru très long !

J'ai réalisé d'autres protocoles pour ces souris afin de tester leur force musculaire, expérimentation réalisée par une équipe plate-forme (**l'évaluation fonctionnelle**) qui a permis de constater la faiblesse de certains muscles chez les souris homozygotes. Tous ces résultats sont cruciaux, effectivement ils le sont pour **mieux comprendre** la pathologie mais surtout ils nous permettent d'avoir des **critères de comparaisons** lorsque les stratégies thérapeutiques seront testées sur ce modèle animal.

L'étude de ce modèle murin s'est poursuivie avec l'étude d'une autre protéine qui interagit avec la titine, (par différentes techniques telles que l'imagerie) et qui est modifiée dans le cas de la mutation. J'ai pu montrer que cette protéine a un rôle majeur dans la pathologie, puisque mes expériences où cette protéine n'est pas présente montre une amélioration de l'état de certains muscles de souris homozygotes. Nous réfléchissons aujourd'hui à utiliser **ces résultats** pour envisager **une approche thérapeutique**.

Nous avons pris la décision d'étudier les autres protéines qui pourraient aussi avoir un rôle dans cette pathologie c'est pourquoi et vu la charge de travail nécessaire, lors de la deuxième année, j'ai eu l'occasion d'**encadrer un technicien** pendant 9 mois exclusivement sur ce travail, et bien que je l'encadre toujours, il travaille sur d'autres projets actuellement. A partir du moment où j'ai encadré ce technicien, j'ai remonté chaque semaine les avancements à ma directrice de thèse directement après avoir réalisé des points d'avancements des expériences avec lui.

Une de ces protéines était étudiée par le laboratoire avec lequel nous sommes en collaboration sur ces pathologies (en Finlande) et après de nombreux échanges, il m'a été demandé de réaliser quelques expériences qui ont donné de bons résultats et qui font entre autre l'objet d'un **paragraphe dans une publication** soumise en mai 2009.

Une publication est en cours d'écriture sur la totalité de la caractérisation du modèle murin de la mutation finlandaise et ces résultats ont été présentés via un poster au congrès Myology, à Marseille (2008), au colloque Jeune Chercheur organisé par l'AFM (2009) et à la SFTCG (Société Française de Thérapie Génique et Cellulaire, 2009).

Pendant cette période qui a consisté en la caractérisation du modèle murin, j'ai étudié cette mutation d'une autre manière pendant la première année : **en cellules**. J'avais déjà acquis les compétences de culture cellulaire pendant mon stage. Cette étude qui s'est déroulée sur une dizaine de semaine m'a permis de travailler en **collaboration avec l'équipe de clonage de Généthon**, qui m'a réalisé les

constructions ADN nécessaires à cette étude. Une fois les constructions réalisées, cette étude m'a permis de déterminer que la mutation entraîne une **modification importante de la structure et de la fonction de la protéine** lorsqu'elle est mutée, ces résultats feront prochainement l'objet d'une publication. Ces résultats ont déjà fait l'objet d'une présentation orale en française de 20 min au Club du Muscle à Cassis.

Parallèlement à toute cette étude j'ai mené le **second « bras » de mon projet**, qui consiste à la mise en place d'une stratégie thérapeutique par trans-épissage ; à Généthon nous avons l'**expertise de la thérapie génique** simple : apporter le gène sain entier. Or dans le cas de mon étude, le gène qui est muté est beaucoup **trop grand** pour qu'une telle approche soit envisagée; Des équipes internationales ont déjà mis en évidence la possibilité de n'apporter **qu'une partie du gène** et j'ai alors du réaliser une veille scientifique et technique pour envisager cette approche dans le cadre de la titine.

La première année de thèse a consisté, sur ce projet, principalement à cette **veille scientifique et technique** mais aussi il a nécessité un certain nombre de réunions de démarrage principalement dû au fait de la nouveauté de cette approche au sein du laboratoire. Ces quelques dix réunions ont permis de **monter la stratégie**, les conditions et les moyens pour mettre en œuvre ce projet. Une fois que nous avons décidé comment réaliser concrètement cette approche, j'ai réalisé les expérimentations de validation ; dans un premier temps il a fallu **déterminer des cellules qui expriment la protéine d'intérêt**, j'ai donc screené un certain nombre de type de cellules musculaires (humaines et murines) pour en déterminer deux qui pourraient me servir de bonne condition pour tester cette approche thérapeutique. Or, un autre problème s'est alors ajouté à celui-ci, en effet, pour tester l'approche thérapeutique par trans-épissage il nous faut rentrer dans ces cellules facilement le morceau de gène sain (avec un tag pour le suivre), mais **ces cellules sont très peu permissives** aux techniques habituelles nous permettant de rentrer de l'ADN dans celle-ci. Produire des vecteurs qui eux rentrent facilement dans les cellules et contenant cet ADN auraient été beaucoup trop long et fastidieux. Il a donc fallu envisager de changer cette stratégie : j'ai donc pensé utiliser **un minigène de synthèse** de notre protéine d'intérêt que j'ai cloné et de le rentrer dans des cellules très permissives avec lesquelles il est facile de travailler et donc de **réaliser un système de substitution** simple d'utilisation. Celui-ci marchant très bien, j'ai alors souhaité tester les constructions de la partie de gène sain sur ce système. Mais la première stratégie que nous avons privilégiée demandait d'utiliser un rapporteur fluorescent qui nous aurait permis de déterminer quand cette stratégie marche en cellules ; or après plusieurs tentatives, il se trouve que ce rapporteur ne s'est jamais exprimé en cellules. Après avoir perdu beaucoup de temps sur ce point, nous avons changé **de nouveau la stratégie de travail** et donc repris la construction de la partie saine du gène. En deuxième année, j'ai alors sous-traité la construction de mon nouveau système chez Genescript (EU) par manque de temps. Lorsque j'ai reçu mes constructions j'ai pu les tester en cellules, et cette fois les résultats ont été probants, **la mise en évidence du trans-épissage** était faite, mais en trop petite quantité pour envisager un passage dans les souris. Cette technique a demandé alors un développement, une amélioration importante pour avoir suffisamment de résultat pour espérer une

bonne efficacité *in vivo*. Je suis allée chercher des informations lors de deux congrès d'une semaine : Gordon Research à Boston (MA), et la SFBBM (Société Française Biochimie et de Biologie moléculaire) en France, ce qui m'a permis d'échanger avec des experts du domaine, et ainsi rapporter des idées et des modifications possibles. **Une stagiaire de MII** que je forme cette année, travaille à temps plein actuellement sur ce même projet, dans l'idée de le continuer en thèse. **Je l'encadre** sur tout ce qui est **développement de cette technique**. J'ai eu l'occasion de présenter l'avancée de ce projet lors d'une réunion qui regroupe tous les laboratoires de Généthon en fin de 2^{ème} année et au colloque Jeune Chercheur, et la SFTCG cité plus haut.

A l'heure actuelle, avec ce système, les résultats sont encourageants, mais nous réalisons toujours des améliorations de celui-ci avant de le tester *in vivo*. Ces résultats ont fait l'objet d'une présentation orale en français en juin 2009 au Colloque Jeunes Chercheurs, et d'un poster à la Société Francophone de Thérapie Cellulaire et Génique en juin 2009.

Parallèlement, en deuxième année, un nouveau sous-projet de stratégie thérapeutique a pris naissance. Un papier est sorti sur une pathologie proche de la nôtre qui montrait que certains malades **moins atteints** montraient une diminution naturelle de la quantité de protéine qui portait la mutation ; cette mise en évidence a fait fleurir l'idée d'essayer de **diminuer la quantité de la protéine mutée dans le cas de nos souris** pour améliorer leur état. J'ai réalisé les tests en cellules en deuxième année après avoir sous-traité la construction nécessaire à cet essai chez Genecust (France). Les résultats *in vitro* se sont montrés positifs. Afin de tester cette approche sur les souris portant la mutation j'ai demandé à la plate-forme de vectorisation de me produire un lot de vecteurs pour l'injection des souris ; Ces souris ont été injectées par l'équipe de bioexpérimentation et j'attends actuellement que la fin de ce protocole pour évaluer les résultats obtenus.

Ces trois années ont été rythmées par un certain nombre d'autres manifestations : en effet, dans notre équipe il y a une **réunion tous les mardis matin** qui consiste à ce que chacun présente pendant 2h l'état d'avancement de son/ses projets. Mais aussi, des réunions une fois par mois, **étudiants-chercheurs**, m'ont permis de discuter et affronter les points de vues avec les différents chercheurs de l'équipe sur nos résultats scientifiques.

Des présentations au **Journal Club** qui consistent à présenter environ 3 fois par an des publications nouvelles dans les domaines qui nous concernent.

Les séminaires de Généthon présentés par des personnes invitées par les chercheurs de Généthon sur des travaux différents des nôtres mais des domaines proches qui peuvent nous intéresser la plupart du temps.

Le Téléthon qui a lieu tous les ans en Décembre et qui entraîne la mobilisation de la plupart des personnes qui travaillent à Généthon,

La journée des familles atteintes de pathologies rares, organisée par L'AFM qui nous permet de discuter avec ces patients qui souhaitent savoir où en est la recherche sur leurs pathologies.

Les visites des laboratoires proposées aux donateurs et malades.

Ma participation à l'**association BODOCS** (association de doctorants parisienne).

2.3 Gestion budgétaire du projet (annexe 2)

Pour ce projet tournant autour de la TMD et de la DDC2J, les ressources humaines nécessaires ont consisté principalement en mon salaire payé par la faculté d'Evry suite à l'obtention d'une bourse MENRT, les salaires de mes encadrants: ma tutrice pendant les 2 premières années et ma directrice de thèse pendant ces 3 années accompagnées d'une prime à l'encadrement et enfin, les techniciens qui ont participé au projet ainsi que la stagiaire de MII. De plus, a été comptabilisé le temps relatif que les plates formes de Généthon ont pu passer sur le projet ; Les équipe d'histologie pour couper les muscles, l'équipe de bioexpérimentation, d'évaluation fonctionnelle, et les équipes de séquençages sont celles qui ont le plus investi de temps sur ce projet. La partie **Ressources Humaines** est la part la plus importante du bilan financier de ma thèse et représente **70% du budget total du projet**. Mon salaire représente 25% de la totalité des dépenses totales, ou 35% de dépenses RH.

Les consommables ont été calculés en prenant compte de la dépense de l'équipe sur une année de la totalité des consommables achetés divisé par le nombre de personne en moyenne par an qui est de 15,4 personnes dans l'équipe par an. De plus, l'élevage des souris se fait dans une animalerie extérieure, et coûte environ 12000 euros par an pour le soin et l'élevage de celles-ci. En ce qui concerne le matériel, les calculs ont été réalisés sur le détail de l'amortissement de chaque logiciel, outil informatique et machine. Le matériel hors informatique s'amortit sur 10 ans, le matériel informatique et les logiciels sont amortis sur 3 ans. C'est pourquoi je n'ai pas pris en compte le prix de mon ordinateur portable qui avait plus de 3 ans quand je l'ai eu et qui de fait est amorti. Pour le reste du matériel utilisé il consiste en grande partie à des machines récemment achetées et notamment un scanner de lecture de Westerns Blots en cours d'amortissement, des bains maries et centrifugeuses, une machine PCR et une hotte neuve qui sont en cours d'amortissement sur 10 ans, j'ai pris en compte ce matériel qui était en cours d'amortissement d'octobre 2006 à aujourd'hui. **La totalité des fournitures, consommables, amortissements, sous-traitance et communication** correspondent à **18% du budget total du projet**.

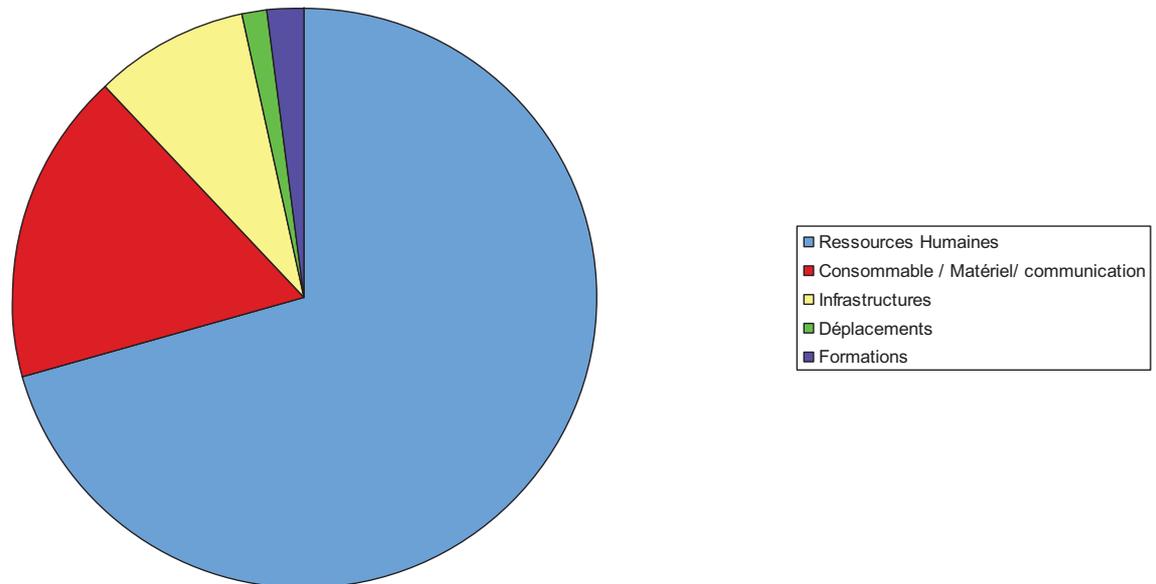
Le coût des infrastructures a été calculé avec la quote-part utilisation de Généthon qui comprend à l'année une moyenne de 212,4 personnes qui correspond à 6,49% de quote-part utilisation pour une personne. Les coûts de l'entretien (ménage, intervention sur système de chauffage et d'électricité, etc.), comprend le loyer qui lui-même comprend les frais de gardiennage, l'eau, l'électricité et les taxes, il est bon de préciser que Généthon a des frais de gardiennage très importants puisqu'il a un système de surveillance très sophistiqué comprenant des dizaines de caméras et des pompiers qui sont présents jours et nuits dans les locaux. La partie téléphone et internet comprend en plus la quote-part documentation qui consiste aux inscriptions pour les revues et une personne dédiée à la documentation. La partie **infrastructure** correspond à **8% du budget total**.

La part des dépenses liée aux **déplacements** : congrès ou conférences ainsi que les inscriptions et les frais de repas, hôtels constitue jusqu'à maintenant 3410 euros soit **1,4% du budget total**.

Enfin, les **formations** que j'ai pu suivre sont le Niveau d'Expérimentation Animale de Niveau II payé par Généthon qui a coûté 1600 euros, puis les autres formations payées par l'Ecole Doctorale pour un

total de 2250 euros, et enfin les frais d'inscription à l'Université et la sécurité sociale de 1128 euros sur 3 ans. Cette partie formation constitue **2% du budget total de la thèse**.

En conclusion, les frais relatifs à cette étude se répartissent de la façon suivante (graphique ci-dessous), pour un total d'environ 250000euros.



Répartition budgétaire du projet de thèse

3. Acquis : Compétences, savoir-faire & qualités

Durant ces trois années de thèse, j'ai bénéficié d'une grande autonomie dans la conduite et la réalisation de mon projet.

J'ai ainsi acquis et mis en évidence des compétences scientifiques, techniques et méthodologiques, mais aussi j'ai pu développer mes qualités personnelles.

3.1 Compétences techniques et scientifiques

- Les compétences techniques

Les compétences techniques que j'ai acquise sont très diversifiées et nombreuses, en effet mon projet a nécessité que j'utilise beaucoup de méthodes de travail différentes ;

- **Travail sur le petit animal** : mon travail de thèse m'a amené à travailler sur des petits animaux (souris, exclusivement) ce qui a nécessité que je sois formée grâce à **l'expérimentation animale de niveau II**. Tout au long de ma thèse j'ai utilisé ces acquis notamment pour disséquer, prélever des muscles, injecter des souris. Liée de façon très étroite à ces expérimentations j'ai eu à améliorer et gérer des protocoles de plusieurs dizaine de souris, avec ses inattendus et à faire concorder le travail des différentes équipes

nécessaires. Gestion des stocks d'animaux (accouplements, veille sanitaire, commande de souris).

- Au niveau technique, mes projets m'ont permis de développer mon expertise scientifique dans le domaine de la **biologie moléculaire** : PCR, qRT-PCR, clonages, Western Blot, immunoprécipitation, imagerie confocale, immunohistochimie, histologie, **et biologie cellulaire** : mise en culture, culture primaire, transfections. Ceci a nécessité le montage d'outils de travail notamment lors de la recherche des problèmes de reproduction des souris où j'ai pu mettre en place avec l'équipe de bioexpérimentation des techniques de prélèvement de spermatozoïdes et d'embryons non utilisés à l'époque au laboratoire.
- Les rapports et résultats à analyser m'ont amené à utiliser un certain nombre de **logiciels** tels que la bureautique classique (Word, Excel, Power Point), la gestion des plannings sur Outlook, Adobe Photoshop et Illustrator, End Note, VNTI, les statistiques.

- Les compétences scientifiques

Ce qui relève pour moi des compétences scientifiques acquises sont celles que je n'ai pas intégré aux compétences liées à la gestion de projet. En effet selon mon point de vue, ces compétences sont nécessaires à tout scientifique sans forcément qu'il gère à lui seul un projet.

- **Veille technologique et scientifique** : Les projets sur lesquels je travaille ont nécessité en amont une importante veille technologique et scientifique notamment pour la mise en place des stratégies thérapeutiques sur les pathologies étudiées, ainsi que des connaissances sur le muscle murin, humain et sur les différentes approches de thérapie génique existante. De plus, je reçois tous les jours les nouvelles publications via une recherche automatique sur Pubmed autour de ces différents axes de recherche, ce qui me permet de suivre en temps réel les avancées scientifiques. Pour toutes ces études il m'a été important de savoir chercher, trouver et utiliser ces informations.
- **Gestion du matériel, gestion des stocks** : dans notre équipe la gestion des stocks se fait à tour de rôle, avec l'aide d'un autre doctorant de l'équipe nous avons d'ailleurs mis en place un fichier d'état des stocks et des commandes qui nous permet de déterminer les produits communs qui peuvent manquer tous les mois. De plus, j'ai réalisé la gestion des stocks des souris sur lesquelles j'ai travaillé : naissances, dispersion des cages, veille sanitaire.
- **Description et interprétation des résultats** : tous les résultats obtenus doivent être décrits, analysés et interprétés afin de continuer la suite des expériences voire de conclure. A de nombreuses reprises les résultats obtenus n'étaient pas les résultats attendus, c'est d'ailleurs ainsi que de nouvelles stratégies thérapeutiques ont vues le jour. Ces descriptions et interprétations sont pour un certain nombre présentées dans les posters, colloques et publications réalisées lors de cette étude. Ceci m'a permis de développer un bon **sens critique** que j'ai d'ailleurs pu utiliser lors des différentes réunions d'équipe qui ont lieu toutes les semaines où chacun présente ses avancements et sur lesquels j'interviens très souvent.

- **Culture scientifique** : depuis très jeune je m'intéresse énormément au monde qui m'entoure et donc de ce fait à la science, depuis des années je suis abonnée et lis régulièrement des journaux comme Sciences et Vie, Pour la Science, Biofutur. Ceci m'a permis d'avoir une bonne culture scientifique de base, plus celle acquise en cours ; Cette étude sur la titine m'a permis de rapidement multiplier mes connaissances sur la muscle, la titine, l'ARN, les vecteurs utilisés. De plus, le fait d'assister régulièrement à des congrès, conférences, et séminaires j'ai pu utiliser toutes ces connaissances scientifiques dans mon travail.
- **Rédiger et synthétiser** : lors de ces trois années j'ai tenu à jour mes cahiers de laboratoire et la sphère électronique afin que quelle que soit la personne qui cherche des informations sur nos expériences puisse les trouver ; De plus j'ai collaboré à la rédaction d'une revue et d'une publication et suis en train de terminer ma propre publication sur la caractérisation des souris. J'ai pu de plus présenter mes résultats sous forme de poster et de présentation orale à différents congrès.
- **Travailler en équipe** : notre laboratoire implique de savoir travailler en équipe, en effet, nous partageons un certain nombre de pièces et de matériels communs, pour lesquels nous avons tous notre rôle au niveau de l'entretien et du rangement. De plus le fait d'avoir des réunions toutes les semaines nous permet d'avoir une équipe unie ou chacun donne son avis sur les idées des autres, les expériences, etc. Chacun a vécu différents et des expertises différentes c'est ce qui en fait la richesse de cette équipe et ce qui nous permet de rester soudés. J'ai toujours été partisane d'une bonne entente et d'une bonne collaboration entre nous, c'est pourquoi je vais souvent demander où en est chacun sur son projet ou sur ces expériences, voire proposer mon avis s'il peut être intéressant et bien sûr demander l'avis des autres pour la mise en place de mes propres expériences.
- **Innover** : l'innovation dans mon projet est passée par différentes étapes. Les protocoles ont du souvent être adaptés et améliorés. De plus, la technique de trans-épissage bien que déjà utilisée a été modifiée de telle façon à s'adapter à un cas particulier qui est celui d'un gène musculaire pour la plus grande protéine connue dans le vivant et difficile d'utilisation.
- **Trouver des nouvelles solutions techniques** : comme j'ai pu l'indiquer plus haut, certains problèmes techniques ont été rencontrés lors de ces trois années, à chaque fois ceci a nécessité de trouver de nouvelles stratégies et des solutions pour contourner ces problèmes de façon judicieuse. Quelques fois elles n'ont pas abouties, et finalement dans mon cas ont fini par donner de bons résultats, je pense notamment au besoin de créer un système de substitution pour tester la stratégie thérapeutique *in vitro*. Pour cela il a fallu concevoir les thèmes et les méthodes d'expérimentation et adapter le matériel aux travaux de recherche. Ceci a toujours commencé par une recherche de ce qui a déjà été fait dans les publications puis le transposer et transférer ces stratégies à mon cas d'étude. Tout ceci implique les trois points suivants :
- **Savoir redémarrer à zéro sans se démotiver** : en effet les nombreux essais infructueux sont souvent démotivants mais il m'a fallu savoir remettre en question ma façon de faire et de

penser pour arriver à des techniques fructueuses ce qui implique de **rester focalisé sur son objectif**.

- **Apprendre de ses erreurs** : j'ai pu constater un certain nombre de fois des erreurs dans mes expériences, notamment une erreur de jugement qui m'a probablement fait perdre beaucoup de temps ceci a nécessité que je recommence tout en me remettant en question.
- **Savoir demander de l'aide** : quelquefois on essaie de réaliser une expérience qui échoue, je fais alors quelquefois appel aux équipes des plates formes de Généthon et eux qui la réalisent souvent peuvent mettre très vite l'erreur en évidence. J'ai aussi pu demander à des experts de me donner leurs avis sur la marche à suivre sur cette nouvelle méthode qui est le trans-épissage.

3.2 Compétences liées à la gestion de projet

- **L'autonomie** : Durant ces trois années de thèse, j'ai bénéficié d'une grande autonomie dans la conduite et la réalisation de mon projet. La gestion autonome de mon projet est passé en grande partie sur la gestion de protocoles qui nécessitent l'action de différent acteurs (techniciens, stagiaire...) et de différentes laboratoires (plates formes, sous-traitant).

La gestion de mon projet a nécessité la **prise d'initiatives** tout au long de l'avancement de mon travail, notamment par la proposition de nouvelles démarches, de nouveaux points de vues lorsque les expériences n'ont pas donné les résultats escomptés il a fallu envisager les choses différemment, d'autres voies de travail.

Ceci a entraîné des **prises de décisions** et la prise de **responsabilités**. Les décisions que j'ai pu prendre ont été d'ordre différent tout au long de ma thèse. Dans la première année elles consistaient la plupart du temps à réaliser moi-même mes protocoles (nombre de souris, prélèvements, analyses) puis j'ai souvent eu à choisir un fournisseur/prestataire extérieur selon les besoins nécessaires à mon étude. Je prévois les commandes, je design les oligonucléotides et les séquences pour anticorps, je me mets en relation avec les commerciaux et sous-traitant pouvant répondre à ces besoins et comparer les prix pratiqués. Dès que j'ai commencé à encadrer techniciens et stagiaire j'ai pris des décisions qui concernaient plus la façon de dispatcher le travail, quelles étaient les priorités et savoir proposer des solutions adaptées à l'avancement du projet.

La gestion de mon projet a nécessité en outre **de prendre des risques**, notamment de travailler sur plusieurs voies parallèles même si la charge de travail s'est souvent révélée supérieure et si certaines de ces pistes risquent de ne pas aboutir. En effet, en avançant dans la compréhension de la pathologie en étudiant le modèle murin de ces pathologies, de nouvelles voies thérapeutiques différentes du trans-épissage se sont révélées intéressantes. J'ai souhaité les tester le plus rapidement possible, bien sûr ces essais sont une prise de risque et un travail important, n'étant pas sûr que cette approche aboutisse, et tout est à imaginer. Mais le but est de trouver une solution à ces pathologies et c'est tellement important que j'ai souhaité lancer ces essais et travailler en me donnant les moyens scientifiques et techniques pour faire avancer le projet : commandes, demande d'aide, sous-traitance citées plus haut.

- L'organisation :

Pour moi l'organisation est le point le plus important dans le travail, une bonne organisation en amont d'un projet est un des éléments majeurs de la bonne réalisation de celui-ci. Et c'est grâce à mes antécédents organisationnels que j'ai pu gérer de nombreuses fois des événements de la vie étudiante (notamment grâce à un an de gestion du Bureau des Elèves de mon école d'ingénieur en tant que Présidente, nécessitant l'organisation d'évènements pour 600 personnes un certain nombre de fois), que je me suis forgée des habitudes importantes en ce qui concerne l'organisation de projets quels qu'ils soient. Tant au niveau des deadlines que de la gestion de différentes personnes sur un même projet, des responsabilités et de la réussite de celui-ci. Dans le cadre de ma thèse j'ai pu utiliser ces compétences notamment dans l'organisation du projet et des moyens humains nécessaires selon le but à atteindre. Mon projet de base s'est divisé en plusieurs sous-projets, au fil de son évolution. J'ai donc géré ces différents projets en parallèles, et pour cela une bonne organisation est nécessaire pour qu'ils avancent chacun en parallèle correctement. Ma façon d'aborder cette organisation passe toujours par la **réalisation d'une liste d'actions** à accomplir avec des **deadlines auto-imposées** et avoir chaque jour un planning de travail.

-J'ai dû **organiser ces tâches en me donnant des délais personnels**, car la plupart de mes tâches ne sont pas organisées sous une forme successive qui demande de boucler une tâche avant de commencer la suivante. Bien sûr je fais en sorte, dans la mesure du possible, que ces délais soient respectés. Ils l'ont été pour la plupart. Par deux fois, ils ne l'ont pas été : l'écriture de la publication sur la caractérisation des pathologies des souris qui provient en grande partie du fait que j'ai attendu certains résultats avant de l'écrire. L'enseignement à en tirer est qu'il faut savoir dire stop et commencer le plus tôt possible l'écriture des publications, enfin, le passage de la thérapie *in vivo* prend plus de temps que prévu. De plus les problèmes techniques rencontrés sur la stratégie thérapeutique qui ne marche pas suffisamment *in vitro* pour passer *in vivo*. Ce point m'a fait perdre beaucoup de temps et les questions restent toujours en suspens. Nous sommes toujours à l'heure actuelle en train d'essayer d'améliorer ce système.

Pour respecter ces délais, je **planifie** les étapes en fixant les temps impartis, je **définis les priorités** pour moi-même et pour les personnes que j'encadre, sur différents projets. Il me faut gérer mon temps, le temps que je dois garder en cas de besoin des techniciens ou stagiaires. Ces planifications se réalisent toutes les semaines avec les intéressés par des réunions d'avancements. La planification et la mise en place des expériences a en quasi totalité été réalisée par moi-même.

- La gestion de ces projets a nécessité la définition et la mise en place d'un **plan d'action** : bien que ce projet n'en soit qu'un seul, il est composé de différents sous-projets qui peuvent être à eux seuls des projets. Ces sous-projets ont nécessité de **travailler en transversal** avec plusieurs équipes impliquées (5 à 6 dans mon cas : bioexpérimentation animale, évaluation fonctionnelle, production...), coopérer avec ces équipes pour trouver des solutions, des accords pour les délais de chaque équipes, les faire concorder et les concilier en terme de délais (passage des animaux d'un service à l'autre, gestion des imprévus, ...). Tout ceci passe par beaucoup de **communication** avec chacune d'entre elle.

Il faut que ces projets soient traités de façon équilibrée selon les priorités de l'équipe et les délais auto-imposés à respecter, tout en étant assez **souple**. Il est arrivé très souvent, notamment lors des problèmes de naissance des souris ou des différents problèmes cités plus hauts, que les délais ne puissent être respectés. Dans ces cas là je transférais plus d'attention sur les projets non prioritaires aux premiers abords.

Etant donné que ces projets avancent en parallèle, il est nécessaire d'aller de l'un à l'autre avec une vue d'ensemble du global au spécifique et ne pas perdre des yeux l'objectif, qui dans mon cas est la thérapie pour les patients atteints de TMD et DDC2J.

Pour gérer correctement tous ces projets, il a été nécessaire de savoir **anticiper** les tâches à venir, prévoir les étapes pour organiser un outil de travail, quelques fois des protocoles lancés sortent 9 mois plus tard pour analyse !

L'organisation du projet passe en outre par la **gestion des aspects administratifs**, en effet j'ai pu assister voire présenter à un certain nombre de congrès et de colloques en France et à l'étranger, ceci à nécessité de réaliser des ordres de mission, prévoir les avances sur frais, le transport, les visas, et le logement.

L'encadrement humain: L'encadrement d'un technicien puis d'une stagiaire de MII m'a demandé d'apprendre à encadrer des personnes. Dans un premier temps j'ai dû apprendre à les **enthousiasmer** sur mon travail, leur donner une vision globale du projet et une méthode de travail.

Une étape difficile pour moi a été d'apprendre à **déléguer** mes expériences, on prend, en thèse beaucoup on a beaucoup l'habitude de tout faire soi-même, et déléguer donne le sentiment de ne pas pouvoir y parvenir seul. Une fois passé ce cap, il devient plus facile de voir les choses autrement et de prendre du plaisir à encadrer.

Au laboratoire, je contrôle **l'avancement et la rapidité des expériences**, ceci nécessite une gestion transversale des projets et des avancées de chacun. De plus, lors des points d'avancements chaque semaine, je dois définir la charge de travail de chacun, les rassurer, les écouter, et gérer leur capacité de travail de chacun, mais aussi savoir rester positif et constructif vis-à-vis des découragements possible, des difficultés ou des malentendus. J'ai ainsi pu prendre conscience qu'il est nécessaire de s'adapter à la personnalité de chacun.

L'important dans le cadre de cet encadrement humain, nouveau pour moi, est d'essayer autant que faire se peut, de **faire progresser les autres et soi-même** tout en instaurant une relation de confiance sur la durée qui fait que le travail se passe bien.

En conclusion, cette expérience que je voulais réaliser m'a vraiment permis de prendre plaisir à encadrer et leur transmettre ce que je pouvais au maximum.

Savoir communiquer sur son projet :

A. Participation active et présentation des résultats

Le fait d'être à Généthon m'a permis de réaliser des visites **de laboratoires** (6 jusqu'à maintenant), en effet les donateurs ou familles de malades peuvent visiter par groupe de 10-15 personnes les locaux de Généthon, visite qui dure en moyenne 1H30. Notre rôle est de leur expliquer

le fonctionnement des laboratoires et les avancées en temps réels de nos études. Dans un premier temps, c'est-à-dire au début de mon stage je participais à ces visites afin de m'imprégner de l'histoire de Généthon et de ce qui était nécessaire de faire passer aux donateurs et malades lors de cette visite puis j'ai fini par mener moi mêmes ces visites lorsque l'occasion s'est présentée. Ceci est pour moi un très bon travail de **vulgarisation** de ce que nous faisons mais aussi une façon de m'informer régulièrement sur l'histoire de Généthon sur ce que chaque équipe réalise et les avancées sur chaque projet phare de Généthon.

De plus d'autres évènements de ce genre nous permettent de **parler de notre travail** de façon plus vulgarisée, ce qui est le cas de la **Journée des Familles** et du **Téléthon** auxquels j'ai pu assister tous les ans jusqu'à présent. Ce sont des journées où on peut échanger avec les malades et leur famille, et de la même façon il est nécessaire de se tenir au courant des dernières avancées et découvertes sur leurs pathologies. De plus, ces journées m'ont permis de rencontrer des personnes atteintes des maladies sur lesquelles je travaille, ceci donne un fort enjeu ce projet et une fort motivation à tout mettre en œuvre pour réussir. Ces journées ont lieu une fois par an sur deux jours, et c'est un rendez-vous très important pour eux.

J'ai eu l'occasion de **donner un cours** de trois heures à des universitaires de Licence Professionnelle sur la thérapie génique, ce qui m'a obligé à faire le bilan de toutes les méthodes utilisées en thérapie génique.

Enfin, j'ai pu **présenter mes résultats** sous forme de présentation orale en français à deux reprises : pour le Club du Muscle qui se déroule tous les ans à Cassis, cette année au Colloque Jeune Chercheur organisé par l'AFM.

J'ai présenté des posters à deux reprises : au congrès international de Myology 2008 à Marseille, et à la Société Française de Thérapie Génique à Paris (2009). En ce qui concerne les **communications orales** à l'intérieur de Généthon, tous les 2 mois, une présentation de l'avancement de mes travaux à l'équipe est réalisé et tous les ans pour la réunion des laboratoires des Généthon qui dure une heure et qui a lieu tous les vendredis. « Le Journal Club » présenté au moins 3 fois par an qui consiste à la présentation d'une publication du moment à un groupe de personnes intéressées de Généthon.

Le fait de présenter mes résultats pour différentes réunion, m'a demandé de réaliser des présentations type power point ainsi que des posters qui demandent de savoir **synthétiser et passer l'information simplement**, de façon compréhensible pour tous.

B. Participation, relation publique et information

J'ai eu l'occasion de **participer** à des congrès spécialisés dans mon domaine à Boston (Gordon Research) pendant une semaine et à la Grande Motte pour la SFBBM (Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire). De plus, j'assiste régulièrement aux différents **séminaires** qui font intervenir des chercheurs de divers domaines dans les locaux de la Génopole et qui nous présentent leurs travaux. Le fait d'assister à ces colloques et d'intervenir quelque fois me permet de pratiquer l'Anglais écrit et oral.

Le reporting :

Il est important dans le cadre d'une gestion de projet de **rendre compte de l'avancement de son travail** : à l'équipe (réunion présentée sur l'avancé du projet 3-4 fois par an), à ma directrice de thèse (toutes les semaines dans la mesure du possible) et de savoir demander des avis et de l'aide quand certains blocages apparaissent.

Mise à jour régulière du cahier de laboratoire ainsi que dans notre cas la mise à jour des fichiers et avancements des projets sur la sphère informatique de Généthon. En plus de ceci, un reporting régulier est réalisé toutes les semaines avec l'encadrant, sur l'avancement des expériences et la mise en œuvre de la suite des expériences à réaliser

Les communications écrites : Je suis à l'heure actuelle en train d'écrire la publication sur le travail que j'ai effectué sur le modèle murin des pathologies que j'étudie. J'ai participé à l'écriture d'une revue de l'équipe et d'un papier d'un collaborateur finlandais. J'ai de plus eu l'occasion de réaliser des rapports écrits et oraux des congrès auxquels j'ai assistés.

Le Réseau :

L'étude que je mène permet à notre équipe de **collaborer** avec une équipe finlandaise, qui travaille sur ces pathologies. Nous avons eu l'occasion de nous rencontrer 5-6 fois pendant ces trois années et de réaliser des réunions pour présenter, chacun, où nous en sommes, et bien sûr de communiquer par mails pour des demandes de matériel nécessaires à nos études.

Pendant ces trois années j'ai aussi l'opportunité de **rencontrer** un certain nombre de commerciaux de différentes sociétés (Invitrogen, Qiagen, Milipore Eurogentec...), je sais que je peux les contacter pour n'importe quelle demande.

Je maintiens mon réseau professionnel grâce aux outils Internet et notamment Viadeo, mais aussi le réseau des anciens élèves de l'école de d'ingénieur de Clermont-Ferrand.

3.3 La gestion de projets parallèlement à la thèse :

Association pour les doctorants : Parce que la valorisation des docteurs me paraît très importante, je pense qu'en France il y a une faiblesse à ce niveau, je me suis rapprochée de l'Association Biodocs Paris qui est une association de doctorants et jeunes docteurs. J'en suis alors devenue secrétaire en 2009. Ceci sera un tremplin pour la prochaine activité qui je l'espère va se mettre en place rapidement et qui concerne la création d'une association des doctorants d'Evry, étant actuellement géré par Francis Quettier, président de l'Ecole doctorale. C'est lui qui a eu l'idée de la création de cette association et celle-ci pourrait permettre aux nouveaux élèves et anciens élèves de rester en contact et de créer un réseau.

La principale activité de Biodocs Paris est d'organiser les journées Biotechno en Ile de France qui ont lieu partout en France et qui consiste à permettre aux jeunes chercheurs de découvrir les métiers des biotechs et les acteurs professionnels du secteur. Cet événement regroupe environ 200 professionnels et 200 participants. Ma première collaboration pour cette journée a lieu cette année à Biocitech à Romainville. Mon rôle a été notamment de trouver le site de réalisation de la journée selon

un budget que nous avons décidé au préalable, mais aussi de contacter des sociétés pour le sponsoring de la journée et réaliser de la publicité auprès des étudiants.

Le Téléthon : ces trois dernières années j'ai aidé à l'organisation du Téléthon qui a lieu dans les locaux de Généthon à Evry ; Ma principale activité est la **recherche de sponsor** pour le Téléthon ; Cette activité a nécessité de contacter chaque année une trentaine d'entreprises qui travaille avec Généthon pour qu'ils fassent un don, de leur expliquer clairement le but de cette démarche et de les relancer. De plus, je fais partie de l'association GAP Team qui tourne des court-métrages pour recueillir de l'argent pour le téléthon grâce à la vente de ces DVDs. J'ai pu à la fois jouer dans ces court-métrages et avoir le rôle d'assistante réalisation sur les tournages.

3.4 Qualités personnelles qui m'ont été nécessaires dans le cadre de mon projet

Pour le travail : Les qualités personnelles que j'ai pu améliorer et qui m'ont surtout permis de mener à bien mon projet sont en particulier la **capacité de se remotiver** suite à des expériences négatives, la **ténacité** face à la nécessité de recommencer et l'**engagement dans le travail**. La volonté d'aboutir est toujours aussi forte mais à certains moment dans l'avancement il a fallu une forte remotivation : quand les naissances des souris portant la mutation n'avaient pas lieu, que quelques unes sont nées mais pas suffisamment pour réaliser des protocoles, et qu'aucune atteinte n'a été visible les premiers mois ! C'est d'ailleurs pour ces raisons que la caractérisation a pris beaucoup plus de temps que prévu. De la même façon, je me trouve face au fait que pour le moment, la thérapie imaginée par trans-épissage n'a pas un effet suffisant pour passer *in vivo*; les premières méthodes utilisées ont échoué, il a faut réfléchir de nouveau à l'approche, recommencer et améliorer toujours dans l'idée d'aboutir à une preuve de principe suffisante pour espérer guérir cette pathologie chez les souris. Et pour tout cela il faut développer de la **patience** (loin d'être une de mes qualités de base !) notamment quand on a hâte d'avoir certains résultats mais qu'il faut attendre 9 mois pour les analyser (en partie dû dans mon cas aux souris dont l'atteinte musculaire est très tardive), et de la **résistance au stress** car la frustration est souvent présente suite à des échecs.

Mais la qualité qui m'a permis d'avancer toujours en positivant est ma **capacité à relativiser** et à **m'adapter aux différentes situations** : prendre mon temps pour analyser les problèmes, garder son calme sont les maîtres mots d'une bonne gestion des problèmes, en tout cas dans le cadre de mon projet.

J'ai mené ce projet en assez grande **autonomie**, toujours en rapportant les avancements aux supérieurs.

De plus, mon habitude à tout **organiser et synthétiser**, m'a permis d'être relativement à l'aise dans l'organisation des tâches concernant les différents sous-projets.

Enfin, j'ai souvent dans mon passé aimé prendre cette position de **leadership** : manager des personnes et manager de façon transversale, en développant le sens des responsabilités, et en restant au maximum **disponible**.

Pour les interactions : Mon caractère fait de moi quelqu'un de **peu timide**, qui a relativement **confiance en soi**, qui dit les choses, ce qui permet d'avoir de bonnes interactions avec tout le monde.

Pour le côté scientifique : Les qualités qui me servent le plus au niveau scientifique c'est **ma mémoire**, la capacité d'enregistrer un grand nombre de données scientifiques, et de m'intéresser à tout (**curiosité d'esprit**). J'ai, je pense, une assez bonne culture scientifique générale car en effet je reste profondément curieuse et intéressée par mon sujet malgré sa forte spécialisation. De plus, j'aime trouver les points positifs et négatifs de chaque chose ce qui m'a permis de développer un **bon sens critique**. Et enfin, je suis **passionnée** par ce que je fais : comprendre comment ça marche, etc...

Après une petite enquête anonyme au sein de l'équipe les qualités personnelles me concernant relevées par mes collaborateurs ont été les suivantes : prendre du recul par rapport à soi même à travers le regard des autres

Adaptabilité, sociabilité, gestion des imprévus et organisation, capacité de synthèse

Disponibilité, sens du service, dynamisme

Impliquée dans la gestion des communs du laboratoire

Capacité à se remettre en cause

Organisation / planification / synthèse

Passionnée

Grande capacité d'innovation

4. L'impact de la thèse et perspective professionnelle

4.1 Résultats

J'ai pu démontrer au cours de ce projet que le modèle murin portant la mutation finlandaise entraînant chez l'Homme deux pathologies distinctes reproduit plutôt bien les symptômes humains. J'ai pu mettre en évidence certains acteurs de la pathologie, imaginer des approches thérapeutiques nouvelles et enfin la preuve de principe *in vitro* de la faisabilité d'une approche par thérapie génique. Ces résultats ont pu être présentés à 2 congrès internationaux et 2 congrès francophones, quelques résultats ont fait l'objet d'une publication soumise par nos collaborateurs finlandais et deux autres sont en cours d'écriture dans notre laboratoire.

Ce travail a nécessité un grand nombre d'optimisations au niveau des expériences mais aussi au niveau des stratégies utilisées et des techniques nouvelles à aborder.

Ce projet, partie de peu de chose, est maintenant bien avancé et pourra probablement permettre dans les mois à venir de tester une thérapie chez les souris.

Je suis heureuse d'avoir pu encadrer deux personnes car cela m'a permis de beaucoup apprendre.

4.2 Impact pour le laboratoire, les partenaires, l'AFM, les malades

Les publications qui découlent et découleront de ce travail sont une façon de valoriser le laboratoire, à l'international. Ce travail permet une meilleure compréhension de ces pathologies et a permis d'imaginer d'autres stratégies thérapeutiques pour l'espoir d'un médicament. Le but final est la

clinique, tout ce travail permettra je l'espère de déterminer la meilleure stratégie à employer dans le cas de ces pathologies.

4.3 Impact pour moi-même, ma carrière, ma vie et mes choix

J'aime vraiment ce que je fais dans la Recherche parce que les enjeux sont forts, que je travaille en équipe, en autonomie, en manageant. Il me reste encore des points à améliorer, notamment appliquer ce que font déjà les autres sans faire à ma façon, et vouloir innover dès le début ! Moins me disperser, me focaliser plus sur le résultat avec application et méthode et ne pas vouloir tout faire en même temps, et enfin améliorer mon anglais.

4.4 Perspectives

Aujourd'hui ma directrice de thèse m'a proposé un contrat pour terminer les expériences en cours. Je souhaiterais travailler en temps que chercheur, responsable Recherche en responsabilité de projets de recherche et d'équipe dans le biomédical et les biotechnologies, avec une préférence pour le privé. Ci possible je souhaiterais continuer dans la recherche de thérapies particulièrement pour les maladies génétiques.

Lors de ce travail et toujours actuellement, je mène des recherches d'enquêtes-terrain. J'ai l'occasion de rencontrer des personnes de différentes entreprises, sur différents projets, sur les métiers de la R&D, les projets qui existent, et c'est très enrichissant.

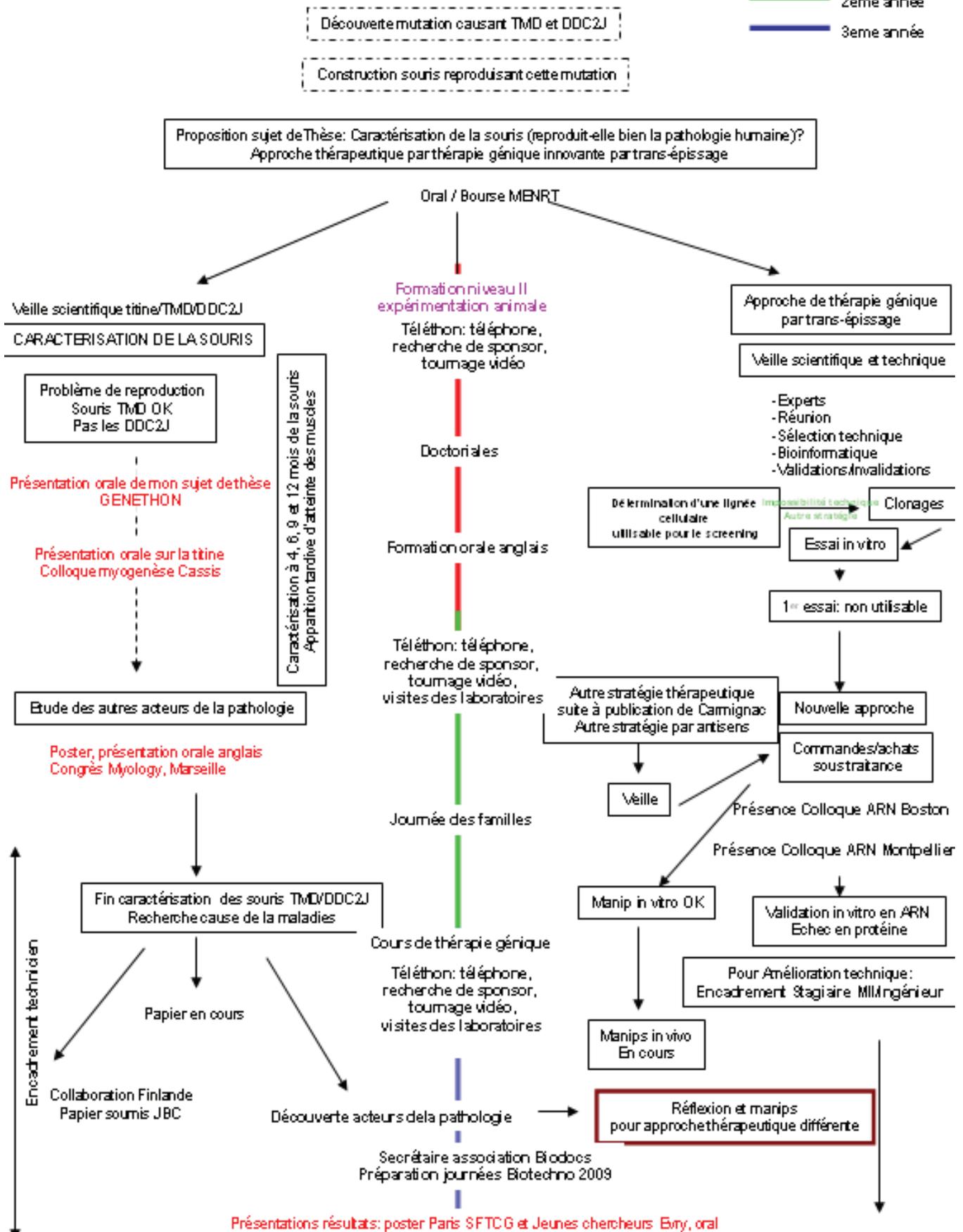
Conclusion sur Le Nouveau Chapitre de la Thèse® :

Mon principal regret a été de ne pas avoir assez de temps à consacrer à ce NCT et pourtant il a été très riche en enseignement sur moi-même et je le conseille à tous les doctorants sans hésitation. J'ai probablement encore des choses à travailler mais maintenant que le travail de groupe et celui avec mon mentor a été fait, j'ai de bonnes bases pour continuer sur cette voie. Ces quelques **formations** sur la mise en évidence de nos compétences, etc...que j'ai pu suivre, notamment en école d'ingénieur et maintenant en formation doctorale sont **nécessaires** au doctorant, qui pendant trois ans, a du mal (comme moi) parfois à sortir « la tête du guidon », et à regarder derrière soi le travail accompli!

Je tiens à présenter mes **remerciements** à ma directrice de thèse Isabelle RICHARD qui m'a soutenue dans cette démarche, à mon équipe qui a joué le jeu de soulever mes qualités et mes défauts, au service financier qui a pris le temps de rechercher toutes les dépenses liées à ma thèse et me les avoir expliquées ; et à Barbara Filler pour son travail à mes côtés et pour sa patience. Enfin, je souhaite remercier l'Université d'Evry de permettre aux doctorants une formation aussi riche et à l'Association Bernard Gregory pour l'avoir mis en place et pour leur mobilisation pour la valorisation des docteurs.

LOGIGRAMME THESE Karine CHARTON

- 1ere année
- 2eme année
- 3eme année



ESTIMATION DU COUT CONSOLIDE DE LA THESE

Se référer aux règles de calcul avant de compléter le tableau

Montants en euros TTC

	Nature de la dépense	Détails *	Coûts totaux (euros TTC)			
			Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
1	Ressources Humaines	BRUT				
1.1	Doctorant	1658,25	36	1658,25		59697
1.2	Encadrant 1	Directeur de thèse 6052	36			16112
1.3	Prime Encadrement	300	3		27j	300
1.4	Encadrant 2	tutrice 6023	24			
1.5	Prime Encadrement	0				10600
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance)	stagiaire 450/mois + technicien 9 mois 2340/mois + technicien sporadiquement 2340/mois 6 mois totaux		2700 + 21060 + 14040		37800
1.7	Sous-traitance	prod AAV + séquençage + Bioexpérimentation +Histologie + informatique + service achat				50000
	Sous-total Ressources Humaines					174509
2	Consommables					
2.1	Fournitures expérimentales	12000 euros souris/an + Fournitures 32000 (comprend la sous-traitance extérieure) pour 1an utilisé par 15,4 personnes	36			43000
2.2	Fournitures de bureau	Papier, papeterie				500
2.3	Autres achats					
	Sous-total Consommables					43500
3	Infrastructures					
3.1	Entretien, gardiennage, secrétariat		36		6,49%	1677,57024
3.2	Loyers des locaux	Loyer brut	36		6,49%	18110,1363
3.3	Electricité, eau, chauffage, ... (si non inclus dans les charges locatives)					0
3.4	Autres telephone, internet		36		6,49%	1291,34743
	Sous-total Infrastructures					21079,054
4	Matériel (amortissements)					
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)	Taux d'amortissement				10%
4.2	Ordinateur de bureau	Taux d'amortissement				amorti
4.3	Logiciels de bureau	Taux d'amortissement				amorti
4.4	Autre	Taux d'amortissement				
	Sous-total Matériel					287,353955
5	Déplacements					
5.1	Missions en France					
5.2	Missions à l'étranger					
5.3	Congrès en France	cassis + parisSFTCG + MYOLOGY Marseille + SFBBM (GM)			Hébergement + inscription +autres frais	2461,24
5.4	Congrès à l'étranger	boston			Hébergement + inscription +autres frais	945,99
	Sous-total Déplacements					3407,23
6	Formation					
6.1	Formations	Niveau II exp animale				1601,84
6.2	Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)	376	3			1128
	NCT + cours anglais + formation innovation + doctoriales					2250
	Sous-total Formation					4979,84
7	Documentation et communication					
7.1	Affranchissements, Internet, téléphone	affranchissements et envois de colis				500
7.2	Publicité, communication, impressions	Posters				200
7.3	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque, etc.)					
7.4	Autres					
	Sous-total Documentation et communication					700
8	Charges financières (intérêts des emprunts)					
	Sous-total Charges financières					
9	Charges exceptionnelles					
	Sous-total Charges exceptionnelles					
10	TOTAL					248462,478

entretien des locaux

le loyer comprend le gardiennage, l'eau et l'électricité et les taxes

+QP documentation

comprend amortissement logiciel!