



HAL
open science

Optimisation du transfert de gène dans les gamma-sarcoglycanopathies

Fanny Lenglard

► **To cite this version:**

Fanny Lenglard. Optimisation du transfert de gène dans les gamma-sarcoglycanopathies. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03435100

HAL Id: dumas-03435100

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03435100>

Submitted on 18 Nov 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

OPTIMISATION DU TRANSFERT DE GÈNE DANS LES GAMMA-SARCOGLYCANOPATHIES

Présentée par
Fanny LENGART

Soutenue publiquement le 17/12/2020
devant le jury composé de

Monsieur Michel BOULOUARD	Enseignant-Chercheur, PharmD-PhD, Doyen de la faculté de pharmacie de Caen, Vice doyen de l'UFR Santé de Caen	Président du jury
Madame Ariane BIQUAND	PharmD-PhD, Post-doctorat à Généthon	Examineur
Monsieur Jérôme POUPIOT	Ingénieur d'étude à Généthon	Examineur

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques

Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative

Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe

Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
ROCHAIIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR	Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne	Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR	Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire	Pharmacie galénique

KIEFFER Charline	Chimie médicinale
KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima	Chimie organique et thérapeutique
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

PRICOT Sophie	Anglais
----------------------------	---------

PERSONNEL ASSOCIÉ À TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie clinique
SEDILLO Patrick	Pharmacie officinale
RICHARD Estelle	Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

REMERCIEMENTS

Au Président de thèse,

Monsieur le Professeur Michel BOULOUARD

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je vous remercie de votre disponibilité. Veuillez recevoir l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

Aux membres du jury et directeurs de thèse,

Monsieur Jérôme POUPIOT,

Jérôme, faire mes premiers pas à Généthon avec toi fut un réel plaisir ! Merci pour tout ce que tu m'as appris au cours de mon stage et pour ton aide. Merci pour ta pédagogie, ta patience, ta disponibilité et ta gentillesse.

Docteur Ariane BIQUAND,

Ariane, je te remercie d'avoir accepté de diriger ma thèse, d'avoir été si réactive et impliquée dans cette mission. Merci pour ton aide, ta sympathie à mon égard, ton écoute et tes encouragements.

Au Docteur Isabelle Richard,

Isabelle, je te remercie de m'avoir fait confiance en m'offrant l'opportunité de réaliser mon stage de Master 2 et de poursuivre en thèse au sein de ton équipe « Dystrophies Musculaires Progressives ». Merci pour le temps que tu m'accordes, pour ton esprit critique et tes précieux conseils.

À tous les membres de l'équipe Dystrophies Musculaires Progressives,

Un grand merci pour votre excellent accueil, vos sourires et votre bonne humeur, votre disponibilité et vos conseils, et tout ce que vous m'apprenez. C'est un immense privilège de travailler avec vous et je suis ravie de continuer mon parcours à vos côtés. Merci à vous tous pour votre soutien, votre gentillesse, et pour les bons moments que l'on partage.

À ma famille,

À mes grands-parents, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue toutes ces années. Merci pour tous vos encouragements qui m'ont redonné la pêche ! Merci pour la tendresse que vous me portez depuis ma naissance, et toutes vos attentions.

À ma mère, merci pour ton soutien infaillible, ta compréhension, ton dévouement sans limite, et le bonheur que ta présence dans ma vie m'apporte au quotidien. Merci de m'avoir aidé à surmonter les défis et de m'avoir montré que le bonheur est partout.

À mon père, merci pour toute l'aide que tu m'apportes, mention spéciale pour la rédaction des dossiers en 24h chrono, grâce à toi l'impossible devient possible ! Merci pour la force et le courage que tu me transmets, et pour m'avoir appris que les limites ne sont que dans notre tête. Et surtout, merci de toujours répondre présent lorsque j'ai un problème.

À ma grande sœur Julie, la meilleure des grandes sœurs, et plus encore. Merci de me comprendre aussi bien et de me faire autant rire. Merci pour tout ce que l'on partage et pour la complicité entre nous, qui n'a pas changé malgré la distance qui nous sépare.

PS : Je continuerai à t'accompagner dans tes bêtises (compte sur moi pour écrire le speech téléphonique en Turquie). Dans la mouise jusqu'au cou, mais ensemble ! See you soon in Nice.

À ma petite sœur Lisa, merci de m'avoir fait réciter mes cours, et pour les « Biiien » qui m'ont encouragée. Merci pour ton soutien, ta confiance, ta franchise et ta générosité. Tu peux toujours compter sur moi, j'espère l'avoir prouvé avec l'urgence pates bolo.

Merci pour tout ce que vous m'apportez et pour les valeurs que vous m'avez transmises. Merci pour votre amour. Je sais qu'à tout moment, je peux compter sur vous.

À Thibault, l'homme qui partage ma vie. Merci de m'apaiser et de me soutenir au quotidien. À nos folles et magnifiques aventures, en France, à l'étranger, et à celles à venir.

À mes amis,

Merci pour les super moments passés ensemble, pour votre soutien et pour être toujours présents à mes côtés. Merci de m'accompagner dans mes délires et mes galères ! Merci de m'écouter et de me conseiller. Merci pour nos fous-rires et nos aventures (soirées, vacances, rally-galas, AG). Merci à ma team pharma et aux belles rencontres que j'ai faite grâce à l'associatif.

#PELICaen #ParisbyNight #KomandaLimonov #SouthAmerica

À Matthieu, même si nos chemins se sont séparés, je n'oublie pas toute l'aide et le soutien que tu m'as apporté. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragée à continuer mes études.

Enfin, une pensée toute particulière à ma binôme, à mes côtés depuis le début de mes études. J'aimerais écrire ces remerciements en GIF mais tu devras te contenter de quelques mots. Merci de tout ton soutien, ton aide, ta gentillesse, et ton ouverture d'esprit. Tu es la meilleure binôme que j'aurai pu avoir et sans qui je n'en serais pas ici aujourd'hui. Merci d'avoir supporté mon « petit » caractère toutes ces années, de m'avoir motivée, reconforter, encore et encore. Merci pour toutes les folies que l'on a partagé et pour tous les défis que l'on a relevés, qui ont rendu notre binôme encore plus fort. Merci d'être toujours là pour TOUT.

*#Binooome #Takeadeepbreath Stepbystep #Unmanageable #Extraterrestre
#Pharmasoulmate*

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	1
Liste des tableaux et des figures	3
Avant-propos	7
I. L'histoire de l'AFM Téléthon	9
II. Les missions de l'AFM-Téléthon	10
III. Les laboratoires de l'AFM-Téléthon	14
I. GÉNÉTHON.....	15
II. INSTITUT DE MYOLOGIE.....	18
III. I-STEM.....	19
IV. YPOSKESI	20
Introduction	21
I. Physiologie du muscle	23
I. Les différents types de muscles	23
II. Origine du développement du muscle squelettique.....	27
II. Structure du muscle squelettique	29
I. Contractions musculaires.....	34
II. Fonction des fibres musculaires dans les myopathies.....	36
III. Dystrophies musculaires	38
I. Dystrophies musculaires progressives	38
II. Sarcoglycanopathies	40
III. Gamma-sarcoglycanopathies.....	41
IV. Approche thérapeutique	44
I. Thérapie génique	44
II. Adéno-associated virus.....	44
III. Utilisation de l'AAVr en thérapie génique	46
V. Expression génique	51
VI. Modèle animal	52
Contexte et objectifs de l'étude	55
Matériels et méthodes	59
I. Expérimentation animale	61
II. Prélèvement des muscles et coupes histologiques	61
III. Vecteurs AAV	62
IV. Extraction protéique	63
V. Western blot	63
VI. Extraction ARN et Reverse Transcription	64
VII. Extraction ADNg	65
VIII. PCR Quantitative	65
IX. Immunohistofluorescence et coloration HES	67
X. Statistiques	68
Résultats	69
I. L'introduction du mir-208T dans la construction AAV8-1-hSGCG réduit-elle l'expression du transgène dans le cœur ?	71
I. Protocole de l'étude	71
II. Résultats	72
III. Conclusion de ces résultats.....	76
II. Les différents promoteurs musculaires (1, 2, 3) modifient-ils l'expression du transgène ? 77	

I. Protocole de l'étude	77
II. Résultats	77
III. Conclusion de ces résultats.....	82
Discussion	83
I. Une diminution de l'expression du transgène dans le cœur suite à l'introduction du miR208T.....	85
II. Des variations du niveaux d'expression du transgène dans les différents organes selon les promoteurs	87
Conclusion.....	89
Bibliographie	93

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAV** : Virus adéno-associé (Adeno-Associated Virus)
- AAVr** : Virus adéno-associé recombinant (recombinant Adeno-Associated Virus)
- ADNc** : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
- ADNg** : Acide Désoxyribonucléique génomique
- AFM** : Association Française contre les Myopathies
- ARNm** : Acide Ribonucléique messager
- ATP** : Adénosine TriPhosphate
- CeBP** : CCAAT Protéine de liaison activatrice (enhancer Binding Protein)
- CK** : Créatinine Kinase
- CP** : Créatine Phosphate
- Ct** : Cycle threshold
- DAG** : Anticorps âne anti-chèvre (Donkey Anti Goat)
- DAR** : Anticorps âne anti-lapin (Donkey Anti Rabbit)
- DFAT** : Graisse dédifférenciée (Dedifferentiated FAT)
- DGC** : Complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine
- DM** : Dystrophies Musculaires
- DTT** : Dithiothréitol
- FC** : Facteur d'amplification (Fold Change)
- FGF** : Facteurs de croissance des fibroblastes (Fibroblast Growth Factors)
- GFP** : Protéine fluorescente verte induite (Green Fluorescent Protein)
- HES** : Hematoxyline Eosine Safran
- ICM** : Masse Cellulaire Interne (Inner Cell Mass)
- IgG** : Immunoglobuline G
- ITR** : Régions terminales inversées (Interverted Terminal Region)
- iPS** : Cellules pluripotentes induites (induced pluripotent stem cells)
- KO** : Inactivation du gène (Knock-Out)
- LGMD** : Limb Girdle Muscular Dystrophy
- miRNA** : micro-Ribonucleic Acid
- Myh7** : Myosine 7
- MYOM3** : Myoméline 3
- pA** : Polyadénylation

PBS : Phosphate Buffer Saline

PeC : Cellules épithéliales pigmentées

qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative (quantitative Polymerase Chain Reaction)

rpm : Rotation par minute

RT : Transcription inverse (Reverse Transcription)

RB : Protéine du rétinoblastome

SG : Sarcoglycane

SGCG : Gamma-Sarcoglycane

TA : Tibialis Antérieur

TG : Thérapie Génique

TTBS : Tween (0,1%) Tris Buffered Saline

VGCN : Vector Genome Copy Number

WB : Western Blot

WT : Wild Type (Type sauvage)

µg : Microgramme

µL : Microlitre

vg/kg : Génomes viraux / kilogramme

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableaux :

Tableau 1 : Les différents types de muscles.

Tableau 2 : Tableau des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

Figures :

Figure 1 : Organigramme du département de recherche et développement de Généthon.

Figure 2 A : Organisation spatiale du développement de mésoderme dans la région postérieure de l'embryon (Chal et al., 2017).

Figure 2 B : Formation et différenciation du mésoderme para-axial (Chal et al., 2017).

Figure 3 : Noyaux sur la longueur d'une fibre musculaire, colorés avec un colorant fluorescent qui se lie à l'ADN, et visualisés par microscopie confocale (Allen et al., 1995).

Figure 4 : Structure du muscle squelettique (Raven et al., 2013).

Figure 5 : Structure de la molécule de myosine II (planet-vie.ens.fr).

Figure 6 : Représentation de la structure cristallographique aux rayons X de la tête de myosine (Brooks et al., 2003).

Figure 7 : Systèmes de tubules transverses et réticulum sarcoplasmique (Frontera et al., 2014).

Figure 8 : Séquence des événements entraînant la génération de force (Frontera et al., 2014).

Figure 9 : Muscles affectés dans les dystrophies des ceintures (Henriques, 2018).

Figure 10 : Illustration du complexe des protéines sarcoglycanes (AFM-Téléthon.fr).

Figure 11 : Thérapie génique par virus adéno-associés (University of Pennsylvania).

Figure 12 : Génomes de l'AAV sauvage et recombinant (Rossi et al., 2016).

Figure 13 : Remplacement des gènes du virus sauvage par le transgène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur.

Figure 14 : La production par tri-transfection (Samulski et al., 2014).

Figure 15A : Western Blot présentant l'expression de la protéine γ -sarcoglycane dans un muscle de souris WT.

Figure 15B : Immunomarquage montrant la perte du complexe protéique à la membrane dans le muscle de souris KO.

Figure 15C : Graphique montrant une diminution de la force musculaire des souris KO par rapport aux WT à l'âge de 2 mois.

Figure 15D : Images en coloration HES présentant l'état histologique de différents tissus musculaires (diaphragme, gastrocnémien, triceps et cœur) de souris KO à 2 mois, 5 mois et 7 mois.

Figure 16 : Western Blot détectant la protéine SGCG dans les TA et le cœur de souris.

Figure 17 : Schémas des vecteurs AAV utilisés dans cette étude.

Figure 18 : Schéma du protocole de l'étude évaluant l'effet sur l'expression du transgène, de l'introduction du mir-208T dans la construction AAV8-1-hSGCG.

Figure 19 : Quantification des VCN par noyaux dans les organes TA, cœurs et foies des souris γ -KO, injectées avec du PBS, la construction AAV8-1-hSGCG et la construction AAV8-1-hSGCG-208T.

Figure 20A : Western Blot des TA, des cœurs et des foies des souris du groupe injecté avec du PBS, du groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG, et du groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG-208T.

Figure 20B : Quantification relative de l'expression protéique du transgène hSGCG dans les TA, dans les cœurs et dans les foies des souris du groupe injecté avec du PBS, du groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG, et du groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG-208T.

Figure 21 : Immunohistofluorescence des coupes de TA, cœurs et foies des trois groupes de souris.

Figure 22 : Schéma du protocole de l'étude évaluant l'effet de différents promoteurs musculaires (1, 2, 3) dans la construction AAV8-hSGCG.

Figure 23 : Quantification des VCN par noyaux dans les organes TA, cœurs et foies des souris γ -KO, injectées avec les 3 constructions différentes.

Figure 24 : Diagramme présentant les quantifications relatives des ARN messagers chez les souris γ -KO injectées avec les 3 constructions différentes.

Figure 25A : Western Blot des TA et des cœurs des souris des 3 groupes, grâce aux anticorps spécifiques anti-hSGCG.

Figure 25B : Quantification relative de l'expression protéique du transgène hSGCG dans les TA et dans les cœurs des souris des 3 groupes.

Figure 26 : Western Blot des foies des souris des 3 groupes, grâce aux anticorps spécifiques anti-hSGCG.

Figure 27 : Immunohistofluorescence des coupes de coeur des souris γ -KO injectées avec les 3 constructions différentes.

Avant-propos



L'AFM-Téléthon est une association de parents et de malades qui mène un combat contre des maladies génétiques, rares et lourdement invalidantes. (Les informations ci-dessous sont tirées du site officiel de l'AFM-Téléthon consulté le 18/09/2020.)

I. L'histoire de l'AFM Téléthon

En 1958 l'Association Française pour la Myopathie (AFM) est créée par un petit groupe de parents révoltés contre l'impuissance de la médecine face aux maladies neuromusculaires qui touchent leurs enfants. Cette association est présidée par Yolaine de Kepper, mère de sept enfants dont quatre atteints par la myopathie de Duchenne, la plus fréquente des maladies neuromusculaires de l'enfant. Dans le but de faire reconnaître ces maladies délaissées par le corps médical, l'association organise des ventes de cartes de vœux et de boîtes de chocolats. En 1972, l'association introduit les premiers fauteuils roulants électriques en France et en 1976, elle est reconnue d'utilité publique par l'État. Il s'en suit la création du premier conseil scientifique de l'AFM, regroupant malades, chercheurs et médecins.

La découverte du gène responsable de la myopathie de Duchenne est annoncée par un jeune chercheur, Anthony Monaco, en 1986, conduisant l'association à s'engager dans la recherche génétique. Afin de financer la recherche génétique, l'AFM organise le premier Téléthon sur Antenne 2 et reçoit plus de 181 millions de francs soit 27,6 millions d'euros. Grâce à cette forte mobilisation, le combat de l'association prend de l'ampleur. L'année suivante, des services régionaux d'aide et d'information sont créés pour accompagner les personnes concernées par une maladie neuromusculaire. En 1990, le premier laboratoire de l'association, Généthron, est créé, suivi en 1996 par le second, l'Institut de Myologie. A partir de 2000, apparaissent les premiers succès de thérapies géniques sur les bébés bulle, privés de défenses immunitaires. En 2005, avec d'autres associations, l'AFM-Téléthon remporte

une victoire historique avec la loi pour l'égalité des droits et des chances, la participation et la citoyenneté des personnes handicapées. Un troisième laboratoire est ensuite créé en partenariat avec l'Inserm, I-Stem, spécialisé dans la recherche sur les cellules souches. En 2009, l'association ouvre son premier Village Répit Familles, lieux de répit où les malades et leurs proches aidants peuvent se ressourcer dans des logements adaptés où ils bénéficient de l'aide de professionnels formés pour les soins et les gestes de la vie quotidienne. Il s'en suit de nombreuses avancées pour les maladies neuromusculaires, jusqu'au premier médicament de thérapie génique pour l'amyotrophie spinale, issu de recherches initiées à Généthon.

II. Les missions de l'AFM-Téléthon

Tout d'abord, une mission très importante pour le financement et la visibilité de l'association, est l'organisation du Téléthon. Le Téléthon regroupe des milliers d'animations dans toute la France et une émission de télévision de 30 heures, diffusée sur France Télévisions. Il a lieu chaque année le premier week-end de décembre. Près de 10 millions de personnes regardent ce programme qui allie informations, témoignages et divertissements, et dont le but est de recueillir des fonds pour l'AFM. De nombreuses personnalités ont parrainé le Téléthon (Garou, Gad Elmaleh, Alain Delon, etc...), cette année le parrain du Téléthon 2020 est le chanteur Matt Pokora. Des artistes (chanteurs, musiciens, comédiens) soutiennent cette cause et appellent le public à faire des dons. Les promesses de dons sont recueillies via un standard téléphonique et un compteur (emblème du Téléthon) situé sur le plateau de télévision, affiche en temps réel, le montant recueilli.

Ensuite, les missions de l'AFM-Téléthon peuvent être regroupées en 3 axes : guérir, aider et communiquer. Afin de guérir des maladies longtemps considérées comme incurables, l'association soutien la recherche et le développement de thérapies innovantes. L'axe « aide aux malades et à leur famille » comprend le diagnostic, les soins, et l'accompagnement. Enfin, la communication, axe majeur dans les missions de l'association, repose sur la transmission de savoirs auprès des familles, des professionnels et du grand public, mais également auprès des autorités pour que les droits des malades soient reconnus.

- Déterminée à vaincre la maladie, l'AFM-Téléthon est responsable d'avancées scientifiques majeures, notamment dans le développement de traitements innovants pour les maladies rares. Ces traitements innovants regroupent la thérapie génique, la pharmaco-génétique ou la thérapie cellulaire. Longtemps considérée comme inaccessible, la thérapie génique constitue aujourd'hui l'une des voies privilégiées pour traiter les maladies génétiques mais également certains cancers.

Le choix de l'association d'investir dans les biothérapies a permis de remporter plusieurs victoires concernant les maladies génétiques rares du sang (immunodéficiences, β -thalassémie) et du cerveau (adrénoleucodystrophie). De plus, afin de mettre les traitements à disposition des malades le plus rapidement possible, l'AFM apporte son soutien à des essais thérapeutiques en cours ou en préparation. Ceux-ci sont menés notamment aux Etats-Unis, en Angleterre, aux Pays-Bas, en Italie et en Espagne.

En 2017, un premier essai de thérapie génique a été lancé chez des enfants atteints de myopathie myotubulaire grâce à un médicament conçu dans les laboratoires de l'AFM. Suite à une injection unique, les premiers bébés traités sont parvenus entre autre à se tenir assis seuls, à lever les bras et à attraper un objet. Ces résultats sont spectaculaires et apportent de l'espoir aux patients atteints d'autres maladies rares. Actuellement, huit médicaments de thérapie génique sont disponibles (Annexe 2 : Tableau des médicaments développés avec le soutien de l'AFM-Téléthon).

- Une autre mission majeure de l'AFM-Téléthon est d'aider les malades et leurs familles à faire face à la maladie. L'aide aux malades se développe grâce à l'implication de l'AFM dans plusieurs domaines notamment l'accès aux soins, l'accompagnement de proximité et l'innovation sociale et technologique.

L'AFM-Téléthon favorise l'accès aux meilleurs standards de soins par la création de centres de référence maladies rares et par la mise en place dans toute la France d'un réseau de consultations pluridisciplinaires. Les familles ont ainsi accès, en un même lieu, à différents spécialistes (neurologue, cardiologue,

pneumologue, psychologue....) sous la responsabilité d'un médecin référent ou coordonnateur. L'Association soutient aujourd'hui 48 consultations par le financement de postes ou de matériel.

De plus, elle anime des groupes de travail afin d'améliorer la prise en charge des malades. Ces groupes, constitués de personnes bénévoles concernées par une même pathologie, se mobilisent pour accompagner et informer les familles et pour contribuer à faire progresser la recherche, le diagnostic et les soins en lien avec les scientifiques et les médecins. D'autre part, l'AFM a créé le métier de « Référent parcours de santé » qui a pour mission d'accompagner les familles à chaque nouvelle étape de la maladie (diagnostic, scolarité, adaptation du logement, recherche d'aide technique,...). Il assure également l'interface entre les familles et les différents professionnels.

L'association a également mis en place des « Villages Répit Familles » qui offrent aux malades et à leur entourage, la possibilité de se ressourcer dans un environnement médical sécurisé où des équipes expertes dans la prise en charge de leur maladie sont présentes en permanence. De plus, afin de permettre aux personnes en situation de grande dépendance de vivre à leur domicile, l'AFM a créé le concept « Habitat-service » offrant une permanence de sécurité 24 heures / 24.

Deux autres objectifs importants de l'association sont de renforcer l'autonomie des personnes dépendantes et de développer des aides techniques répondant à leurs besoins. Pour cela, l'AFM initie le développement de technologies innovantes avec notamment la robotique, la domotique, les dispositifs d'interprétation du mouvement ou encore la compensation de la perte de fonction du membre supérieur.

- Une dernière mission importante de l'association est de militer pour la reconnaissance des droits des malades. Elle s'est mobilisée pour la reconnaissance des maladies rares en tant que priorité de santé publique, en créant en 2001 la « Plateforme maladies rares », et pour l'adoption de plans nationaux. Ces plans nationaux ont permis entre autre, la mise en place de centres de référence dans les hôpitaux pour un meilleur diagnostic et une

meilleure prise en charge des malades, ainsi que la création de la Fondation Maladies Rares pour une meilleure coordination de la recherche.

L'AFM-Téléthon porte la voix des malades pour réduire les inégalités liées au handicap. Le Téléthon a rendu possible l'implication des citoyens dans la recherche de thérapies, et leur forte mobilisation a changé le regard sur la maladie et le handicap. L'association milite depuis de nombreuses années pour une citoyenneté pleine et entière des personnes malades et a remporté plusieurs victoires comme la loi de 2002 sur les droits des malades ou celle de 2005 qui accorde des droits à la compensation, à la scolarité, à la formation et à l'emploi pour les personnes en situation de handicap.

L'AFM-Téléthon est présente dans de nombreuses instances nationales telles que le Conseil national consultatif des personnes handicapées, le conseil de la Caisse nationale de solidarité pour l'autonomie, la Haute autorité de santé, la Conférence nationale de santé, ou encore le Haut Conseil pour le financement de la protection sociale. Elle est également présente dans les Maisons départementales des personnes handicapées (MDPH). Enfin, elle est très impliquée dans le dialogue inter-associatif à travers le Collectif inter-associatif sur la santé, le Droit au savoir ou encore le Comité d'entente des associations représentatives de personnes handicapées et de parents d'enfants handicapés.

La stratégie et les actions de l'AFM-Téléthon sont fixées par un Conseil d'administration composé uniquement de malades et de parents de malades.

En 2019, l'Association comptait 2808 bénévoles permanents et 557 salariés, dont 77 % travaillaient directement pour les missions sociales. Un réseau de bénévoles et de salariés est présent sur tout le territoire. Ce réseau est constitué notamment de 150 coordinations (des bénévoles qui coordonnent l'organisation de l'événement Téléthon), de 68 délégations (des bénévoles qui représentent l'Association auprès des instances départementales et qui portent les revendications des malades auprès des décideurs politiques et partenaires institutionnels), et de 17 services régionaux (des professionnels qui accompagnent les malades et leur famille à chaque étape de l'évolution de la maladie). En 2019, ces services régionaux ont accompagné 7 398 malades et leurs familles.

Enfin, l'AFM-Téléthon organise chaque année, avec le soutien de l'Association des Professeurs de Biologie et de Géologie, l'opération 1000 chercheurs dans les écoles, en France et à l'étranger. Cette opération vise à sensibiliser les élèves à la recherche médicale, aux enjeux des nouvelles thérapies pour les maladies génétiques, et à leur faire découvrir les métiers de la science. Il est proposé aux collèges et lycées de recevoir dans leurs classes un chercheur des laboratoires soutenus par l'AFM-Téléthon. L'opération s'adresse aux élèves de 3ème et lycées afin qu'ils aient déjà des bases en génétiques. Cette occasion permet aux chercheurs de présenter leurs travaux et de raconter leur quotidien dans les laboratoires. Différents thèmes sont abordés tels que les maladies génétiques, les maladies rares, la thérapie génique, la thérapie cellulaire ainsi que les avancées récentes en biologie moléculaire. Pour l'élaboration de contenus adaptés, l'AFM-Téléthon bénéficie de l'expertise de l'Ecole de l'ADN à Généthon qui, depuis 1998, organise des animations et des formations auprès du grand public et des associations de malades. En 2020, la 8ème édition de l'opération se déroulera dans les établissements scolaires du 2 au 30 novembre.

III. Les laboratoires de l'AFM-Téléthon

En plus des 200 programmes de recherche qu'elle soutient chaque année, l'AFM-Téléthon a créé ses propres laboratoires, seule ou en partenariat avec la recherche publique. Depuis 2011, ces laboratoires sont rassemblés au sein de l'Institut des biothérapies des maladies rares. Cet institut a pour mission d'accélérer la mise à disposition des traitements innovants pour les malades. Il permet de mieux coordonner les projets transversaux, en particulier les essais cliniques. Il est considéré comme un exemple dans le domaine de la recherche translationnelle, allant de la recherche fondamentale à la mise à disposition des traitements.

L'institut des biothérapies des maladies rares est composé de 3 laboratoires leaders dans leur domaine respectif : Généthon pour la thérapie génique des maladies rares, I-Stem pour les cellules souches et la thérapie cellulaire des maladies monogéniques, et l'Institut de Myologie pour la recherche et le traitement des maladies du muscle. De plus, en partenariat avec Bpifrance, l'AFM-Téléthon a créé en 2016

YposKesi, le premier acteur industriel français dédié au développement et à la production de médicaments de thérapies innovantes.

I. GÉNÉTHON

Créé en 1990 par l'association de familles de malades (l'Association Française contre les Myopathies), Généthon est l'un des premiers laboratoires à avoir étudié le génome humain. Les équipes de recherche de ce laboratoire ont publié en 1992 les premières cartes du génome humain. Ces cartes ont été le point de départ du décryptage du génome humain qui s'est achevé en 2003. Grâce aux nouvelles cartographies disponibles, Généthon s'est lancé dans la localisation et l'identification des gènes responsables des maladies génétiques. Grâce à ce travail, des gènes impliqués dans plus d'une centaine de pathologies héréditaires ont été identifiés.

Généthon a ensuite concentré ses recherches sur l'étude et le développement des vecteurs de thérapie génique, c'est-à-dire le moyen de délivrer au patient les gènes médicaments. Ainsi, ces nouvelles investigations se sont portées sur les vecteurs viraux adéno-associés (AAV) ainsi que sur les vecteurs rétroviraux et lentiviraux. Ces nouvelles connaissances en vectorologie et sur la génétique de certaines maladies ont permis à Généthon de commencer différents programmes précliniques qui ont mené aux premiers essais cliniques chez l'Homme. En 2004, des chercheurs de Généthon sont parvenus à restaurer la dystrophine dans les muscles d'un modèle murin de la Dystrophie Musculaire de Duchenne par saut d'exon (Goyenvallée et al., 2004). Ce résultat a marqué le début d'une série de victoires pour la recherche contre les maladies rares. En 2006, Généthon a obtenu sa première autorisation d'essai de thérapie génique chez des patients humains. Généthon a reçu en 2012, le prix Galien France de la Recherche Pharmaceutique pour ses traitements innovants en thérapie génique. En 2013, il a obtenu le statut d'établissement pharmaceutique accordé par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM).

Aujourd'hui, Généthon s'intéresse plus particulièrement au développement préclinique et clinique de médicaments de thérapies géniques, ainsi qu'à la recherche de méthodes de production, de purification et d'optimisation des vecteurs viraux,

principal facteur limitant de la thérapie génique à grande échelle. La mission globale de Généthon est donc de mettre à la disposition des patients atteints de maladies rares, des traitements de thérapie génique efficaces à un prix juste et maîtrisé.

Une maladie rare est une maladie touchant moins d'une personne sur 2000. Jusqu'à présent, entre 6000 et 8000 maladies rares ont été dénombrées concernant au total, 30 millions d'Européens. Ces maladies ont une origine génétique pour 80% d'entre-elles, 65% sont graves, chroniques, évolutives, lourdement invalidantes et mortelles. Elles touchent en majorité les enfants. A ce jour, Généthon a permis la mise sur le marché d'un traitement contre l'amyotrophie spinale infantile. L'association réalise également des essais cliniques pour près d'une dizaine de maladies rares de la vision, du foie, du sang, de système immunitaire et du muscle. De plus, sept autres sont en phase de préparation aux essais cliniques pour 2020 à 2023 (site internet AFM-Téléthon consulté le 08/09/2020).

Aujourd'hui dirigée par Frédéric Revah, Généthon est un laboratoire ayant un budget d'environ 38 millions d'euros par an financé en partie par l'AFM-Téléthon et qui compte près de 200 collaborateurs. Généthon regroupe différents départements notamment les départements de recherche, de développement préclinique et clinique, et d'innovation technologique. Les départements de recherche thérapeutique assurent la conception de nouvelles approches de thérapie génique. Le département de développement préclinique se compose d'une plate-forme d'exploration fonctionnelle, d'une plate-forme d'imagerie-cytométrie, et d'un groupe d'évaluation histologique, formant à eux trois une plate-forme d'évaluation thérapeutique préclinique. Le département d'innovation technologique vise à améliorer les méthodes de production des vecteurs ainsi que leur qualité en terme d'infectivité, afin d'en faire baisser significativement le coût.

Le département de recherche et développement, organisé comme présenté ci-dessous (Figure 1), héberge une unité Inserm, dirigée par le Dr. Anne Galy. En effet, la recherche Académique est menée au sein de cette Unité Mixte de Recherche de l'INSERM S951 (UMR_S951) nommée INTEGRARE. Cette unité est divisée en différents laboratoires en fonction du type de pathologie étudiée.

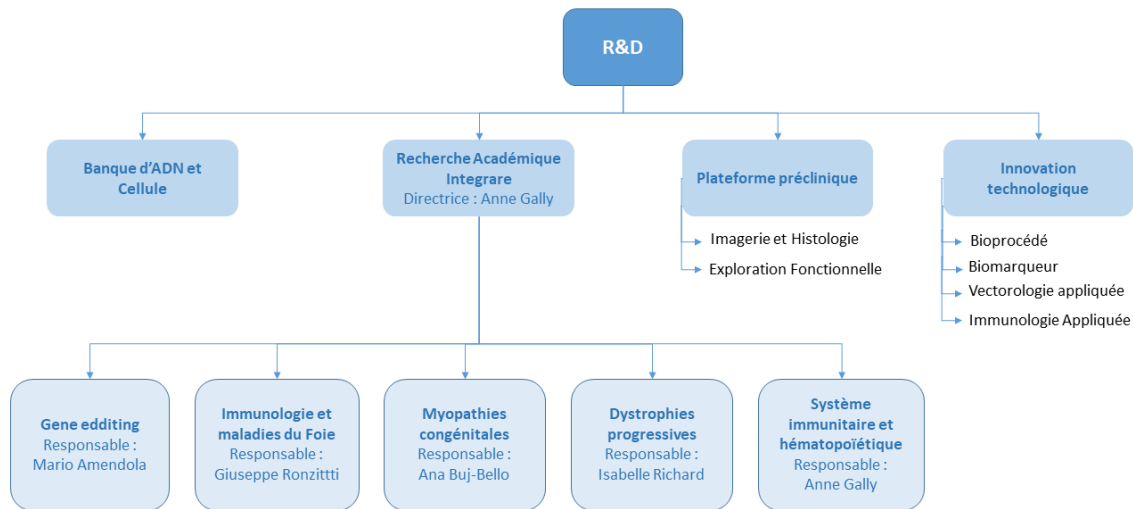


Figure 1 : Organigramme du département de recherche et développement de Généthon

L'étude des maladies neuromusculaires est un des axes principaux de la recherche à Généthon. Celles-ci représentent environ 200 pathologies qui touchent 30 000 à 40 000 malades en France. Dans cet ensemble de pathologies figurent les dystrophies musculaires. Ces maladies sont caractérisées par une atrophie progressive du muscle squelettique d'ue à la destruction des fibres musculaires et à l'absence de régénération. Les fibres dégénérées sont remplacées par de la graisse et du tissu fibreux (Sewry et al. 2010). Il existe plus de 80 dystrophies musculaires. La plus connue est la myopathie de Duchenne. Parmi ces dystrophies musculaires, certaines touchent préférentiellement les muscles au niveau des ceintures scapulaires et pelviennes, appelées les dystrophies des ceintures. Un des laboratoires de Généthon est spécialement dédié à l'étude de ces dystrophies : le laboratoire Dystrophies Musculaires Progressives, dirigé par le Dr Isabelle RICHARD. C'est au sein de ce laboratoire que cette étude d'optimisation d'une approche de thérapie génique sur les gamma-sarcoglycanopathies a été réalisée.

D'autre part, pour accélérer le développement de ses produits, Généthon développe une politique de collaborations internationales à travers notamment des institutions académiques et des partenariats industriels. De plus, Généthon est le coordinateur du Consortium Préindustriel des vecteurs de Thérapie Génique (PTG) qui a pour objectif de développer des procédés de bioproduction validés à une échelle préindustrielle. Généthon détient également la banque d'ADN et de cellules la plus importante d'Europe pour les maladies génétiques humaines. Enfin, Généthon assure, grâce à l'équipe de l'École de l'ADN, une formation permanente sur les méthodes et

les enjeux de la recherche fondée sur les technologies du génome et de la science de l'ADN.

II. INSTITUT DE MYOLOGIE

L'Institut de Myologie a été créé à Paris, en 1996, au cœur de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, et regroupe 250 professionnels (médecins, chercheurs, ingénieurs et personnels soignants). Ce centre de référence international, assure différentes missions telles que la recherche fondamentale et clinique, les soins et l'enseignement, dans le but de promouvoir l'innovation thérapeutique pour les malades neuromusculaires (www.institut-myologie.org consulté le 12/09/2020). Cet institut comporte 7 pôles d'activité distincts et complémentaires et une activité transversale : l'enseignement. Ces 7 pôles sont composés : de la consultation neuromusculaire, qui est le pôle d'activité principal du centre de référence des maladies neuromusculaires Nord/Est/Ile de France ; du laboratoire d'histopathologie ; du laboratoire de physiologie et d'évaluation neuromusculaire ; du laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire ; du Centre de Recherche en Myologie ; de la Myobank, qui est une banque de tissus pour la recherche ; et enfin de la recherche clinique et des bases de données dont fait partie l'Institut I-Motion.

L'Institut I-Motion est une plateforme de recherche clinique, créée par l'AFM-Téléthon et l'Institut de Myologie à l'Hôpital Armand Trousseau. Cet institut a eu à sa charge en 2018 une vingtaine d'études cliniques. Parmi ces études, 10 portaient sur la Dystrophie Musculaire de Duchenne, 5 sur l'Amyotrophie spinale proximale, 3 sur les myopathies myotubulaires et centro-nucléaires et 2 sur la maladie de pompe. L'institut I-Motion est reconnu désormais comme le centre expert pour ces nouvelles technologies.

En 2018, au sein de l'institut de myologie, deux projets majeurs ont pu être lancés grâce à l'arrivée de financements extérieurs très importants. Le premier projet s'intitule RESPIMYO et a pour but d'évaluer le diaphragme par des techniques non invasives, en lien avec le service de pneumologie de la Pitié Salpêtrière. Le second projet s'appelle ASSISTMYO et a pour objectif de réaliser l'évaluation d'outils de compensation et à terme, de mettre en place une plateforme de compensation pour

les patients. Aujourd'hui, l'Institut de myologie porte également le projet de création d'une fondation de myologie.

III. I-STEM

I-Stem « Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Étude des maladies Monogéniques », créé en 2005 par l'AFM-Téléthon et l'Inserm est le plus grand laboratoire de recherche français sur les cellules souches et la thérapie cellulaire des maladies monogéniques. Ses 71 collaborateurs travaillent à l'élaboration de traitements fondés sur le potentiel thérapeutique des cellules souches tels que les greffes de cellules souches pour le traitement de maladies neurodégénératives, neuromusculaires, de la peau ou de la rétine ; et le criblage à haut débit de molécules sur des modèles cellulaires de la progéria, la maladie de Huntington, la maladie de Lesch Nyan ou encore la dystrophie musculaire de Steinert (www.istem.eu consulté le 24/09/2020).

La première mission d'I-STEM est d'identifier par une recherche fondamentale ciblée, les conditions dans lesquelles des approches thérapeutiques de maladies monogéniques peuvent être élaborées à partir de l'étude des cellules souches. Ceci dans le but de promouvoir ces approches jusqu'au transfert de nouvelles thérapies vers la recherche clinique. Sa seconde mission est de promouvoir la recherche sur les maladies monogéniques, par la mise à disposition de ses ressources biologiques et technologiques, ainsi que de son savoir-faire, auprès d'équipes extérieures pertinentes.

I-STEM est organisé, depuis 2009, en deux entités de recherche administrativement distinctes. Il s'agit pour la première entité, d'un laboratoire académique sous la forme d'une Unité Mixte de Recherche sous la tutelle de l'INSERM, de l'UEVE et du CECS (Centre d'Étude des Cellules Souches). La seconde entité est le CECS, en tant que laboratoire privé financé principalement par l'AFM-Téléthon. Le CECS est une association loi 1901 qui a été créée par l'AFM-Téléthon en 2005, afin de mener à bien sa stratégie à travers la réalisation des programmes de recherche scientifique de l'Institut. Le Conseil d'Administration du CECS représente

les membres de l'association qui sont l'AFM-Téléthon, Généthon et l'Institut de Myologie (tiré de la synthèse d'activité 2018 www.istem.eu).

IV. YPOSKESI

YposKesi a été créé en 2016 par l'AFM-Téléthon et le fonds SPI (Sociétés de Projets Industriels) géré par Bpifrance dans le cadre du Programme d'Investissement d'Avenir. YposKesi est le premier industriel pharmaceutique français consacré au développement et à la production de médicaments de thérapies innovantes. Cette plateforme est indispensable pour permettre à l'AFM-Téléthon de passer au stade industriel afin d'accroître les capacités de production en thérapie génique et de développer la production de médicaments de thérapie cellulaire. Elle répond aux besoins des laboratoires de l'AFM-Téléthon et des acteurs académiques et industriels des biotechnologies, pour les essais cliniques ou pour une diffusion post-AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) des médicaments issus des biothérapies.

Les premières productions d'YposKesi concernent des lots de médicaments de thérapie génique pour des essais cliniques concernant la myopathie de Duchenne, des maladies du système immunitaire comme le Syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) et la Granulomatose Septique Chronique, ou encore des maladies du sang comme l'anémie de Fanconi. Les premières productions en thérapie cellulaire, dès que les capacités de production seront disponibles, concerneront les rétinites pigmentaires et les ulcères drépanocytaires. A l'horizon 2021, des dizaines de lots de médicaments de thérapie génique et cellulaire seront produits chaque année pour traiter quelques dizaines à quelques milliers de patients selon les pathologies (afm-telethon.fr consulté le 24/09/2020).

Introduction

I. Physiologie du muscle

Le muscle squelettique est l'un des tissus les plus dynamiques et les plus élastiques du corps humain. Chez l'homme, le muscle squelettique représente environ 40% du poids corporel total. Il est principalement composé d'eau (75%), de protéines (20%) et d'autres substances telles que des sels inorganiques, des minéraux, des graisses et des glucides (5%) (Frontera et al. 2015). En général, la masse musculaire dépend de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines. Ces deux processus sont sensibles à différents facteurs notamment l'état nutritionnel, l'équilibre hormonal, l'activité physique, les blessures ou les maladies.

Le muscle squelettique contribue à de multiples fonctions corporelles. D'un point de vue métabolique, les rôles du muscle squelettique comprennent une contribution au métabolisme énergétique de base, servant de stockage pour des substrats importants tels que les acides aminés et les glucides, la production de chaleur pour le maintien de la température corporelle, et la consommation de la majorité de l'oxygène et du carburant pendant l'activité physique (Frontera et al. 2015).

D'un point de vue mécanique, la fonction principale du muscle squelettique est de convertir l'énergie chimique en énergie mécanique pour générer de la force et de la puissance, maintenir la posture et produire un mouvement. Par conséquent, toute altération de la fonction musculaire squelettique entraîne un certain degré d'instabilité ou d'immobilité. Une altération de la fonction musculaire entraîne un impact sur la qualité de vie, une participation réduite aux activités récréatives et enfin, une capacité réduite à effectuer les activités de la vie quotidienne et à conserver son indépendance (Brooks, 2003).

I. Les différents types de muscles

Le muscle est un tissu formé de fibres capables de se contracter permettant de produire un mouvement. Les muscles participent à diverses fonctions essentielles à la vie de l'organisme (respiration, digestion...) et à son adaptation au milieu environnant (locomotion, thermorégulation...). Deux grands groupes de muscles se distinguent : les muscles rouges, striés volontaires et les muscles blancs, lisses involontaires. Les caractéristiques fonctionnelles et anatomiques des différents muscles permettent de

les subdiviser en quatre grandes catégories : les muscles lisses, le muscle strié cardiaque, les muscles striés squelettiques et les muscles striés à insertion conjonctive (institut-myologie.org).

	Muscle lisse	Muscle strié cardiaque	Muscle strié squelettique	Muscle strié à insertion conjonctive
Fibres	Allongées disposées en couche mince	Striées	Striées	Striées
Noyaux	Un seul noyau central	Un seul noyau central	Multinuclée (syncitium), noyaux périphériques	Multinuclée (syncitium)
Myofibrilles	Dans l'axe de la cellule (longitudinale)	Groupées, divisées dans le sens longitudinal en disques sombres et clairs alternés	Groupées, divisées dans le sens longitudinal en disques sombres et clairs alternés	Groupées, divisées dans le sens longitudinal en disques sombres et clairs alternés
Contraction	Involontaire lente	Involontaire	Volontaire	Mixte
Localisation	Parois viscères creux, vaisseaux sanguins	Myocarde		Sphincters, autres

Tableau 1 : Les différents types de muscles.

a. Muscle lisse

Les muscles lisses sont présents dans la paroi de tous les vaisseaux sanguins (sauf les plus petits), et dans la paroi de nombreux organes (intestins, utérus, etc...). Ils forment des couches denses qui tapissent la paroi interne des vaisseaux et des organes creux et ne montrent pas de stries transversales. Ils sont constitués de cellules fusiformes mononucléées de taille variable (20 à 200 μm) dont le noyau est en position centrale, appelées fibres musculaires lisses (institut-myologie.org). Les muscles lisses sont sous le contrôle du système nerveux neurovégétatif (ou système autonome) qui ne répond pas au contrôle de la volonté. Les fibres nerveuses du système autonome présentent, dans le muscle lisse, des varicosités axonales qui se présentent sous la forme de renflements en forme de bulbe. Ces varicosités libèrent les neuromédiateurs nécessaires à la stimulation des fibres musculaires lisses dans une fente relativement large : les jonctions diffuses. Cette stimulation induit ainsi la contraction des fibres musculaires lisses. Une contraction rythmique caractérise les muscles lisses unitaires ou muscles viscéraux qui ne sont pas adaptés à la réalisation de mouvements fins. Ces muscles sont impliqués dans le péristaltisme.

b. Muscle strié cardiaque

Le muscle strié cardiaque est un muscle creux constitué de myocytes de contraction involontaire, rythmique et automatique qui forment un réseau tridimensionnel dans le myocarde. Les cardiomyocytes ont une forme de cylindre dont les extrémités forment des bifurcations avec les cellules adjacentes formant ce réseau tridimensionnel. Ils possèdent chacun un noyau central allongé dans le sens longitudinal de la cellule. Les striations observées dans le sarcoplasme des cardiomyocytes sont semblables à celles observées dans le muscle strié squelettique. Les extrémités des fibres adjacentes sont accolées l'une à l'autre au niveau d'une structure appelée disque intercalaire.

Le muscle cardiaque est très dépendant du métabolisme oxydatif et est continuellement actif. Par conséquent, le flux sanguin nécessaire à son fonctionnement est très important. L'innervation du muscle cardiaque est de deux types : l'innervation intrinsèque et l'innervation extrinsèque. La première, effectuée par

l'intermédiaire du tissu nodal, 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, intervient dans la régulation de l'activité du tissu nodal et ainsi peut moduler le rythme cardiaque. Cette innervation passe par l'intervention du système nerveux autonome sur la modulation de l'influx nerveux au niveau des nœuds.

c. Muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique est le muscle qui se fixe au squelette par l'intermédiaire du tendon, et permet le mouvement de celui-ci dans une direction bien définie grâce à sa fonction essentielle de contraction. Il présente des striations à la fois transversales et longitudinales. Les fibres musculaires sont des cellules plurinucléées de forme polygonale dont les noyaux se situent en périphérie de la fibre, accolés à la membrane sarcoplasmique. Une fibre musculaire squelettique est un syncytium vrai, c'est à dire un ensemble de protoplasmes ayant fusionnés entre eux. La fibre musculaire striée squelettique présente donc les caractéristiques fonctionnelles d'une cellule géante (1-5 cm de long, 10-100 μ m de diamètre).

La vascularisation des fibres du muscle strié squelettique est effectuée via un réseau anastomotique de capillaires indispensable à l'oxygénation des tissus. Il s'agit d'un réseau à mailles rectangulaires autour des fibres musculaires. La densité de ce réseau est dépendante du type de la fibre concernée. Les fibres musculaires striées sont innervées par les motoneurones dont le corps cellulaire est présent au niveau de la corne antérieure de la moelle épinière. Le muscle strié squelettique est un muscle à contraction volontaire. L'intensité de la contraction du muscle dans son ensemble est fonction du nombre d'unités motrices qui ont été activées.

II. Origine du développement du muscle squelettique

Les muscles squelettiques proviennent du mésoderme para-axial, un tissu qui se forme dans le blastopore pendant la gastrulation, puis dans le bourgeon de la queue lors de l'élongation de l'axe embryonnaire (Figures 2A et 2B). Le mésoderme para-axial naissant constitue le mésoderme présomitique à l'extrémité postérieure de l'embryon. Le mésoderme présomitique est un tissu transitoire qui est ensuite subdivisé en une région postérieure immature et une région antérieure constituée de segments qui formeront les somites. C'est au sein des somites que la myogenèse squelettique est initiée avec la spécification des progéniteurs prémyogènes et des myoblastes squelettiques. Plusieurs phases de prolifération et de différenciation conduisent à la formation de myofibres multinucléées à partir de la fusion de myocytes mononucléés (Chal et al., 2017).

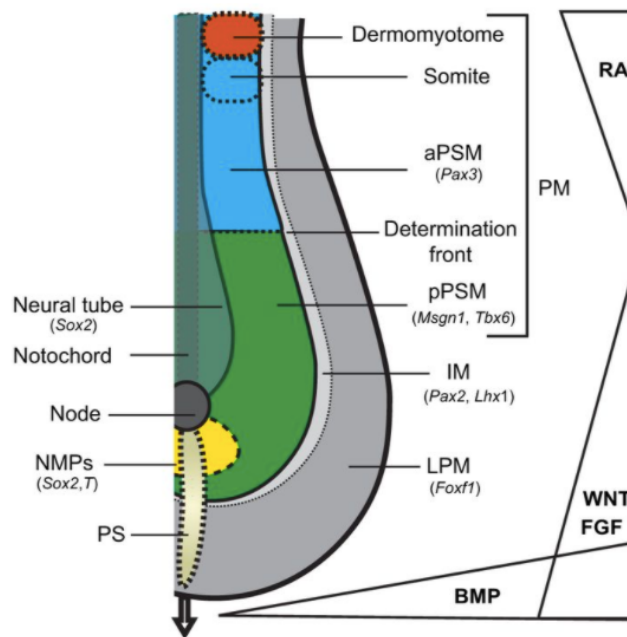


Figure 2 A : Organisation spatiale du développement de mésoderme dans la région postérieure de l'embryon (Chal et al., 2017).

aPSM : mésoderme présomitique antérieur

pPSM : mésoderme présomitique postérieur

PS : ligne primitive

PM : mésoderme para-axial

IM : mésoderme intermédiaire

LPM : plaque latérale du mésoderme

RA : acide rétinoïque

NMPs : progéniteurs neuro-mésodermiques

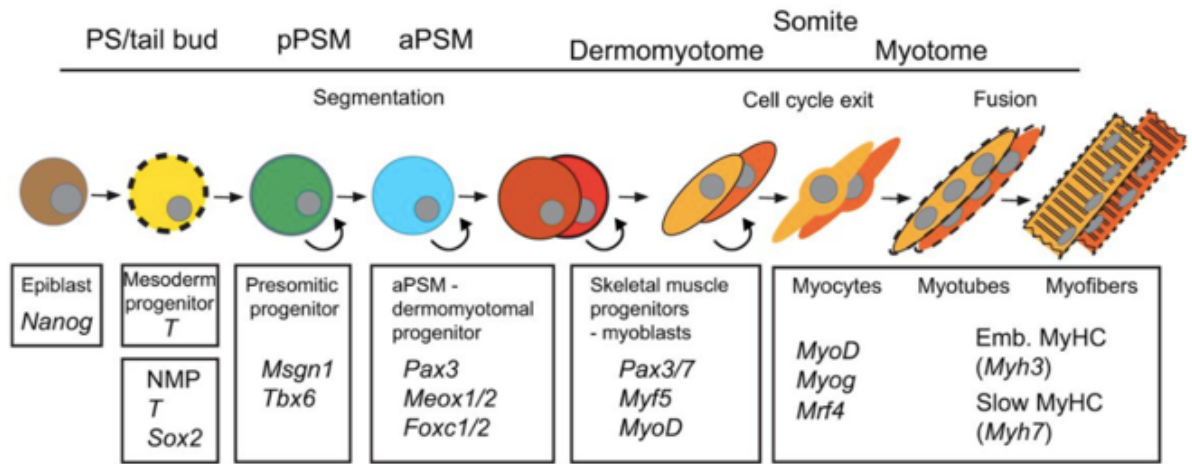


Figure 2 B : Formation et différenciation du mésoderme para-axial (Chal et al., 2017).
Emb : embryonique

II. Structure du muscle squelettique

L'architecture du muscle squelettique est caractérisée par une disposition particulière des fibres musculaires (également appelées myofibres ou cellules musculaires) et du tissu conjonctif associé (Frontera et al., 2014). Les fibres musculaires sont multinucléées (Figure 3).

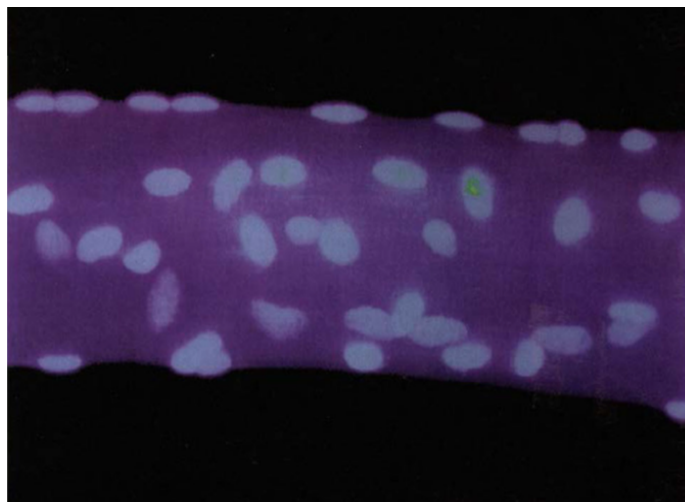


Figure 3 : Noyaux sur la longueur d'une fibre musculaire, colorés avec un colorant fluorescent qui se lie à l'ADN, et visualisés par microscopie confocale (Frontera et al., 2014).

Un muscle individuel est entouré d'une couche de tissu conjonctif appelé épimysium (Figure 4). Un groupe de fibres à l'intérieur de ce muscle est disposé en faisceaux et entouré d'une autre couche de tissu conjonctif connue sous le nom de pérимыsium. Chaque fibre musculaire est entourée d'une membrane cellulaire appelée sarcolemme (Frontera et al., 2014). Au sein de ces fibres musculaires, les deux protéines les plus abondantes sont l'actine et la myosine, représentant environ 70 à 80 % de la teneur totale en protéines d'une seule fibre. Ces deux protéines sont incorporées respectivement dans des filaments épais et fins, qui sont disposés en bandes répétées longitudinalement appelées sarcomères (Brooks et al., 2003). Les sarcomères en série forment des myofibrilles, et de nombreuses myofibrilles parallèles existent dans chaque fibre (Figure 4).

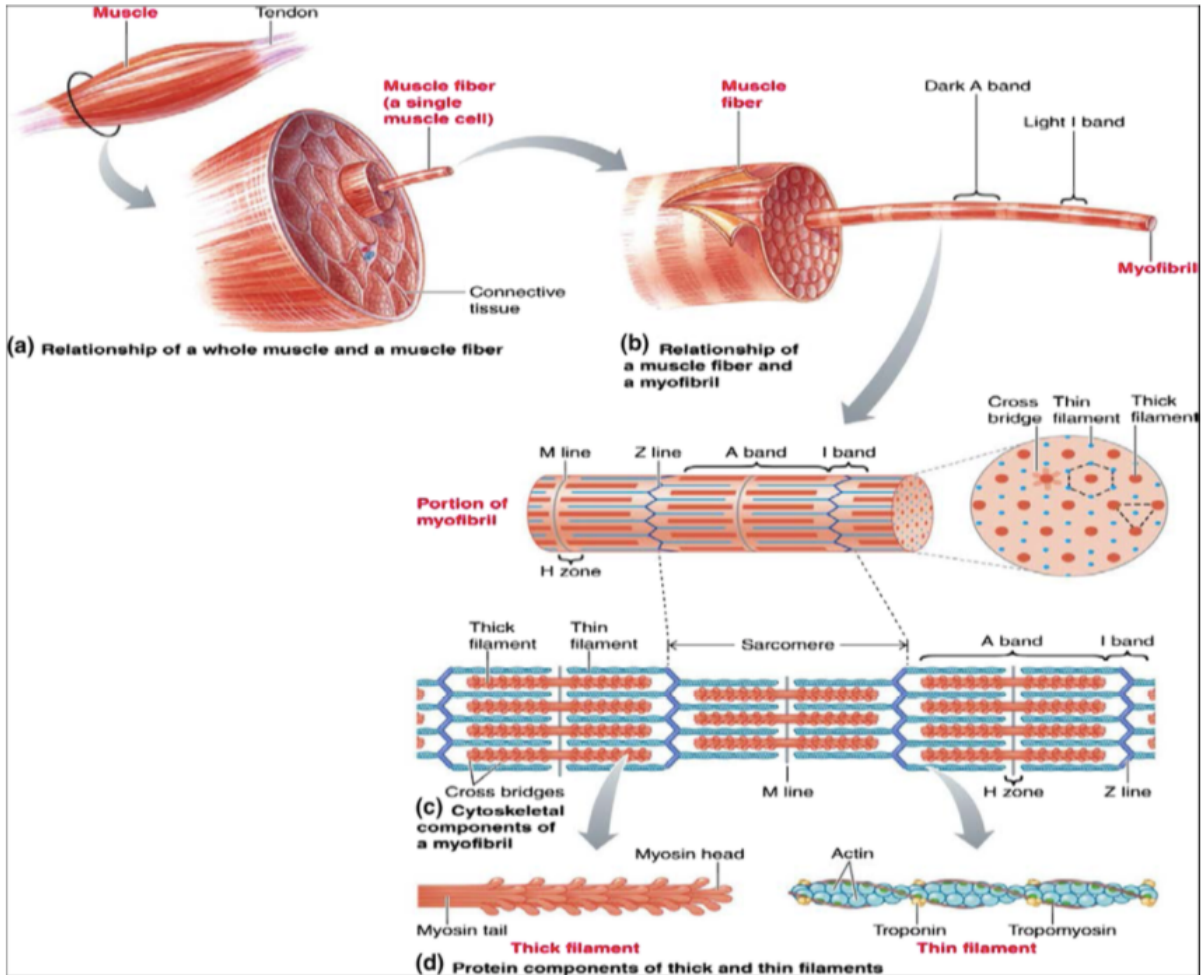


Figure 4 : Structure du muscle squelettique (Raven et al., 2013)

La myosine est le principal moteur moléculaire. La myosine musculaire est un hexamère composé de deux chaînes lourdes et de deux paires de chaînes légères (Figure 5).

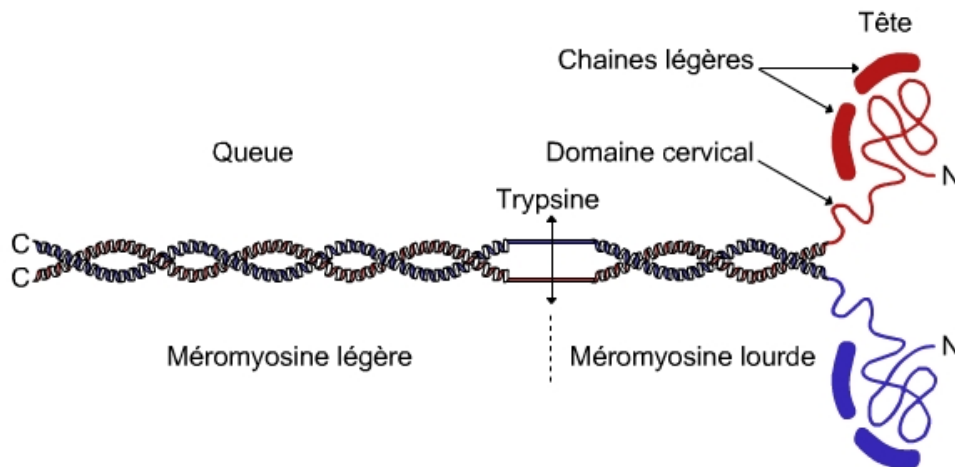


Figure 5 : Structure de la molécule de myosine II (planet-vie.ens.fr)

Les extrémités COOH-terminales des chaînes lourdes forment une bobine enroulée de deux hélices qui s'agrègent dans la cellule pour créer le squelette des filaments épais. Le reste de la molécule de myosine se projette vers l'extérieur à partir du filament épais, formant la partie de pont transversal de la molécule à laquelle les chaînes légères sont liées de manière non covalente (Brooks et al., 2003). La tête de myosine correspond à une partie du pont transversal et est responsable des fonctions motrices de la molécule, c'est-à-dire la capacité de produire du mouvement et de la force. La tête de myosine est constituée de trois domaines fonctionnels principaux. Le domaine « catalytique » NH₂-terminal contient à la fois le site de liaison à l'actine et le site actif pour l'hydrolyse de l'ATP. Le domaine « cervical » hélicoïdal long s'étend vers la queue de la molécule et semble être stabilisé par son interaction avec les deux chaînes légères. Enfin, entre les domaines se trouve le domaine « convertisseur » (Figure 6).

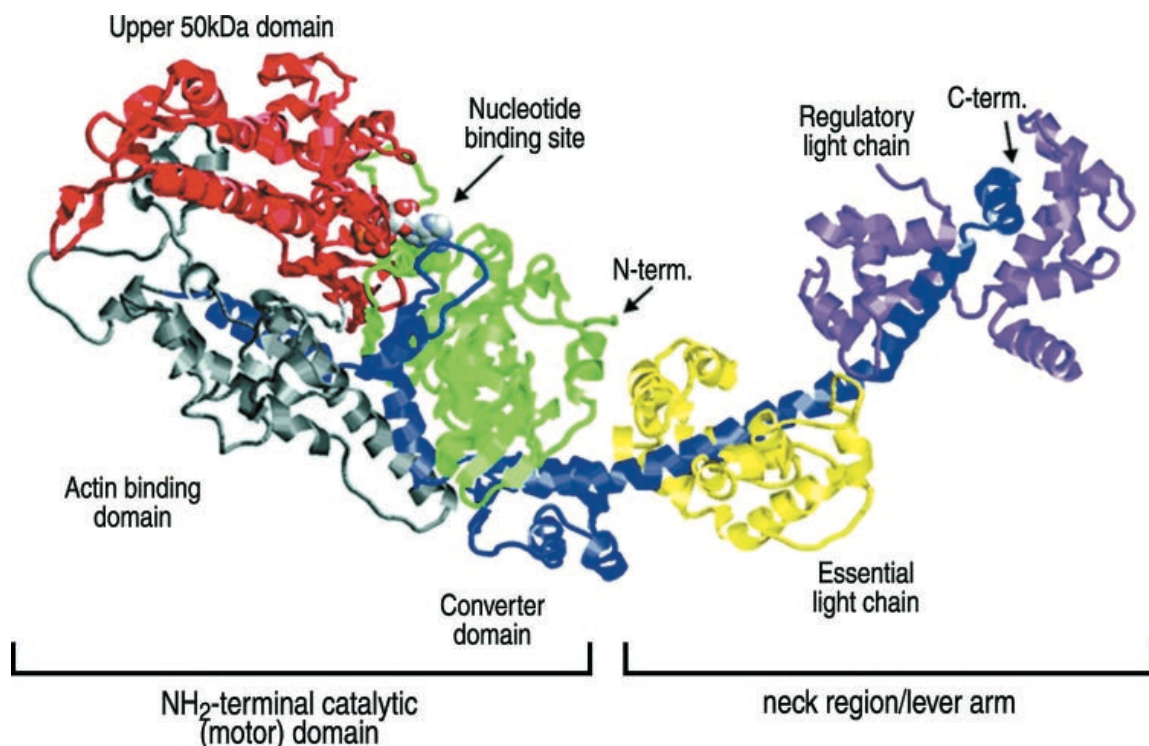


Figure 6 : Représentation de la structure cristallographique aux rayons X de la tête de myosine (Brooks et al., 2003). Les segments vert, rouge, gris et bleu constituent la chaîne lourde ; les segments jaune et violet constituent quant à eux les chaînes légères.

Le sarcomère et le sarcoplasme contiennent de nombreuses autres protéines qui contribuent à la structure du cytosquelette, au couplage des processus d'excitation et de contraction, à la libération d'énergie et à la génération de force et de puissance. L'actine est une protéine très importante qui intervient dans plusieurs processus. C'est une protéine musculaire qui agit en synergie avec la myosine dans le processus de la contraction musculaire. Elle est également présente dans le cytosquelette de toutes les cellules, où elle participe notamment aux mouvements internes (comme le déplacement des chromosomes lors de la division cellulaire) et aux déformations de la membrane cellulaire.

Les protéines régulatrices telles que le complexe de la troponine et la tropomyosine ont un rôle important dans le processus d'activation qui conduit au glissement du myofilament. La titine et la nébuline sont deux protéines qui contribuent aux propriétés mécaniques et physiologiques du muscle. La titine est une grande protéine élastique qui se fixe au disque Z du sarcomère et à la myosine. Celle-ci a pour rôle d'aider à stabiliser et à aligner le filament épais. La nébuline, en revanche, est intégrée à d'autres protéines dans les filaments fins contenant de l'actine (Ottenheim et al., 2010) et (Monroy et al., 2012). Le disque Z du sarcomère contient plusieurs protéines dont l' α -actinine et sert de point d'attache pour le myofilament d'actine. D'autres protéines relient le disque Z (par exemple la desmine) au sarcolemme et à la matrice extracellulaire.

D'autres éléments cellulaires sont présent dans le sarcoplasme des fibres musculaires, notamment un système tubulaire transverse (tubule T), un réticulum sarcoplasmique et un réseau mitochondrial; la quantité exacte de ces éléments dépend du type de fibre (Figure 7). Le système tubulaire T est une invagination du sarcolemme dont le rôle important est la conduction nerveuse du potentiel d'action vers l'intérieur de la cellule. Ce réseau de tubules est en contact avec l'extérieur de la cellule et garantit que l'excitation peut se propager uniformément dans toute la fibre. La dysferline est une protéine importante localisée dans la membrane du système tubulaire T et est sensible aux changements de concentration de calcium dans la cellule (Kerr et al., 2014). Le réticulum sarcoplasmique est responsable du stockage, de la libération et de la recapture du calcium. Les mitochondries forment un réseau tridimensionnel dans toute la cellule qui génère l'énergie nécessaire aux actions musculaires lorsque l'oxygène est mis à la disposition de la fibre musculaire.

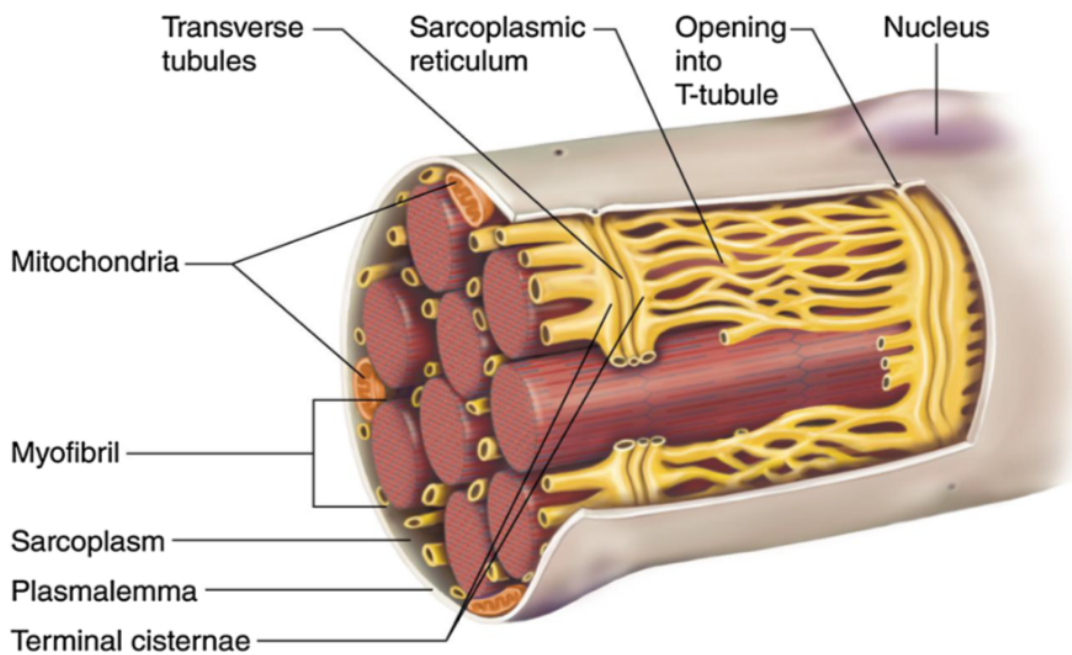


Figure 7 : Systèmes de tubules transverse et réticulum sarcoplasmique (Frontera et al., 2014).

Un complexe de plusieurs protéines existe au niveau du sarcolemme, appelé complexe des protéines associées à la dystrophine (DGC). La dystrophine est une grande protéine sous-sarcolemmale associée aux filaments d'actine intracellulaires par son domaine N-terminal, à l'élément membranaire β -dystroglycane (β -DG) par ses domaines intermédiaires et aux syntrophines par son domaine C-terminal. En plus d'un rôle structurel, le DGC est important pour d'autres fonctions telles que pour la transduction du signal de la matrice extracellulaire à l'intérieur de la cellule, et pour assurer l'intégrité de la jonction neuromusculaire. La dystrophine est impliquée dans des cascades de signalisation cellulaire soit directement, en régulant des protéines membranaires telles que les canaux calciques, soit indirectement, par l'intermédiaire des voies de signalisation calciques ou de l'oxyde nitrique.

La classification la plus fréquemment utilisée pour les muscles des membres humains adultes comprend trois types de fibres : type I (lent, oxydatif, résistant à la fatigue), IIA (rapide, oxydant, propriétés métaboliques intermédiaires) et IIB (plus rapide, glycolytique, fatigable). Une seule fibre musculaire peut exprimer, simultanément, plus d'un type de chaîne lourde de myosine; par exemple de type I et

IIA ou IIA et IIB ensemble (Schiaffino et al., 2011). Un changement dans l'expression de la chaîne lourde de myosine d'une seule fibre peut résulter de la transcription de différents ARNm dans différents domaines nucléaires.

I. Contractions musculaires

Un peu moins de la moitié de la masse corporelle est constituée de muscles squelettiques, la plupart des muscles étant liés aux os par des tendons à travers lesquels les forces et les mouvements développés lors des contractions sont transmis au squelette (Brooks et al., 2003). Une fibre musculaire est innervée par une seule branche d'un motoneurone, tandis qu'un seul motoneurone se branche pour innerver de nombreuses fibres musculaires. Un nerf moteur, ses branches et les fibres musculaires innervées par les branches constituent une unité motrice. L'unité motrice est le plus petit groupe de fibres dans un muscle qui peut être activé volontairement. L'activation d'une unité motrice se produit lorsque des potentiels d'action émanant du cortex moteur dépolarisent les corps cellulaires des motoneurones. La dépolarisation génère un potentiel d'action dans un motoneurone qui est transmis à chaque fibre musculaire de l'unité motrice, et chaque fibre se contracte alors plus ou moins simultanément. Les unités motrices varient en taille, allant de petites unités avec seulement quelques dizaines de fibres musculaires à de grandes unités contenant plusieurs milliers de fibres (Brooks et al., 2003).

La contraction est la fonction essentielle des muscles squelettiques. En effet, ces contractions génèrent la stabilité et la puissance pour tous les mouvements du corps. Elles résultent du glissement des filaments fins et épais les uns contre les autres. Elles sont liées à l'excitation des fibres musculaires par les motoneurones, et se produisent lorsque l'augmentation de la concentration de calcium cytosolique déclenche une série d'évènements moléculaires :

Le potentiel d'action qui arrive à la membrane d'une fibre musculaire est conduit à l'intérieur de la cellule musculaire via le système tubulaire transversal (tubule T). L'impulsion nerveuse arrive dans la triade où le tubule T est à proximité immédiate des

citernes terminales du réticulum sarcoplasmique qui stocke le calcium. Une sous-unité de détection de tension des récepteurs de la dihydropyridine sur le tubule T s'ouvre et permet un courant entrant de calcium. Ce courant calcique déclenche l'ouverture des récepteurs de la ryanodine dans les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique et libère de grandes quantités de calcium dans le sarcoplasme. Le calcium libéré dans le sarcoplasme se lie alors à la protéine régulatrice troponine C sur le myofilament fin d'actine. Cela déclenche une série d'événements moléculaires qui déplacent la tropomyosine bloquant le site actif du filament d'actine. De cette séquence d'événements résulte le glissement des filaments d'actine et de myosine et ainsi, la génération de force (Frontera, 2014).

Toutes les actions musculaires nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP (Adénosine TriPhosphate). La voie énergétique métabolique utilisée pour produire et maintenir les actions musculaires dépend de la durée et de l'intensité de l'activité. Les trois voies énergétiques de base dans la fibre musculaire sont les réserves d'ATP et de CP (Créatine Phosphate), la glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative (Frontera et al., 2014). La série d'événements qui entraînent la génération de force commence lorsque l'ATP est mis à disposition d'un pont transversal actine-myosine (Figure 8). L'ATP se lie à son site de liaison sur la tête de myosine. L'ATPase, également dans la tête de myosine, hydrolyse l'ATP, ce qui entraîne la transformation de l'ATP en l'Adénosine DiPhosphate (ADP) et le Pi (Phosphate inorganique) et le détachement du pont transversal. La tête de myosine bascule et se lie à une nouvelle molécule d'actine. La libération du Pi déclenche une libération d'énergie et la myosine pousse le filament d'actine. La force est générée pendant cette poussée de puissance. A la fin l'ADP est libéré et la myosine reste liée à l'actine.

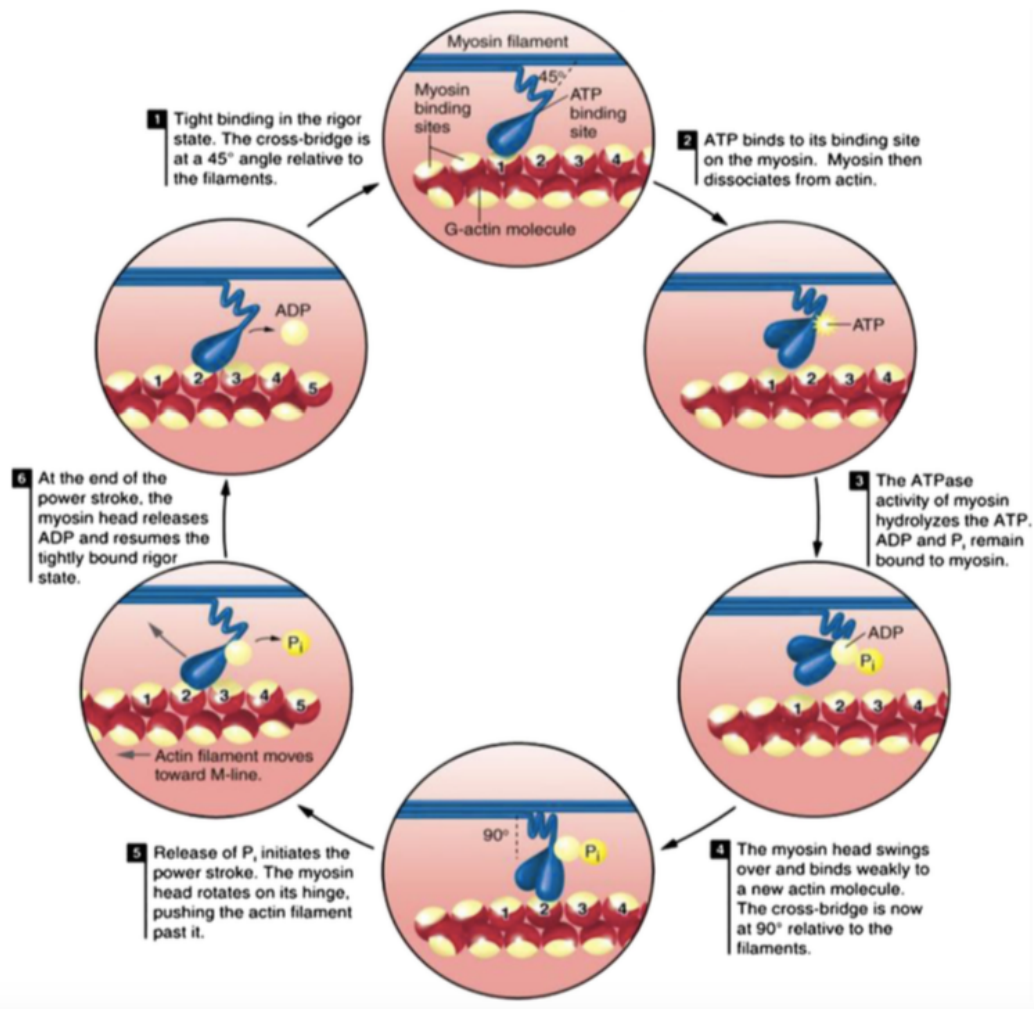


Figure 8 : Séquence des évènements entraînant la génération de force (Frontera et al., 2014).

II. Fonction des fibres musculaires dans les myopathies

Le terme de myopathie désigne une maladie du muscle. Celle-ci peut toucher la structure de la fibre musculaire (myopathie congénitale), les processus chimiques qui permettent à la cellule musculaire d'assurer sa fonction (myopathie métabolique). D'autres maladies musculaires sont désignées par la localisation des muscles atteints (myopathies distales). Les dystrophies musculaires représentent des formes particulières de myopathies. Le terme dystrophie musculaire désigne des myopathies dans lesquelles l'examen du muscle au microscope montre une dégénérescence des cellules musculaires s'accompagnant de la présence de cellules jeunes, témoin d'une régénération de nouvelles cellules tendant à contrebalancer la perte cellulaire due à la dégénérescence.

Ces dystrophies musculaires sont causées par des mutations dans les gènes codant des protéines impliquées dans le complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine ou pour des enzymes qui provoquent des modifications post-traductionnelles de ces protéines (Collins et al., 2010). Les patients présentent une faiblesse musculaire progressive précoce et invalidante des membres. Les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de cette déficience fonctionnelle sont probablement liés à la dégénérescence des fibres musculaires. Il est intéressant de noter que les mutations génétiques du complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine sont corrélées à une réduction de la vitesse de glissement des myofilaments d'actine sur la myosine et à des altérations de la force et de la qualité des fibres musculaires de type I et II.

En plus des dystrophies musculaires, certaines maladies musculaires congénitales sont associées à une altération de la fonction des fibres. C'est le cas des troubles liés à des mutations des gènes codant pour la protéine régulatrice tropomyosine. Par exemple, la mutation faux-sens R133W située dans la région médiane du segment de tropomyosine induit une faiblesse musculaire principalement via des changements dans la force et la qualité des fibres musculaires (Ochala et al., 2010).

III. Dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires sont un ensemble de maladies génétiques rares caractérisées par une atrophie des muscles squelettiques. Les mutations des gènes codant pour plusieurs protéines du complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine (DGC) peuvent conduire à différentes formes de dystrophies musculaires (DM). La dystrophie musculaire la plus connue est la myopathie de Duchenne, mais ce groupe de maladies comprend également d'autres dystrophies comme les dystrophies musculaires des ceintures (ou Limb Girdle Muscular Dystrophy, LGMD), les dystrophies musculaires distales, la dystrophie myotonique ou la dystrophie facio-scapulo-humérale. La prévalence concernant l'ensemble des dystrophies musculaires est estimée entre 19,8 et 25,1 pour 100 000 personnes par an (Theadom et al 2014).

L'absence ou la perturbation du DGC ou de la liaison de ce complexe à la matrice extracellulaire dû à un défaut génétique, compromet l'intégrité des fibres musculaires, conduisant à de multiples cycles de dégénération/régénération du tissu. Le processus de régénération musculaire est réalisé grâce à une population native de cellules souches musculaires, les cellules satellites, qui sont activées lors de la nécrose des fibres et ont la capacité de fusionner avec le tissu musculaire restant et de s'auto-renouveler. Malheureusement, le potentiel de ces cellules pour la réparation musculaire est progressivement perdu et l'installation d'une fibrose et d'une adipogenèse conduit finalement à une diminution de la masse musculaire et de la force. Ces DM conduiront in fine à un décès prématuré dû à des complications cardiaques ou respiratoires.

I. Dystrophies musculaires progressives

Les dystrophies musculaires progressives, comme leur nom l'indique, sont des dystrophies musculaires pour lesquelles la pathologie se développe progressivement au cours de la vie du patient. Dans cet ensemble de DM progressives, les plus fréquentes sont la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), entraînant une atteinte sévère chez le patient, et la dystrophie musculaire de Becker (DMB) dont le phénotype

est plus léger. Ces deux dystrophies sont causées par des mutations dans le gène de la dystrophine, lié à l'X (Ray et al. 1985). La protéine dystrophine possède des sites d'ancrage essentiels pour les protéines structurales du complexe DGC et son absence dans le muscle conduit à l'absence du complexe DGC, à la fragilité des fibres et à une perte progressive de masse et de force musculaires (Emery et al., 1998). Les symptômes de la DMD commencent vers l'âge de 3-4 ans avec des patients souvent en fauteuil roulant à l'âge de 12 ans (Emery et al., 2002). À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif de la DMD et les patients ne survivent généralement pas au-delà de la vingtaine ou de la trentaine.

Les dystrophies des ceintures ou LGMD sont également des dystrophies musculaires progressives. Le phénotype clinique a été décrit pour la première fois en 1954 (Walton et al., 1954) et se caractérise principalement par une altération des muscles de la ceinture scapulaire et de la ceinture pelvienne (Figure 9), des taux élevés de créatine kinase (CK) et une dégénérescence musculaire avec fibrose et inflammation. Les muscles du visage sont rarement atteints mais il peut y avoir une atteinte des muscles respiratoires et cardiaques (Thompson et al., 2016).



Figure 9 : Muscles affectés dans les dystrophies des ceintures (représentés en rouge), (Henriques, 2018).

Il existe une trentaine de types de dystrophies des ceintures selon le gène responsable (Thompson et al., 2016). En effet, plus d'une vingtaine de gènes ont été identifiés comme responsables de différentes formes de LGMD. Ces gènes codent des protéines impliquées dans l'intégrité du DGC, du sarcomère, dans la réparation membranaire ou encore dans la transduction du signal et le trafic intracellulaire. L'âge d'apparition est très variable et la gravité de la maladie très hétérogène. Les LGMD se classent selon le mode de transmission et la cause génétique. Les LGMD de type 1 (LGMD-1) désignent les dystrophies autosomiques dominantes et les LGMD de type 2 (LGMD-2) les autosomiques récessives, cette dernière étant la forme la plus prédominante trouvée chez les patients (Bushby et al., 1995). Dans ce travail, nous nous intéressons aux LGMD-2 et plus particulièrement aux gamma-sarcoglycanopathies (LGMD-2C).

II. Sarcoglycanopathies

Les patients atteints de sarcoglycanopathies ont été initialement diagnostiqués avec la dystrophie musculaire de Duchenne en raison de leur ressemblance phénotypique. En 1992, Matsumura a montré que cette maladie était différente de Duchenne, car les patients présentaient des niveaux normaux de dystrophine mais une absence de la glycoprotéine 50DAG (α -SG) à la membrane. De plus, la DMD affecte principalement les hommes alors que les sarcoglycanopathies affectent les deux sexes de manière égale. La pathologie a ensuite été nommée Dystrophie musculaire autosomique récessive sévère de l'enfant (SCARMD) (Matsumura et al., 1992) (Roberds et al., 1994). Le terme sarcoglycanopathies a finalement été inventé en 1995 (Ozawa et al., 1995). Ce terme comprend 4 maladies rares appartenant au groupe des dystrophies des ceintures (LGMDs). Des mutations dans les α -SG, β -SG, γ -SG et δ -SG conduisent respectivement à des LGMD2D (Matsumura et al., 1992), LGMD2E (Bonnemann et al., 1995 ; Lim et al., 1995), LGMD2C (McNally et al., 1996) et LGMD2F (Nigro et al., 1996).

Les sarcoglycanopathies représentent 23% des LGMD autosomiques récessives (Ginjaar et al., 2000) et présentent les phénotypes pathologiques

caractéristiques du groupe des LGMD. Environ 20% des patients atteints de γ - et δ -sarcoglycanopathies et 63% des patients atteints de β -sarcoglycanopathies présentent un phénotype cardiaque (Piccolo et al., 2002 ; Semplicini et al., 2015) qui n'est pas corrélé à la sévérité de l'atteinte musculaire (Politano et al., 2001). Aucun problème mental n'est observé chez les patients atteints de sarcoglycanopathies. Étonnamment, la fréquence relative de chaque forme varie énormément selon les zones géographiques. Par exemple, LGMD2F représente environ 14% des sarcoglycanopathies au Brésil alors qu'elle est extrêmement rare ailleurs, et LGMD2C est la forme presque exclusivement présente en Afrique du Nord et dans les populations Roms (Israeli et al., 2019).

III. Gamma-sarcoglycanopathies

La gamma-sarcoglycanopathie, (LGMD2C ou LGMD-R5) est due à des mutations dans le gène γ -sarcoglycane (SGCG) codant pour la protéine γ -sarcoglycane. Cette protéine (SGCG) est une glycoprotéine transmembranaire à un seul passage avec un poids moléculaire de 35 kDa. Elle est composée d'un petit domaine intracellulaire localisé à l'extrémité N terminale, d'un domaine transmembranaire et d'un grand domaine extracellulaire contenant des sites de N-glycosylation (Israeli et al., 2019). Celle-ci est intégrée au sein du complexe des protéines sarcoglycanes présent dans les muscles striés (Figure 10).

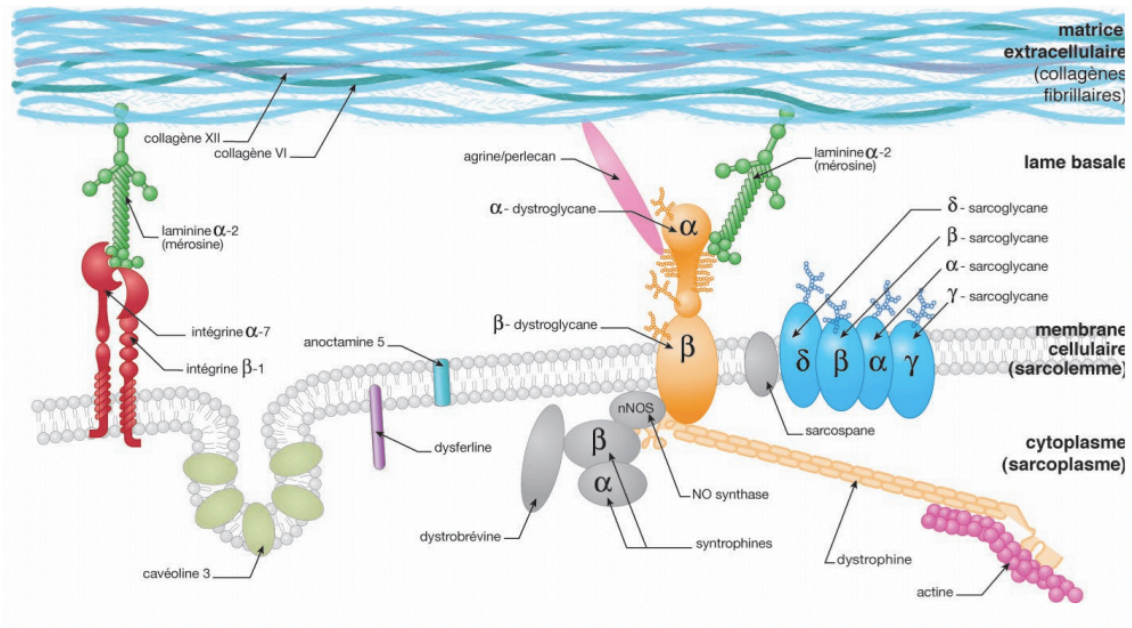


Figure 10 : Illustration du complexe des protéines sarcoglycanes (AFM-Téléthon.fr)

Ce complexe est un composant important du complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine, un acteur crucial dans le maintien du lien entre le cytosquelette sous-sarcolemmal et la matrice extracellulaire. Il a pour rôle de protéger le sarcolemme contre les dommages induits par les contraintes d'étirement et de contraction musculaire (Petrof, et al., 1993). L'absence de l'une des sarcoglycanes sur la membrane plasmique, réduit la stabilité de l'ensemble du complexe, perturbe l'intégrité de la membrane des fibres musculaires, conduisant ainsi, à une dégénérescence des cellules musculaires (Magri et al., 2017). Cette perte de protection conduit au processus de dégénération-régénération nécrotique, entraînant une fonte musculaire progressive.

La maladie est caractérisée par une faiblesse musculaire dans les membres, commençant presque toujours dans les membres inférieurs. Ces symptômes débutent généralement avant l'âge de 10 ans, avec une perte de la capacité de marcher survenant dès la puberté. La fréquence des insuffisances respiratoires et des cardiomyopathies dilatées est variable. Ces deux symptômes aggravent le pronostic et peuvent conduire à une mort prématurée. La sévérité clinique est généralement corrélée à la quantité de protéines résiduelles, et des corrélations génotype-phénotype peuvent être observées. Les mutations non sens sont généralement associées à des protéines absentes et à un phénotype de type dystrophie musculaire de Duchenne

sévère, tandis que les mutations faux-sens sont associées à des quantités réduites de protéines et à un phénotype de type LGMD plus léger (Israeli et al., 2019).

À ce jour, aucun traitement n'est disponible pour la LMGD2C. Récemment, une approche de thérapie génique pour la correction de la pathologie a été démontrée dans un modèle murin déficient en γ -SG. En 2012, les résultats d'un essai clinique de phase I-II pour LGMD2C par injection intramusculaire d'un AAV1 exprimant le gène humain γ -SG, ont montré une bonne tolérance du vecteur AAV avec une expression de SGCG chez tous les patients sauf un et la reconstitution du complexe SG (Herson et al., 2012).

IV. Approche thérapeutique

I. Thérapie génique

La thérapie génique a pour but de modifier les cellules ayant une mutation génétique, de façon *in vivo* ou *ex vivo*. La méthode *in vivo* consiste à administrer directement les vecteurs dans l'organisme tandis que la méthode *ex vivo* nécessite le prélèvement des cellules du patient, leur modification *in vitro* puis leur réinjection chez le patient. La méthode *in vivo* est réalisée lorsque le prélèvement des cellules n'est pas possible, comme dans le cas des cellules du système nerveux ou des cellules musculaires.

Les stratégies de thérapie génique pour les maladies musculaires ont été étudiées dans le but soit de corriger directement la mutation au niveau génomique (édition génique) en une version fonctionnelle normale; soit pour introduire le gène sauvage (WT) fonctionnel dans le tissu cible. L'un des vecteurs de transfert les plus utilisés pour la thérapie génique est le virus adéno-associé (AAV) (Figure 11), bien que d'autres types de mécanismes de transfert puissent être exploités tels que les vecteurs dérivés de lentivirus, d'adénovirus, les nanoparticules ou les vésicules extracellulaires.

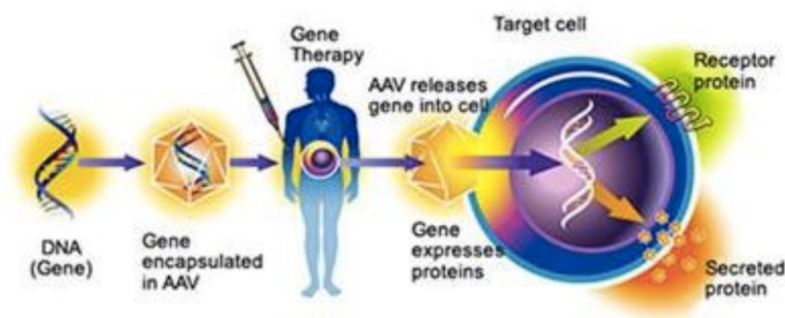


Figure 11 : Thérapie génique par virus adéno-associés (University of Pennsylvania).

II. Adéno-associated virus

L'Adéno-Associated Virus (AAV) a été décrit pour la première fois en 1965 par Atchinson et al. Il s'agit d'un virus de 22 nm de diamètre, non enveloppé, faisant partie de la famille Parvoviridae, et du genre Dependovirus. Il possède un génome ADN

simple brin linéaire de 4,7 kb, contenant deux gènes : un gène Rep impliqué dans la réplication du virus associé et un gène Cap permettant la formation de la capside. Des séquences terminales inversées répétées de 145pb (Inverted Terminal Repeats, ITR) sont présentes de chaque côté des séquences codantes (Figure 12). Ces séquences ont un rôle dans la réplication, l'encapsidation et l'intégration du génome viral.

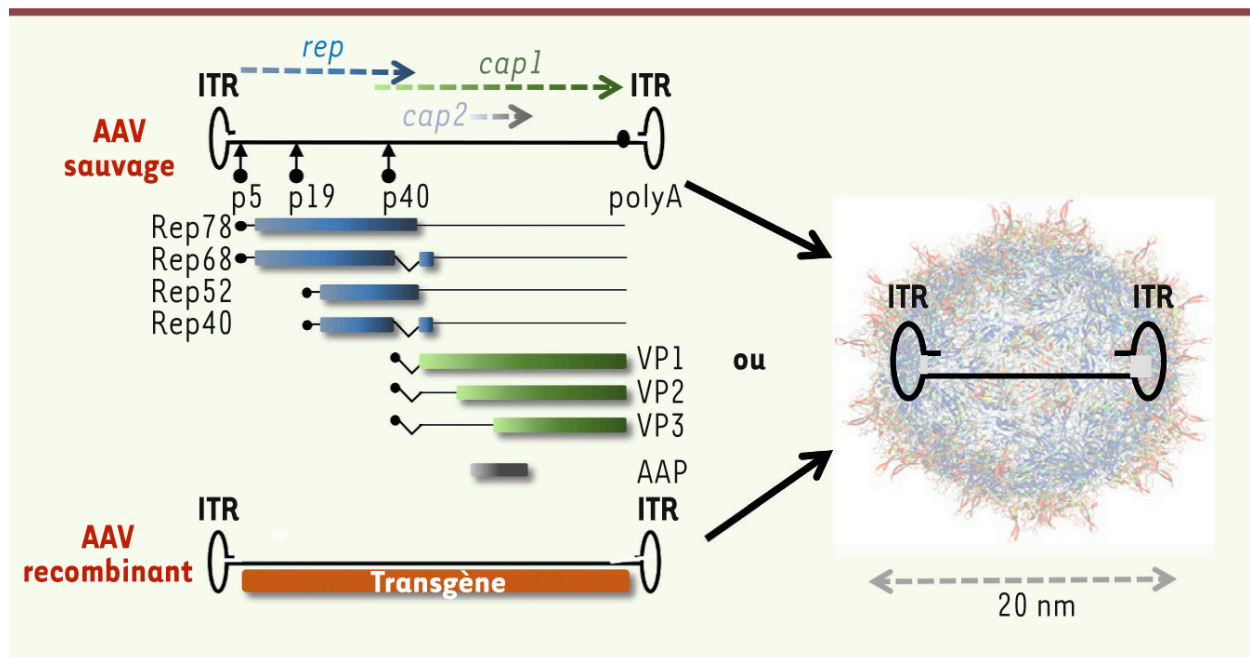


Figure 12 : Génomes de l'AAV sauvage et recombinant (Rossi et al., 2016)

Les virus associés aux adénovirus (AAV) sont connus pour infecter l'homme sans être pathogènes. Actuellement, 13 sérotypes d'AAV ont été isolés, et chaque sérotype a une capacité d'infection différente selon le tissu (Drouin et al., 2013). Les sérotypes 1, 5, 6, 8 et 9 sont efficaces pour transduire le muscle squelettique (Chamberlain et al., 2002 ; Grose et al., 2012 ; Tang et al., 2010). Ils ont l'avantage d'infecter aussi bien les cellules quiescentes que les cellules en division, de permettre une expression stable et à long terme du transgène, d'être peu immunogènes et non toxiques (Chamberlain et al., 2002) ; c'est pourquoi ils sont plus particulièrement utilisés pour la thérapie génique du muscle.

III. Utilisation de l'AAVr en thérapie génique

a. Présentation

L'utilisation de l'Adéno-Associated Virus (AAV) comme vecteur pour le transfert de gènes a été démontrée en 1984 par Hermonat et al. Depuis, de nombreux essais cliniques utilisant ce vecteur ont été menés et plusieurs médicaments de thérapie génique ont été autorisés récemment aux États-Unis et en Europe.

Les vecteurs AAV recombinants (AAVr) dérivent du virus sauvage, dans lequel les deux gènes Rep et Cap, sont substitués par le transgène d'intérêt (Figure 13) sous le contrôle d'un promoteur favorisant son expression dans le tissu cible.

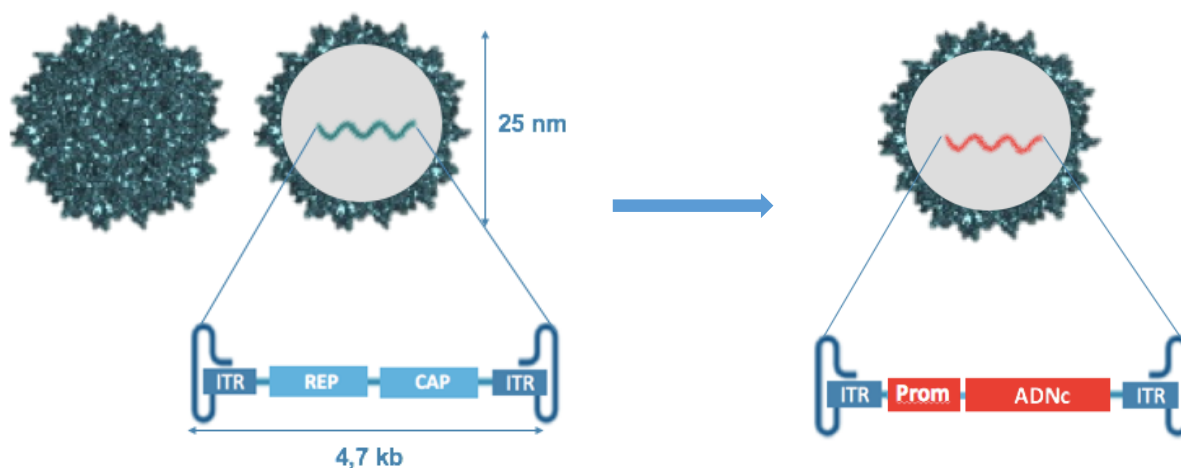


Figure 13 : Remplacement des gènes du virus sauvage par le transgène d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur.

Etant donné que le génome viral est remplacé par le gène d'intérêt, le vecteur AAVr ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte et reste sous forme épisomale. Il convient donc à des cellules qui se divisent peu comme les cellules musculaires (Tang et al., 2010). Ce vecteur d'origine virale présente de nombreux avantages pour le transfert de gène *in vivo*, ce qui en fait un outil à grand potentiel pour la thérapie génique. Dans cette étude, l'AAVr utilisé est l'AAV de sérotype 8, ciblant préférentiellement les muscles squelettiques.

b. Production

Les vecteurs AAV utilisés dans cette étude ont été produit grâce à la méthode de tri-transfection de cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney) (Figure 14).

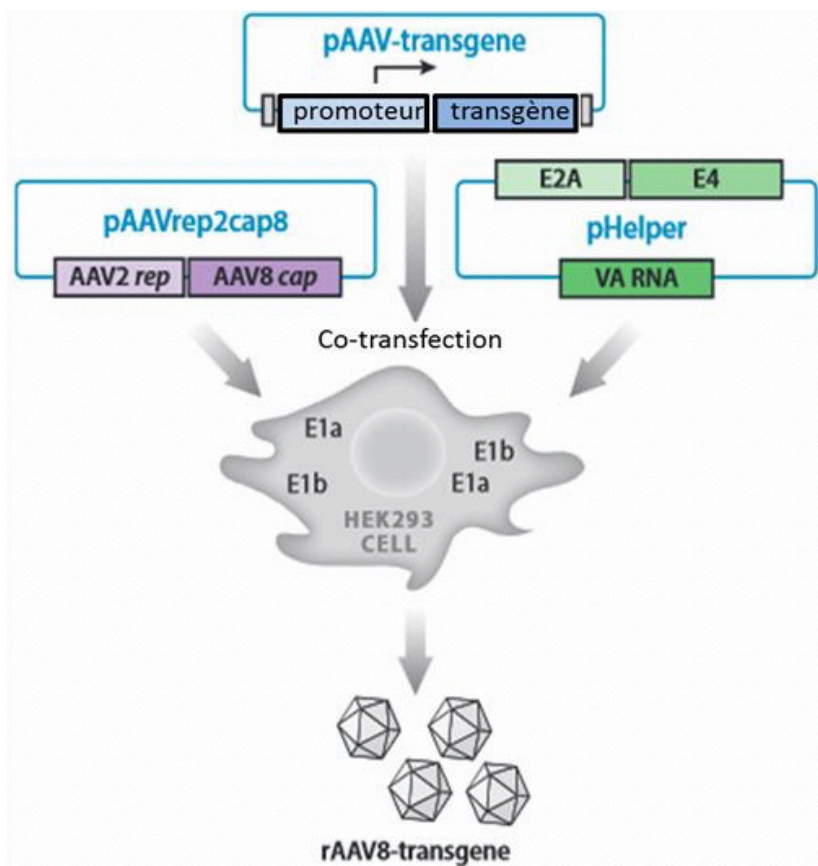


Figure 14 : La production par tri- transfection (Samulski et al., 2014).

La production d'AAV consiste en la transfection de cellules HEK 293 par trois plasmides différents. Un premier plasmide contenant le transgène d'intérêt placé entre deux ITR pour permettre son encapsidation dans le vecteur. Un deuxième plasmide codant pour les gènes viraux Rep et Cap, sans région ITR afin d'éviter l'encapsidation du génome viral. Enfin, un troisième plasmide appelé « Helper » contenant des éléments de l'adénovirus (les gènes E2A et E4, et le micro-ARN VA), essentiels à la réplication du vecteur AAV (Samulski et al., 2014). Les cellules HEK 293 sont des cellules humaines embryonnaires de rein qui expriment stablement les gènes E1A et E1B de l'adénovirus, également nécessaires pour la réplication de l'AAV (Matsushita et al., 1998). Cette méthode est utilisée pour la production à grande échelle, dans des bioréacteurs.

c. Preuves de principes

Dans le cas des sarcoglycanopathies, de nombreuses études ont montré la faisabilité du transfert du gène dans les modèles murins. La preuve de principe de la délivrance du transgène par AAV a été démontrée pour α -SG (Fougerousse et al., 2007), β -SG (Pozsgai et al., 2017), γ -SG (Israeli et al., 2019) et δ -SG (Li et al., 2003). Ces études ont montré un bon transfert et une bonne expression des protéines SG dans les muscles squelettiques et cardiaques.

Suite à ces études expérimentales, des essais cliniques utilisant des AAV ont été lancés. Une étude clinique humaine randomisée en double aveugle pour l' α -sarcoglycanopathie a été réalisée par injection intramusculaire d'AAV sérotype 1 (AAV1) codant pour α -SG, en association avec des médicaments immunosuppresseurs. Trois patients et les témoins correspondants ont été suivis et les résultats ont montré une restauration complète du complexe SG au niveau de la membrane des cellules musculaires et une augmentation de la taille des fibres musculaires à 3 mois et à 6 mois (Mendell et al., 2009 ; Mendell et al., 2010). Aucune augmentation des réponses cytotoxiques par rapport aux témoins n'a été observée. Pour cette pathologie, une autre étude a ensuite été menée où le transgène a de nouveau été transféré à l'aide de vecteur AAVr, mais cette fois-ci avec un promoteur spécifique du muscle (promoteur de la créatine kinase) qui a contrôlé l'expression du gène. Dans cette étude l'expression du gène a persisté pendant 6 mois (Mendell et al., 2012).

Un premier essai de transfert de gène par perfusion de membre isolé (membres inférieurs) chez l'homme, a récemment été réalisé (Mendell et al., 2019). Le vecteur AAVrh74 contenant le transgène SGCA a été administré par voie intravasculaire à travers l'artère fémorale chez 6 patients. L'administration du vecteur a été efficace pour produire la protéine SGCA à de faibles doses qui étaient en corrélation avec le nombre de copies du vecteur. Les auteurs ont également décrit une amélioration fonctionnelle en corrélation avec une augmentation du diamètre des fibres dans les muscles ciblés.

Un essai clinique de phase I a également été réalisé pour la γ -sarcoglycanopathie, dans lequel neuf patients ont reçu une injection intramusculaire

d'AAV1 codant pour le gène WT γ -SG. L'expression de la protéine γ -SG a été obtenue aux doses les plus élevées, sans aucune réaction immunitaire exacerbée (Herson et al., 2012).

d. Obstacles à l'utilisation du vecteur AAV

Les principaux obstacles auxquels est confronté l'utilisation des AAVr en thérapie génique sont :

- la réponse du système immunitaire
- la taille limitée du transgène qui peut être encapsidé (Balakrishnan et al., 2014)
- la production de vecteur à grande échelle
- l'expression du transgène uniquement dans les organes cibles

Premièrement, bien que réduites par rapport à d'autres types de vecteurs viraux, le vecteur AAV reste un virus qui entraîne tout de même des réponses immunitaires chez le patient. Ces réponses peuvent être induites contre la capsid du vecteur ou contre les produits du transgène et sont susceptibles de diminuer considérablement l'efficacité de la thérapie. En effet, une réponse contre la capsid pourrait bloquer l'efficacité de transduction des cellules. Ceci est essentiellement dû au fait qu'une grande partie de la population est naturellement infectée par un virus AAV sauvage dès les premiers mois de vie et qu'une première réponse immunitaire a ainsi déjà été induite contre les capsides des AAV (Millet et al., 2013). Une réponse contre le transgène est qu'en a elle plus complexe à prévoir car elle dépend de la nature même des transgènes. Les conséquences d'une telle réponse sont potentiellement plus graves car elles peuvent conduire à la destruction des cellules transduites.

D'autre part, l'AAV comporte un génome de petite taille, environ 4,7 kb, ce qui limite la capacité d'encapsulation du transgène. Cette capacité d'encapsulation limitée est un obstacle pour le transfert de gènes de grande taille comme que le gène DMD, codant la dystrophine, la protéine touchée dans la dystrophie musculaire de Duchenne (Wang et al., 2000).

De plus, la production de vecteurs constitue une véritable limite technique pour traiter un patient atteint de maladie musculaire. En effet, les méthodes de production actuellement utilisées fournissent peu de vecteurs par rapport à la quantité requise pour une thérapie complète. Les quantités obtenues sont suffisantes pour les essais précliniques et les essais cliniques qui demandent par exemple 10^{12} vg (génomés viraux) pour une application locale au niveau de l'œil, mais ne le sont pas pour les dystrophies musculaires qui demandent jusqu'à 10^{17} vg (Virag et al., 2009).

Or, les méthodes de production actuelles, réalisées en bioréacteur de 200 litres, permettent de produire $3 \cdot 10^{14}$ à $2 \cdot 10^{15}$ vg au maximum. Une importante quantité de vecteurs AAV est tout particulièrement requise pour le traitement des dystrophies musculaires puisqu'il est nécessaire de traiter l'ensemble des cellules musculaires touchées dans le corps entier.

Enfin, même si les AAV infectent préférentiellement un tissu, ils ne sont pas spécifiques de celui-ci et sont capables d'infecter tous les tissus de l'organisme ; ceci pose un problème d'adressage du gène médicament spécifiquement dans le tissu malade. Afin d'améliorer le ciblage des vecteurs, plusieurs stratégies pour modifier les capsides sont actuellement étudiées. Parmi ces stratégies, on peut citer l'insertion de mutations dans la capside, les hybrides de capsides, ou encore l'ajout d'éléments sur la capside tels que des groupements chimiques.

V. Expression génique

Le design de la cassette d'expression du vecteur est très important car il permettra l'expression de notre transgène. Au sein de cette cassette d'expression, on retrouve notamment le transgène sous forme ADNc, qui devra être transcrit en ARN puis traduit en protéine. On retrouve également un promoteur, un intron stabilisateur de l'ARN messager et une queue PolyA, indispensable pour la maturation de l'ARN messager. Ces éléments permettent de réguler l'expression du transgène et d'apporter plus de spécificité à notre vecteur.

La transcription est le mécanisme cellulaire permettant de recopier un gène présent sur l'ADN génomique, en molécule d'ARN, grâce à l'ARN polymérase. Pour amorcer la transcription, un ensemble de protéines appelées facteur de transcription doit reconnaître le promoteur du gène afin de recruter la polymérase. La transcription terminée, l'ARN pré-messager obtenu devra subir des étapes de maturation avant d'être traduit en protéine. La traduction de l'ARN en protéine peut être régulée, afin de contrôler l'expression des gènes. Ces mécanismes de régulation impliquent généralement des structures spécifiques sur l'ARNm dont la traduction est régulée. La régulation peut faire intervenir un régulateur traductionnel exogène qui peut être soit une protéine, soit un autre ARN qui interfère avec la traduction. Ce régulateur peut être un activateur ou un répresseur. Un des mécanismes réprimant l'expression génique, est l'appariement de microARN avec les ARNm cibles dont ils sont partiellement complémentaires. Cette hybridation réprime la traduction de la protéine correspondante ou clive l'ARNm cible au milieu du site de fixation du microARN (Hartmann et al., 2004). Le miR-208T est une séquence qui cible spécifiquement le microARN cardiaque 208a. Il a été démontré que l'introduction de cette séquence dans la cassette d'expression d'un AAV a été efficace pour réprimer l'expression cytotoxique du transgène Calpain3 dans le tissu cardiaque (Roudault et al., 2013).

VI. Modèle animal

Le modèle de souris utilisé sont des souris ayant subi un Knock-Out de leur gène de la gamma-sarcoglycane. Ce Knock-Out (Hack. et al., 1998) a été réalisé par délétion de l'exon 2 (porteur du codon initial ATG) par recombinaison homologue. La protéine gamma-sarcoglycane n'est plus exprimée chez les souris KO γ -sarcoglycane, comme le montre le Western Blot (Figure 15A) et les images histologiques grâce à l'immunomarquage de la protéine (Figure 15B). Il résulte également de ce KO une diminution de la force musculaire des souris par rapport aux souris WT (Figure 15C). Le phénotype musculaire des souris tend à s'aggraver avec l'âge comme nous pouvons l'observer chez les patients. Les colorations HES de ces muscles mettent en évidence une architecture désorganisée des fibres musculaires, accompagnée de zones d'inflammation, de foyers de centronucléation, des zones de calcification et la présence de fibres nécrotiques (Figure 15D).

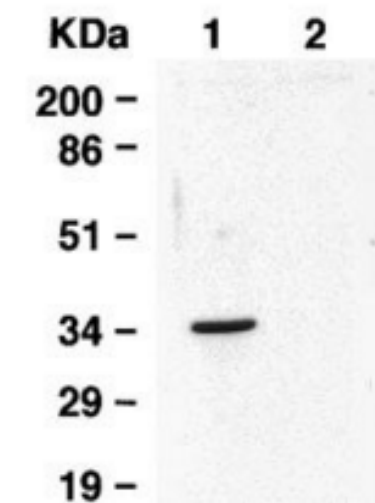


Figure 15A : Western Blot présentant l'expression de la protéine γ -sarcoglycane dans un muscle de souris WT (piste 1) et son absence chez une souris KO (piste 2).

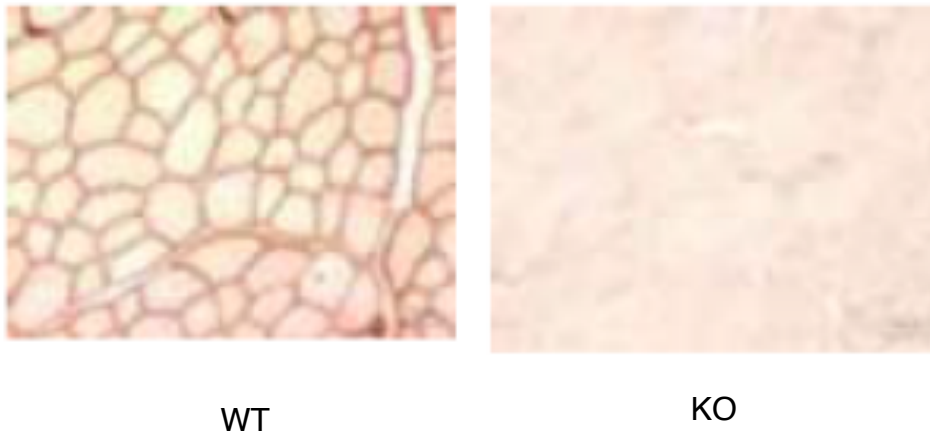


Figure 15B : Immunomarquage montrant la perte du complexe protéique à la membrane dans le muscle de souris KO.

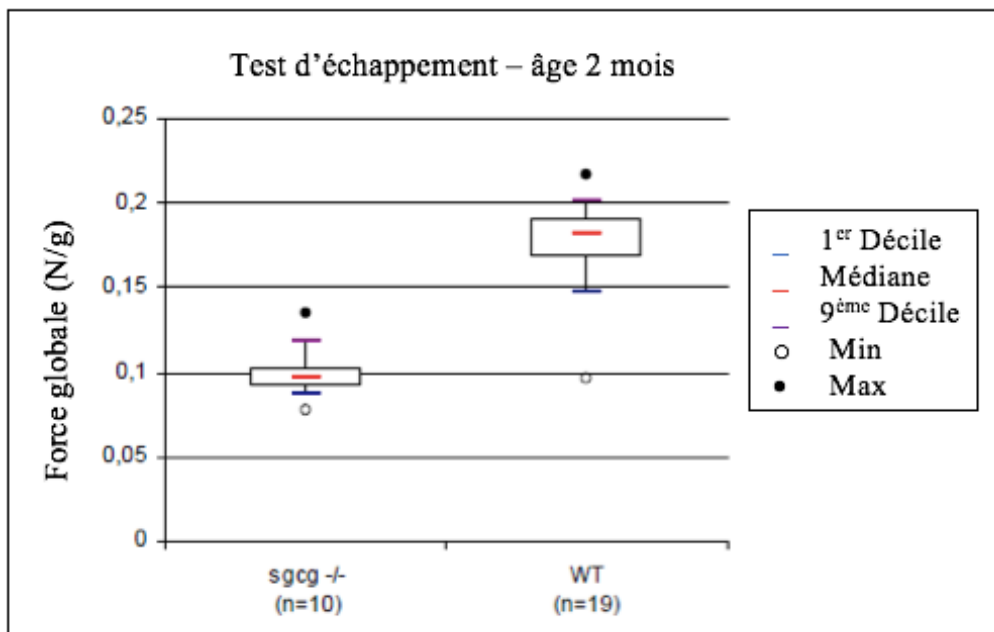


Figure 15C : Graphique montrant une diminution de la force musculaire des souris KO par rapport aux WT à l'âge de 2 mois.

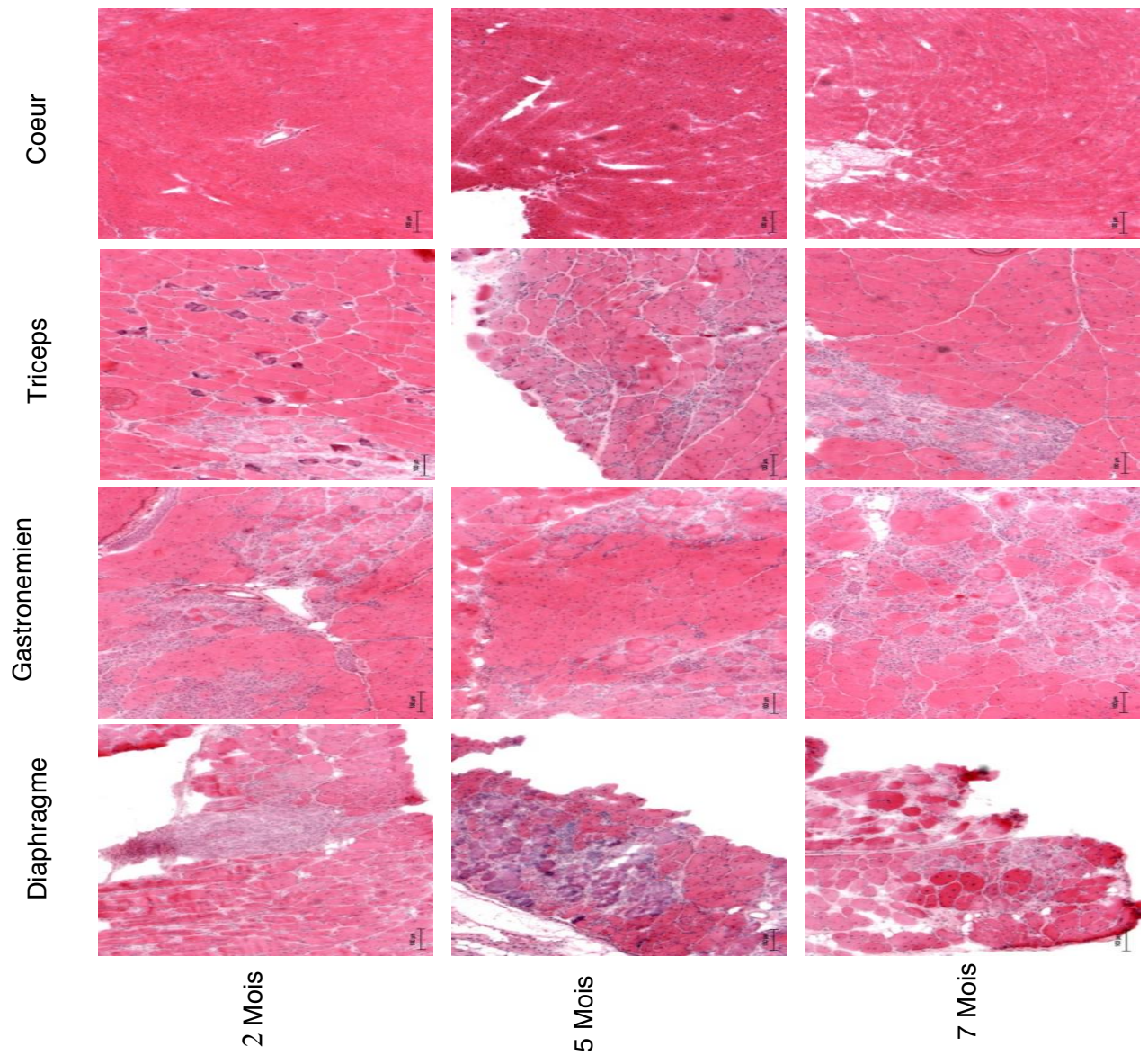


Figure 15D : Images en coloration HES présentant l'état histologique de différents tissus musculaires (Diaphragme, Gastrocnémien, Triceps et Cœur) de souris KO à 2 mois, 5 mois et 7 mois.

Contexte et objectifs de l'étude

Une première étude chez le modèle de souris Knock Out (KO) γ -sarcoglycane a permis de faire la preuve de principe de l'efficacité de la thérapie génique pour corriger le phénotype musculaire en utilisant une cassette AAV exprimant le cDNA de la gamma sarcoglycane (Israeli et al., 2019). Cette étude a également permis de développer les outils analytiques nécessaires pour le suivi de l'efficacité du transfert de gène, notamment la conception des amorces de QPCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction) pour quantifier l'expression du transgène et le nombre de copies du génome viral, ainsi que les anticorps anti-transgène SGCG.

Les niveaux d'expression de la SGCG endogène ne sont pas significativement différents dans le cœur et les TA des échantillons de souris (Figure 16). Or, lors d'une étude précédente, une forte expression cardiaque du transgène a été observée. Cette observation amène la nécessité de réguler plus finement l'expression du transgène afin qu'elle soit plus faible dans le tissu cardiaque et plus forte dans les muscles squelettiques. Bien que quelques cas d'atteinte cardiaque aient été rapportés, il serait tout de même préférable de privilégier le muscle squelettique au détriment du cœur car l'atteinte dystrophique est majoritairement présente au niveau des muscles squelettiques.

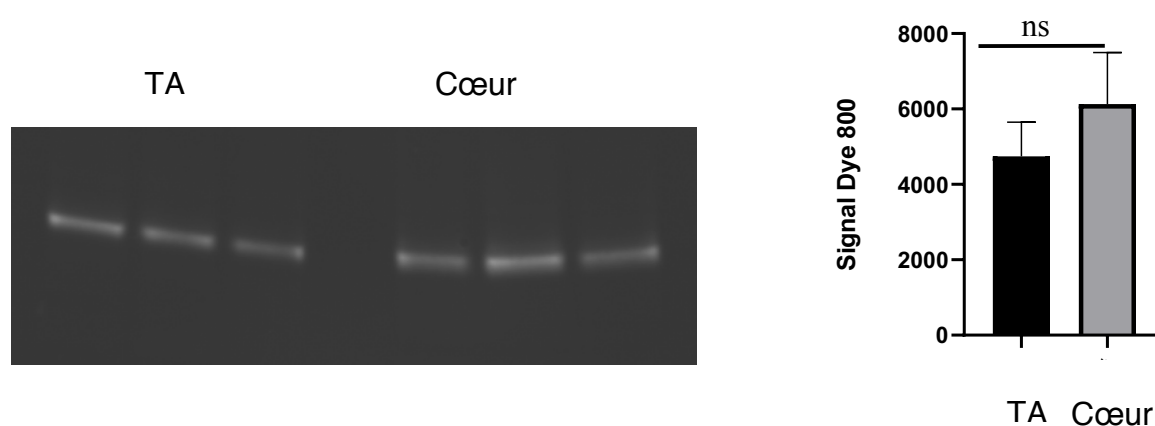


Figure 16 : Western Blot détectant la protéine SGCG dans les TA et le Cœur de souris.

En vue d'une thérapie génique chez l'homme, nous souhaitons développer un vecteur dont l'expression du transgène soit adaptée au niveau endogène de la SGCG retrouvée dans le cœur et dans les muscles squelettiques. Pour développer cette cassette d'expression, nous avons étudié deux approches différentes : l'utilisation de séquences cibles de miRNA cardiaques et le changement de promoteurs musculaires. Les promoteurs comparés dans cette étude sont le promoteur 1 (séquence originelle d'un promoteur musculaire), et les promoteurs 2 et 3 issus de la littérature.

Matériels et méthodes

I. Expérimentation animale

Toutes les procédures sur les animaux sont réalisées en accord avec la directive du 24 novembre 1986 du conseil de la Communauté Européenne et ont été approuvées par le comité d'éthique (CEEA-5, référence APAFIS 3491) du Centre d'Exploration et de Recherche Fonctionnelle Expérimentale (CERFE), plateforme d'élevage de rongeurs. Les souris C57BL/6, souris sauvages (ou wild type, WT), sont fournies par la société Charles River. Le modèle animal déficient en γ -sarcoglycane qui présente une délétion de l'exon 2 du gène (Hack. et al., 1998) est quant à lui élevé au CERFE.

II. Prélèvement des muscles et coupes histologiques

Les muscles sont prélevés immédiatement après le sacrifice des souris. Ces muscles sont montés sur des bouchons de liège surplombés de gomme puis congelés dans de l'isopentane refroidi. Les muscles sont conservés à -80°C, en attendant d'être coupés au cryostat et analysés. Dans le cas de la préparation de lames pour marquage par immunofluorescence, les muscles sont coupés de manière transversale avec une épaisseur de coupe de 8 μm et posés sur une lame de verre. Les lames sont séchées à température ambiante et conservées à -80°C en attendant le marquage. Pour une analyse des protéines ou des acides nucléiques, les muscles sont également coupés de manière transversale mais avec une épaisseur de coupe de 30 μm , et les coupes récupérées (20 coupes par organe) sont conservées dans un tube eppendorf à -80°C en attendant la suite des analyses.

III. Vecteurs AAV

Les cassettes d'expression consistent en une organisation de différentes séquences intervenant non seulement dans la régulation et le contrôle de l'expression des gènes mais aussi dans le maintien et la stabilité du vecteur. Les différentes cassettes d'expression des vecteurs utilisées dans cette étude sont les suivantes : (Figure 17)

- AAV-promoteur-1-SGCG-pA HBB2

(construction avec le promoteur 1)

- AAV-promoteur-1-SGCG-miR208T-pA HBB2

(construction avec le promoteur 1 et un élément de régulation : la séquence miR208T)

- AAV-promoteur-2-SGCG-pA HBB2

(construction avec le promoteur 2)

- AAV-promoteur-3-SGCG-pA HBB2

(construction avec le promoteur 3)

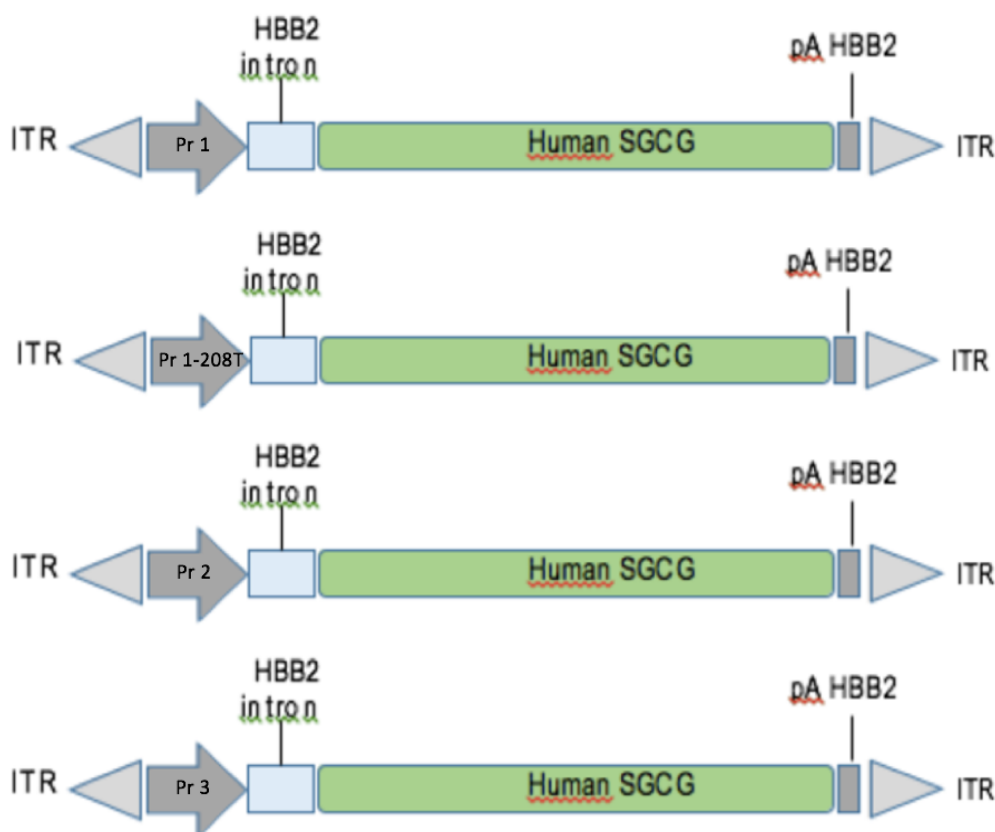


Figure 17 : Schémas des vecteurs AAV utilisés dans cette étude.

IV. Extraction protéique

Les échantillons de muscle TA, de cœur et de foie sont lysés avec 300 μ L de Cell Lysis Solution (QIAGEN) à l'aide d'une homogénéisation mécanique au Fastprep (MP Biomedicals) à 4m/s pendant 20 s. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 2000 rpm pendant 5 min pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est alors récupéré. La concentration en protéine totale est mesurée à l'aide du kit BCA (PIERCE).

V. Western blot

La technique du Western Blot permet grâce à une reconnaissance avec des anticorps spécifiques, de détecter dans un tissu la présence de protéines d'intérêt. Elle permet également d'évaluer la taille de ces protéines et de réaliser leurs quantifications relatives. Une fois l'extraction protéique réalisée, un tampon NuPAGE™ LDS Sample Buffer complété avec du DTT (THERMO SCIENTIFIC) est ajouté aux échantillons puis ceux-ci sont chauffés 5 min à 90°C pour permettre la dénaturation des protéines. Les échantillons contenant 30 μ g de protéines sont déposés sur gel précoulé NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Midi Gel (Life technologies). Un marqueur de poids moléculaire Precision Plus (BIORAD) est également déposé sur le gel. La séparation des protéines est réalisée à 80 V pendant 15 min puis pendant 1h30 à 120 V dans un tampon de migration MOPS-SDS running buffer (INVITROGEN). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose grâce à un transfert rapide à sec iBlot2 Gel Transfer Device (INVITROGEN) pendant 8 min 30 s à 20 V.

Afin de minimiser les risques d'hybridation non spécifique des anticorps sur la membrane, celle-ci est préalablement saturée 1h avec une solution de blocage Odyssey (Blocking Buffer, LI-COR) diluée à 50% dans du PBS (Phosphate buffer saline (SIGMA/ALDRICH)). La membrane est ensuite hybridée avec les anticorps primaires de lapin spécifiques de la forme humaine (ABCAM) SGCG (ab203112) et l'anticorps de chèvre (SIGMA) anti-GAPDH (PLA0302) dilués à 1/2 000 dans 50% PBS, 50% tampon de blocage Odyssey pendant une nuit à 4°C, sous agitation. Après trois lavages de 5 min dans du tampon TTBS (SIGMA/ALDRICH), la membrane est hybridée avec les anticorps secondaires fluorescents (LI-COR) DAR 800 et DAG 680 (dilués au 1/10000ème dans 50% PBS, 50% tampon de blocage Odyssey). L'anticorps

DAR 800 est spécifique pour l'antigène de lapin et l'anticorps DAG 680 est spécifique de l'antigène de chèvre. Ces anticorps vont émettre à une longueur d'onde différente, ce qui permettra d'identifier les protéines séparément. La membrane est de nouveau lavée trois fois 5 min dans du TTBS, puis est conservée dans du PBS. La membrane est lue à l'aide du scanner ODYSSEY aux longueurs d'ondes d'émission 680 et 800 nm. Les poids moléculaires des protéines sont estimés par comparaison avec le marqueur Precision Plus Protein Standards (BIORAD). Le GAPDH est utilisé comme normalisateur, permettant ainsi la quantification de la quantité de protéines par la mesure d'intensité de fluorescence des bandes. Ces quantifications sont exprimées en ratio (quantification bande d'intérêt / quantification normalisateur, unités de quantification arbitraires) directement via le logiciel d'acquisition d'image (Image Studio Lite).

VI. Extraction ARN et Reverse Transcription

Les échantillons sont solubilisés dans 500 μ L de NucleoZol. L'extraction s'effectue selon le protocole du kit Nucleospin RNA set for NucleoZOL (MACHEREY NAGEL). L'ARN élué dans 70 μ L d'eau est conservé dans des tubes collecteurs. L'ARN est par la suite traité à la DNase, à l'aide du kit TURBO DNA-free™ (AMBION). Pour 25 μ L d'éluât d'ARN, 3 μ L de Tampon 10X, 1 μ L de DNase 2U/ μ L et 1 μ L d'eau sont ajoutés. Le mélange est incubé à 37°C pendant 1h. L'ARN est ensuite purifié grâce à l'ajout de 3 μ L de résine. Cet ajout de résine va permettre de capter la DNase dans la suspension d'ARN qui sera après homogénéisation et centrifugation, sous forme d'un culot au fond du tube. Seul le surnageant avec l'ARN purifié est conservé. Avant de réaliser la reverse transcription, les ARN sont quantifiés par mesure de densité optique à 260nm avec 2 μ L, grâce au Nanodrop 1000 (THERMO SCIENTIFIC). La transcription inverse est une réaction permettant de synthétiser un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin d'ARN matrice à l'aide d'une transcriptase inverse. La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 1 μ g d'ARN suivant les recommandations du fournisseur (RevertAid RT Reverse Transcription Kit, ThermoFisher). Les ADNc obtenus sont alors prêts à être mesurés par QPCR avec les amorces spécifiques des gènes d'intérêt.

VII. Extraction ADNg

Les échantillons de muscle TA, de cœurs et de foies sont préparés comme décrit précédemment (cf. Extraction ARN). L'extraction est réalisée selon le protocole NucleoMag Pathogen (MACHEREY NAGEL) grâce au robot KingFisher (THERMO SCIENTIFIC). Les ADN sont élués dans un volume de 100uL tampon d'éluion du kit. Les ADN sont quantifiés par mesure de densité optique avec 2uL, grâce au Nanodrop 1000 (THERMO SCIENTIFIC). L'analyse par QPCR des ADN permettra de mesurer le nombre de génome viraux présents dans les différents tissus et ainsi d'évaluer le niveau de transduction dans chacun des organes.

VIII. PCR Quantitative

La technique de qPCR en temps réel permet d'estimer de façon très précise le nombre de copies de la séquence cible d'ADN. Elle est dans cette étude, utilisée sur de l'ADNc pour estimer l'expression d'un ou plusieurs gènes, ainsi que sur de l'ADNg pour déterminer le nombre de copies dans le génome (VGCN).

Les sondes, amorces et oligonucléotides utilisés dans ce projet sont présentés en Tableau 2 :

- Taqman home made-specific primers pour P0 et pA-HBB2
- Commercial Taqman Gene Expression Assay for human SGCG
- Commercial Taqman Gene Expression Assay for murin Cd8, Tmem8c and Myh7.

La plaque est ensuite placée dans le thermocycleur LightCycler480 (ROCHE) avec le programme suivant :

- 95°C pendant 10 min.
- 95°C pendant 15 s / 60°C pendant 1 min = 45 cycles.
- 40°C pendant 30 s.

Le logiciel du thermocycleur affiche les résultats de l'amplification des échantillons sous forme de Ct par puits, donnant ainsi une indication de la quantité initiale de matériel transféré dans les puits. Le Cycle threshold (Ct) indique le seuil à partir duquel est détecté une certaine intensité de signal, émise par la sonde libérée suite à l'amplification. Dans les conditions optimales avec une efficacité de 100%, l'intensité

du signal est multipliée par deux à chaque cycle. Ainsi, plus la concentration initiale en ADN dans un puit est élevée, plus le Ct a une valeur faible.

- Concernant le calcul du nombre de transgènes par noyau, une gamme de plasmide de différentes concentrations est utilisée afin de déterminer la concentration en transgènes par rapport à la concentration d'une séquence normalisatrice endogène P0 (gène ubiquitaire de l'acide ribophosphoprotéique). Le rapport s'écrit : (Nombre de transgènes) / (Nombre de séquences normalisatrices P0/2). Le nombre de séquences est divisé par 2 car il y a 2 allèles par noyau.
- Concernant la quantification relative entre les ARN d'intérêt (détection grâce à une sonde

FAM) et un normalisateur (détection grâce à une sonde VIC), nous n'avons pas de gamme de plasmide pour chaque gène mesuré, nous réalisons donc un calcul de quantification par la méthode du ΔCt (Livak K. et al., 2001). Ci-dessous les différentes étapes de calcul :

- Moyenne des duplicats : $(Ct1 + Ct2) / 2$
- Différence entre le Ct du gène et le Ct du normalisateur : $-\Delta Ct = - (Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène normalisateur})$
- Abondance relative par rapport au gène normalisateur : $2^{-\Delta Ct}$

Fonctions	Gènes cibles	Séquences
Réponse immune	Cd8a	Mm01182107_g1
Cardiotoxicité	Myh7	Mm01319006_g1
Transgène	SGCG	Hs00165089_m1
Régénération musculaire	Tmem8c	Mm00481256_m1
Normalisateur	P0murin	Sonde : CCGTGGTGCTGATGGGCAAGAA
	P0murin	Amorce sens : CTCCAAGCAGATGCAGCAGA
	P0murin	Amorce antisens : ATAGCCTTGCGCATCATGGT
Séquence du génome viral (Reflète le nombre de copie de l'ARN viral)	PolyAHBB2	Sonde : CTCGCCGTAAAACATGGAAGGAACACTTC
	PolyAHBB2	Amorce sens : CTTGACTCCACTCAGTTCTCTTGCT
	PolyAHBB2	Amorce antisens : CCAGGCGAGGAGAAACCA

Tableau 2 : Tableau des oligonucléotides utilisés dans cette étude.

IX. Immunohistofluorescence et coloration HES

Pour l'immunomarquage fluorescent de la protéine γ -sarcoglycane sur les cryosections de muscles de souris, les lames doivent tout d'abord revenir à température ambiante. Puis, les coupes sont entourées au Dakopen et laissées sécher pendant 5 min. Les sites non spécifiques sont bloqués avec une solution de PBS/sérum de chèvre 10% (DAKO – Réf. : X 0907), pendant 20 min à température ambiante et en chambre humide. La solution est ensuite retirée. L'anticorps primaire monoclonal de lapin anti- γ -sarcoglycane (ABCAM - Réf. : ab203112) est dilué au 1/200 dans du PBS.

- *Pour un double immunomarquage fluorescent γ -sarcoglycane et lymphocytes T8 (Cd8alpha), l'anticorps primaire de rat anti-Cd8 α murin (THERMO FISHER® - Réf. : MA5-17594) est dilué au 1/40 dans cette même solution de PBS.*
- *Pour un double immunomarquage fluorescent γ -sarcoglycane et fibres lentes (myosin squeletal slow), l'anticorps primaire de de souris anti-myosin Skeletal Slow (SIGMA® - Réf. : M-8421) est dilué au 1/1000 dans cette même solution de PBS.*

La solution d'anticorps primaires est déposée pour une incubation d'une nuit à +4°C en chambre humide. Les coupes sont rincées dans du PBS 1X pendant 2 min. Cette opération est renouvelée 3 fois en changeant le contenu entre chaque bain. L'anticorps secondaire de chèvre anti-Ig de lapin Alexa 594 Molecular Probes (INVITROGEN - Réf. : A11012) est diluée au 1/1000 dans du PBS.

- *Pour un double immunomarquage fluorescent γ -sarcoglycane et lymphocytes T8, l'anticorps secondaire chèvre anti-Ig de lapin Alexa 488 Molecular Probes® (INVITROGEN® - Réf. : A11008) est dilué au 1/1000 et l'anticorps secondaire de chèvre anti-Rat Alexa 594 Molecular Probes® (INVITROGEN® - Réf. : A-11007) est dilué au 1/600^{ème} dans cette même solution de PBS.*
- *Pour un double immunomarquage fluorescent γ -sarcoglycane et fibres lentes, l'anticorps secondaire de chèvre anti-Ig de lapin Alexa 488 Molecular Probes® (INVITROGEN® - Réf. : A11008) et l'anticorps secondaire de chèvre anti-Souris couplé à l'Alexa 594 Molecular Probes® (INVITROGEN® - Réf. : A-11020) sont dilués au 1/1000 dans une solution PBS.*

La solution d'anticorps secondaires est déposée pour une incubation de 2h à l'obscurité de la lumière, à température ambiante et en chambre humide. Les coupes

sont rincées dans du PBS 1X pendant 2 min. Cette opération est renouvelée 3 fois en changeant le contenu entre chaque bain. Les lames sont ensuite montées au Fluoromount G + Dapi (SOUTHERN BIOTECH - Réf. 0100-20) puis laissées sécher à l'obscurité de la lumière environ 20 min. Enfin, les lames sont conservées à l'obscurité de la lumière et à +4°C.

La coloration histologique HES associe une coloration nucléaire par l'hématoxyline, une coloration cytoplasmique par l'éosine et une coloration du collagène par le safran. Les noyaux apparaissent en bleu violet, le cytoplasme en rose et les fibres de collagène en jaune orangé. Cette coloration met en évidence les zones de fibrose et donne ainsi des informations sur l'état histologique de l'organe étudié.

Les images ont été acquises par le numériseur de lames Axio Scan Zeiss. Les images générées par ce numériseur sont traitées grâce au logiciel Fiji-ImageJ2. Ce logiciel de traitement d'image permet de sélectionner les zones d'intérêts. Ces images sont ensuite regroupées dans un fichier afin de les comparer intra et inter groupes.

X. Statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 6.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). Des analyses statistiques ANOVA ont été effectuées pour toutes les expériences. Les données ont été exprimées en moyenne +/- l'écart type. Les valeurs de P inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

I. L'introduction du mir-208T dans la construction AAV8-1-hSGCG réduit-elle l'expression du transgène dans le cœur ?

I. Protocole de l'étude

Lors d'une étude précédente, la dose 3×10^{14} vg/kg de vecteur AAV8-1-hSGCG a été identifiée comme une condition conduisant à une forte expression du transgène dans le cœur. Nous souhaitons répondre à la question suivante : Cette expression peut-elle être réduite par l'introduction du miR-208T dans la construction AAV8-1-hSGCG ? Nous souhaitons utiliser le miR-208T car il s'agit d'une séquence d'acide nucléique qui cible un microARN qui s'exprime spécifiquement dans le cœur. L'appariement du miR-208T avec le microARN, va entraîner la dégradation de celui-ci ou l'inhibition de sa traduction. La stratégie utilisant les miR-208T pour réguler l'expression du transgène, a été testée grâce au protocole expérimental suivant (Figure 18).

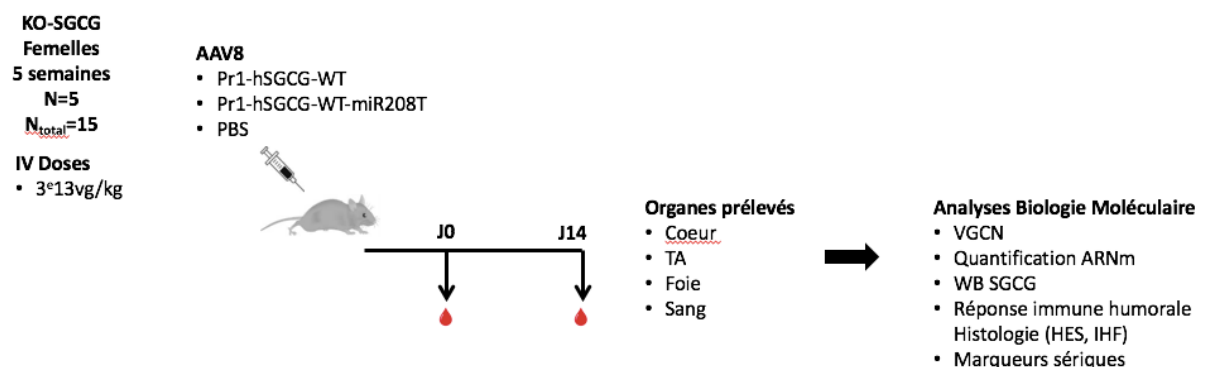


Figure 18 : Schéma du protocole de l'étude évaluant l'effet sur l'expression du transgène, de l'introduction du mir-208T dans la construction AAV8-1-hSGCG.

Un premier groupe de 5 souris γ -sarcoglycane KO a reçu une injection de PBS, un deuxième groupe a reçu une injection d'AAV8-1-hSGCG à 3×10^{13} vg/kg, et un troisième groupe a reçu une injection d'AAV8-1-hSGCG-miR208T à 3×10^{13} vg/kg. Le

PBS a été utilisé comme contrôle dans cette étude car il s'agit de l'excipient utilisé dans les injections de doses de vecteurs. Du sang est prélevé à chaque souris avant l'injection, puis 14 jours plus tard a lieu le sacrifice. Les 14 jours suffisent pour observer l'expression du transgène. Des analyses de biologie moléculaire telles que la quantification des VGCN, des ARN messagers et des protéines dans les TA, les cœurs et les foies, ainsi que des analyses histologiques sont ensuite réalisées. Les expériences sur les foies ont été réalisées car une toxicité hépatique a été rapportée dans la littérature, suite à l'administration de vecteurs AAV chez l'animal (Hinderer C et al., 2018) et chez l'homme (essai NCT03199469 ; communiqué de presse du 20 août 2020 ; https://www.audentestx.com/press_release/audentes-therapeutics-provides-update-on-the-aspiro-clinical-trial-evaluating-at132-in-patients-with-x-linked-myotubular-myopathy/). Il est donc essentiel de regarder le niveau d'expression du transgène dans le foie. Les différents résultats sont présentés ci-dessous.

II. Résultats

La quantification des VGCN a mis en évidence une transduction similaire entre le vecteur AAV8-1-hSGCG et le vecteur AAV8-1-hSGCG-208T dans les muscles TA, dans le cœur et dans le foie (Figure 19).

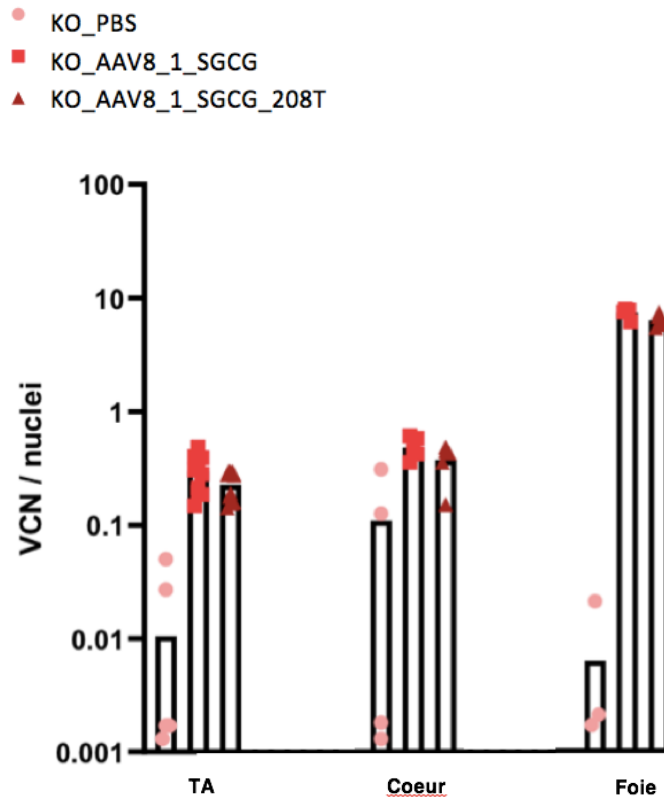


Figure 19 : Quantification des VCN par noyaux dans les organes TA, cœurs et foies des souris γ -KO, injectées avec du PBS, la construction AAV8-1-hSGCG et la construction AAV8-1-hSGCG-208T.

La quantification relative des ARN messagers du transgène hSGCG dans les muscles TA, normalisée par l'expression endogène de P0 est similaire entre les deux constructions. Le Western Blot correspondant a également montré une expression similaire de hSGCG entre les 2 constructions. Dans le cœur, la quantification relative des ARN messenger est beaucoup plus faible dans la construction AAV8-1-hSGCG-208T que dans la construction AAV8-1-hSGCG. En effet, il y a 25 fois moins de transcrits chez les souris injectées avec la construction AAV8-1-hSGCG-208T que chez celles injectées avec la construction AAV8-1-hSGCG. Le Western Blot a également révélé 25 fois moins de protéines SGCG chez les souris injectées avec la construction AAV8-1-hSGCG-208T que chez celles injectées avec la construction AAV8-1-hSGCG. Dans le foie, l'expression protéique est similaire pour les deux constructions (Figures 20A et 20B).

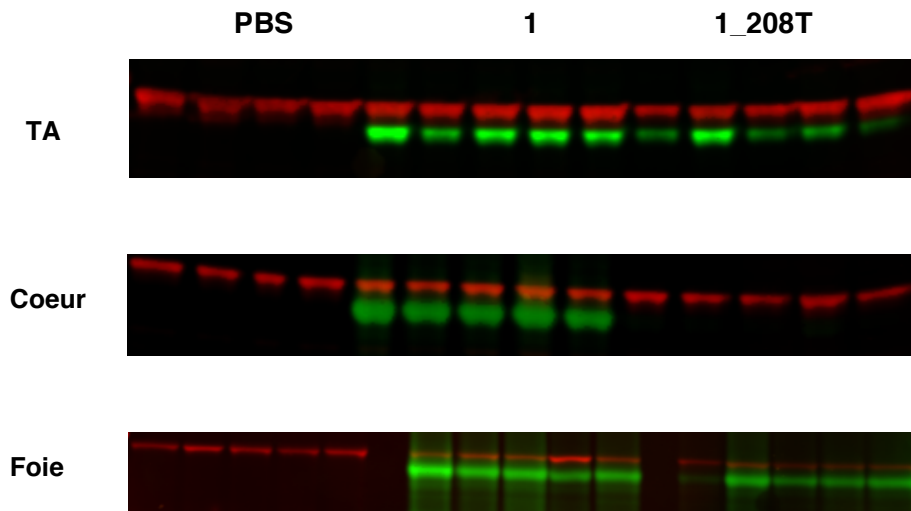


Figure 20A : Western Blot des TA, des cœurs et des foies des souris du groupe injecté avec du PBS, du groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG, et du groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG-208T, grâce aux anticorps spécifiques anti-hSGCG. Le transgène hSGCG est représenté en vert et le normalisateur (Gapdh) est représenté en rouge.

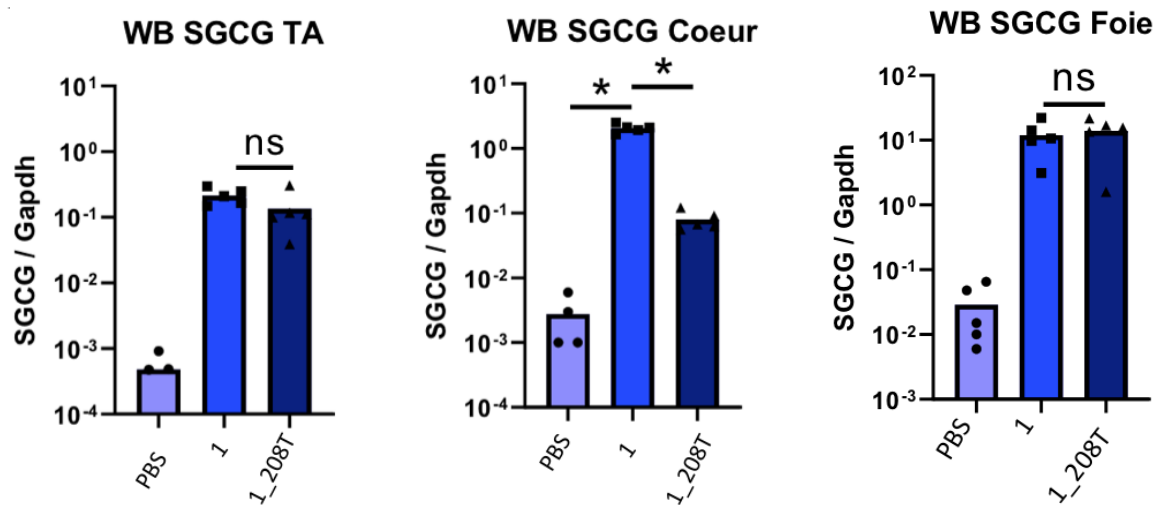


Figure 20B : Quantification relative de l'expression protéique du transgène hSGCG dans les TA, dans les cœurs et dans les foies des souris du groupe injecté avec du PBS, du groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG, et du groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG-208T.

Une coloration immunohistofluorescence des coupes histologiques de TA provenant des souris des 3 groupes a montré une efficacité de transduction du transgène proche de 100%, aussi bien pour le groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG-208T, que pour le groupe injecté avec la construction AAV8-1-hSGCG. Concernant les coupes histologiques de cœurs, la coloration immunohistofluorescence a montré que dans le groupe de souris injectées avec la construction AAV8-1-hSGCG-208T, seuls quelques cardiomyocytes expriment le transgène alors qu'avec la construction AAV8-1-hSGCG, le transgène est très fortement exprimé. Enfin, la coloration immunohistofluorescence des coupes histologiques de foies a montré une forte expression similaire du transgène entre les deux constructions (Figure 21).

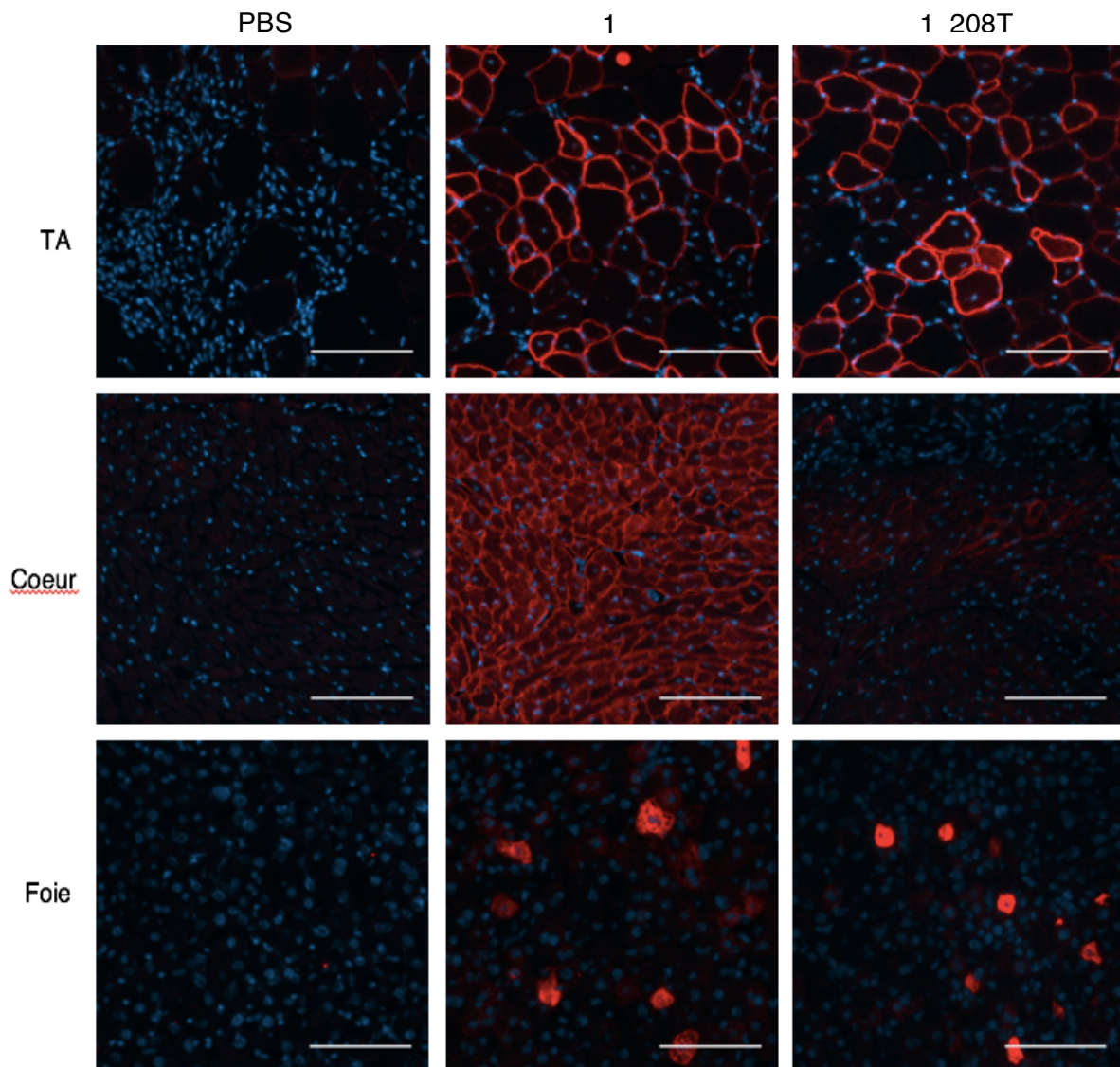


Figure 21 : Immunohistofluorescence des coupes de TA, cœurs et foies des trois groupes de souris, avec le transgène SGCG représenté en rouge et les noyaux en bleu grâce au DAPI.

III. Conclusion de ces résultats

Ces résultats ont montré une réduction importante de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle du transgène dans le cœur lors de l'ajout du miR-208T dans la cassette d'expression du vecteur, chez les souris γ -sarcoglycane KO. La construction de vecteur AAV8-1-hSGCG-208T est éligible pour cette approche de thérapie génique, néanmoins l'expression dans le foie reste importante.

II. Les différents promoteurs musculaires (1, 2, 3) modifient-ils l'expression du transgène ?

I. Protocole de l'étude

Une autre stratégie pour rapprocher l'expression du transgène à l'expression endogène, serait de changer de promoteur. Ainsi, cette étude a pour but d'évaluer différents promoteurs musculaires (1, 2, 3) dans les constructions SGCG afin d'identifier d'éventuelles modifications dans l'expression du transgène.

Dans cette étude, un groupe de 5 souris γ -sarcoglycane KO a reçu une injection d'AAV8-1-hSGCG à 5×10^{12} vg/kg, un deuxième groupe a reçu une injection d'AAV8-2-hSGCG à 5×10^{12} vg/kg, et un troisième groupe a reçu une injection d'AAV8-3-hSGCG à 5×10^{12} vg/kg. Le schéma du protocole de cette étude est présenté en figure 22. Du sang est prélevé à chaque souris avant l'injection, puis à J14 a lieu le sacrifice. Des analyses de biologie moléculaire telles que la quantification des VGCN, des ARN messagers, des protéines, ainsi que des analyses histologiques sont ensuite réalisées.

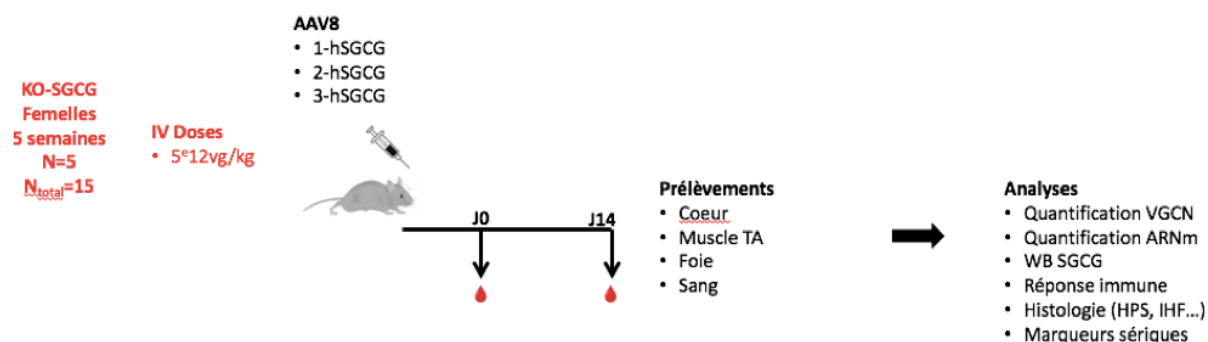


Figure 22 : Schéma du protocole de l'étude évaluant l'effet de différents promoteurs musculaires (1, 2, 3) dans la construction AAV8-hSGCG.

II. Résultats

Dans les muscles TA et dans le coeur, la quantification des VGCN a montré que la transduction des souris γ -KO avec les vecteurs à 5×10^{12} vg/kg est inférieure à 0,01

VCN noyau, quel que soit le promoteur. Les 3 vecteurs ont des efficacités de transduction similaires, permettant une comparaison sans biais des cassettes d'expression (Figure 23).

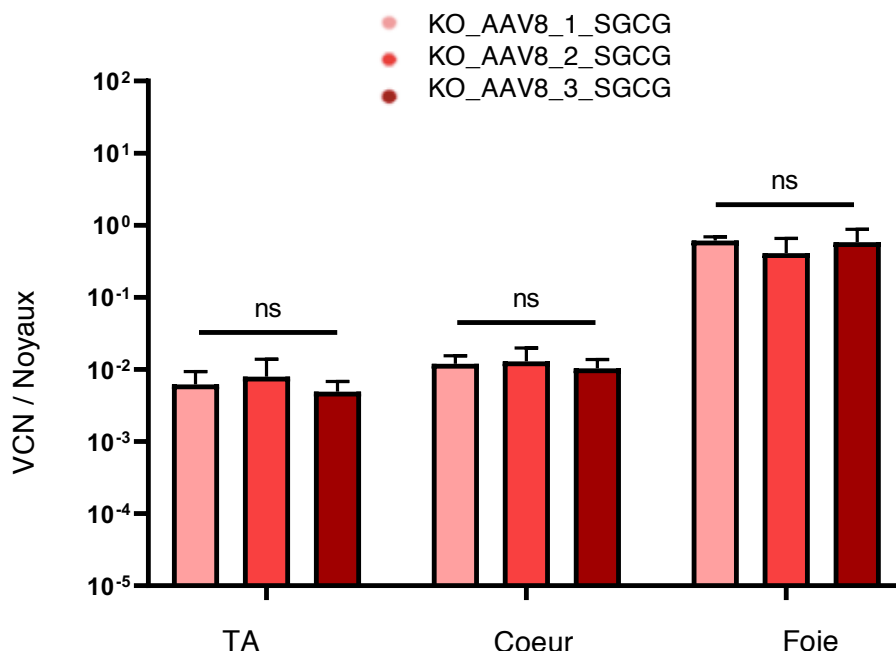


Figure 23 : Quantification des VCN par noyaux dans les organes TA, cœurs et foies des souris γ -KO, injectées avec les 3 constructions différentes.

La quantification relative des ARN messagers du transgène SGCG/P0 a mis en évidence une expression plus faible du transgène dans le cœur, dans les groupes de souris injectées avec le vecteur AAV8-3-hSGCG, par rapport aux deux autres groupes. Les marqueurs d'inflammation (Cd8), d'hyperrégénération (Tmem8c) et d'atteinte cardiaque (Myosine 7 (Myh7)) ont également été regardés. Une augmentation du marqueur Tmem8c témoignerait d'une hyperrégénération du tissu musculaire faisant suite à une importante dégénération des fibres musculaires. Une diminution du niveau de l'expression des ARN messagers de Myh7 serait révélateur d'une atteinte cardiaque. La Myosine 7 étant exprimée par les cardiomyocytes, lorsque ceux-ci sont détruits, le niveau global de Myh7 est également diminué sur l'ensemble du tissu cardiaque. Ces marqueurs ont été détectés au même niveau pour chacune des constructions (Figure 24).

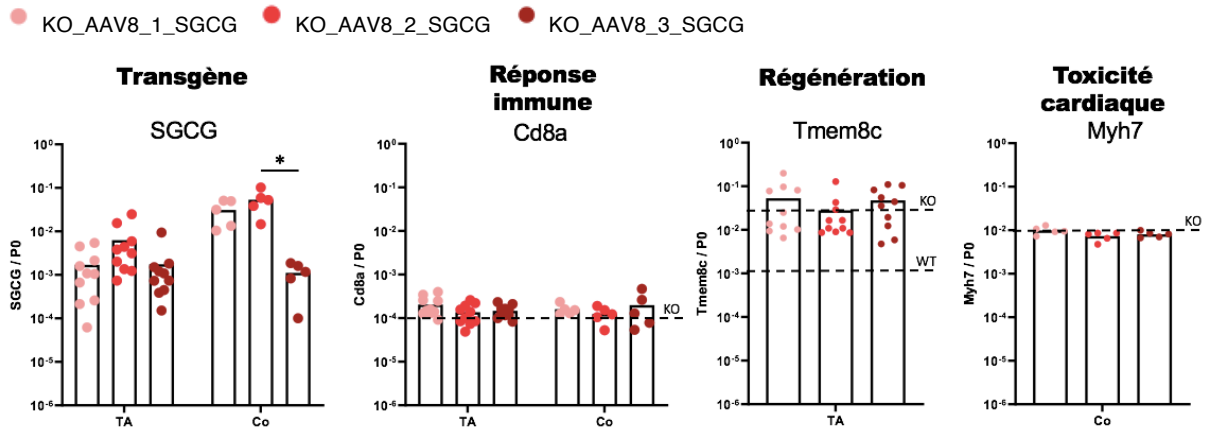


Figure 24 : Diagrammes présentant les quantifications relatives des ARN messagers chez les souris γ -KO injectées avec les 3 constructions différentes. Quantification relative des ARN messagers du transgène SGCG/P0 dans le cœur et dans les TA. Quantification relative des ARN messagers de Cd8a/P0 dans le cœur et les TA (indicateur d'une inflammation). Quantification relative des ARN messagers de Tmem8c/P0 dans les TA (indicateur d'une régénération des cellules musculaires). Quantification relative des ARN messagers de Myh7/P0 dans le cœur (indicateur d'une atteinte cardiaque).

Le Western Blot des TA des souris γ -KO des 3 groupes a montré une faible expression des protéines. Les deux constructions avec les promoteurs 1 et 3 expriment le transgène de manière équivalente, tandis que la construction avec le promoteur 2 montre une expression plus importante. Le Western Blot des cœurs des souris γ -KO a quant à lui mis en évidence une expression plus faible du transgène chez les souris du groupe ayant été injectées avec la construction AAV8-3-hSGCG, par rapport aux souris des deux autres groupes (Figures 25A et 25B).

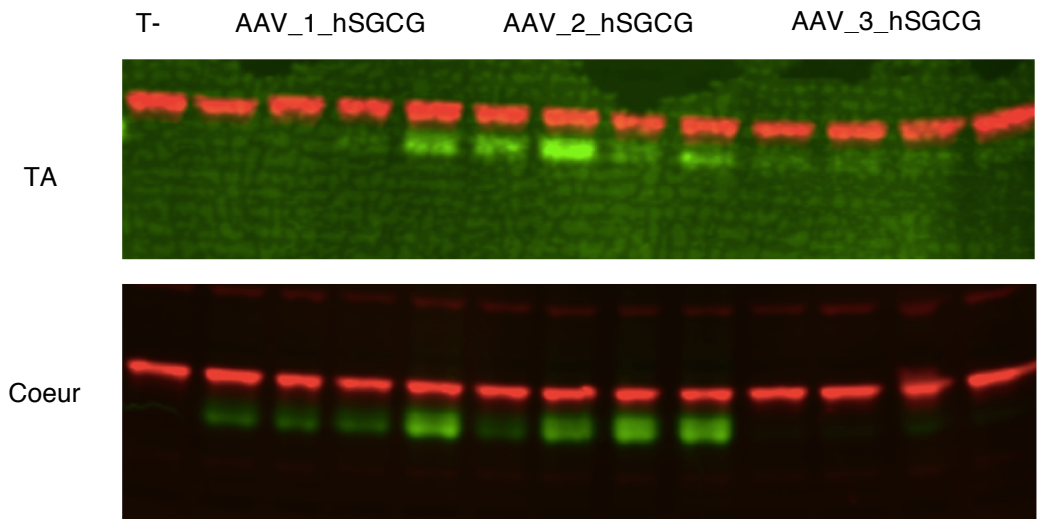


Figure 25A : Western Blot des TA et des cœurs des souris des 3 groupes, grâce aux anticorps spécifiques anti-hSGCG. Le transgène hSGCG est représenté en vert et le normalisateur (Gapdh) est représenté en rouge.

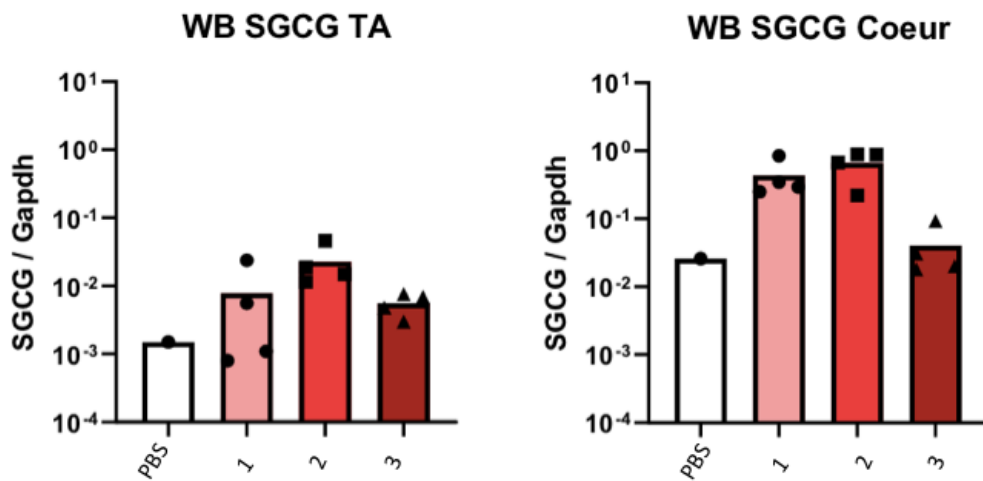


Figure 25B : Quantification relative de l'expression protéique du transgène hSGCG dans les TA et dans les cœurs des souris des 3 groupes.

Le Western Blot des foies des souris γ -KO a mis en évidence, une expression beaucoup plus faible du transgène chez les souris ayant été injectées avec la construction AAV8-3-hSGCG, par rapport aux deux autres constructions (Figure 26).

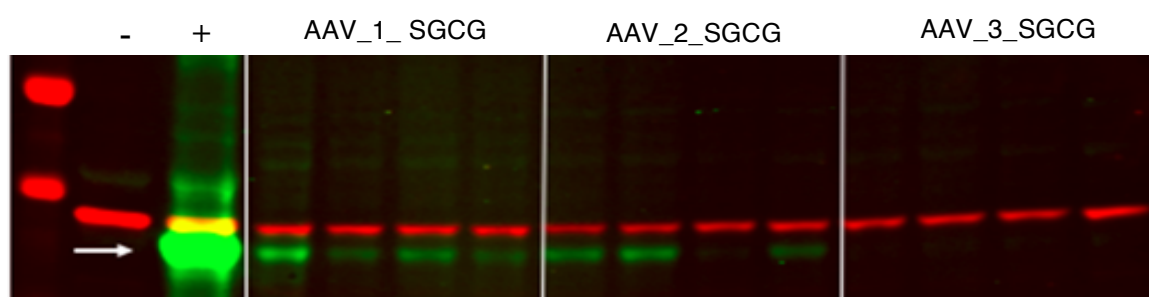


Figure 26 : Western Blot des foies des souris des 3 groupes, grâce aux anticorps spécifiques anti-hSGCG. Le transgène hSGCG est représenté en vert et le normalisateur (Gapdh) est représenté en rouge.

D'autre part, une coloration immunohistofluorescence des coupes histologiques de cœur provenant des souris des 3 groupes a été réalisée pour détecter la protéine hSGCG. Les résultats ont montré une nouvelle fois une expression du transgène beaucoup plus faible avec la construction AAV_3_SGCG qu'avec les constructions AAV_1_SGCG et 11V_2_SGCG (Figure 27).

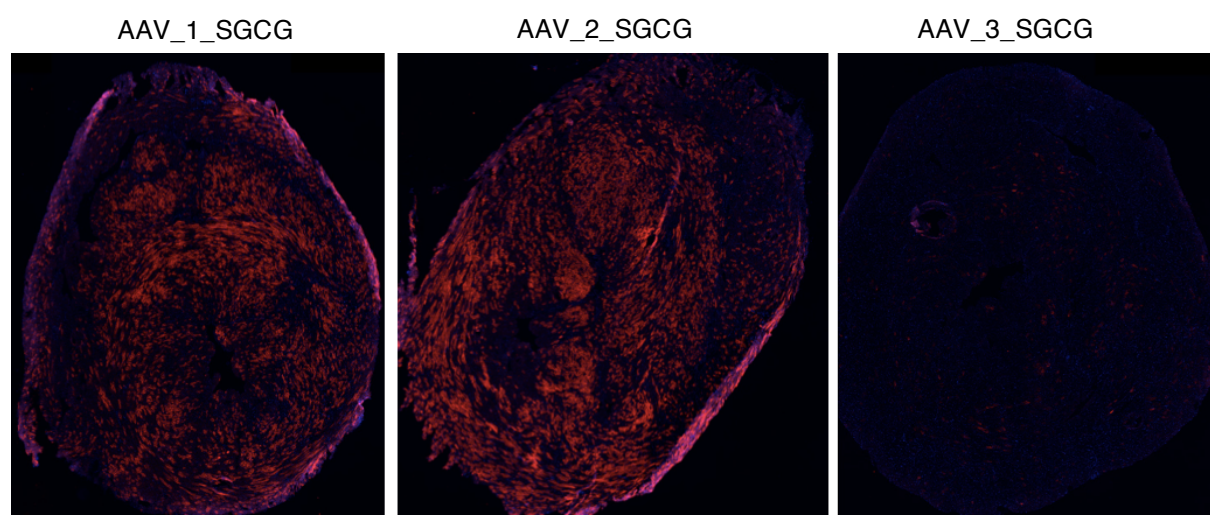


Figure 27 : Immunohistofluorescence des coupes de cœur des trois groupes de souris γ -KO, avec le transgène hSGCG représenté en rouge et les noyaux en bleu grâce au DAPI.

III. Conclusion de ces résultats

Ces résultats ont montré pour le promoteur 2, une forte expression du transgène dans tous les organes. Pour le promoteur 3, les résultats ont mis en évidence une très faible expression du transgène dans le foie et dans le cœur (même niveau d'expression qu'avec le mir208 target), et une expression dans le muscle squelettique aussi forte qu'avec le promoteur 1. Ce promoteur répond à nos attentes en matière d'équilibre d'expression entre les muscles, le cœur et le foie, sans effet de toxicité ni de réponse immune (Figure 24).

Discussion

Nous avons étudié deux approches afin d'optimiser la cassette d'expression du vecteur AAV8-hSGCG. La première a permis de réduire considérablement l'expression du transgène dans le cœur grâce à l'utilisation d'une séquence cible de miRNA cardiaque. La seconde a mis en évidence un promoteur permettant une régulation de l'expression du transgène proche de celle d'un promoteur endogène. La première approche avec l'utilisation du miR208T n'a pas tout à fait répondu à notre objectif car l'expression hépatique du transgène reste élevée. La seconde approche quant à elle, a répondu à notre objectif.

I. Une diminution de l'expression du transgène dans le cœur suite à l'introduction du miR208T

Une étude a été réalisée chez la souris avec le promoteur 1 à $3e^{14}$ vg/kg avec et sans l'introduction d'un mirTarget, afin d'évaluer l'effet de celui-ci sur le niveau d'expression du transgène dans les muscles TA, le cœur et le foie.

Les résultats de cette étude ont mis en évidence que l'introduction du miR208T dans la cassette d'expression (AAV8-1-hSGCG-208T) entraîne une diminution très importante (25 fois) du nombre d'ARN messagers du transgène et de l'expression protéique dans le cœur sans pour autant diminuer dans les muscles TA. La quantification des VCN a montré que la transduction avec les deux vecteurs AAV8-1-hSGCG et AAV8-1-hSGCG-208T n'est pas significativement différente dans le cœur, ce qui était attendu puisque la quantification des VGCN reflète l'efficacité de l'infection virale. Le miR208T ne semble pas impacter l'expression massive du transgène dans le foie. L'introduction du miR208T dans la construction du vecteur a montré qu'il s'agissait bien d'un élément régulateur spécifique du cœur.

L'élément de régulation peut aussi être trop puissant par rapport à l'effet attendu car une expression résiduelle dans le cœur est nécessaire pour prévenir l'atteinte cardiaque. Cet élément pourrait également interférer avec le rôle qu'exerce les

miRNA208 sur leurs cibles naturelles et pourrait ainsi entraîner des conséquences sur la fonction cardiaque. Travailler avec des promoteurs plus adaptés à l'expression naturelle de la SGCG permettrait de supprimer la nécessité d'un autre élément de régulation, donc de simplifier la cassette d'expression du vecteur, et ainsi permettre un suivi plus simple et plus sûr de l'expression du transgène.

II. Des variations du niveaux d'expression du transgène dans les différents organes selon les promoteurs

La deuxième phase d'investigation a été de rechercher le promoteur le plus efficace pour répondre aux critères d'expression de la γ -sarcoglycane dans notre modèle. Le promoteur 1 a montré une forte expression du transgène dans le cœur. Le promoteur 2 a montré une forte expression du transgène dans les TA, mais aussi dans le foie et le cœur. L'expression du transgène avec la construction 3 semble plus équilibrée entre le muscle squelettique et le cœur. De plus il s'exprime très peu dans le foie. C'est donc le promoteur qui a les propriétés les plus proches du promoteur endogène et qui a donc été sélectionné à la fin de cette étude pour d'autres études plus approfondies.

Cette construction de vecteur avec le promoteur 3 (AAV8-3-hSGCG) est préférable à celle avec le miR-208T (AAV8-1-hSGCG- 208T) car le miR-208T est un élément de régulation d'expression qui est potentiellement plus difficile à contrôler que l'expression d'un seul promoteur. De plus, si le miR-208T réduit l'expression dans le cœur, il ne la réduit pas dans le foie. Or, une diminution de l'expression dans le foie est voulue car des études ont montré que les AAV pouvaient entraîner une toxicité hépatique chez l'homme (Le Quellec et al., 2019). Cependant, il a également été rapporté dans l'article Poupiot et al., 2019 que le foie a un rôle dans la tolérance immunitaire. Cet article indique que la transduction simultanée du foie et du muscle par un vecteur AAV contenant un transgène, n'entraîne pas de réponse anti-transgène et ne déclenche pas de réaction immunitaire, contrairement à la transduction du muscle seul. Le foie semble entraîner une tolérance anti-transgène. Il serait donc intéressant de développer les connaissances sur ce rôle du foie, afin de l'utiliser à notre avantage, pour éviter ou diminuer les réponses immunitaires.

Des études (Isareli et al., 2019) ont montré des effets bénéfiques de la thérapie génique par AAV sur des souris jeunes, mais qu'en serait-il chez des souris plus âgées présentant des signes dystrophiques plus avancés ? Des études préliminaires tendent à démontrer qu'il est très difficile de modifier un phénotype installé. Intrinsèquement, l'âge pourrait aussi être un facteur qui affecte l'efficacité de la thérapie génique. En effet, le vecteur que nous avons conçu semble tout à fait adapté pour corriger un tissu

musculaire encore modelable mais comment faire pour que les muscles qui ont un phénotype dystrophique trop avancé puissent-être transduits efficacement et que la protéine SGCG puisse être exprimée à un niveau suffisant ? Certains muscles sont dans un état fibrotique tel que les cellules ont perdu leurs propriétés myogéniques et ne sont plus en mesure d'exprimer le transgène. Il faudrait donc réaliser pour ces muscles, un travail en amont afin de les rendre capables d'exprimer la protéine SGCG. Une piste de réflexion concernant ce travail serait d'utiliser les principes de la médecine régénérative afin de rendre aux cellules leurs propriétés myogéniques.

Conclusion

Pour conclure, nous sommes partis de 4 constructions exprimant la SGCG : AAV-1, AAV-1-208T, AAV-2, AAV-3. La construction AAV-1 a montré une forte expression du transgène dans le cœur. L'introduction du miR-208T dans la construction du vecteur a permis de réduire drastiquement (25 fois) ce niveau d'expression dans le cœur. Cette construction serait donc une option possible pour le choix du produit. La construction avec le promoteur 2 donne une forte expression du transgène dans les TA mais aussi dans le foie et le cœur ce qui n'en fait pas un bon candidat. Enfin la construction avec le promoteur 3 donne le même niveau d'expression du transgène dans les TA que la construction avec le promoteur 1, et le même niveau d'expression dans le cœur que la construction avec le miR208T. De plus, l'expression du transgène est très limitée dans le foie, ce qui fait de ce promoteur le candidat idéal pour optimiser la cassette d'expression du vecteur.

Bibliographie

1. Allen DL MS, Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. J Appl Physiol 78(5): 1969–1976. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. J Appl Physiol. 1995;78(5): 1969–1976.
2. Atchison RW CB, Hammon WM. . Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. Science. 1965;149(3685):754.
3. Balaji B GR. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. Current Gene Therapy. 2014;14(2):86-100.
4. Balakrishnan B. JGR. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. Current Gene Therapy. 2014;14, 1-15.
5. Bartoli M RC, Martin S, Fougerousse F, Suel L, Poupiot J, et al. Safety and Efficacy of AAV-Mediated Calpain 3 Gene Transfer in a Mouse Model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. Molecular Therapy 2006;13(2):250-9.
6. Bonnemann CG, R. Modi, et al. Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. Nat Genet. 1995;11(3): 266-273.
7. Büning H SA. Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. Molecular Therapy Methods & Clinical Development. 2019;12:248-65.
8. Bushby KMaJSB. The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature. Neuromuscul Disord. 1995;5(4): 337-343.
9. CA. S. Muscular dystrophies: an update on pathology and diagnosis. Acta Neuropathologica. 2010;120(3):343-58.
10. Chal J PO. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. Development. 2017;144(12):2104-2122.
11. Chambers lea. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. Nature. 2007;450, 1230–1234.
12. Christian Hinderer NK, Elizabeth L. Buza, Cecilia Dyer, Tamara Goode, Peter Bell, Laura K. Richman, and James M. Wilson. Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. Human Gene Therapy. 2018;29:3, 285-298.
13. Collins J BC. Congenital muscular dystrophies: toward molecular therapeutic interventions. Curr Neurol Neurosci Rep. 2010;10:83–91.
14. Drouin LM A-MM. Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. Future Virol. 2013;8(12):1183-99.

15. Ellis Pea. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev Neurosci*. 2004;26, 148–165.
16. Emery AE. The muscular dystrophies. *BMJ*. 1998;317(7164): 991-995.
17. Emery AE. The muscular dystrophies. *Lancet*. 2002;359(9307): 687-695.
18. Fernandez-Fuente M, Martin-Duque, P., Vassaux, G., Brown, S. C., Muntoni, F., Terracciano, C. M., and Piercy, R. J. Adenovirus-mediated expression of myogenic differentiation factor 1 (MyoD) in equine and human dermal fibroblasts enables their conversion to caffeine-sensitive myotubes. *Neuromuscul Disord*. 2014;24, 250e258.
19. Fougousse F BM, Poupiot J, Arandel L, Durand M, Guerchet N, et al. Phenotypic Correction of Sarcoglycan Deficiency by Intra-arterial Injection of a Muscle-specific Serotype 1 rAAV Vector. *Molecular Therapy* 2007;15(1):53-61.
20. Frontera WR, & Ochala, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. . *Calcified tissue international*. 2015;96(3), 183–195.
21. Ghosh TKea. Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development. *Mol Cell Biol*. 2009;29, 2205–2218.
22. Gicquel E MN, Foltz SJ, Martin WJ, Bourg N, Svinartchouk F, et al. AAV-mediated transfer of FKRP shows therapeutic efficacy in a murine model but requires control of gene expression. *Human Molecular Genetics*. 2017;26(10):1952-65.
23. Ginjaar HB vdKA, Ceelie H, et al. . Sarcoglycanopathies in Dutch patients with autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy. *J Neurol*. 2000;247(7):524-529.
24. Goyenvalle A. VA, Fougousse F., Leturcq F., Kaplan J-C., Garcia L., Danos O. Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *SCIENCE*. 2004;1796-1799.
25. Griffin MA FH, Tewari M, Acosta P, Kawana M, Sweeney HL, et al. γ -Sarcoglycan deficiency increases cell contractility, apoptosis and MAPK pathway activation but does not affect adhesion. . *Journal of Cell Science* 2005;118(7):1405-16.
26. Grose WE CK, Griffin D, Malik V, Shontz KM, Montgomery CL, et al. Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. . *PLoS One*. 2012;7(6):e39233-e.
27. Hack AA LC, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, et al. Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J Cell Biol*. 1998;142(5):1279-87.

28. Hartmann C C-MF, Boualem A, Jovanovic M, Lelandais-Brière C. Les microARN. *Med Sci (Paris)*. 2004;20(10):894-8.
29. Henriques SFD. Towards pharmacological strategies for missense mutations in two genes linked to muscular dystrophies: Université Paris-Saclay; 2018.
30. Hermonat PL MN. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(20):6466.
31. Herson S, F. Hentati, et al. A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1-gamma- sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C. *Brain*. 2012;135(Pt 2): 483-492.
32. Israeli D CJ, Corre G, Amor F, Poupiot J, Stockholm D, et al. An AAV-SGCG Dose- Response Study in a γ -Sarcoglycanopathy Mouse Model in the Context of Mechanical Stress. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2019;13:494-502.
33. Jopling C BS, Izpisua Belmonte JC. . Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(2):79-89.
34. JS. C. Gene therapy of muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*. 2002;11(20):2355-62.
35. Kehl T BC, Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, et al. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget*. 2017;8(63):107167-75.
36. Kerr JP WC, Bloch RJ. Dysferlin at transverse tubules regulates Ca² homeostasis in skeletal muscle. *Front Physiol*. 2014;5.
37. Khodabukus A, Madden, L., Prabhu, N. K., Koves, T. R., Jackman, C. P., Muoio, D. M., and Bursac, N. Electrical stimulation increases hypertrophy and metabolic flux in tissue-engineered human skeletal muscle. *Biomaterials*. 2019;198, 259e269.
38. Lapierre P AF. Le foie : un organe du système immunitaire ? . *Med Sci (Paris)*. 2007;23(11):985-90.
39. Lattanzi L, Salvatori, G., Coletta, M., Sonnino, C., De Angelis, M. G. C., Gioglio, L., Murry, C. E., Kelly, R., Ferrari, G., Molinaro, A., and other 3 authors. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer - an alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. *J Clin Investig*. 1998;101, 2119e2128.
40. Le Quellec S DA, Barbon E, Bordet J-C, Mingozi F, Dargaud Y, et al. Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors Expressing Human Coagulation FIX-E456H Variant in Hemophilia B Mice. *Thromb Haemost* 2019;119(12):1956-67.

41. Li J, D. Wang, et al. Efficient and long-term intracardiac gene transfer in delta-sarcoglycan- deficiency hamster by adeno-associated virus-2 vectors. *Gene Ther* 2003;10(21): 1807-1813.
42. Lim LE, F. Duclos, et al. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet.* 1995;11(3): 257-265.
43. Livak KJ ST. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
44. Lostal W BM, Bourg N, Roudaut C, Bentaïb A, Miyake K, et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Human Molecular Genetics* 2010;19(10):1897-907.
45. Magri F NV, Angelini C, Mongini T, Mora M, Moroni I, et al. The italian limb girdle muscular dystrophy registry: Relative frequency, clinical features, and differential diagnosis. *Muscle & Nerve.* 2017;55(1):55-68.
46. Matsumura K, F. M. Tome, et al. Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature.* 1992;359(6393): 320-322.
47. Matsushita T ES, Elliger C, Podsakoff G, Villerreal L, Kurtzman GJ, Iwaki Y et Colosi P. . Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther.* 1998;5, p. 938-945.
48. McNally EM, D. Duggan, et al. Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma- sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1996;5(11): 1841-1847.
49. Mendell JR, L. R. Rodino-Klapac, et al. Limb-girdle muscular dystrophy type 2D gene therapy restores alpha-sarcoglycan and associated proteins. *Ann Neurol.* 2009;66(3): 290-297.
50. Mendell JR, L. R. Rodino-Klapac, et al. Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol.* 2010;68(5): 629-638.
51. Mendell JR CL, Al-Zaidy SA, et al. Gene Delivery for Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2D by Isolated Limb Infusion. *Hum Gene Ther.* 2019;30(7):794-801.
52. Mendell JR R-KL, Sahenk Z, et al. Gene therapy for muscular dystrophy: lessons learned and path forward. *Neurosci Lett.* 2012;527(2):90-99.

53. Millet R RA, Ploquin A, Epstein A et Greco A et Salvetti A. Les vecteurs AAV pour le transfert de gène in vivo ou comment petit virus devient grand. *Virologie*. 2013;17, p. 343-453.
54. Monroy JA PK, Gilomre LA, Uyeno TA, Lindstedt SL, Nishikawa KC. What is the role of titin in active muscle? *Exerc Sports Sci Rev*. 2012;40:73–78.
55. N. SReM. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol*. 2014;1, p. 427-451.
56. Naso MF TB, Perry WL, 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*. 2017;31(4):317-34.
57. Nigro V, G. Piluso, et al. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet* 1996;5(8): 1179-1186.
58. Ochala J IH, Larsson L, Yagi N. A myopathy- linked tropomyosin mutation severely alters thin filament con-formational changes during activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:9807–9812.
59. Ottenheijm CAC GH. Lifting the nebula: novel insights into skeletal muscle contractility. *Physiology*. 2010;25:304–310.
60. Ozawa E, M. Yoshida, et al. Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 1995;4 Spec No: 1711-1716.
61. P. I. Liver auto-immunology: The paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. *Journal of Autoimmunity*. 2013;46:1-6.
62. Petrof BJ SJ, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(8):3710.
63. Piccolo F, S. A. Moore, et al. Limb-girdle muscular dystrophies. *Adv Neurol*. 2002;88: 273-291.
64. Politano L, V. Nigro, et al. Evaluation of cardiac and respiratory involvement in sarcoglycanopathies. *Neuromuscul Disord*. 2001;11(2): 178-185.
65. Poupiot J CVH, Hardet R, Colella P, Collaud F, Bartolo L, et al. Role of Regulatory T Cell and Effector T Cell Exhaustion in Liver-Mediated Transgene Tolerance in Muscle. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;15:83-100.
66. Pozsgai ER, D. A. Griffin, et al. Systemic AAV-Mediated beta-Sarcoglycan Delivery Targeting Cardiac and Skeletal Muscle Ameliorates Histological and Functional Deficits in LGMD2E Mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017;25(4): 855-869.

67. Raven PB WD, Squires WG Jr, Muray TD. Exercise physiology: an integrated approach. Wadsworth Cen- gage Learning, Belmont, CA. 2013.
68. Ray PN, B. Belfall, et al. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature*. 1985;318(6047): 672-675.
69. Roberds SL, F. Leturcq, et al. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994;78(4): 625-633.
70. Rossi A SAMSP. Intégration des vecteurs AAV et mutagenèse insertionnelle. 32(2):167-74. 2016.
71. Roudaut C RF, Suel L, Poupiot J, Charton K, Bartoli M, et al. ;. Restriction of Calpain3 Expression to the Skeletal Muscle Prevents Cardiac Toxicity and Corrects Pathology in a Murine Model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Circulation*. 2013;128(10):1094-104.
72. Rouillon J PJ, Zocevic A, Amor F, Léger T, Garcia C, et al. Serum proteomic profiling reveals fragments of MYOM3 as potential biomarkers for monitoring the outcome of therapeutic interventions in muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics* 2015;24(17):4916-32.
73. Schiaffino S RC. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev*. 2011;91:1447–1531
74. Semplicini C, J. Vissing, et al. Clinical and genetic spectrum in limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Neurology*. 2015;84(17): 1772-1781.
75. Tang Y CJ, Huard J, Wang B. AAV-directed muscular dystrophy gene therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2010;10(3):395-408.
76. Theadom A RM, Roxburgh R, et al. Prevalence of muscular dystrophies: a systematic literature review. *Neuroepidemiology*. 2014;43(3-4):259-268.
77. Thompson R SV. Limb-girdle muscular dystrophies — international collaborations for translational research. *Nature Reviews Neurology*. 2016;12(5):294-309.
78. V. BS. Current topics for teaching skeletal muscle physiology. *Adv Physiol Educ*. 2003;27(1-4):171-182.
79. Virag T CSeKR. Producing recombinant Adeno-Associated Virus in foster cells: overcoming production limitations using a baculovirus–insect cell expression strategy. *Human Gene Ther*. 2009;20, p. 807-817.
80. Walton JNaFJN. On the classification, natural history and treatment of the

myopathies. Brain. 1954;77(2): 169-231.

81. Wang B LJeXX. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97 : p. 13714-13719.



VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

TITREOPTIMISATION DU TRANSFERT DE GÈNE DANS LES GAMMA-SARCOGLYCANOPATHIES

Résumé

La Gamma-Sarcoglycanopathie (ou dystrophie musculaire des ceintures de type 2C) est une maladie génétique rare, due à des mutations dans le gène de la gamma-sarcoglycane. Ces mutations empêchent l'expression de la gamma-sarcoglycane, une protéine indispensable au maintien de l'intégrité membranaire des cellules musculaires. Chez ces patients, la dégénérescence des cellules musculaires entraîne une faiblesse progressive des muscles du bassin et des épaules. Une atteinte du muscle cardiaque et une insuffisance respiratoire peuvent également survenir et conduire à une mort prématurée. Il n'y a à ce jour aucun traitement disponible pour cette maladie. Dans cette étude, nous avons exploré une approche de thérapie génique, consistant à réintroduire dans l'organisme le gène de la gamma-sarcoglycane grâce au vecteur AAV8. Deux approches d'optimisation de la cassette d'expression du vecteur ont été étudiées, afin de rendre l'expression de la protéine la plus proche possible de celle exprimée par un gène non muté. La première approche consiste en l'introduction d'un élément régulateur (miR-208T), et la seconde en la comparaison de différents promoteurs. Suite aux résultats de cette étude, le promoteur sélectionné pour la construction du vecteur est le promoteur 3.

TITLEGENE TRANSFER OPTIMIZATION IN GAMMA-SARCOGLYCANOPATHIES

Summary

Gamma-Sarcoglycanopathy (or Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2C) is a rare genetic disorder caused by mutations in the gamma-sarcoglycan gene. These mutations cause the lack of expression of gamma-sarcoglycan, a protein that plays a fundamental role in maintaining the integrity of muscle cells during contraction. In these patients, degeneration of muscle cells leads to progressive weakness of pelvis and shoulder muscles. Heart and respiratory failure can also occur and lead to premature death. Currently, there is no treatment available for this disease. In this study, we explored a gene therapy approach, consisting of reintroducing the gamma-sarcoglycan gene into the body using an AAV8 vector. In order to make the expression of the protein most similar to the one expressed by unmutated gene, two approaches for optimizing the expression cassette of the vector were studied. The first approach consists in the introduction of a regulatory element (miR-208T), and the second in the comparison of different promoters. The results showed that the best promoter for this vector is the 3rd promoter.

Mots-clés

Gamma-Sarcoglycanopathie ; Dystrophies des ceintures ; Thérapie génique ; AAV ; Promoteurs