



HAL
open science

Thérapie génique par saut d'exon : application à une Myopathie à Core et à un cas de syndrome OculoCérébroRénale de Lowe

John Rendu

► **To cite this version:**

John Rendu. Thérapie génique par saut d'exon : application à une Myopathie à Core et à un cas de syndrome OculoCérébroRénale de Lowe. Biotechnologies. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV014 . tel-01555445

HAL Id: tel-01555445

<https://theses.hal.science/tel-01555445>

Submitted on 4 Jul 2017

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 obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biotechnologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par **John RENDU**

Thèse dirigée par **Isabelle MARTY**

préparée au sein de l'équipe « **Muscle et Pathologies** » dirigée par le Dr I. Marty à l'**Institut des Neurosciences de Grenoble** dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant**

Thérapie génique par saut d'exon : application à une Myopathie à Core et à un cas de syndrome OculoCérébroRénale de Lowe

Thèse soutenue publiquement le **10 Juin 2014**,
devant le jury composé de :

Monsieur Alain BUISSON

Professeur des Universités, Université de Grenoble, Président

Monsieur Denis FURLING

Directeur de recherche CNRS, Paris, Rapporteur.

Monsieur Jocelyn LAPORTE

Directeur de recherche INSERM, Strasbourg, Rapporteur

Monsieur, Arnaud ECHARD

Directeur de recherche CNRS, Paris, Examineur

Monsieur Julien FAURE

Maitre de Conférence Universitaire -Praticien Hospitalier, Université de Grenoble, Membre

Madame Isabelle MARTY

Directeur de recherche INSERM, Grenoble, Directrice



Remerciements

Ca y est c'est fini, après 15 inscriptions à la fac, 5 inscriptions en thèse, ma vie d'étudiant se termine. Je profite de ce moment pour faire mes remerciements à tous ceux qui ont participé à ce travail et surtout à ces années de vies.

Je tiens à remercier tout d'abord tous les membres du jury. Vous me faites l'honneur de juger ce travail, j'espère ne pas vous decevoir.

Je te remercie Isabelle, pour m'avoir accueilli au laboratoire et m'avoir fait découvrir le monde du calcium. Je te remercie pour toute la confiance que tu m'a donnée. Et aussi pour la relecture de la thèse, je vais suivre une formation INSERM orthographe. Et je relance les manips demain !

Julien, je te remercie de la confiance que tu me donnes et pour tous les projets qui nous attendent pour les années à venir.

Au membre de l'équipe Muscle et Pathologie d'avant et d'aujourd'hui, Sarah, Arianne, Isabelle, Yasmine, Orianna, Muriel , Alexis , Brice, Julie, Klaus et Didier pour votre disponibilité, votre sympathie. Un grand merci à Anne qui m'a encadré au début de ma thèse (pour la thèse de pharmacie).

A tous ceux de la BGM : Delphine, Joelle, Nadine, Peggy, Severine, Marina, Jonathan, Gaelle, Pierre, Amandine, Claire, Tomato et surtout Nathalie Merci !

A Patrice Faure, Benoit Busser, Xavier Fonrose et tous ceux du DBTP.

A mes trois mentors : à Alain pour votre sympathie et pour m'avoir mis le pied à l'étrier de la recherche, à Joel pour m'avoir accueilli en BGM et m'avoir fait découvrir la génétique, la biochimie et le LOWE. Pour tous vos conseils et votre savoir. Pour la liberté que vous m'avez accordée. Je vous remercie de votre soutien dans toutes ces épreuves. A Nicole enfin, pour toutes nos discussions, tes conseils, ton savoir. J'espère pouvoir relever le défi des myopathies. Tu as mis la barre très haut.

A Charles et à Marie, pour ces millions de projets et rifougnades qui nous attendent : la génétique n'a qu'à bien se tenir !!

A ma famille,

A mes beaux frères et à ma belle sœur, c'est toujours une joie d'être avec vous

A tous ces futurs moments que nous aurons.

Aux neveux et nièces.

A Natacha, William et Anne-Caroline : c'est grâce (ou à cause !) de vous que j'en suis arrivé là.

A mes parents, vous qui m'avez tant donné : Merci. J'espère vous rendre fiers.

A Marieke, pour avoir partagé mes joies et mes peines durant cette thèse, pour ton soutien sans faille et pour tout le reste, surtout pour la dernière dédicace

A Corentin, tu es venu changer « mon rythme de manip » en me forçant à respecter les horaires. Je te souhaite de faire un métier dans lequel tu t'épanouiras.

Résumé

Après la transcription, le pré-ARNm subit des étapes de maturation avant de sortir du noyau pour être traduit. Une des étapes de maturation est l'épissage. Il permet de souder les séquences codantes de l'ARNm entre elles (les exons) et d'exclure les régions non codantes (les introns).

Des mutations génétiques sont à l'origine de défaut d'épissage. Elles peuvent conduire à des rétentions d'intron, des sauts d'exon et des inclusions de séquences introniques appelées pseudo exons.

Ma thèse a porté sur l'utilisation du saut d'exon pour corriger ces inclusions. Je me suis intéressé à deux pathologies : la myopathie à cores et le syndrome de Lowe

Pour le premier cas, je me suis intéressé à une mutation dans l'intron 101 du gène *RyR1*. Cette mutation est à l'origine de la création d'un site donneur d'épissage qui active un site accepteur provoquant l'inclusion d'un pseudo exon de 99 nucléotides. Cette inclusion induit une baisse de la quantité du canal calcique RyR1 dans les cellules du patient. Ce canal permet le couplage entre l'excitation et la contraction musculaire. Ses défauts conduisent à diverses myopathies dont la myopathie à cores. Le patient présentait une hypotonie néonatale, une scoliose et des défauts respiratoires, et n'a jamais acquis la marche. J'ai dessiné des oligonucléotides, je les ai transfectés dans les cellules du patient en culture et ainsi montré par RT-PCR que le saut du pseudo exon était possible. Afin d'optimiser l'efficacité pour pouvoir évaluer la restauration au niveau protéique et fonctionnel, j'ai développé un lentivirus exprimant une cassette U7 SmOPT avec les AON choisis. Après transduction des cellules, j'ai pu montrer que le saut du pseudo exon permettait le retour de la protéine et de sa fonctionnalité, cette approche pourrait donc permettre une correction génique chez le patient.

Pour le deuxième cas, j'ai tenté de corriger une mutation du gène *OCRL*. Cette mutation crée un site donneur d'épissage dans l'intron 4 du gène *OCRL* et active un site accepteur d'épissage 66 nucléotides en amont. L'inclusion du pseudo exon induit la chute du taux de transcrit *OCRL* par un mécanisme de "Non sense mediated mRNA Decay". *OCRL* est une phosphatidyl inositol 5 Phosphatase permettant de réguler la quantité de Ptd Ins(4,5)P2 dans la cellule. Les défauts dans *OCRL* sont responsables d'une pathologie multisystémique, le syndrome de Lowe. J'ai pu obtenir des fibroblastes cutanés du patient. J'ai transfecté ces cellules avec des AONs choisis pour permettre un saut de l'exon pathogène. J'ai ensuite intégré la séquence des AONs efficaces dans un lentivirus U7. J'ai transduit les cellules du patient en culture et observé un retour de la protéine et un retour de l'activité enzymatique, cette approche pourrait donc théoriquement permettre une correction chez le patient.

Ces deux travaux sont les premières preuves de principes de thérapie par modulation de l'épissage pour les myopathies congénitales et pour le syndrome de Lowe. Ils ouvrent la voie à des perspectives de traitement pour ces maladies génétiques.

Abstract

After transcription, the pre mRNA will undergo different maturation step before getting out of the nucleus for translation. One of these step of maturation is the splicing. It allows to concatenate the coding sequences of the mRNA (the exons) and induces the exclusion of the non coding sequences (the introns).

Genetics mutations can lead to splicing defects. These defects could be intron retention, exon skipping and exonisation of intronic sequences called pseudo exons.

My thesis work was to evaluate the exon skipping therapy to correct these exonisation. I focuses on two diseases: core myopathy and Lowe syndrome.

For the first one, my interest was on a mutation in the 101 th intron of *RYR1* gene. This mutation creates a splicing donor site wich unveils a cryptic acceptor site. This leads to the inclusion of a 99 nucleotides pseudo exon. This inclusion induces a decrease of the quantity of the calcium channel RyR1 in the patient cells. This channel allows the excitation-contraction coupling, and therefore the muscular contraction. Defects in this channel lead to different myopathies (eg. core myopathy). The patient present at birth a major neonatal hypotonia, scoliosis and respiratory defects. He has never walked. I designed oligonucleotides (AON), transfected them in the cultured patient cells and showed by RT PCR that exon skipping was possible. In order to optimise the efficiency and to evaluate the rescue at a protein level and at a fonctionnal level, I develloped a lentivirus which express a U7 Sm OPT cassette with the choosen AONs. After cell transduction, I have shown that exon skipping allowed the rescue of the protein and of its fonctionnality. This approach could permit a genetic correction for the patient

For the second case, I have tried to correct an OCRL mutation. This upstream creates a splicing donor site and unveils an acceptor site 66 nucleotides before. This leads to the inclusion of a pseudo exon which induces a severe decrease of OCRL transcripts level due to a "non sense mediated mRNA Decay". OCRL is a phosphatidyl inositol 5 Phosphatase, which regulates the Ptd Ins(4,5)P₂ pool in the cell. OCRL defects induces a multi systemic disease the Lowe syndrome. I obtained patient cutaneous fibroblasts. I transfected these cells with choosen AONs to correct the splicing defect. I integrated the AONs sequence into a U7 lentiviral cassette. I transduced the cultured patient cells and observed a rescue of the protein with a rescue of its activity. This approach could, theoritically permit a correction in the patient.

These two studies are the first proof of concept of splicing modulation therapy for congenital myopathy and for Lowe syndrome. This work offers a lot of perspective for the tratment of these genetic illness

Préambule : Contexte de l'étude

Je développe mon activité de recherche en parallèle de mon activité hospitalière. Au cours de mon activité hospitalière, au sein du laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire du CHU de Grenoble, je réalise depuis environ 6 ans (seconde moitié de mon internat en Biologie Médicale) le diagnostic moléculaire de différentes pathologies géniques. Les diagnostics moléculaires auxquels je participe sont la myopathie de Duchenne et de Becker, le déficit en ornithine Transcarbamylase (déficit en OTC), la maladie de Dent et le Syndrome de Lowe. Depuis le départ à la retraite du Dr Nicole Monnier (fin 2013), j'ai en outre pris entièrement en charge le diagnostic moléculaire des myopathies congénitales (myopathies structurales à cores et myopathies à némaline). Pour mon activité de recherche et la réalisation des travaux présentés dans cette thèse, j'ai souhaité avoir une continuité avec mes activités hospitalières. Le laboratoire de diagnostic est étroitement lié à l'équipe Muscle et Pathologie de l'Institut des Neurosciences de Grenoble (GIN) pour les activités de recherche sur les pathologies neuromusculaires, c'est donc au sein de cette équipe que mon travail de thèse s'est déroulé.

Le travail de recherche que j'ai réalisé durant ma thèse fut de développer une approche de thérapie génique pour certains cas particulièrement bien adaptés identifiés au laboratoire. J'ai ainsi testé une approche de thérapie génique par saut d'exon pour deux pathologies différentes :

- une mutation intronique profonde dans l'intron 101 du gène *RyR1* responsable d'une myopathie congénitale dans une famille de patient
- une mutation intronique profonde dans l'intron 4 du gène *OCRL* responsable d'un syndrome de Lowe chez un patient.

Le but de ces études est de montrer qu'il est possible de corriger ces mutations par saut d'exon. Ce travail permettra de poser les premières pierres de la thérapie génique pour ces pathologies.

Sommaire

<u>Remerciements</u>	3
<u>Résumé</u>	5
<u>Abstract</u>	6
<u>Préambule : Contexte de l'étude</u>	7
<u>Sommaire</u>	8
<u>Abréviations</u>	11
<u>Introduction</u>	12
<u>Chapitre I L'épissage</u>	13
<u>I-L'épissage</u>	14
I-A L'épissage alternatif	14
I-B Le mécanisme d'épissage	15
I-C Régulation de l'épissage	20
<u>II Les mutations d'épissage</u>	25
II-A Différentes possibilités	25
II-B Les mutations introniques profondes	27
II-C Etude des variations d'épissage	28
<u>Chapitre II Thérapie génique par chirurgie des ARNm</u>	30
<u>I-Thérapie génique par Chirurgie des ARNm</u>	33
I-A Correction par blocage d'une séquence d'épissage par AON	33
I-B Correction génique par U7 snRNA	40
I-C Applications	43
<u>II Trans-épissage</u>	46
<u>Chapitre III Les Myopathies Congénitales</u>	48
<u>I Le muscle</u>	48
<u>II Les myopathies congénitales</u>	55
<u>III Le récepteur de la ryanodine de type 1</u>	61

<u>Chapitre III Le syndrome de Lowe</u>	67
<u>I Le gène OCRL</u>	67
I-A Les phosphoinositides	68
I-B OCRL : la protéine	71
<u>II Maladies liée aux mutations dans le gène OCRL</u>	74
II-A Le syndrome de Lowe	74
II-B Les mutations du gène OCRL	76
<u>Matériels et méthodes</u>	77
<u>I Culture Cellulaire</u>	78
<u>II Oligonucléotides et anticorps</u>	80
<u>III-Biologie moléculaire</u>	84
<u>IV Biochimie</u>	87
<u>V Transfection et Transduction</u>	89
<u>VI Etudes des transcrits</u>	90
<u>VII Biologie Cellulaire</u>	93
<u>VIII Bio informatique</u>	95
<u>Résultats</u>	96
<u>Projet n°1 Thérapie Génique par saut d'exon appliquée à une myopathie à core</u>	97
<u>Présentation du cas RYR1</u>	98
<u>Résultats, Discussion</u>	101
<u>I Validation du modèle cellulaire</u>	101
<u>II Etude de la mutation</u>	103
<u>III Détermination des AONs</u>	107

<u>IV Saut d'exon sur cellules fœtales</u>	109
<u>V Restauration par lentivirus U7</u>	111
<u>Discussion et Perspectives autour du projet RYR1</u>	118
<u>Projet n°2 Thérapie génique par saut d'exon appliquée au syndrome de Lowe</u>	122
<u>Présentation du cas OCRL</u>	123
<u>Résultats, Discussion</u>	125
<u>I Etude de la mutation</u>	125
<u>II Choix des AONs et transfection</u>	128
<u>III Saut d'exon par lentivirus U7</u>	130
<u>Discussion, Perspectives autour du projet OCRL</u>	138
<u>Conclusion générale</u>	141
<u>Bibliographie</u>	143
<u>Article</u>	159

Abréviations

A: adénine	LNA: acide nucléique fermé
AA: acide aminé	MmD : multi minicore disease
ADN: acide desoxyribonucléique	MyHC: chaîne lourde de la myosine
ADNc: acide desoxyribonucléique complémentaire	PCR : polymérase chaîne réaction
AON: oligonucléotide antisens	PM: poids moléculaire
ARN: acide ribonucléique	PNA: acide nucléique peptidique
ARNm: acide ribonucléique messager	PPyT: région riche en pyrimidine
ATP: adénosine tri phosphate	pré-ARNm: pré acide ribonucléique messager
BMD: myopathie de Becker	PS: phosphorothioate
BP: point de branchement	RS: réticulum sarcoplasmique
C: Cytosine	RT: rétro transcription
CmC : 4 Chloro m Cresol	RyR1: récepteur de la ryanodine de type1
CCD: central core disease	SA: site accepteur
CK: créatine Kinase	SD: site donneur
couplage-EC: couplage excitation contraction	SL: splice leader
CRC: complexe de relargage du calcium	snRNP: petite ribonucléoprotéine nucléaire
DG: enthalpie libre	T: Thymine
DHPR: récepteur aux dihydropyridines	TE: élément transposable
DMD: myopathie de Duchenne	Tm: température de fusion
DMEM: dulbecco's modified eagle medium	U: uracile
ESE: exonic splicing enhancer	
ESS: exonic splicing silencer	
G: guanine	
HEK: human embryonic kidney	
HM: hyperthermie maligne	
hnRNP: ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire	
ISE: intronic splicing enhancer	
ISS: intronic splicing silencer	
kDA: kilo Dalton	
LESE: ESE de grand exon	

Introduction

Chapitre I

L'épissage

L'acide désoxyribonucléique ou ADN, le support de l'information génétique, est séquestré dans le noyau. Une succession d'étapes permettra l'expression de cette information sous la forme de protéine dans le cytosol de la cellule.

L'enchaînement des bases de l'ADN est d'abord lu puis transcrit en pré-ARNm, séquence de ribonucléotidique. Le pré-ARNm subit différentes étapes de maturation, qui lui permettent ainsi de sortir du noyau pour atteindre les ribosomes. Ces derniers vont lire la séquence d'ARNm, et la traduire en une séquence d'acides aminés codant pour la protéine. Des étapes de maturation, de modification vont ensuite moduler, modifier le message génétique et permettre son expression.

Trois grandes étapes sont essentielles à la maturation du pré-ARNm en ARNm mature, maturation qui permettra à l'ARNm de se diriger vers le pore nucléaire:

- la fixation d'un motif guanylique par une liaison 5'-5' tri phosphate (ou Coiffe) à l'extrémité 5' de l'ARNm permettant sa protection face aux 5'exonucléases
- la reconnaissance du site de polyadénylation et la fixation d'un long motif poly riboadénosique (ou queue polyA), lui conférant ainsi sa demi vie face aux 3'exonucléases. A noter que plus sa séquence est longue plus l'ARNm perdurera. Seul l'ARNm des histones ne subit pas de fixation de la queue polyA
- l'épissage.

Nous nous intéresserons plus particulièrement lors de ce travail à la troisième étape :

l' épissage

I-L'épissage

L'épissage est une étape clé de la maturation des ARNm. Les transcrits primaires ou pré-ARNm sont constitués d'une alternance d'introns (séquences non codantes ne participant pas à la traduction) et d'exons (séquences, codantes ou non, participant à la traduction). Grâce à l'épissage, les introns sont excisés du transcrit primaire et les exons sont joints l'un à l'autre pour former une séquence continue qui sera traduite et codera pour une protéine.

Jusqu'en 1977, la communauté scientifique pensait que tous les gènes étaient continus. Mais Philip Sharp et Richard Roberts découvrirent qu'un grand nombre de gènes chez les eucaryotes étaient interrompus par des séquences non codantes : les introns (Berget and Sharp 1977, Chow et al. 1977). Mis à part les gènes codant pour les histones, la plupart des gènes contiennent des introns. La présence des introns chez les eucaryotes varie suivant le genre et l'espèce. On trouve aussi des introns dans quelques gènes d'eubactéries et d'archaebactéries.

Pour un même ARNm, l'épissage pourra être différent d'un tissu à un autre ou à un stade du développement différent: c'est l'épissage alternatif. Chez l'être humain, plus de 60% des gènes subissent un épissage alternatif. Le nombre de gènes codant pour des protéines est de 24.000 or le nombre de protéines synthétisées est estimé à plus de 100.000.

I-A L'épissage alternatif

L'épissage est à l'origine de la diversité protéique.

Avant la découverte de l'épissage, le dogme était « un gène une protéine ».

La régulation de l'épissage permet de « choisir les exons à épisser » et donc de faire varier la séquence protéique. Le choix d'exon différentiel est appelé épissage alternatif, il pourra produire un ARNm de séquence partiellement différent suivant le type cellulaire, la phase de cycle etc.

Chez l'Homme, on estime à plus de 60% les gènes dont les pré-ARNm subissent un

épissage alternatif avec environ 7 protéines différentes.

Pour exemple de diversité, le gène *DSCAM* exprimé chez la drosophile est épissé en plus de 38.000 messagers différents (Wojtowicz et al. 2004).

Chez les eucaryotes supérieurs, les conséquences de cet épissage alternatif sont le plus fréquemment le saut d'exon ou l'utilisation d'un site accepteur différent. Chez les plantes, les champignons ainsi que les protozoaires la conséquence la plus fréquente est la rétention de l'intron.

L'épissage est un phénomène complexe permettant la diversité. Il est finement régulé quant à la définition des exons et quant au processus d'épissage lui-même.

I-B Le mécanisme d'épissage.

La réaction d'épissage est une réaction complexe. Elle est en effet soit médiée par les ARNm eux mêmes, on parle alors d'auto épissage ; soit médiée par des complexes ribonucléoprotéique:

- l'auto épissage de type I utilisant une guanine située hors de la séquence nucléotidique
- l'auto épissage de type II qui utilise une adénine intra brin.
- l'épissage médié par ribonucléoprotéine (similaire sur de nombreux points à l'auto épissage de type II)

L'excision des introns du pré-ARNm et l'accolement des exons sont dirigés par des séquences particulières, « les séquences consensus » au niveau des jonctions intron-exon (figure 1).

La première séquence consensus, à l'extrémité 5' de l'intron, est appelée site donneur (SD). Cette séquence MAG/GURAGU est très conservée (où M correspond aux acides nucléiques Cytosine ou Adénine, R les acides nucléiques puriques adénine ou guanine et / la jonction exon-intron).

La seconde séquence consensus se situe à la fin de l'intron en 3' et est constituée de 3 parties:

- de -20 à -50 nucléotides du prochain exon, une adénine appelée point de branchement (BP) appartenant à la séquence consensus YNYCRAY
- une région riche en pyrimidines (ou PolyPyrimidineTract, PpyT)
- le site en 3' comportant YAG/G très conservé dans l'évolution appelé site accepteur (ou SA)

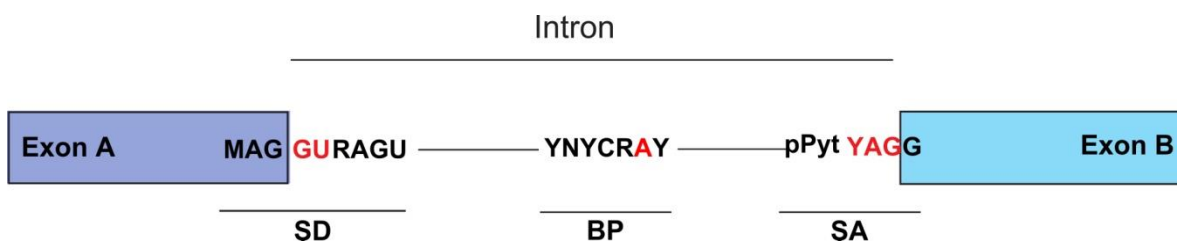


Figure 1 Site consensus d'épissage

SD: site donneur, composé de la séquence MAG/GURAGU. BP: point de branchement, séquence YNYCRAY. pPyt: polyPyrimidine tract zone riche en uracile et cytosine. SA: site accepteur, avec pour séquence YAG/G. /: séparation exon-intron; A, adénine; C, cytosine; U, uracile; G, guanine; M adénine ou cytosine; R, adénine ou guanine; Y, cytosine ou uracile; N adénine, cytosine, guanine, Uracile.

L'épissage est réalisé à l'aide d'une énorme machinerie enzymatique complexe appelée épissosome, ou plus communément spliceosome (Ritchie, Schellenberg, and MacMillan 2009).

Le spliceosome est composé de petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires (snRNP) spécialisées et de nombreuses protéines accessoires. Les snRNPs sont constituées de protéines associées à des petits ARN catalytiques de 100 à 200 nucléotides. Cinq snRNPs (U1, U2, U4, U5 et U6) participant à l'épissage sont retrouvées en abondance dans le noyau des eucaryotes.

L'épissage est une réaction complexe qui passe par plusieurs étapes. Ces étapes sont décrites ci dessous.

Le spliceosome forme un premier complexe appelé le complexe "E" (early ou précoce), de la façon suivante :

le complexe E

La snRNP U1 se lie au site donneur par appariement de base entre le transcrit primaire et le petit ARN U1 grâce à sa séquence en 5' (étant l'inverse complémentaire du site consensus donneur d'épissage MAG/GURAGU). La sous unité de 65 kDa du dimère U2AF (U2 auxiliary factor) se fixe sur la région riche en pyrimidine tandis que l'autre sous-unité de 35kDa se fixe à la séquence du site accepteur YAG/G formant le complexe E (figure 2)

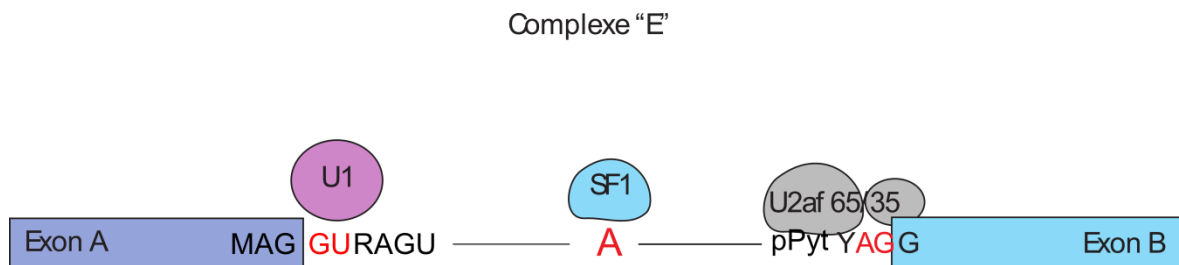


Figure 2. Epissage : le complexe E

Le complexe A

Il y a alors recrutement de la snRNP U2 qui se lie au BP, remplaçant la protéine SF1 pour former le complexe A. La snRNP U2 forme une poche dans laquelle la séquence du point de branchement se lie. L'adénine de cette séquence est alors retournée et est mis en évidence avec la fonction 2'OH qui servira à la réaction. (figure 3)

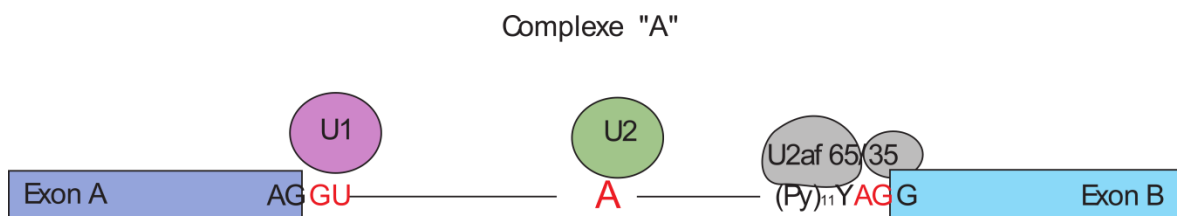


Figure 3. Epissage : le complexe A

Le complexe B

Au complexe A viennent se joindre les tri-snRNP composés de U5 et du duplex U4/U6 pour former le complexe B (figure 4).

La snRNP U4 est considérée comme une chaperonne pour la snRNP U6, elle lui est appariée. U5 reconnaît les deux exons en s'y hybridant. U1 recrute U6. Une hélicase, portée à l'origine par U5, sépare U4 et U6. U6 s'apparie alors à U2.

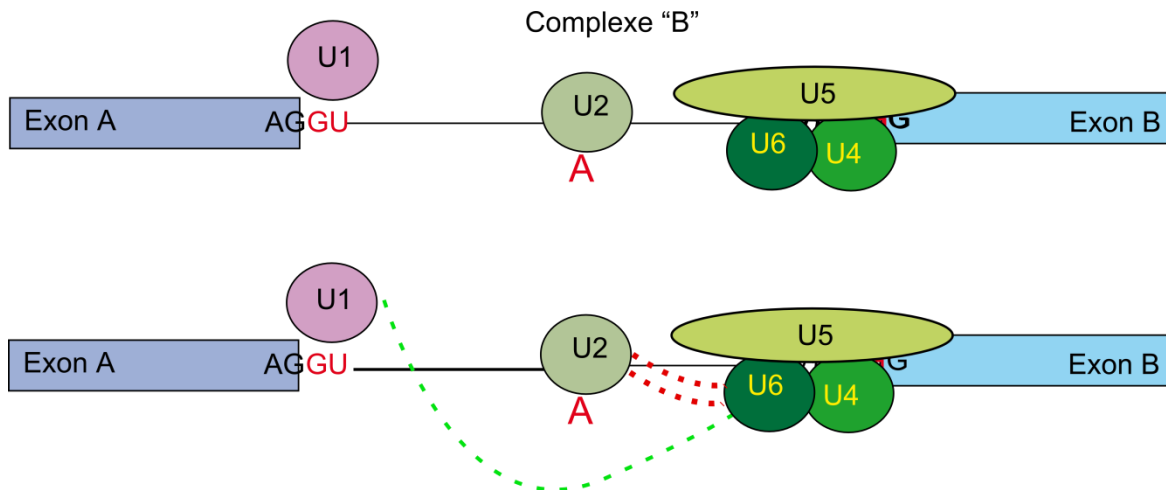


Figure 4. Epissage : le complexe B

Ce changement conformationnel en permettant la formation d'une structure hairpin appelé stemloop 1 et dévoile la séquence ACAGAGA. Cela permet :

- la reconnaissance précise du site à épisser par hybridation au site donneur en +2 +5+6
- la réaction d'épissage par le rapprochement du point de branchement au site donneur. Il y aura attaque de substitution nucléophile du 2'OH du BP.

Le complexe C (figure 5)

Le complexe B subit un réarrangement pour former le complexe C dans lequel les snRNP U1 et U4 sortent du complexe. C'est ce nouveau complexe qui catalyse les deux étapes de trans-estérification. Les protéines liées au complexe U2/5/6 sont des catalyseurs des réactions d'épissage (comme la protéine prp8 (Kuhn, Li, and Brow 1999; Galej et al. 2013)), et permettent de former des intermédiaires réactionnels optimisant la réaction d'épissage (Umen and Guthrie 1995). Le groupement hydroxyle en 2' de l'adénosine du BP réalise une attaque nucléophile sur le phosphate du site donneur. La

première trans-estérification réalisée, le site donneur encore en contact avec une boucle d'U5 est très proche du site accepteur.

La deuxième trans-estérification peut donc se dérouler. Elle conduit au clivage de l'exon en 5' avec l'intron, suivit d'une attaque sur le phosphate en 3' de l'intron (site accepteur) par le groupe hydroxyle 3' de l'exon permettant la jonction entre les deux exons. A chaque étape de la trans-estérification, une nouvelle liaison phosphodiester est formée et une ancienne est rompue, maintenant la balance énergétique.

De l'ATP est par ailleurs requis pour la formation des différents complexes mais pas pour les réactions de clivage et de ligation. L'intron épissé en forme de lasso reste dans le noyau. La liaison 2'OH est alors coupée par la protéine dBR1 (lariat debranching enzyme) (Cheng and Menees 2011) . Le « lasso » linearisé est enfin dégradé.

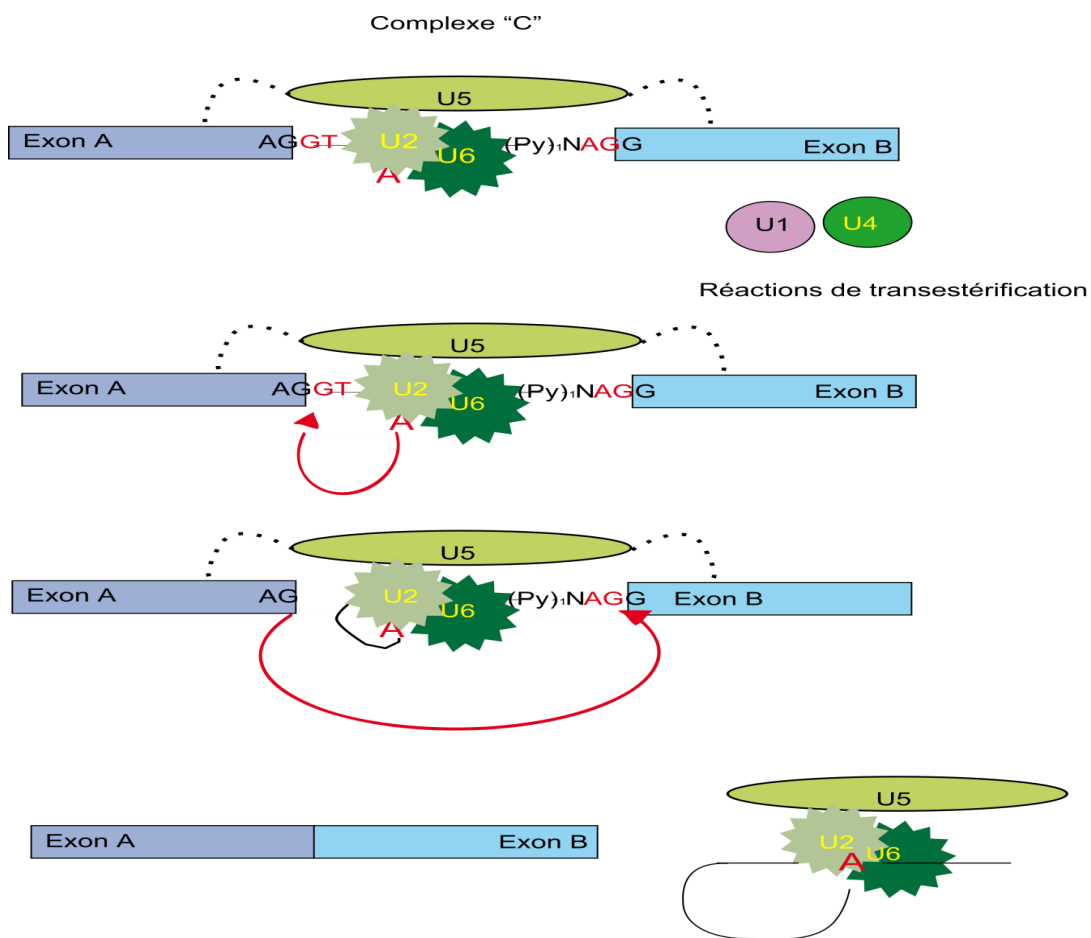


Figure 5 Complexe C et réaction d'épissage

Un autre système d'épissage par spliceosome existe mais est très faiblement représenté, c'est le système d'épissage minoritaire U11 U12 (Chang, Chen, and Tarn 2008). Il utilise des snRNP et des séquences consensus différentes, appelés exons atac, contrairement au système majoritaire (GT AG). Il représente 0,4 % des exons chez l'être humain. Ce système utilise U11 et U12, qui remplacent respectivement U1 et U2. Il utilise également d'autres snRNP : U4atac, U6tac et U5 (Turunen et al. 2013). La séquence du point de branchement est également différente. Les couples U1_U2 et U11_U12 n'interagissent pas entre eux.

I-C Régulation de l'épissage

Les exons ont en moyenne une taille moyenne de 150 nt et sont entourés d'intron de taille moyenne de 3.500 nucléotides. Il faut une reconnaissance parfaite des sites de coupures et de jonction, pour permettre la synthèse d'un messager cohérent à l'origine de la synthèse d'une protéine normale.

Cette reconnaissance est modulée par un certain nombre de facteurs.

On trouve des séquences additionnelles dans les introns et dans les exons. Ces séquences agissent aussi bien en augmentant qu'en diminuant la reconnaissance des sites consensus d'épissage. Elles sont appelées exonic splicing enhancers (ESE) pour les séquences exoniques augmentant l'épissage, intronic splicing enhancers (ISE) pour les séquences introniques augmentant l'épissage, exonic splicing silencer (ESS) et intronic splicing silencer (ISS) pour les séquences diminuant l'épissage (Pozzoli and Sironi 2005).

I-C-1 Les activateurs d'épissage : les SR protéines

Les ESE ont largement été étudiées. Ces séquences sont le lieu de fixation spécifique d'une classe de protéines riches en Sérine et en Arginine appelées SR protéines. Elles sont définies pour être des séquence courtes (6 nucléotides pour les ESEs) sur lesquels se fixent les protéines promouvant l'épissage.

Parmi les ESEs, on distingue les RescueESE qui sont des ESEs majoritairement retrouvés dans les exons (par rapport au introns), et majoritairement retrouvés dans les exons ayant des sites consensus donneurs et accepteurs faibles. Concernant les exons de taille importante, de nouvelles séquences ont été identifiées qui sont appelées « LESEs » (Large Exon Splicing Enhancers)(Bolisetty and Beemon 2012).

Les autres séquences régulatrices ISE, ESS et ISS n'ont à ce jour pas encore été étudiées aussi précisément. Seul un groupe de ribonucléoprotéines a été reconnu comme antagonisant l'épissage dans les ESS et ISS: les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes ou hnRNPs. Pour les ISE, c'est plus flou, on suppose que des régions introniques riches en répétition GT augmenteraient l'épissage.

La famille de protéines ayant été les plus étudié sont les SR protéines(Long and Caceres 2009,Stojdl and Bell 1999)

Ces protéines sont appelées ainsi du fait de leur domaine carboxy terminal riche en acide aminés sérine et arginine (>40 %). Ces motifs sont à l'origine des interactions protéines-protéines. Elles possèdent aussi un ou plusieurs domaines de reconnaissance et de fixation à l'ARNm dans leur partie N terminale

3 modes d'action ont été proposés:

- Permettre le recrutement de la snRNP U1
- Permettre le recrutement des sous-unités U2AF
- Augmenter le recrutement du complexe snRNP U4/U6,U5 durant l'épissage

I-C-2 Les inhibiteurs d'épissage : les hnRNP

D'autres facteurs influent aussi sur la régulation de l'épissage et l'inhibent : les hnRNP.

Cette famille appelée « ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire » est composée de protéines ayant un « ancêtre » commun avec les SR protéine. Elles possèdent un domaine de fixation à l'ARNm, lui permettant la fixation à des séquences riches en guanine. Elles ne possèdent pas de domaine d'interaction SR, mais une région riche en glycine. Leurs séquences de fixation sont souvent situées aux bornes introniques. Les hnRNPs participeraient aussi à la définition de l'intron. L'inhibiteur le plus décrit est la

hnRNPA1 (Paz, and Caputi 2013).

Différents modes d'action ont été mis en évidence pour cette protéine (Roca, Krainer, and Eperon 2013):

- hnRNPA1 peut entrer en compétition avec certaines SR protéines dont SRSF1 (SF2/ASF), leur séquence de fixation étant relativement proche. L'équipe de Talukdar a montré que l'épissage des transcrits du gène du récepteur à insuline était modifié par le rapport *srsf1/hnRNPA1* (Talukdar et al. 2011).
- Certaines hnRNPs peuvent polymériser et ainsi bloquer un ESE à distance
- Les hnRNPs n'ont pas qu'un rôle dans l'inhibition de l'épissage d'un exon en gênant stériquement la fixation d'un ESE.

Elles ont surtout un rôle dans l'épissage alternatif : deux hnRNP A1 distants peuvent dimériser permettant de créer une boucle et ainsi exclure un ou plusieurs exons de la reconnaissance des systèmes d'épissage.

I-C-3 Définition de l'exon

Il a été montré sur des travaux sur la drosophile que plus l'intron est grand, plus l'exon est autonome dans son épissage. C'est à dire que les ESE ont un poids important pour la sélection de l'exon.

Les vertébrés et plus particulièrement les mammifères, possèdent des exons de petite taille et des introns de grande taille, ce qui est l'inverse des eucaryotes inférieurs. On aura deux types de "définition", selon la taille des introns : si les introns sont supérieurs à 250 nucléotides, les séquences régulatrices seront situées dans les exons (c'est l'exon définition) si les introns sont inférieurs à 250 nucléotides ce sont les séquences introniques qui permettent la définition de l'exon; c'est l'intron définition. Chez les mammifères, l'exon définition sera la plus souvent mis en œuvre (De Conti, Baralle, and Buratti 2013). L'étude de Xiao et al. montre que les séquences ESS et les sites consensus évolueraient d'une manière similaire : pour qu'un exon reste présent dans les transcrits au cours de l'évolution, il faut qu'un site consensus soit capable de supplanter une variation qui augmenterait la force d'un ESS. Le phénomène se retrouve avec certains

ESE (Tra2, SRp55, SRp20) qui évoluent en compensant les variations de sites consensus.(Xiao et al. 2007)

I-C-4 Structure et temporalité

Une fonction inhérente à l'ARN est sa capacité à former des structures secondaires et tertiaires stables. Certaines structures vont ainsi permettre la traduction, sans recourir aux séquences kozac, comme les séquences IRES (internal ribosome entry site) ou la formation de boucle en épingle à cheveux (ou Hairpin) pour ainsi former les ARNt. La formation de ces structures se réalise donc au fur et à mesure la transcription. La vitesse de la polymérase influe sur l'épissage (Nogués, Muñoz, and Kornblihtt 2003). Un site d'épissage faible pourra être reconnu plus aisément si la polymérase n'évolue que lentement, ne permettant pas à la cellule de choisir un autre site plus fort et inversement. Il a même été montré qu'en changeant la vitesse de processivité de l'ARN polymérase, on pouvait changer l'épissage alternatif d'un gène.

Les structures de l'ADN peuvent aussi ralentir la polymérase. Les histones jouent un rôle important sur l'enroulement de la chromatine (Hnilicová and Staněk 2011). C'est pourquoi certains marqueurs comme les modifications post traductionnelles des histones ou la méthylation de l'ADN peuvent être à l'origine d'une modification d'épissage. Certaines études montrent des modifications des histones différentes suivant si l'exon est constitutif ou alternatif. Les protéines histones peuvent aussi être liées aux facteurs d'épissage comme les SR protéines.

La méthylation de l'ADN peut altérer l'épissage de certains gènes :

- la méthylation des promoteurs est à l'origine d'une diminution de la transcription.
- A un niveau Intra-génique la méthylation provoquera un ralentissement de la transcription à l'origine de l'inclusion ou de l'exclusion d'un exon (Maunakea et al. 2013).

Les structures secondaires et tertiaires des pré-ARNm vont influencer sur l'épissage de certains exons (Buratti and Baralle 2004). Les structures ouvertes du pré-ARNm, les boucles des épingles à cheveux ont été recensées comme lieu de fixation des éléments

de régulation (ESR).

L'étude de grands gènes comme la dystrophine a pu mettre en évidence l'importance de la temporalité dans l'épissage :

La dystrophine, un des plus grand gène du génome humain (2400kbases) représentant 0.1% du génomes met 16h pour être transcrit. Une partie de son épissage est réalisé simultanément avec la transcription, une réaction d'épissage durant environ 30 secondes (Tennyson, Klamut, and Worton 1995).

II Les mutations d'épissage

Les variations géniques sont à l'origine de modifications du message protéique, avec la production d'une protéine porteuse d'une modification d'un acide aminé lors des mutations faux sens, ou tronquée voire absente lors des mutations non sens.

II-A Différentes possibilités (Baralle and Baralle 2005)

D'autres variations peuvent avoir un impact en amont de la synthèse protéique. Ces mutations peuvent modifier l'épissage d'un exon et avoir des conséquences dramatiques pour la protéine. Une mutation au niveau des sites d'épissages (séquences consensus et/ou régulatrices) peut en effet modifier l'épissage normal de l'ARNm. Ces mutations peuvent entraîner soit la diminution de la reconnaissance du site d'épissage lorsque celles-ci se trouvent au niveau des sites physiologiques (consensus et des ESE) soit la création d'un site d'épissage plus « fort », l'ancien site ne sera plus reconnu. Les conséquences au niveau de l'épissage sont nombreuses, on peut noter:

- une abolition d'un site physiologique avec saut de l'exon concerné

Destruction du site Physiologique:
Saut d'exon

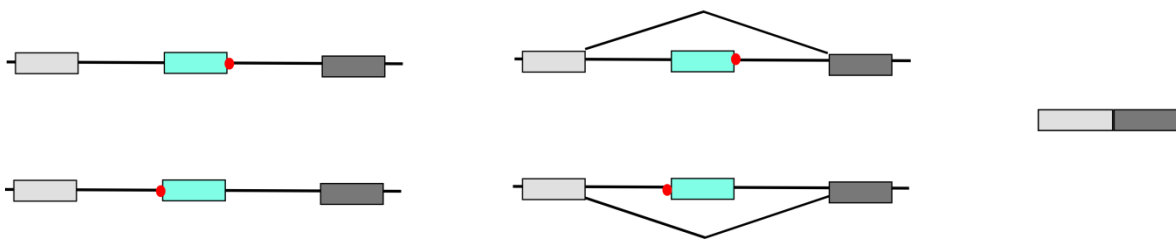


Figure 6 Conséquence de mutation d'épissage : le saut d'exon

les mutations sont représentées en rouge

- une abolition d'un site physiologique avec rétention intronique

Destruction du site Physiologique:
Rétention d'intron

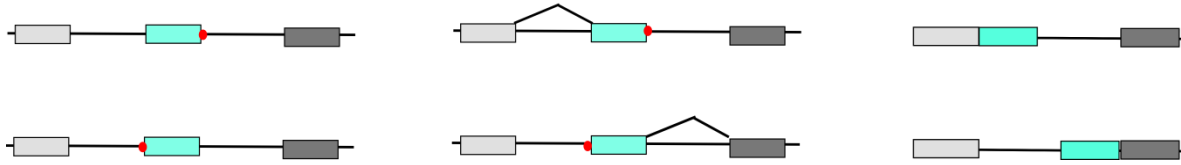
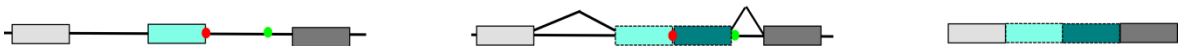


Figure 7 Conséquence de mutation d'épissage : la rétention d'exon

- une abolition du site physiologique avec révélation d'un site dit « cryptique ». En fonction de la localisation du site cryptique, il s'ensuit soit une délétion exonique partielle soit une rétention intronique.

Destruction du site Physiologique:
Activation d'un site cryptique intronique



Destruction du site Physiologique:
Activation d'un site cryptique exonique



Figure 8 Conséquence de mutation d'épissage : activation d'un site cryptiques

Le site cryptique est représenté en vert

- une création d'un site qui induira une délétion exonique ou une insertion exonique si le site devient plus fort que le site physiologique

Création d'un nouveau site:
Rétention intronique partielle

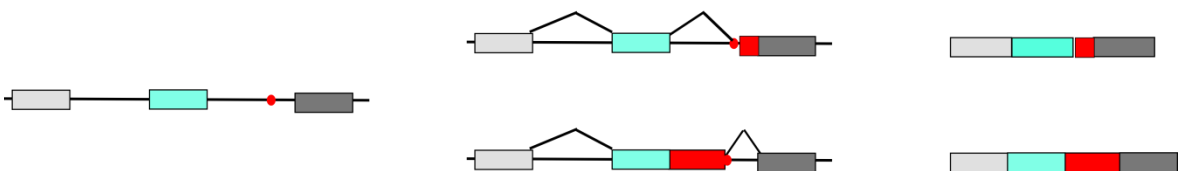


Figure 9 Conséquence de mutation d'épissage : activation d'un site cryptiques

- une création d'un site qui provoquera l'inclusion d'un nouvel exon ou « pseudo exon » dans la séquence de l'ARNm. (figure 10)
- Soit une combinaison des mécanismes précédents.

Création d'un nouveau site:
Activation site cryptique, l'exonisation

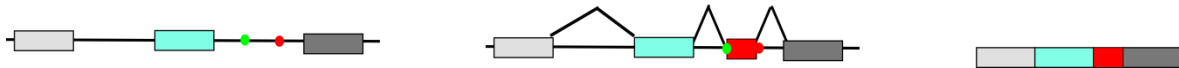


Figure 10 Conséquence de mutation d'épissage : la création d'un nouveau site avec activation d'un site cryptique

II-B Les mutations introniques profondes

Une des questions est comment une mutation profonde peut être à l'origine d'une exonisation. L'épissage est un phénomène complexe qui a besoin d'un certain nombre de séquences pour que celui-ci soit réalisé. Il est difficilement imaginable à la vue de la complexité de l'épissage qu'une simple mutation soit à l'origine de la pathologie. Sachant que, comme décrit en introduction, au-delà de 250 nucléotides une variation n'est pas sensée être capable de modifier l'épissage, comment une simple variation « perdue dans un intron » peut-elle activer les senseurs d'épissage ? L'étude de Vorechowski et al. (Vorechovsky 2010) a montré que ces exonisations n'étaient pas le fruit du hasard. La plupart des pseudo-exons sont situés dans des régions particulières : des éléments transposables.

Ces séquences dispersées à travers le génome sont des séquences qui se sont multipliées au cours de l'évolution se multipliant et se dispersant dans tout le génome. Ces éléments ont arrêté de s'étendre il y a quelques millions d'années. Ces séquences considérées comme des séquences « inutiles » ne le sont pas. Elles possèdent tout ce qu'il faut pour une exonisation : un point de branchement, une région riche en pyrimidine, un pseudo-site accepteur et un pseudo-site donneur. Ces éléments transposables sont considérés comme des moteurs évolutifs importants permettant non pas une évolution par glissement mais une évolution « brutale » à l'origine d'une insertion de séquence.

Dans la base de données DBASS 5' (Buratti et al. 2011) où sont recensées un grand

nombre de mutations introniques profondes retrouvées dans la littérature, on retrouve un certain nombre de mutations présentes dans des régions ALU, MIR, LINE2, LINE1.

II-C Etude des variations d'épissage

La validation de ces mutations ne peut pas être obtenue uniquement par l'étude des transcrits du tissu dans lequel s'exprime le gène muté. La complexité d'obtention du tissu à étudier oriente vers d'autre type d'étude.

Différentes alternatives sont possibles.

II-C-1 Le minigène d'épissage

On peut en effet étudier l'effet de la mutation par l'utilisation de plasmide ou minigène permettant l'expression de la variation dans un système in vitro. Différents plasmides ont été mis au point pour permettre l'étude des variations. Ces outils sont cependant limités de part la taille des fragments à intégrer dans le plasmide (Cooper 2005). De plus la lignée cellulaire utilisée peut ne pas exprimer les facteurs d'épissage du tissu où le gène est normalement exprimé.

II-C-2 Les logiciels de bioinformatique

On peut aussi étudier ces variations à l'aide de logiciel bioinformatique. Différents logiciels permettant l'étude de l'épissage existent :

- ceux orientés vers l'étude des sites consensus d'épissage avec analyse des sites donneurs, accepteurs (voir les points de branchement)
- ceux étudiant les régulateurs de l'épissage ESE ESS.

II-C-2-a Logiciels étudiant les sites consensus d'épissage

Concernant les sites accepteurs et donneurs, trois logiciels sont couramment utilisés par la communauté scientifique et sont considérés comme les plus fiables : NNSplice, SSF (splice site finder) et MaxEntScan. Ils utilisent la connaissance actuelle de la composition des sites d'épissage mais ont été développés avec des algorithmes

différents.

- L'algorithme utilisé dans Splice Site Finder est basé sur l'étude de Shapiro et Senapathy (Shapiro and Senapathy 1987) qui utilise une table pondérée de nucléotides représentant la fréquence des nucléotides dans leur position dans une séquence d'épissage. Le logiciel utilisant l'algorithme Princeps n'est plus disponible mais a été développé dans les logiciels Alamut et Human Splicing Finder (HSF)(Desmet et al. 2009).
- NNSplice est un logiciel qui utilise une base de données de site d'épissage. Il ne reconnaît un site d'épissage que si la séquence est présente dans sa base de données : plus la base sera grande meilleure sera la détection
- MaxEntScan est basé sur le principe de l'entropie maximale (un modèle statistique) et utilise un large panel de sites d'épissage humain. Contrairement aux autres logiciels il prendrait en compte les séquences adjacentes (Yeo and Burge 2004)

J'ai utilisé durant ce projet HSF et MaxEntScan pour l'étude des sites donneurs et accepteurs d'épissage.

L'étude de Houdayer et al. (Houdayer et al. 2012) sur les mutations d'épissage de BRCA1/BRCA2 estimait qu'il fallait utiliser deux algorithmes différents: MAXENT suivi d'un logiciel utilisant un algorithme SSF-like pour avoir une sensibilité supérieure à 85%.

Un nouvel algorithme a été proposé par Tsai et Wang (Tsai and Wang 2012) : SPO . Il s'intéresse à la séquence du site donneur mais cet algorithme ajoute une notion de structure. L'étude utilisant cet algorithme montrait qu'il est de plus grande fiabilité que les autres logiciels. Mais cet algorithme n'a toujours pas d'interface conviviale.

II-C-2-b Logiciels étudiant les modulateurs d'épissage

Pour identifier les ESE, le logiciel ESE finder (Cartegni et al. 2003), qui utilise les résultats d'une méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) a été utilisé, cette méthode permet de sélectionner de courtes séquences sur lesquelles se fixent préférentiellement les protéines SR et hnRNP.

Le logiciel RESCUE ESE recense les séquences ESE qui ont été retrouvées dans des exons et non dans des introns. Ces séquences Rescue ESE sont de plus retrouvées dans des

exons ayant des sites d'épissage faible (Fairbrother et al. 2002).

Durant ce projet j'ai pu utiliser ces deux logiciels pour rechercher les séquences modulant l'épissage.

D'autres logiciels existent :

- SpliceAID2 créé en 2012 qui comme ESE finder recense les séquences ESE mais a la particularité d'utiliser une base de données d'expression de transcriptomique et protéomique, permettant une meilleure reconnaissance des recherches suivant le tissu et le type cellulaire (Piva et al. 2012).
- SpliceAidF quant à lui s'intéresse aux données de la littérature concernant les différentes protéines se fixant sur les ESR (Giulietti et al. 2012).
- Cryp Skip qui propose d'évaluer si un changement nucléotidique peut engendrer ou non un saut de l'exon ou une rétention en offrant un score prenant en compte les sites donneurs et accepteurs ainsi que les variations parmi les ESR et ISR (Divina et al. 2009).
- HOT skip qui étudie pour chaque nucléotide d'un exon les effets d'une substitution nucleotidique sur les ESE ou ESS et ainsi propose un score représentant le rapport ESE/ESS (Raponi et al. 2011)

Chapitre II

Thérapie génique par chirurgie des ARNm

Depuis la découverte des lois de la génétique par Gregor Mendel, l'Homme n'a cessé d'essayer de modifier la faune et la flore.

En 1932, lors du 6ème Congrès International de Génétique, Goodale proposa un traité portant sur l'Ingénierie Génétique dans lequel il décrivait l'intérêt d'utiliser la génétique pour l'agroalimentaire. Ce fut la première fois que le terme d'Ingénierie Génétique fut utilisé (Crow 1992).

Dès lors, l'utilisation de la génétique paraissait évidente pour traiter les pathologies humaines.

L'idée d'utiliser des virus pour le transfert de gène fut ainsi appliquée en 1968 par Rogers et Pfluderer. En 1989, le premier essai de thérapie génique fut réalisé par l'équipe de Rosenberg sur des patients atteints de mélanome (S. A. Rosenberg et al. 1990).

L'année suivante, les lymphocyte T d'une jeune patiente atteinte d'un déficit immunitaire (déficit en adénosine déaminase) furent transduits par des gammas retrovirus, ce qui permit de corriger son immunodéficiance (Blaese et al. 1995) . Au début des années 2000 un essai fut lancé sur des garçons atteints de déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X mais quelques années plus tard certains de ces patients développèrent cependant des leucémies dues aux intégrations "aléatoires" de ces virus

(Cavazzana-Calvo 2000). Les années suivantes, des efforts furent réalisés pour développer des vecteurs viraux n'ayant pas la capacité à s'intégrer parmi le génome de la cellule hôte mais en restant sous forme épisomale non intégratif. Ces vecteurs sont issus des Adeno Associated Virus (AAV).

Le choix de la "sécurité" a une conséquence importante, là où il était possible d'encapsider de grands transgènes avec les retro virus (12 kb), les AAV ont une capacité d'encapsulation beaucoup plus faible (4.7kb). Considérant qu'en moyenne, un gène est composé de 10 à 11 exons et que la taille de ceux ci est de 100 à 200 nucléotides, soit un transgène de 1 à 2 kb, un AAV pourrait aisément être utilisé en thérapie génique pour remplacer un gène délété. La technologie ne permet cependant pas à l'heure actuelle de remplacer les grands gènes tels que ceux codants pour la dystrophine, le récepteur de la ryanodine etc.

Ces vecteurs viraux sont utilisés à fort taux d'infection (un grand nombre de virus par cellule), ils induisent une sur- expression du transgène.

D'autres approches de thérapie génique ont été développées afin de palier à l'impossibilité actuelle de remplacement de grands gènes.

Deux types approches ont été développés:

- la première consiste à prélever des cellules du patient les corriger par l'utilisation de Nucléase (TALEN, Méganucléase, Zinc finger nucléase) (Ousterout et al. 2013) et de réinjecter ces cellules au patient. Les nucléases utilisées ont la faculté de couper spécifiquement la région à corriger, ce qui permet, par recombinaison homologue avec un ADN injecté dans la cellule, de corriger la mutation pathogène. Ce type de technique montre son intérêt pour le traitement des cellules facilement accessibles et se montre efficace sur des gènes de petites tailles. A l'inverse cette technique est difficilement utilisable pour les pathologies neuromusculaires pour lesquelles les gènes atteints sont de grande taille et où il est difficile de réinjecter l'ensemble des muscles atteints.
- La deuxième approche développée actuellement est la thérapie génique par chirurgie des ARNm. Cette technique ne corrige pas un gène muté au niveau de l'ADN, mais au niveau de ses produits d'expression : au niveau de l'ARNm, par modulation de l'épissage. Elle permet par exemple la rétention d'un exon, d'empêcher la

reconnaissance d'un exon porteur d'une mutation, etc.

Durant la seconde partie de cette introduction je développerai les différentes approches de thérapie génique par chirurgie des ARNm.

I Thérapie génique par Chirurgie des ARNm

I-A Correction par blocage d'une séquence d'épissage par AON

Il est possible d'abolir ou de forcer la reconnaissance d'un exon à épisser en jouant sur les séquences du pré-ARNm. En bloquant une séquence promotrice d'épissage, de par l'encombrement stérique, la fixation d'une protéine effectrice d'épissage à sa séquence ne peut plus se faire. Il pourra y avoir à ce moment saut d'exon

Il est aussi possible de bloquer une séquence inhibitrice d'épissage (par exemple la séquence sur laquelle se fixe hnRNPA1) et ainsi permettre la rétention d'un exon.

Saut d'exon

Les premières expériences de thérapie génique par saut d'exon ont été réalisées dans le laboratoire de Ryszard Kole en 1993 (Dominski and Kole 1993). Cette équipe a utilisé des oligonucléotides antisens (ou AONs) pour restaurer un épissage normal dans des cellules de patients atteints de bêta thalassémie (Sierakowska et al. 1996) ou de mucoviscidose. En bloquant la reconnaissance du site donneur, c'est à dire en mimant l'effet d'une mutation du site donneur d'épissage d'un exon, on peut bloquer la « définition de l'exon » donc empêcher sa reconnaissance et provoquer un saut d'exon. Cette approche se nomme thérapie génique par saut d'exon. L'utilisation de ces AONs pour modifier l'épissage a beaucoup de potentiel que ce soit en thérapeutique ou en science fondamentale (Aartsma-Rus and van Ommen 2007).

Principe du saut d'exon

L'utilisation des AONs permet de moduler la reconnaissance des sites d'épissage en se fixant au niveau du transcrit primaire par appariement. Par encombrement stérique, les AONs ainsi fixés sur des sites d'épissage bloquent la fixation des effecteurs de l'épissage (SR protéine) ou les sites donneurs et accepteurs. Ainsi, ils empêchent l'inclusion de l'exon ciblé dans l'ARNm final. Le but de cette modulation du pré-ARNm est de cibler l'exon à l'origine d'une pathologie, et de l'exclure de l'ARNm mature.

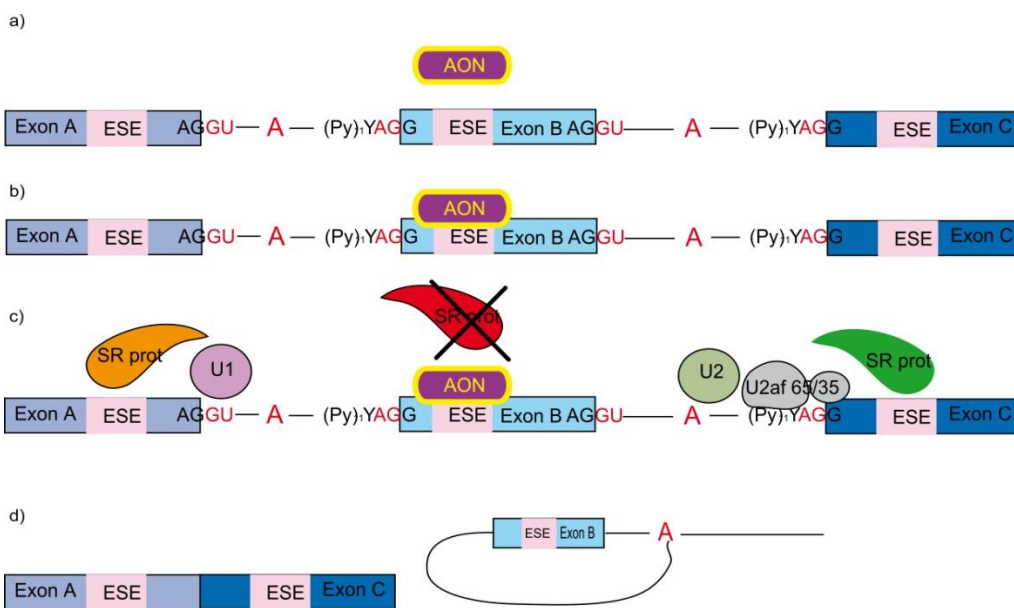


Figure 11 : Exemple de saut d'exon.

L'AON utilisé se fixera sur la séquence ciblée (ici un ESE de l'exon B). La protéine SR ne pourra plus se fixer à cette séquence, l'AON bloquant stériquement sa fixation (a-b-c). Il n'y aura pas le recrutement des effecteurs de l'épissage ici une SR protéine (SR prot), l'exon B ne sera plus reconnu comme tel, il sera « sauté », permettant la jonction entre l'exon A et C (d)

Choix des séquences

Toutes les séquences ciblées par des AONs ne vont pas obligatoirement conduire à un saut de l'exon d'intérêt: le design de ces AONs est donc un enjeu majeur pour l'efficacité du saut d'exon.

L'étude présentée de Aartsma Rus et al (Aartsma-Rus et al. 2009) établit quelques recommandations pour le choix de ces oligonucléotides : en ce qui concerne le choix des cibles, différentes cibles sont possibles: les séquences consensus (point de branchement, site accepteur, site donneur) et les séquences régulatrices d'épissage comme les ESE.

Il est admis que les AONs ciblant les ESE avec un score fort ou une séquence rescue ESE sont plus efficaces que les AONs ciblant un site consensus.

- L'ARNm, n'est pas une molécule linéaire, il possède une structure secondaire contenant un grand nombre de boucles en épingle à cheveux. Les bases non appariées forment des structures dites « ouvertes », permettant une meilleure accessibilité de l'AON sur la cible. Or les ESE se trouvant dans ces régions ouvertes seraient plus prompts à la fixation des protéines SR. Le logiciel mFold permet de représenter ces régions. Pour conclure concernant ces cibles il faut s'intéresser aux séquences ESE fortes situées dans les régions ouvertes du pré-ARNm. Il est difficile de prédire exactement si une structure sera présente ou non dans le pré-ARNm. Certains logiciels permettent de prédire les appariements d'un brin d'ARN comme mFOLD (Zuker 2003), RNA structure (Reuter and Mathews 2010) etc. Mais ils ne permettent pas de réaliser les appariements sur toute la longueur du pré-ARNm. L'ARNm est une structure dynamique, il a été proposé de réaliser plusieurs prédictions de structure en se déplaçant sur l'ARNm. Si une structure est présente dans toutes les prédictions, il est plus probable qu'elle existe.

- La stabilité de la liaison AON pré-ARNm est importante pour réaliser le saut d'exon. Cette stabilité est mesurée par différents facteurs comme le pourcentage en GC de la séquence AON (ou la température de fusion) qui doit être le plus haut possible ou l'enthalpie libre du duplex pré-ARNm-AON qui doit être le plus stable (donc l'enthalpie la plus basse). Ces informations peuvent être données par le logiciel RNA Structure qui

permet de se déplacer sur la séquence du pré-ARNm par sa fonction « oligowalk » et de donner un résultat nucléotide par nucléotide. Ce logiciel permet également de déterminer les données thermodynamiques de l'AON. Il indique :

- La force des liaisons intra AON, qui devait être la plus proche de zéro. Si l'AON est replié sur lui-même, il ne pourra se fixer sur sa cible.
- La force des liaisons inter AON. Les AONs formant des dimères sont mieux transfectés mais pour être efficace, leur liaison ne doit pas être trop forte.

Chimie des AONs

La chimie des oligonucléotides joue un rôle important que ce soit au niveau de la stabilité de la liaison, de sa demie vie, de sa toxicité...

Un des problèmes inhérents aux duplex ARN-ADN est leur capacité à activer la RNase H induisant une destruction du messenger et annulant l'effet recherché de correction génique. Les AONs étant sensibles aux endonucléases, aux exonucléases ainsi qu'à la RNase H, un certain nombre de modifications ont été réalisées.

Historiquement, une des premières modifications a porté sur le squelette de la molécule en remplaçant un oxygène lié au phosphate par un atome de soufre (squelette phosphorothioate, PS (figure 12), permettant ainsi la résistance aux différentes nucléases. La seconde modification fut de rajouter un groupement méthyl en 2' sur le ribose, bloquant ainsi l'action de la RNase H et augmentant l'affinité pour les cibles ARNs (2'O méthyl RNA-PS). On estime qu'il conduit à une augmentation de la température de fusion de 1°C par modification (1°C par base) par rapport aux molécules d'ARN de même séquence. Le squelette phosphorothioate augmente aussi la stabilité des AONs. De plus, les taux de transfection sont améliorés, un des problèmes de leur utilisation est leur toxicité au niveau cellulaire lors de la transfection.

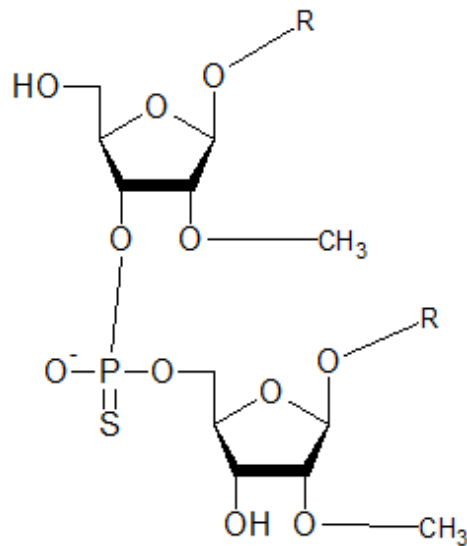


Figure 12 Oligonucléotide 2' O Methyl
RNA PS R : base

D'autres modifications ont également été testées :

- des 2'-o-méthoxyéthyl antisens oligonucléotides ressemblant aux 2'O méthyl qui seraient plus efficaces
- Des modifications plus importantes sur le squelette, avec les acides nucléiques peptidiques ou PNA (figure13), qui contrairement aux autres chimies ne sont pas composés d'un squelette sucre phosphate mais d'un enchainement de liaison 2 amino ethyl glycine. Les bases nucléotidiques sont reliées à ce squelette par des linkers methyl carbonyl. Les molécules sont ainsi non chargées, les PNA ont de ce fait une très faible pénétration cellulaire. Ils peuvent être couplés à des séquences peptidiques leur permettant une prise en charge pour cibler un tissu particulier. Ils ont une affinité augmentée pour les acides nucléiques (Pooga et al. 2001).

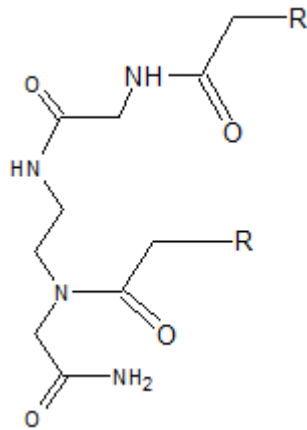


Figure 13 Oligonucléotide PNA

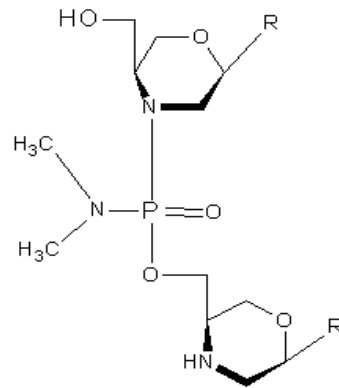


Figure 14 Oligonucléotide PMO

- les phosphoramidates morpholino oligonucléotide ou PMOs (figure 14) plus communément appelés morpholinos. Chez les morpholinos, le ribose est remplacé par un cycle morpholine, leurs liaisons sont des liaisons phosphoramidates. La structure non ionique du squelette des morpholinos à pH physiologique les rend difficile à transférer en culture cellulaire, mais la faible toxicité in vivo des morpholinos les rend éligibles pour la thérapie génique.

- les LNAs (pour locked nucleic acids). Les LNAs (figure 15) possèdent un pont méthylène connectant le 2-O' au 4-C' du ribose. Ce pont les rend non flexibles, leur structure est bloquée. Leur affinité est par conséquent considérablement augmentée. Un inconvénient majeur des LNAs est leur difficulté de synthèse au delà de 11 nucléotides.

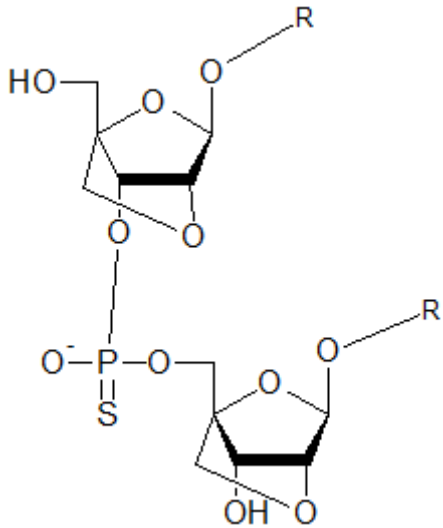


Figure 15 Oligonucléotide LNA

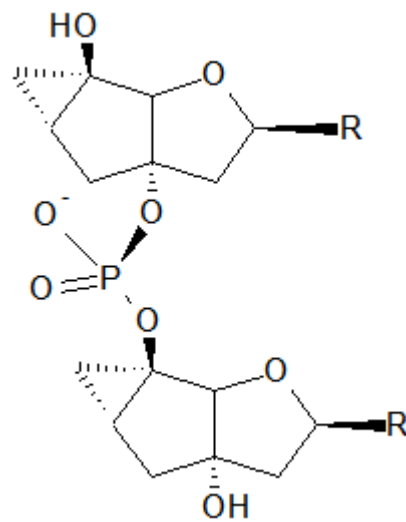


Figure 16 Oligonucléotide Tricyclo DNA

- les tricycloADN (figure 16). Derniers nés de la synthèse oligonucléotidique, ils possèdent comme les LNAs une structure bloquée ce qui confère une augmentation de la stabilité de la liaison TricycloADN/ARN. Les essais comparatifs montrent une activité 100 fois supérieure aux 2'O methyl RNA PS. Il a été estimé que cette modification conduit à une augmentation de la température de fusion de 1.9 à 2.4°C par base modifiée (Renneberg et al. 2002; (Ittig, Schümperli, and Leumann 2008). Enfin, leur résistance est augmentée face aux différentes nucléases, ce qui en fait des candidats très intéressants pour la thérapie génique.

Ces différentes chimies ont pu être testées et évaluées pour obtenir leur données pharmacocinétique et de biodisponibilité.

Toxicité

Les phosphorothioates, (2'OMéthyl RNA PS et LNA) , peuvent provoquer une augmentation des tests de coagulation, une activation du complément et une action pro inflammatoire (réaction chez la plupart des patients au lieu d'injection), une augmentation des transaminases (reflet de la toxicité hépatique), et pour les doses importantes une induction des cascades apoptotiques.

Les PMO sembleraient peu toxique mais le recul sur cette chimie est trop court comme pour les PNA et les tricycloADN.

I B Correction génique par U7 snRNA modifié

Un des inconvénients majeur des thérapies par utilisation d' oligonucléotides est leur effet transitoire. Un patient traité par cette technique devrait en effet subir des injections durant toute sa vie alors même que la toxicité sur le long terme n'a pas été évaluée chez l'être humain.

Une approche permettant une correction sur le long terme a été développée: le saut d'exon par snRNA U7 optimisé.

La snRNA U7 est complexé à des protéines permettant la formation de la ribonucléoprotéine snRNP U7. A l'état physiologique cette snRNP n'intervient pas dans l'épissage. Elle intervient dans la terminaison des transcrits des Histones qui ne sont pas polyadénylés.

Une séquence U7 est composée d'une séquence antisens permettant la fixation et la définition de la fin de l'ARNm des histones, une séquence Sm comme les autres sn RNA (U1, U2, U4/U6 et U5) et enfin une structure hairpin. La séquence U7 est transcrite par la RNA polymérase de type II.

L'équipe de Kole et Schumperli utilisèrent avec succès cette snRNA pour réaliser un saut d'exon, en modifiant la séquence de fixation aux ARNm histones par la séquence "AON". Cette séquence sert, comme un AON, à bloquer la fixation d'un effecteur de

l'épissage. Cette cassette ainsi constituée pourra être intégrée dans un vecteur viral afin de permettre la correction génique dans un grand nombre de cellule. Une autre modification a été apportée à la séquence U7 permettant une meilleur prise en charge par les systèmes d'épissage. Cette molécule modifié est appelé U7 SmOPT

Les premiers travaux ont été dirigés contre les variations du gène de la beta globine à l'origine de l'apparition d'un pseudo exon responsable chez les patients d'une thalassémie (Gorman et al. 1998).

Tout comme le saut d'exon par AON, le saut d'exon par U7 SmOPT a ainsi été testé pour la dystrophine : les tests sur modèles de culture de cellules de patients, les études sur souris mdx (modèle animal de déficit en dystrophine) ainsi que chez le chien montrent des résultats très encourageants.

Design du U7 SmOPT

La cassette U7 a été optimisée en U7 SmOPT pour pouvoir fixer le complexe SMN qui permet l'import de la snRNP U7 SmOPT dans le noyau jusqu'au spliceosome.

La séquence que l'on peut introduire dans la cassette U7 SmOPT est moins contrainte, ce qui permet d'y insérer des séquences de tailles supérieures à celles des AONs. Avoir une séquence antisens plus grande permet d'augmenter le nombre de cibles.

Pour une meilleure activité, il est nécessaire cependant que la séquence ne se replie par sur elle même en formant une boucle en épingle à cheveu ou harpin.

La présence de la séquence RRKY (où R est un nucléotide purique, K un nucléotide avec fonction cétone et Y une base pyrimidique) dans la région antisens à 16-17 nt du début de la région smOPT améliorerait l'efficacité de l'épissage. La séquence RRKY semble importante car elle interagirait par liaison hydrogène avec les nucléotides de la boucle en épingle à cheveux formant une structure appelé le "kiss" permettant une meilleure présentation de la séquence antisens (Garcia et al. 2011) (figure17).

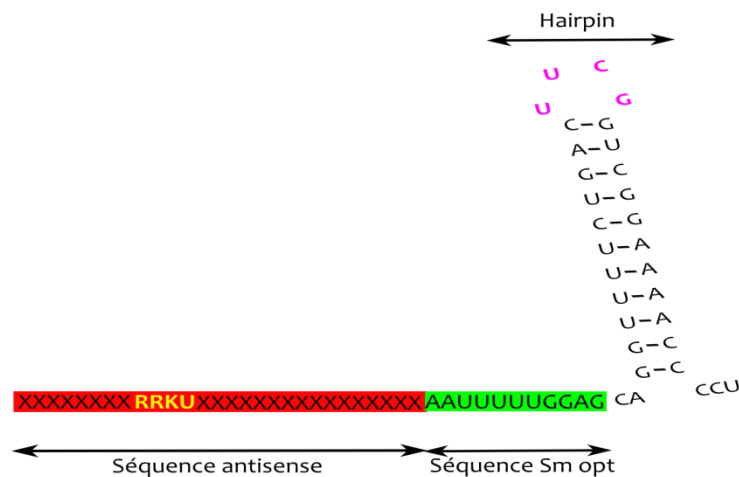


Figure 17 Anatomie d'un U7 snRNA SmOPT.

En rouge la séquence antisens, en vert la séquence Sm optimisée (ou Sm OPT) suivi d'une boucle en épingle à cheveux. Une interaction par liaison hydrogène s'établirait entre la boucle en épingle à cheveu (Hairpin) et le motif R R K U de l'oligonucléotide (en jaune)

Un autres avantages de l'approche U7 est sa toxicité maîtrisée :

Sa chimie est une chimie endogène contrairement aux AONs, sa dégradation pourra ainsi être réalisée par les enzymes de la cellule, il y a un risque limité d'accumulation de la ribonucléoprotéine.

De plus ce type de thérapie a prouvé son efficacité in vitro et ne semble pas être toxique dans les modèles animaux (Vulin et al. 2012 ; Bish et al. 2012)

Son inconvénient est la nécessité d'utiliser un vecteur viral stable dans le temps. Si le virus induit une réaction immunitaire, il ne sera plus possible de le réutiliser. Il faut donc pouvoir transduire un maximum de cellules du patient en une fois.

Une étude récente (Le Hir et al. 2013) montre que chez les animaux transduits par AAV exprimant la molécule U7 SmOPT, il y a une diminution dans le temps de l'expression de la cassette U7 SmOPT. Les fibres musculaires perdaient le génome viral des AAVs lorsqu'elle n'étaient que faiblement transduites seules les fibres transduites avec un titre viral élevée conservaient le génome viral, d'où l'intérêt d'une transduction optimale à la première injection

I C Applications :

Le saut d'exon peut être utilisé dans deux buts: la restauration de la phase de lecture d'un ARNm et le saut des pseudo-exons

I-C-1 Restauration de la phase

Le saut d'exon a été largement développé pour corriger l'effet de certaines mutations. On peut induire un saut des exons mutés d'un gène ou induire un saut d'exon pour rétablir la phase de lecture d'un ARNm. Le modèle le plus étudié à ce jour est la myopathie de Duchenne pour laquelle la thérapie génique par saut d'exon offre des résultats très prometteurs.

L'exemple de la myopathie de DUCHENNE

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie liée à l'X qui présente une incidence de 1/3500 parmi les nouveaux nés garçons (Evans and Goyne 1991). La DMD est causée par des mutations dans le gène de la dystrophine. La dystrophine est requise pour stabiliser la membrane de la fibre musculaire lors de l'exercice. Les mutations entraînant une DMD provoquent généralement une perte de cadre de lecture lors de la traduction (délétion, non sens, etc...). La dystrophine est absente chez les malades DMD, le muscle ne résiste pas à la contraction, et de lésions en lésions, le muscle ne se régénère plus. Il s'ensuit une perte musculaire progressive qui aboutit à une faiblesse musculaire entre 3 et 5 ans, une perte de la marche nécessitant un appareillage à moins de 13 ans et une mort prématurée, avant 30 ans.

Une autre pathologie est liée aux mutations de la dystrophine : la myopathie de Becker (BMD). Cette pathologie est moins sévère et peut demeurer asymptomatique jusqu'à 60 ans (Bosone et al. 2001). Les mutations sont le plus souvent des délétions en phase, ce qui ne provoque pas de perte de cadre de lecture. Elles conduisent à la production d'une protéine tronquée et partiellement fonctionnelle. La durée de vie d'un patient atteint de BMD n'est pas affectée.

Tant que les domaines fonctionnels de la dystrophine ne sont pas touchés, les délétions

en phase ne sont pas ou peu délétères. Chez 65% des patients DMD, la délétion d'un exon en plus de l'exon muté (exon précédent ou suivant) permet de retrouver le cadre de lecture et la restauration d'une protéine tronquée et partiellement fonctionnelle.

Typiquement les mutations ponctuelles et les petites délétions (28% des mutations DMD) peuvent être traitées en sautant l'exon muté. D'où l'idée de transformer la myopathie de Duchenne en myopathie de Becker, en induisant un saut des exons mutés ou de plusieurs exons pour préserver le cadre de lecture.

Les premiers tests ont été réalisés en 2003 sur des cultures de cellules musculaires de patients (van Deutekom et al. 2001, Aartsma-Rus et al. 2003). Ces premiers essais ont montré le saut des exons ciblés par RT-PCR puis un retour de l'expression protéique par immunofluorescence. Les essais ont été développés dans différents modèles animaux : la souris mdx (modèle murin de la myopathie de Duchenne) (Dunckley et al. 1998) (Wilton et al. 1999), des modèles canins (golden retriever, beagle etc...) (Yokota et al. 2009).

Des essais cliniques sont en cours. Deux essais ciblant l'exon 51 de la dystrophine sont actuellement en phase III avec le Drisapersen (un 2'OMePS) ou l'Eterlispén (un PMO), ils ont passé les différentes phases préliminaires avec succès (van Deutekom et al. 2007), (Cirak et al. 2011) Des essais de phase II sont en cours avec des molécules dirigées contre l'exon 44. Des tests sont en cours avec un oligonucléotide tricyclo ADN dirigé contre l'exon 51 du gène de la dystrophine.

Les résultats récents de l'essai clinique de phase III (essai randomisé contre placebo en double aveugle) avec le DRISAPERSEN n'ont malheureusement pas montré d'effet significatif chez les patients traités (Hoffman and McNally 2014).

I-C-2 Saut des Pseudo exons

Les mutations introniques profondes représentent 1 à 5 % des mutations pathogènes identifiées à ce jour. Ces variations créent un site accepteur ou donneur et activent un site cryptique donneur ou accepteur qui, lors de l'épissage sera à l'origine d'un épissage aberrant. Il y aura alors inclusion d'un exon supplémentaire appelé pseudoexon. Sauter cet exon permettra donc de restaurer la production d'un ARNm sain et permettra la

synthèse d'une protéine normale.

Ces mutations étant pour la plupart privées (non récurrentes), il faudrait développer une molécule par mutation, par famille de malade. On retrouve jusqu'à présent des essais sur les gènes *NPC1*, *ATM*, *NF2*, *LGMD2A*...(Rodríguez-Pascau et al. 2009), ;Cavalieri et al. 2012, Castellanos et al. 2013, Blázquez et al. 2013)

Mes travaux de thèse ont porté eux sur la correction de deux mutations introniques profondes dans deux gènes différents *RYR1* et *OCRL*

II Trans-épissage

Un des problèmes majeurs des précédentes thérapies est le manque de polyvalence: pour une molécule correspond un exon à corriger. Ce type de thérapie ne s'adresse qu'à des pathologies ayant des mutations récurrentes. Les thérapies personnalisées sont à ce jour trop peu développées de par leur coût et de par le travail avant la commercialisation d'une molécule qui ne sera utilisable que par une famille de patient.

Une approche plus globale est théoriquement possible on l'appelle la thérapie génique par trans épissage ou SmarT (spliceosome mediated mRNA Transplicing, trans épissage médié par le spliceosome) thérapie qui ne permet pas de corriger un exon mais toute une séquence

Le trans épissage permet l'épissage d'un brin d'ARNm non plus en cis (c'est à dire sur le même brin) mais en trans c'est à dire sur un autre brin. Le trans épissage est un phénomène physiologique retrouvé chez les eucaryotes supérieurs mais à faible fréquence chez les mammifères. Par contre, il est très fréquent chez les protistes (exemple : tetrahymena) ou chez les nématodes comme *C.Elegans*.

Chez *C. elegans* plus de 85% de ses messagers sont transépissés 75% par un petit ARN nommé SL1 et 10% par un autre petit ARN SL2 (SL: splice leader)(Blumenthal 2012).

On distingue 3 types de trans épissages (figure18) :

- en 5' qui permet de corriger le début d'un transcrit
- en 3' qui permet la correction de la fin d'un transcrit
- interne ou l'échange d'exon (exon exchange *Lorain et al. 2010*)

Afin de réaliser le trans épissage, il faudra utiliser une molécule d'ARN qui contient :

- un domaine de liaison (ou BD) permettant sa fixation au pré-ARNm à trans épisser
- Une séquence intronique qui va permettre l'épissage
- une séquence codante d'ARNm permettant la correction

Cette molécule est appelé PTM (pour Pré Transplicing Molecule)

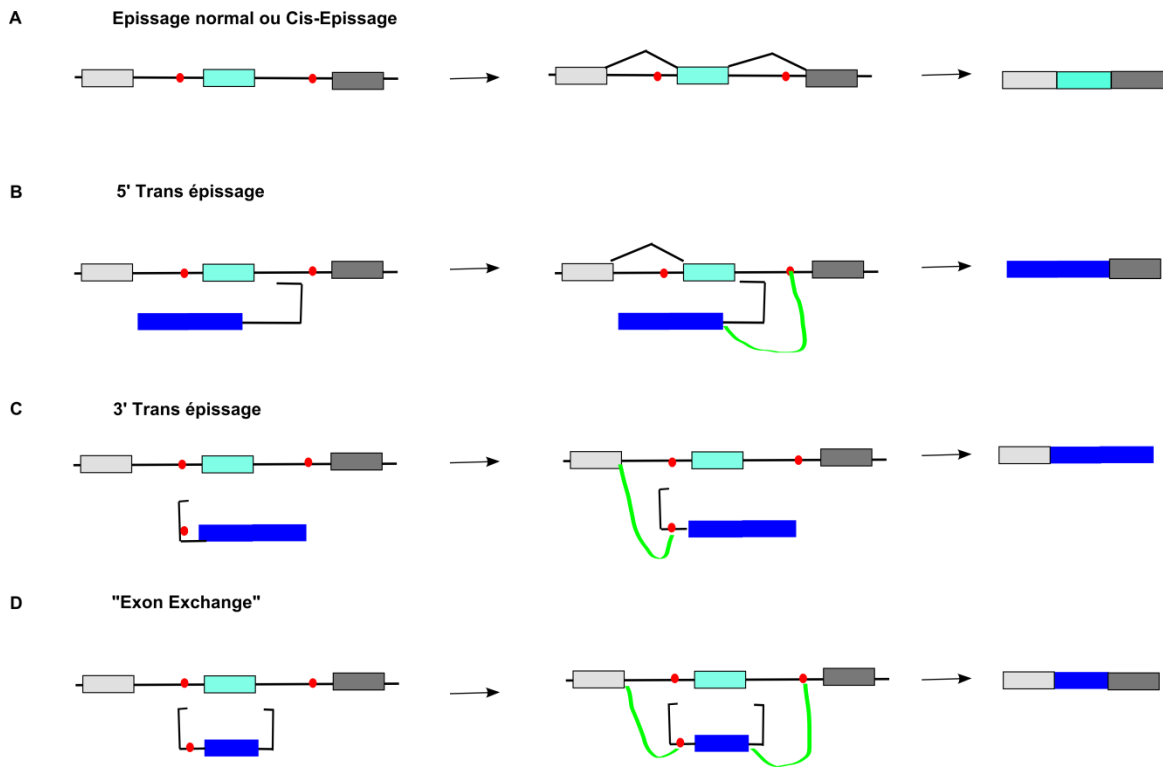


Figure 18 Le Trans épissage.

En Bleu foncé la molécule de transépissage ou PTM, en rouge le point de branchement et en vert la première réaction d'épissage. A épissage normal en cis ,B 5' trans épissage, la molécule de trans épissage ou PTM s'hybridera avec le pre ARNm, il pourra y avoir alors réaction d'épissage , C 3' trans épissage et D exon exchange ou double transepissage interne

Les taux de trans épissage ont jusqu'à aujourd'hui toujours été assez faible mais permettait une production de protéine.

Un des obstacles majeurs à l'utilisation du trans épissage est la production de molécules toxiques. Deux toxicités ont été mises en évidence :

- le PTM peut trans épisser un autre pré-ARNm
- La molécule peut être traduite et être à l'origine d'une protéine tronquée

L'essor du trans épissage reste encore faible mais cette approche a l'avantage de pouvoir corriger un plus grand nombre de mutations.

Chapitre III

Pathologies étudiées :

Les Myopathies Congénitales

I Le muscle

I-A Organisation de la fibre musculaire

Il n'est pas nécessaire d'insister sur l'importance des muscles dans le monde du vivant, en particulier chez les mammifères. La vie demande en effet du mouvement, impossible sans muscles. Chez l'homme, 40% de la masse corporelle est composée de muscle strié, ce qui en fait le tissu le plus abondant. Le muscle strié comprend le muscle cardiaque et les muscles squelettiques. Ces derniers sont impliqués dans la posture et sont responsables de la quasi-totalité des mouvements dont nous sommes capables. Les muscles squelettiques sont fixés sur le squelette osseux par leurs deux extrémités myotendineuses. Chaque muscle est composé de faisceaux de fibres musculaires, les cellules musculaires, qui s'étendent d'une extrémité à l'autre du muscle. Les cellules musculaires sont entourées d'une gaine conjonctive, l'endomysium. Elles sont rassemblées en plusieurs faisceaux enrobés d'une enveloppe commune à toutes les

fibres: le périnysium. Il y a plusieurs faisceaux par muscle, compactés à l'intérieur d'une enveloppe aponévrotique: l'épimysium. Le muscle est également entouré de fascias. Aux deux extrémités du muscle, le fascia fusionne avec l'endomysium qui entoure chaque cellule et forme les fibres tendineuses qui se rassemblent ensuite en tendons.

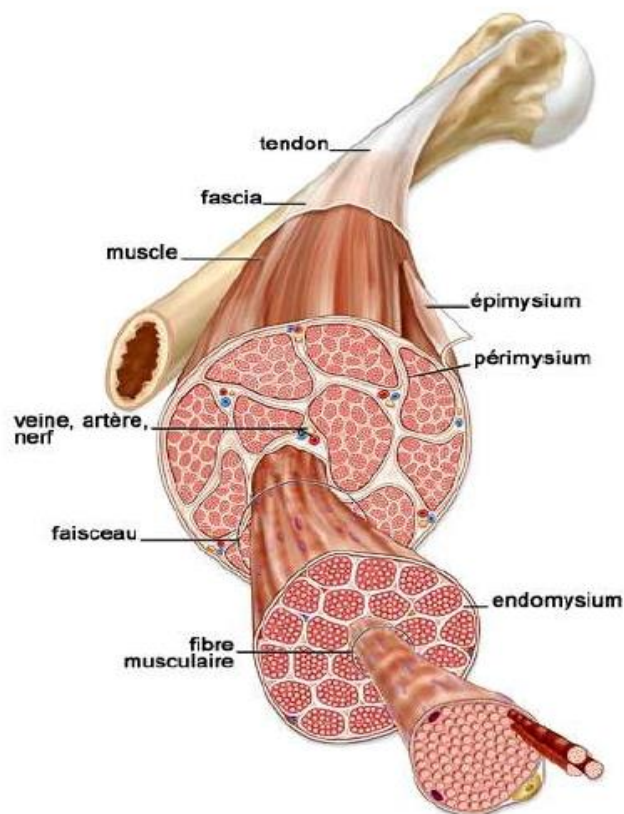


Figure 19 . Organisation du muscle squelettique

.Schéma adapté du site <http://academic.kellogg.cc.mi.us/>

La fibre musculaire est la cellule du muscle, son diamètre varie de 10 à 100µm et sa longueur peut atteindre 15 cm. Elle est organisée en unités contractiles composées par des filaments d'actomyosine appelés sarcomères. Ces myofibrilles apparaissent, en microscopie électronique, sous forme d'une alternance de bandes claires (bandes I: isotropes) et de bandes sombres (bandes A: anisotropes).

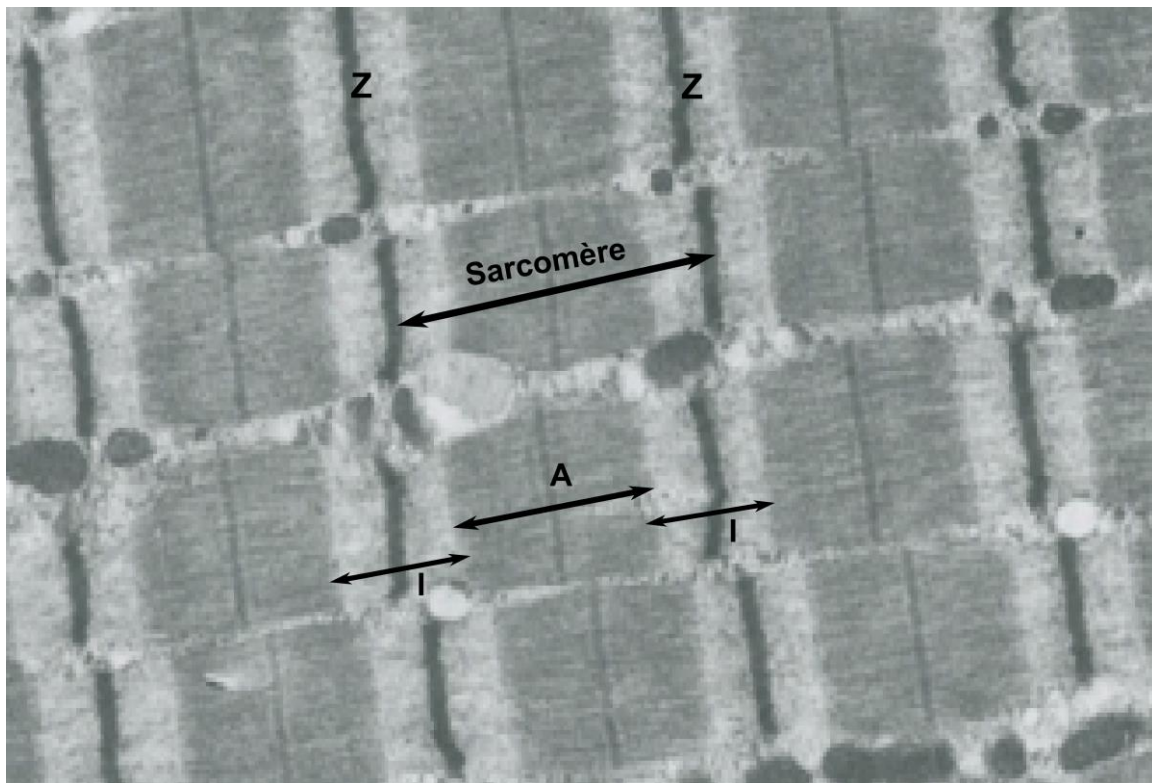


Figure 20 Vue en microscopie électronique d'une coupe longitudinale d'une fibre musculaire.

Les sarcomères s'étendent entre deux lignes Z (ici Z) : ils sont composés de deux demies bande I (filaments fins d'actine) entourant une bande A (filaments épais de myosine et filaments fins d'actine) adaptée de Muscle Biopsy de Dubowitz, Third edition

Un sarcomère est donc composé (figure 20):

- de filaments fins d'actine pour les bandes I
- de filaments épais de myosine chevauchant des filaments fins d'actine pour les bandes A.

Les filaments de myosine sont entourés chacun de 6 filaments d'actine F (polymère d'actine globulaire G). Les filaments d'actine sont reliés à la ligne Z, elle-même composée d'un assemblage macromoléculaire où se trouvent ancrées les protéines alpha-actinine, titine, la myotiline, la nébuline etc (figure 21)

L'actine F est associée à deux filaments de tropomyosine qui se glissent dans un sillon de l'actine F. Au repos, la tropomyosine masque les sites d'interaction actine-myosine.

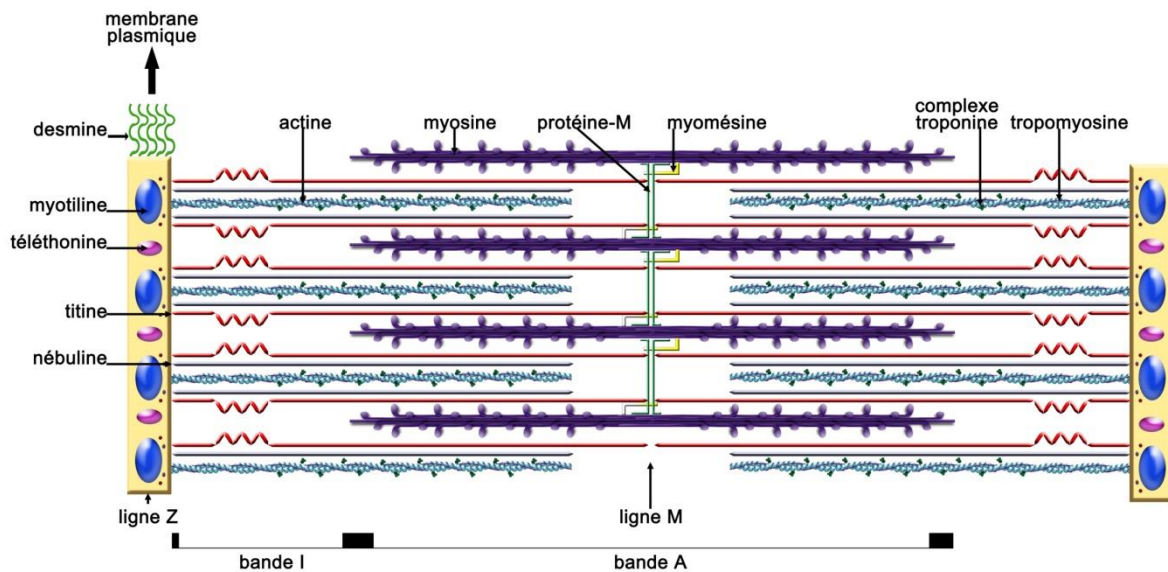


Figure 21 Structure du sarcomère.

Représentation schématique de l'organisation des protéines principales du sarcomère. Les filaments d'actine sont ancrés à la ligne Z. L'extrémité N-terminale de la titine est à la ligne Z et la protéine s'étend jusqu'au milieu de la bande A : la ligne M. Le complexe troponine/tropomyosine est associé à l'actine d'après la thèse de Sarah Oddoux

Lorsque les concentrations de calcium intracellulaire sont faibles, le complexe des troponines est associé à l'actine F et à la tropomyosine. Les variations de concentration calcique permettent les changements de conformation et laissent accessible l'actine aux têtes de myosine. Cela permet in fine la contraction. Le complexe des troponines est par ailleurs ancré à intervalles réguliers sur la tropomyosine. Il est formé de trois protéines :

- la troponine C (TnC) qui lie le calcium (Ca^{2+}),
- la troponine I (TnI, Inhibitrice) qui, au repos, masque les sites de fixation de la myosine sur l'actine
- la troponine T (TnT) responsable de la liaison du complexe avec la tropomyosine.

I-B Organisation des membranes: le reticulum sarcoplasmique et la triade

Les myofibrilles sont entourées d'un réseau de reticulum sarcoplasmique (RS). Le RS constitue le stock calcique de la cellule musculaire. On distingue deux compartiments :

- * un compartiment situé le long des myofibrilles : le RS longitudinal
- * un compartiment situé aux niveaux des triades : le RS jonctionnel.

La triade est une structure spécifique du muscle qui est composée de l'apposition de trois membranes: deux membranes du RS jonctionnel entourant une invagination de la membrane plasmique appelée le tubule transverse (ou tubule-T). Les triades sont situées à l'interface des bandes A et I.

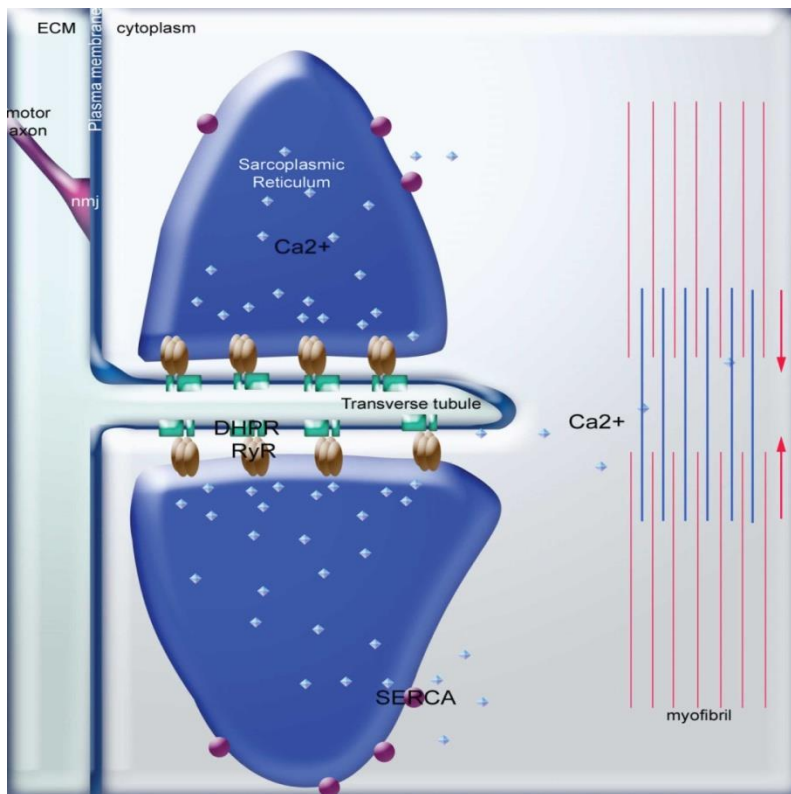


Figure 22. La triade

La triade est formée d'une invagination de la membrane plasmique appelée Tubule Transverse avec, de chaque côté, une citerne de réticulum sarcoplasmique contenant le calcium. Le calcium relâché par le RyR1, va induire la contraction des myofibrilles.

I-C Le couplage excitation contraction

Lors de la contraction musculaire, l'arrivée d'un influx nerveux au niveau de la jonction neuromusculaire déclenche une dépolarisation de la membrane de la fibre musculaire. Cette dépolarisation va induire une libération massive de calcium des compartiments intracellulaires vers le cytoplasme. Les ions calcium, en se fixant à la troponine C, supprimeront l'effet inhibiteur de la troponine I permettant alors le glissement de la myosine sur l'actine. Ce glissement est réalisé grâce aux têtes de myosine et à leur activité ATPasique. Les sarcomères se raccourcissent alors, et le muscle se contracte. Le mécanisme liant la stimulation nerveuse à la contraction musculaire est appelé couplage excitation contraction (couplage-EC).

I-D Le complexe de relâchement du calcium

Le couplage-EC est réalisé par un assemblage macromoléculaire appelé le complexe de relâchement du calcium (CRC). Le CRC est composé, en particulier, de deux canaux calciques couplés physiquement : le récepteur des dihydropyridines (DHPR), qui est un canal calcique voltage-dépendant de la membrane plasmique, et le récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1), autre canal calcique situé dans la membrane du reticulum sarcoplasmique (RS).

Le couplage de ces deux canaux requiert un contact particulièrement étroit entre la membrane plasmique et la membrane du RS. Ce contact a lieu au niveau de la triade .

Dans le muscle squelettique, le DHPR sert principalement de senseur de la dépolarisation membranaire pour initier le couplage-EC, et donc activer RyR1 . En effet, le couplage-EC du muscle squelettique fonctionne sur le mode « VICR » (Voltage-Induced Calcium Release): la dépolarisation membranaire induit un changement conformationnel du DHPR qui entraîne ensuite l'ouverture du canal RyR1. L'ouverture de RyR1 permet au calcium de sortir du RS selon un gradient de concentration. La concentration calcique myoplasmique augmentera alors d'un facteur 10.000. A ces deux canaux essentiels au relâchement de calcium sont associées diverses protéines régulatrices :

- La **calséquestrine** située dans le RS à proximité de RyR1 est une protéine capable de fixer une grande quantité de calcium. Elle constitue un réservoir de calcium rapidement mobilisable lors de la stimulation.
- La **triadine** et la **junctine** sont deux protéines transmembranaires du RS: elles possèdent une courte partie cytosolique, un unique segment transmembranaire et une partie luminale capable de se lier à RyR1. Ces protéines semblent participer à la régulation du CRC, en assurant en particulier un ancrage de la calséquestrine à proximité du RyR. Elles auraient aussi un rôle structural.
- La protéine **FKBP12** qui stabilise le tétramère de RyR1.
- La **calmoduline** modulerait le relâchement de calcium du CRC.

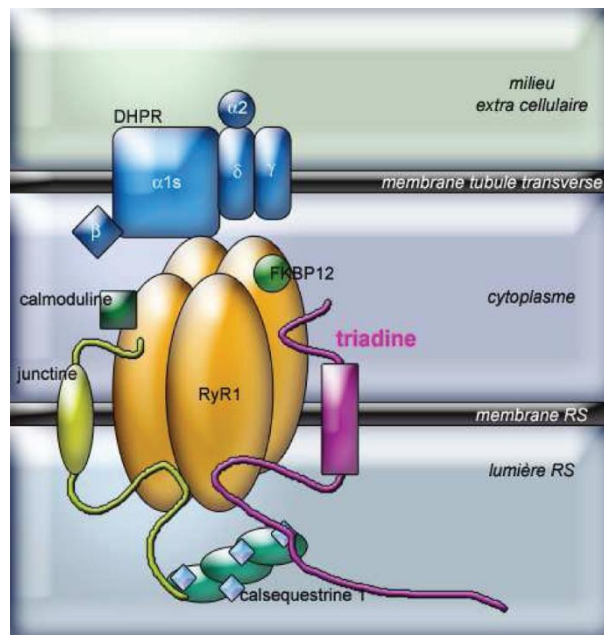


Figure 23. Le complexe de relâchement du calcium dans le muscle squelettique.

RyR1 est associé à la calséquestrine 1 via la junctine et la triadine. Il est également associé à la sous-unité alpha 1s du DHPR.

II Les myopathies congénitales

Les mutations dans les protéines du sarcomère que ce soit les gènes structuraux et/ou les gènes permettant la transduction du signal électrique en signal mécanique sont à l'origine de myopathies.

Les myopathies congénitales sont regroupées en trois classes et ont une incidence de 1/17.000 naissances. Les myopathies congénitales comme leur nom l'indique ont des signes cliniques présents dès la naissance : une hypotonie et une faiblesse musculaire. Les taux sanguin de créatine kinase sérique (CK), marqueur de la lyse musculaire, sont souvent normaux ou peu modifiés. L'étude de la biopsie ne montre pas de fibre dystrophique (de dégénérescence de la fibre)

Ce sont des pathologies rares caractérisées par une atteinte musculaire associée à des anomalies anatomopathologiques. On distingue 3 grandes types:

- *les myopathies à agrégat protéique
- *les myopathies centro nucléaires et myotubulaire
- *les myopathies à cores

II-A les myopathies à agrégat protéique.

Les myopathies à agrégats protéiques constituent un groupe hétérogène de pathologies présentant un mode de transmission autosomique récessif ou dominant, avec des mutations dans les gènes codant le plus souvent pour des protéines sarcomériques des filaments fins. En général, les patients présentent une faiblesse musculaire du visage, du cou et des muscles proximaux des membres. On retrouve aussi des cas extrêmement sévères à l'origine d'akinésie fœtale et de décès prématurés.

Une anomalie structurale caractéristique de cette maladie est la présence de d'agregats intra-cytoplasmiques (en forme de bâtonnet) correspondant à des anomalies des stries Z associées à l'interruption de l'organisation des filaments fins. On les appelle les myopathies à némaline (du grec nema: fils)

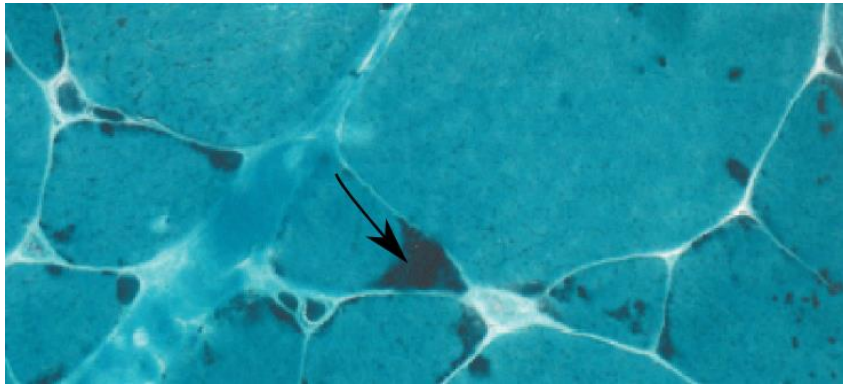


Figure 24 Myopathie à nemaline. Fibre musculaire en coupe transversale La flèche indique les bâtonnets retrouvés ici en périphérie cellulaire . Coloration en trichrome de Gomori. Adaptée de Muscle Biopsy de Dubowitz, Third edition

Des mutations ont été retrouvées dans les gènes des protéines du sarcomère comme l' α -actine squelettique (ACTA1), l' α -tropomyosine (TPM3), la b-tropomyosine (TPM2), la troponine T (TNNT1), la cofiline-2 (CFL2), la nebuline (NEB) (Wallgren-Pettersson et al. 2011). De nouveaux gènes ont été mis en évidence : les gènes codant pour des protéines servant à la maintenance des protéines du sarcomère comme KLHL40 et KLHL41 (Gupta et al. 2013, Ravenscroft et al. 2013). Dans certaines formes néonatales très sévères avec hypotonie sévère, le gène RYR1 peut être impliqué.

II B Les myopathies centronucléaires et myotubulaires

Les myopathies centronucléaires et myotubulaires sont définies morphologiquement par la présence de fibres musculaires présentant des noyaux centraux. Les myopathies centronucléaires, peu évolutives, sont liées aux mutations dans le gène de l'amphiphysine 2 ou *BIN1* (transmission autosomique récessive) (Prokic et al, 2014) ou des mutations dans le gène de la dynamine 2 ou *DNM2* codant pour la dynamine 2 ou du récepteur de la ryanodine de type1 *RYR1*(Jungbluth, et al 2008). La myopathie myotubulaire est la forme la plus sévère. Elle est due à des mutations dans le gène de la myotubularine *MTM1* (transmission liée à l'X).

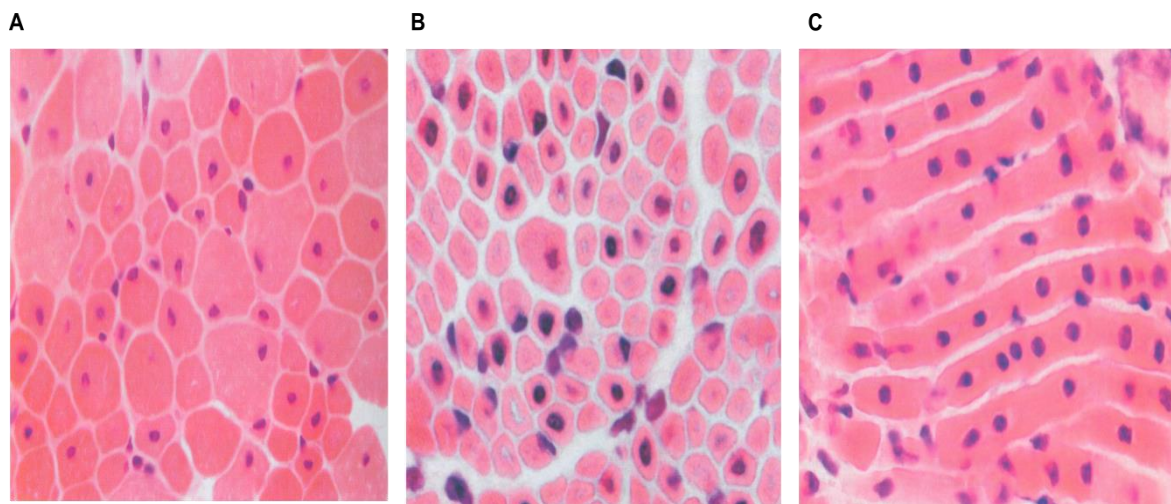


Figure 25 Myopathie centronucléaire et myotubulaire.

Coupe transversale (A et B) et Longitudinale (C). En myopathie centro nucléaire (avec internalisation des noyaux). B et C myopathie myotubulaire avec internalisation des noyaux. Adaptée de Muscle Biopsy de Dubowitz, Third edition

II C Les myopathies à cores

Le diagnostic de myopathies à cores est posé suite à la mise en évidence de régions caractéristiques appelées cores, correspondant à des zones déplétées en mitochondries et présentant une désorganisation sarcomérique. On trouve deux anomalies anatomopathologiques qui permettent de classer ce type de myopathie en deux catégories: les myopathies à core centraux ou CCD (central core disease) avec la présence d'un core unique et les myopathies à cores multiples et petits ou MmD (multi minicore Disease)

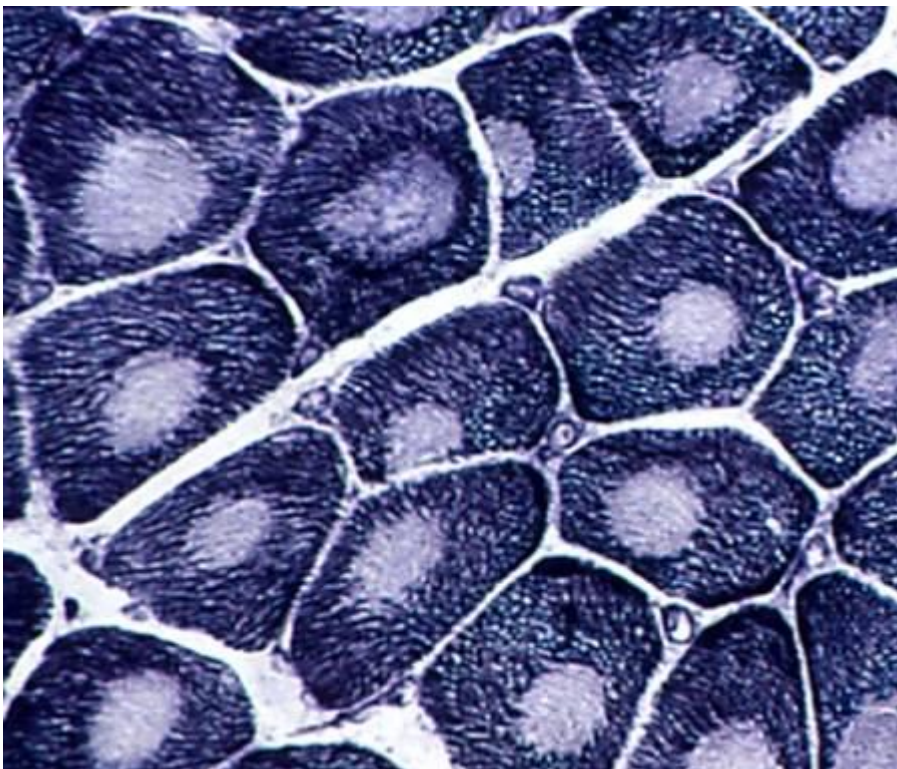


Figure 26 Myopathie à cores centraux. Coloration NADH-TR (tetrazolium réductase)

On peut observer des zones dépourvues d'activité oxydative correspondant au mitochondries. Ces zones sont appelées cores.

Le central core disease (Jungbluth 2007a)

Au niveau clinique, les symptômes cardinaux sont: une hypotonie à la naissance, un retard de développement moteur, une faiblesse musculaire, des myalgies, etc. Les complications orthopédiques sont fréquentes (dislocation de la hanche, scoliose, etc.). Les CCD sont dans la plupart des cas pas ou peu évolutives et de transmissions

dominantes. Plus de 85 % des cas sont liés à des mutations dans le gène RYR1.

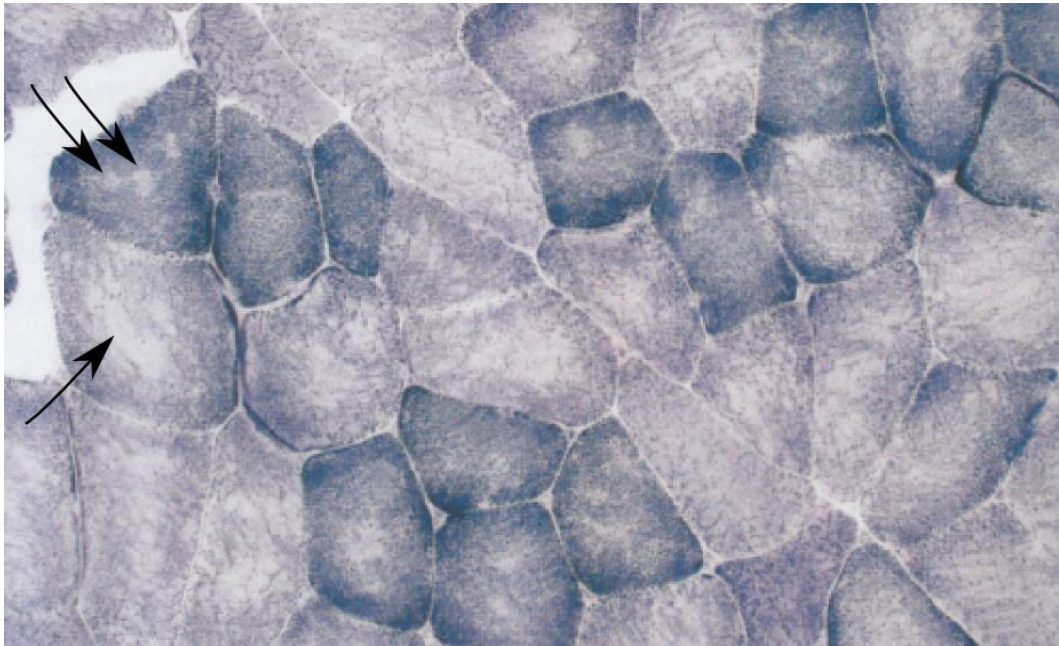


Figure 27 Myopathie à multi minicore ou MmD. Coloration oxydative NADH-TR . Les flèches noires indiquent les zones dépourvues d'activité oxydative. Adaptée de Muscle Biopsy de Dubowitz, Third edition

Le Multiminicore Disease (MmD) (Jungbluth 2007b)

La MmD est caractérisée par une hypotonie néo-natale, une réduction des mouvements foetaux, une faiblesse musculaire axiale, etc.

Les symptômes cardinaux sont la rigidité du rachis surtout pour les myopathies liées à SEPN1 ou une ophtalmoplégie pour les formes liées à RyR1 avec des symptômes communs comme une scoliose et une atteinte respiratoire.

Le gène RyR1 est impliqué dans plusieurs pathologies neuromusculaires, les myopathies congénitales de type myopathie à disproportion de type de fibre (CFTD), myopathies centronucléaires, myopathies à core, à cores centraux à multi minicores, à cores et à batonnets.

A noter cependant que les mutations dans RyR1 peuvent être également à l'origine d'un

autre type de pathologies : les « myopathies induites » qui regroupent les intolérances à l'effort, les rhabdomyolyses d'effort (Dlamini et al. 2013) et la plus étudiée l'hyperthermie maligne per anesthésique.

L'hyperthermie maligne

L'hyperthermie maligne ou HM est un trait pharmacogénétique qui provoque une susceptibilité aux dérivés halogénés et aux relaxants musculaires dépolarisants utilisés en anesthésie (H. Rosenberg et al. 2007). L'incidence de l'HM lors d'une induction anesthésique chez l'adulte est de 1/3.000 à 1/10.000. 50% au moins des familles présentant ce trait portent une mutation dans *RyR1*. Un épisode d'hyperthermie maligne est caractérisé par un relâchement de calcium excessif induisant un hyper métabolisme, une rigidité musculaire, une augmentation rapide de la température du corps, du taux de lactate sanguin, une tachycardie et une hypercapnie. En absence de prise en charge spécifique, l'issue de la crise est généralement fatale.

L'épuisement des réserves énergétiques musculaires, couplé au défaut de perfusion induit par la contracture, est responsable de la destruction généralisée du muscle squelettique, très rapidement irréversible dans les formes fulminantes qui conduisent au décès dans un tableau de rhabdomyolyse massive et de défaillance multi viscérale. Le traitement efficace d'un épisode de HM sera réalisé par un arrêt rapide de l'anesthésiant, une hyperventilation et une administration d'un antidote, le dantrolène. En dehors des crises, il n'y a aucun symptôme et l'aspect du muscle est normal.

III Le récepteur de la ryanodine

de type 1

Le récepteur de la ryanodine est nommé ainsi car la ryanodine, alcaloïde extrait de la plante *Ryana speciosa*, est un agoniste de la protéine. Le récepteur de la ryanodine est un homotétramère d'environ 560 kDa par sous-unité. Trois gènes RyR sont exprimés chez les mammifères. RyR1 est exprimé dans le muscle squelettique en grande quantité et dans certains neurones, RyR2 dans le cœur et dans le cerveau dont c'est la forme majoritaire et RyR3 est une isoforme ubiquitaire moins abondante. Les séquences primaires de ces trois isoformes présentent 65% d'homologie entre elles et trois zones de divergence responsables pour ces dernières de leurs différences fonctionnelles.

Chez l'homme le gène *RyR1* est situé dans la région q12-q13.2 du chromosome 19. Ce gène de 106 exons dont deux alternatifs (le 70 et le 83) s'étend sur 153864 nucléotides. Les 106 exons codent pour une protéine de 560 kDa composée de 5038 acides aminés.

Au niveau musculaire, *RyR1* n'est exprimé que dans les cellules différenciées (les myotubes). La protéine *RyR1* ne s'exprime donc pas dans les cellules précurseurs comme dans les myoblastes. La protéine présente deux grandes régions : le domaine N terminal situé dans le cytoplasme, et le domaine C terminal formant le canal transmembranaire. La partie cytoplasmique terminal comprend 90 % de la séquence protéique. Elle est le lieu de la plupart des interactions avec d'autres protéines qui régulent l'activité du canal. La protéine possède 6 domaines transmembranaires, localisés dans la partie C terminale. L'unité fonctionnelle est un homotétramère.

III-A Domaines et interactions de RYR1

Un grand nombre d'interactions ont été mises en évidence:

- **Interaction avec le DHPR:** le couplage-EC est en large partie régulé par l'interaction RyR1 et la sous unité $\alpha 1s$ du DHPR. Lors de l'activation du DHPR par la dépolarisation membranaire, les modifications structurales de la sous unité $\alpha 1s$ (en particulier au niveau de ses boucles cytoplasmiques II et III) provoquent l'activation de RyR1 par couplage physique direct (Cui et al. 2009). Le site d'interaction serait situé dans le domaine composé des acides aminés 1084-1207
- **Interaction avec la calmoduline :** elle se lie à chaque monomère de RyR1 (AA 1975-1999) et est un agoniste partiel de RyR1. Lorsque la concentration calcique est basse (de l'ordre du nanomolaire), elle est un agoniste de RyR1. Quand la concentration calcique s'élève, elle devient un inhibiteur.
- **Interaction avec La calstabine ou FKBP12 :** elle se lie elle aussi à chaque monomère de RyR1 sur les acides aminés 2458 à 2468 et elle stabilise l'état fermé. Une déplétion de la calstabine induit une augmentation de l'ouverture des canaux de RyR1 et induit une baisse de la conductance par augmentation de la fuite calcique.
- **l'interaction avec la triadine** (AA 4861 à 4918) (Groh et al. 1999; Goonasekera et al. 2007)
- **le pore calcique** (AA 4895-4900)

RyR1 est modulé par un grand nombre de petites molécules, comme le calcium, l'ATP ou le magnésium. Il est également soumis à des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (serine 2843), l'oxydation ou la nitrosylation (cystéine 3635)(Hwang et al. 2012)

Le domaine C-terminal possède six à huit hélices transmembranaires. Ces hélices transmembranaires après oligomérisation de 4 monomères de RyR1 forment le pore du canal.

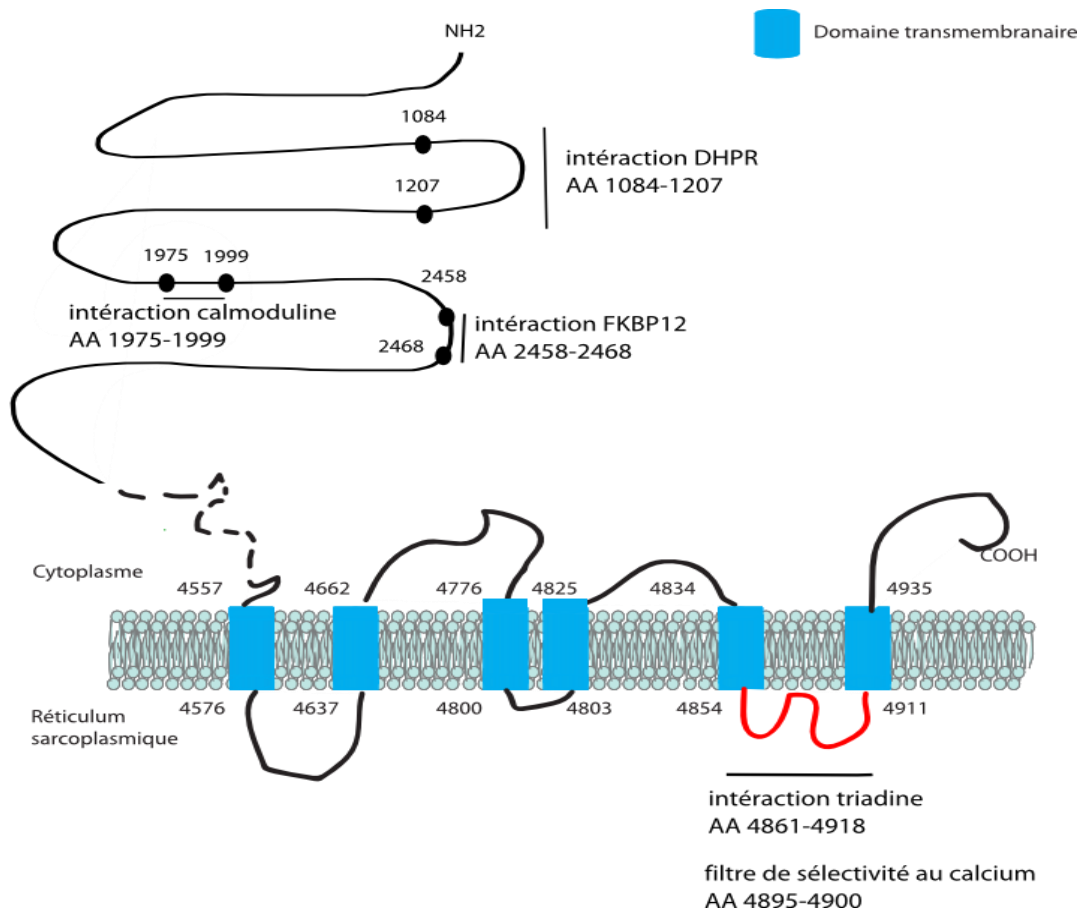


Figure 28. Représentation du récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1), avec 6 domaines trans-membranaires (d'après (Meur et al. 2007 et Hwang et al. 2012) La représentation n'est pas à l'échelle de la protéine. Les numéros des acides aminés sont spécifiés. Différentes interactions sont notées sur la protéine. avec en rouge le pore du canal.

III-B Mutation dans RYR1

Les conséquences des mutations de RyR1 au niveau moléculaire sont soit une baisse quantitative de RyR1 soit des changements dans la conduction et la sélectivité du canal, engendrant une modification de l'homéostasie calcique. Plus de 431 mutations ont été identifiées et référencées (base de données LOVD RyR1).

Un certain nombre de pathologies ont été liées à des mutations dans le gène RyR1, on pourra distinguer les pathologies provoquées (l'hyperthermie maligne, hyperthermie d'effort, les rhabdomyolyses d'effort) et les pathologies congénitales à l'origine d'un

syndrome myopatique. Les pathologies liées aux mutations dans le gène *RYR1* font partie d'un continuum entre l'hyperthermie maligne asymptomatique et des myopathies sévères avec akinésie foetale. Ce spectre symptomatologique rend l'analyse de ces variants et leur validation très compliquée. De plus RyR1 se tétramérise pour former le canal, les possibilités d'assemblages des monomères sains avec les monomères mutés sont donc nombreuses et peuvent expliquer l'importante variabilité clinique.

Les mécanismes physiopathologiques des mutations RyR1

Le spectre clinique des pathologies liées à RyR1 étant très large, différentes hypothèses ont été proposées quant aux mécanismes physiopathologiques impliqués. On peut recenser au moins 4 mécanismes :

- **Défauts quantitatifs :**

Certaines mutations sont en effet à l'origine d'un défaut quantitatif de RyR1

Les mutations mises en évidence au laboratoire montrent ainsi que les signes cliniques apparaissent pour des quantités de RyR1 inférieures à 50 %. Ces mutations sont donc récessives.

A ce jour aucun KO RyR1 n'a été mis en évidence chez les patients même dans les formes d'akinésie foetale (Monnier et al. 2008). Les souris KO RyR1 décèdent à la naissance.

- **Canal fuyant**

La deuxième hypothèse est centrée autour de la fonction du canal. Certaines mutations conduisent à une augmentation de la fuite calcique à travers RyR1 au repos ce qui entraînerait une déplétion du calcium dans le RS. Le canal est dit « fuyant ». L'activation du canal ne permet alors qu'une libération faible de calcium qui serait l'origine de la faiblesse musculaire (Tong 1999).

- **Mutations découplantes**

Une troisième hypothèse expliquant la conséquence physiopathologique serait un défaut de couplage de RyR1 avec le DHPR. Ces mutations découplantes, à l'origine d'une perte du couplage excitation contraction, conduisant à l'absence de relâchement de calcium suite à une stimulation électrique (Dirksen 2002)

- **Hyper-activité du Canal**

La quatrième hypothèse est un relargage excessif de calcium dû à des mutations abaissant le seuil d'activation ou permettant l'activation du canal par des molécules exogènes comme ce que l'on peut observer dans l'Hyperthermie Maligne (Tong et al. 1997).

Répartition des mutations suivant les maladies

Les mutations dans le gène RYR1 sont réparties différemment suivant les pathologies

Les mutations à l'origine de l'hyperthermie maligne sont situées en majorité dans deux domaines cytoplasmiques appelés: domaines MH1 et MH2. Les mutations à l'origine d'une myopathie CCD dominante seront pour plus de 85 % des cas situées dans les 500 derniers acides aminés (Wu et al. 2006).

Seuls le CCD et l'HM ont des points chauds de mutations clairement définis.

Pour les mutations à l'origine d'hyperthermie d'effort, de rhabdomyolyse d'effort ainsi que de myopathie congénitale récessive, les mutations sont réparties quant à elles sur toute la longueur de la protéine (Amburgey et al. 2013).

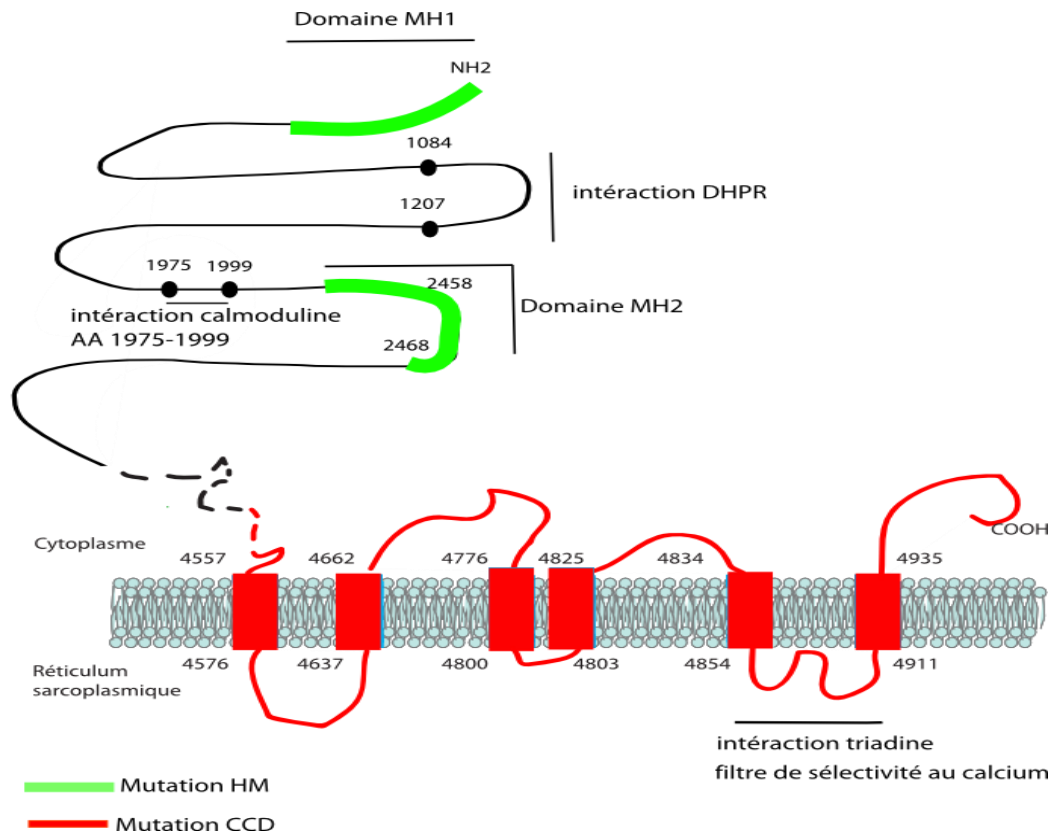


Figure 29 Répartition des mutations dans RyR1.

Les points chauds de mutations sont représentés en vert pour l'HM et en rouge pour le CCD. Les mutations HM peuvent aussi être situées dans le domaine C terminale de la protéine

Chapitre III

Le syndrome de Lowe

I Le gène OCRL

Le gène *OCRL* est situé sur le bras long du chromosome X (région Xq24-26)(Nussbaum et al. 1997). Ce gène est composé de 24 exons dont un exon alternatif (18a). La protéine *OCRL* est composée de 901 acides aminés pour sa forme alternative et de 893 acides aminés pour la forme ubiquitaire.

La protéine *OCRL1* est localisée au niveau du réseau trans-golgien (Trans Golgi Network : TGN)(Dressman et al. 2000), des replis membranaires, sur les endosomes précoces et au niveau des vésicules recouvertes de clathrine, mais elle est absente des endosomes tardifs(Rawshan Choudhury et al. 2005) et des lysosomes.

Il existe deux isoformes de la protéine, générés par un épissage alternatif tissu-spécifique. La protéine est ubiquitaire, mais les 2 formes « s'excluent » mutuellement.

- L'isoforme *OCRL1-a* comportant 8 acides aminés supplémentaires (exon 18a), est présente au niveau cérébral. Cette isoforme est exprimé dans tous les tissus mais en très faible quantité.
- L'isoforme *OCRL1-b*, plus courte (sans l'exon alternatif), s'exprime dans tous les tissus et en très faible quantité dans le cerveau.

Cette protéine est une enzyme ayant la capacité d'hydrolyser le phosphate en position 5 des phosphoinositides, dont le substrat préférentiel est le Phosphatidyl inositol 4,5 diphosphate (Ptd Ins (4,5) P₂) (Woscholski and Parker 1997). Elle hydrolyse aussi le Phosphatidyl inositol 3,4,5 triphosphate(Ptd Ins (3,4,5)P₃).

I-A Les phosphoinositides

I-A-1 Définition et localisation

Les phospho inositides sont des phospholipides qui, malgré leur très faible abondance proportion dans la bicouche lipidique des membranes cellulaires, sont des messagers essentiels de la cellule. Ce sont des lipides couplés à un sucre de 6 carbones particuliers avec 5 fonctions alcools appelé inositol. On distingue 7 phospho inositides différents suivant le ou les phosphorylations retrouvées sur le cycle inositol (figure 30 et 31).

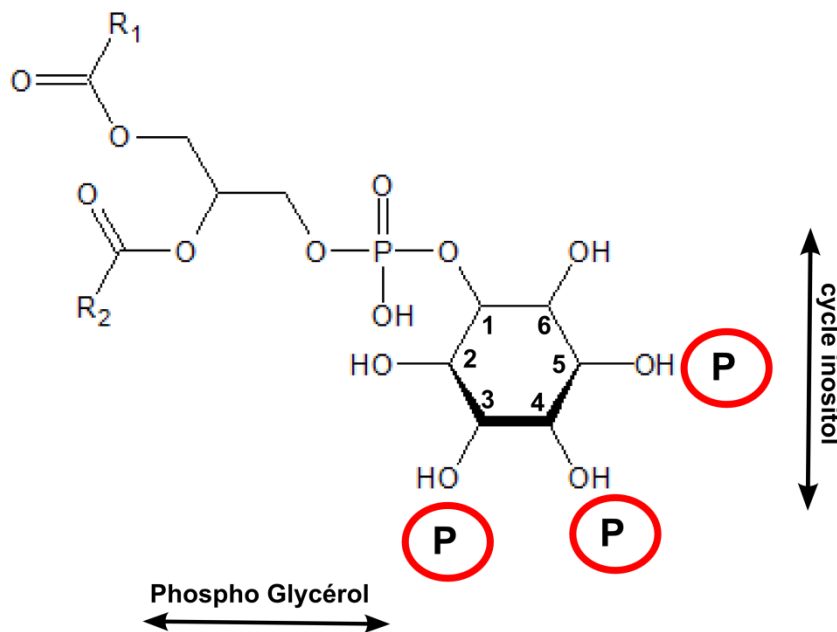


Figure 30. Représentation d'une molécule d'inositol phosphate.

Les positions phosphorylables sont indiquées par le Phosphate représenté par un P entouré par un cercle rouge. R₁ et R₂ sont des acides gras.

- Le Ptd Ins(3)P qui est majoritairement présent dans les endosomes précoces. Il participe au trafic des vésicules maturation endosome
- Le Ptd Ins(4)P est principalement présent au niveau de l'appareil de Golgi.
- Le Ptd Ins(5)P . Sa concentration membranaire est très faible (50 fois moins que le Ptd Ins(4)P)
- Le Ptd Ins(3,5)P₂ est majoritairement présent dans les endosomes tardifs et

participe par ailleurs au recyclage des lysosomes vers le golgi.

- Le Ptd Ins(3,4)P₂ est abondamment présent à la membrane plasmique.
- Le Ptd Ins(3,4,5)P₃ est en très faible quantité dans les cellules au repos. Sa concentration augmente lors de stimulations. Il est un messager secondaire important
- Le Ptd Ins(4,5) P₂. C'est le plus abondant. Il est le précurseur de deux voies de signalisation :

la première est la voie de la phospholipase C qui hydrolyse le Ptd Ins(4,5)P₂ et aboutit à la production de diacyl glycérol qui active la protéine kinase C et à celle d'Ins(1,4,5)P₃ qui se lie qui permet de réguler le relâchement calcique via l'IP₃R (le récepteur à l'Ins (1,4,5)P₃).

la deuxième voie est celle de la phospho inositide 3 kinase qui phosphoryle le Ptd Ins(4,5) P₂ en réponse à la stimulation par des facteurs de croissance, l'insuline ou des cytokines formant ainsi le Ptd Ins (3,4,5)P₃ qui intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires.

Le Ptd Ins (4,5) P₂, n'est pas qu'un intermédiaire, il intervient aussi dans dans de nombreuses fonctions cellulaires en régulant le cytosquelette d'actine et le trafic membranaire. Le Ptd Ins (4,5) P₂ se lie aux protéines liant l'actine comme la profiline, la vinculine, la gelsoline. Il intervient dans l'endocytose médiée par la clathrine. (Liu et al, 2009)

Les modifications dans ces pools de phosphoinositides permettent de définir l'identité des compartiments cellulaires. (Balla T., 2013)

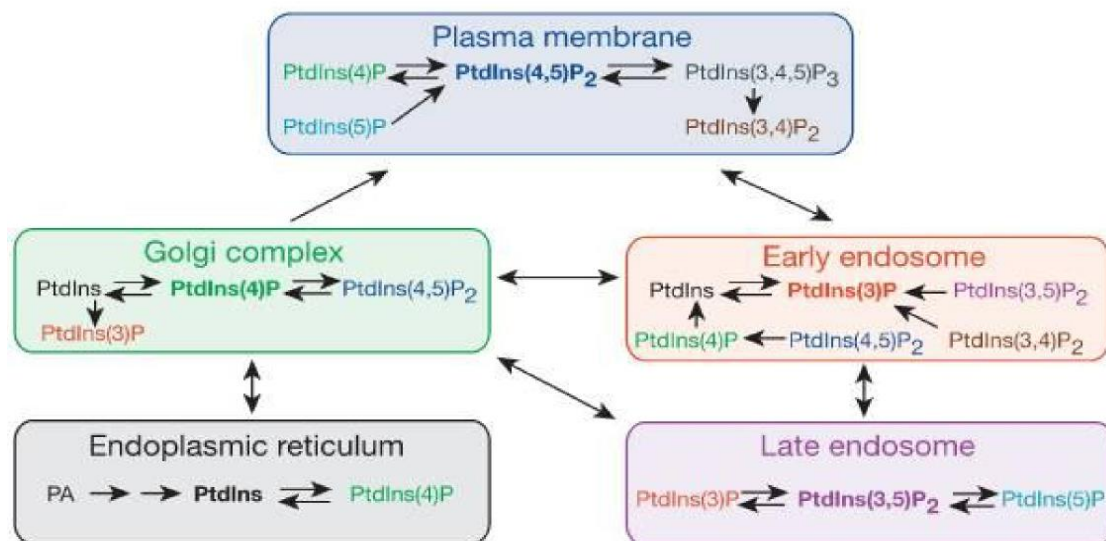


Figure 31 Localisation subcellulaire des différents phosphoinositides. PA ; acide phosphatidique ; PtdIns, phosphatidylinositol. Les phospho inositides majoritaire sont inscrits en gras. Tiré de Di Paolo and De Camilli, Nature (Di Paolo and De Camilli 2006)

I-A-2 Métabolisme des phospho inositides

Les phospho inositides sont régulés par un jeu d'enzymes très conservés dans l'évolution. Ces enzymes sont des kinases qui permettent d'ajouter des phosphates ou des phosphatases qui retirent des phosphates.

Les mutations dans ces enzymes sont liées à un grand nombre de pathologies, on peut citer en exemple :

- Des cancers avec des mutations dans PIK3Ca (une phosphatidyl inositol 3 kinase) et PTEN (une phosphatidyl inositol 3 phosphatase)
- la myopathie myotubulaire pour les mutations retrouvées dans *MTM1* (une phosphatidyl inositol 3 phosphatase). Cette enzyme participe à la formation et à la maintenance du tubule transverse au niveau musculaire.
- la neuropathie de Charcot Marie Tooth pour les mutations dans *MTMR2* et *MTMR13* (des phosphatidyl inositol 3 phosphatases)
- le syndrome de Lowe et la maladie de Dent de type2 en lien avec des mutations dans le gène *OCRL* (une phosphatidyl inositol 5 phosphatase(Zhang et al. 1995))

I-B OCRL : la protéine

I-B-1 Domaines fonctionnels et interactions

La protéine OCRL est composée de 5 grands domaines. Du Nter au Cter de la protéine on trouve :

*un domaine PH qui serait impliqué dans la liaison aux phosphoinositides. Ce domaine est utile aux interactions avec les autres protéines. Il est relié au suivant par un bras flexible comportant une séquence AP2 médiant des interactions avec la clathrine.

* le domaine catalytique de la protéine permettant l'hydrolyse du phosphate en 5 du phosphoinositol 4,5 di phosphate

* le domaine ASH (ASPM, SPD2 et Hydin), retrouvé dans les protéines des centrosomes et du cil primaire.

C'est au niveau de ce domaine qu'a lieu l'interaction avec les protéines Rab. OCRL interagirait avec plus de 16 protéines Rab et plus particulièrement avec Rab1, Rab5, Rab6, Rab8 et Rab35

*le domaine RhoGAP-like, lieu d'interaction avec les protéines SES 1 / 2 et APPL1.

On trouve aussi des séquences sur la protéine permettant l'interaction avec les molécules de clathrine dans le domaine ASH et dans une boucle du domaine RhoGAP. Cette séquence est épissée alternativement dans les tissus neurologiques. Il permet une augmentation de l'affinité d'OCRL pour la clathrine (R. Choudhury et al. 2009)

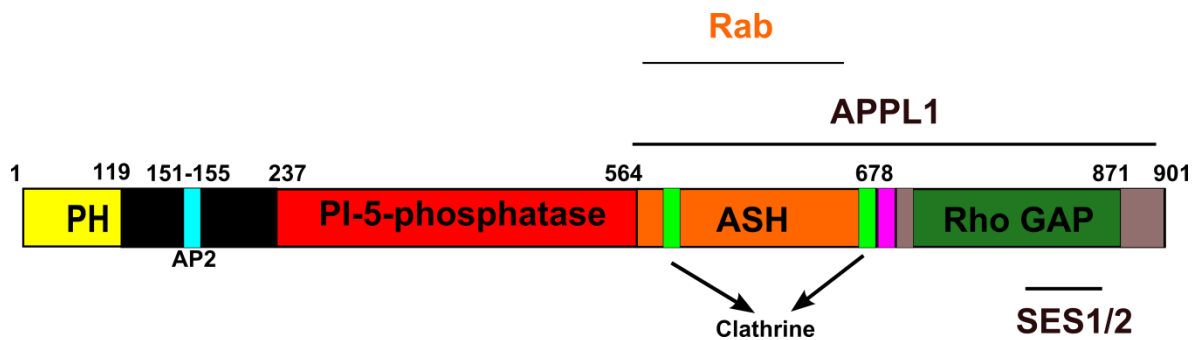


Figure 32 Domaine d'OCRL

en jaune le domaine PH, en bleu un site de fixation d'AP2, en rouge le domaine catalytique de l'enzyme, en orange le domaine ASH, en vert clair des domaines de fixation de la clathrine en rose l'exon alternatif et en vert foncé le domaine Rho Gap like. Adapté de (Hou et al. 2011)

I-B-2 Role d'OCRL

Jusqu' au début des années 2000, les phénomènes cellulaires auxquels participe OCRL1 étaient totalement inconnus. De part ces multiples interactions protéiques et de part le rôle du Ptd Ins (4,5)P₂, OCRL est impliqué dans un grand nombre de processus cellulaires.

Les différents rôles de la protéine sont résumés ci dessous :

Role dans la dynamique de l'actine

Le cytosquelette des patients porteur de mutation dans OCRL est altéré. L'accumulation de PI(4,5)P₂ due aux défaut dans OCRL serait à l'origine d'une accumulation d'Actine F et des défauts dans les protéines liant l'actine, comme la Cofiline (1 et 2), la Gelsoline, la Profiline, l'alpha actinine (Suchy et Nussbaum 2002)

Endocytose et trafic cellulaire

OCRL intervient dans l'endocytose de part ces liaisons avec les clathrines (Erdmann et al. 2007). Via son interaction avec APPL1, OCRL permet la mise en place du trafic de la mégaline une protéine rénale qui permet la réabsorption tubulaire au niveau rénale (Vicinanza et al. 2011).

Adhesion cellulaire et migration

OCRL a été retrouvé au niveau des lamellipodes des cellules, de plus les tests de recolonisation de blessure sur culture cellulaire ont montré un défaut des cellules de déplétées en OCRL à migrer et à recoloniser une surface (Coon et al. 2009). Ce serait ce défaut qui serait à l'origine de l'atteinte oculaire.

Division cellulaire

Un lien entre OCRL et la division a été mis en évidence. Dambournet et al. (Dambournet et al. 2011) montrait dans ses travaux que OCRL interagissait avec RAB35. Cette interaction permettait la terminaison de la division cellulaire au moment de la cytokynèse : l'abscission enregulant niveau actine

Ciliogenèse

Quatre équipes différentes ont montré une implication de la protéine OCRL dans la ciliogénèse du cil primaire. Ce cil primaire, anciennement considéré comme un artefact, est un organe particulier qui sert d'antenne à la cellule. Trois des équipes montrèrent que les fibroblastes de patients mutés pour OCRL avaient un cil primaire plus petit. Coon et al (Coon et al. 2012) montra l'interaction d'OCRL et RAB 8 ainsi que celle d'OCRL et SES1 (IPIP27a) au cil primaire. Une dernière équipe mis en évidence un cil plus grand dans les cellules rénales (Rbaibi et al, 2012)

Phagocytose

La protéine OCRL intervient aussi dans la phagocytose. Elle est recrutée au niveau du phagosome via APPL1 ce qui permet la diminution du taux de Ptd Ins(4,5)P₂ de la membrane, à l'origine de la fermeture de la vacuole. (Kühbacher et al,2012)

Un certains nombre de pathogènes intracellulaires utilisent OCRL pour permettre l'invasion cellulaire (Sarantis et al. 2012)

II Maladies liée aux mutations

dans le gène OCRL

II-A Le syndrome de Lowe

le syndrome de Lowe est une pathologie rare liée à l’X avec une incidence de 1/300.000 à 1/500.000 naissances. Elle fut identifiée par Lowe en 1952 chez trois garçons non apparentés (LOWE C et al. 1952).

Les patients sont atteints d' une cataracte congénitale bilatérale, d'un déficit intellectuel et d'une atteinte rénale de type tubulopathie de Fanconi. Ce syndrome appelé Syndrome Oculo, Cerebro, Rénal de Lowe est lié uniquement à ce jour à des mutations dans le gène OCRL.

Ce syndrome évolue en trois étapes :

-une période de latence durant les 6 premiers mois de vie, où seule une atteinte oculaire et une hypotonie sévère sont présentes.

-une période d'évolutivité où les signes neurologiques et rénaux se développent. Cette période peut durer plus de 10 ans.

-enfin une stabilisation. La durée de vie des patients dépendra surtout de l'atteinte rénale de la manière dont elle sera jugulée.

Les atteintes sont multiples (Loi 2006) :

L'atteinte oculaire

On trouve chez plus de 99 % des patients une atteinte oculaire constituée par une cataracte bilatérale congénitale. Cette atteinte peut être décelé dans certains cas en anté natal à l'échographie. Elle serait due à un défaut de migration de l'épithélium cristallin durant la période embryonnaire.

La cataracte entraîne une déficience visuelle importante chez les enfants Lowe. Ce

phénomène est réversible par traitement chirurgical précoce et avec le port de lunette. Les patients atteints peuvent également présenter un glaucome.

Chez les mères conductrices, des opacités punctiformes au niveau du cristallin ont été détectées par examen ophtalmologique à la lampe à fente. Ce test aurait une sensibilité de 97 à 100 % chez les conductrices Lowe post pubère (Delleman et al. 1977)

L'atteinte neurologique

L'hypotonie néonatale serait une des conséquences de l'atteinte neurologique. L'amélioration de l'hypotonie est lente avec l'âge. La faiblesse musculaire serait d'origine centrale, aucun défaut n'aurait été imputé à un désordre de la physiologie musculaire. La taille des fibres seraient diminuées (Kohyama et al. 1989).

Les enfants présentent également une déficience intellectuelle avec un retard mental modéré (QI entre 40 et 54) avec retard dans l'acquisition du langage, troubles comportementaux de type accès de colère, irritabilité, comportement agressif...

L'atteinte neurologique peut être à l'origine de convulsion. Des kystes cérébraux sont détectables à l'IRM.

L'atteinte rénale

La fonction tubulaire est perturbée, donnant une atteinte dite de Fanconi. Cette atteinte est à l'origine d'un défaut de réabsorption minérale et acido basique, avec acidose due au défaut de réabsorption des ions bicarbonates. L'hyperaminoacidurie est constante. Le taux de réabsorption des ions phosphates est abaissé, ce qui cause à terme un rachitisme hypophosphatémique. L'atteinte rénale conduit in fine à une insuffisance rénale chronique mettant en jeu le pronostic vital.

Le traitement est la dialyse, difficilement réalisable du fait des troubles comportementaux des patients, voire la transplantation rénale.

Autres atteintes

Au niveau morphologique, on trouve souvent une bosse frontale. On trouve aussi des défauts de dentition. Enfin, des atteintes de la physiologie de la coagulation ont été décrites, telles que l'atteinte de l'hémostase primaire mise en évidence par le test de PFA 100 (Lasne et al. 2010).

Une forme moins sévère a également été décrite, on appelle cette forme : la maladie de Dent. Cette maladie se révèle dans l'enfance ou à l'âge adulte, elle se définit par une atteinte rénale comme pour le Lowe, un défaut de réabsorption tubulaire à l'origine de nephrocalcinose et d'insuffisance rénale (Devuyst and Thakker 2010).

II-B Les mutations du gène OCRL

Les mutations sont retrouvées sur toute la séquence du gène avec une prédominance des mutations pour la maladie de Dent au niveau des exons 1 à 7 et au niveau des exons 8 à 23 pour le syndrome de Lowe. La différence de symptomatologie entre les Patients Lowe et les patients Dent reste encore un mystère. Les patients Lowe et Dent montrent tous des taux d'activité d'OCRL abaissé du même ordre. On peut même retrouver des mutations identiques pour les deux pathologies (Hichri et al. 2011). La différence de symptomatologie ne serait donc pas aussi nette, il s'agirait d'un continuum clinique. On suspecte une compensation d'OCRL par une autre phosphatase lui étant structurellement très proche : INPP5B (Luo et al. 2013).

Les mutations retrouvées sont des mutations tronquantes, décalage du cadre de lecture, faux sens , mutation d'épissage et des délétions exoniques et du gène entier. Les mutations de la protéine sont le plus souvent à l'origine d'une chute du taux de protéine (données du laboratoire) cette chute s'accompagne bien évidemment d'un défaut d'activité phosphatasique de l'enzyme.

Il a été retrouvé dans la littérature une duplication totale du gène OCRL chez un patient atteint d'autisme ce qui orienterait vers une toxicité d'OCRL lorsque la quantité dépasse la normale (Schroer et al. 2012).

Matériels et méthodes

I Culture Cellulaire

I-A HEK 293

La lignée cellulaire HEK293 ATCC n°CRL-1573 est cultivée dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 4.5g/l de glucose, 10 % de sérum de veau foetal (SVF) et 1% de pénicilline et streptomycine.

I-B Cellules musculaires fœtales

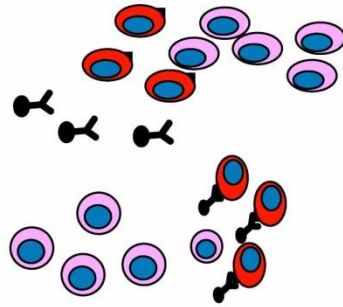
Les cellules fœtales utilisées durant ce travail ont été obtenues avec consentement éclairé des parents. Les cellules obtenues lors d'une Interruption médicale de grossesse suivant le diagnostic prénatal pour les cellules mutées et après une interruption volontaire de grossesse pour les cellules controles. Les cellules fœtales ont été produites à partir d'une biopsie musculaire placée dans du milieu de culture Ham's F10, 20% sérum de veau fœtal, 2% Ultrosor, 1% pénicilline – streptomycine. Après amplification, les cellules sont placées dans un mélange cryoconservateur (Ham F10 65 %, SVF 25 %, DMSO 10%). Pour la mise en différenciation, les cellules confluentes sont placées dans du milieu appauvri en sérum : milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) à 1g/l de glucose, 2% de sérum de cheval, 1% pénicilline et streptomycine. Cette différenciation permet la formation de myotube. La différenciation est arrêtée au bout de 4 jours pour l'étude des transcrits et 8 jours pour les marquages immunofluorescents et l'imagerie calcique.

I-C Tri cellulaire

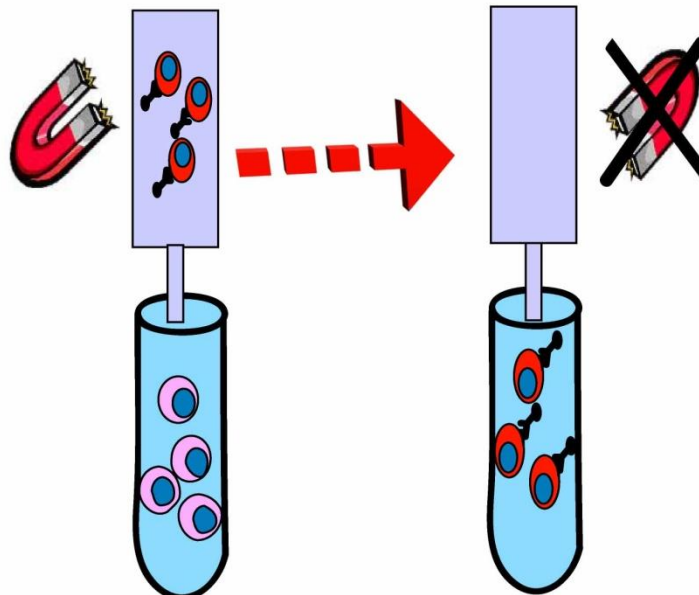
Pour réaliser ce tri, les cultures primaires sont tout d'abord comptées. $5 \cdot 10^6$ cellules sont incubées avec l'anticorps anti CD 56 couplé aux billes magnétiques (Kit MACS minibeads, Miltenyi Biotech). Après incubation à basse température (4°C), les cellules sont centrifugées et lavées. Le culot cellulaire est resuspendu dans une solution tampon fournie avec le kit (figure 33). Les cellules sont déposées sur une colonne fixée au

support magnétique. Les fibroblastes (CD 56 négatifs) n'étant pas fixés aux anticorps couplés aux billes magnétiques sont élués. Après 3 lavages de la colonne par la solution tampon, la colonne est retirée du support magnétique, et les myoblastes, n'étant plus retenus par le champ magnétique, sont ainsi élués.

A) Incubation des cellules avec l'anticorps



B) Passage au travers de la colonne magnétique



1) Sélection de la fraction négative

2) Sélection de la fraction positive



anticorps anti CD56 marqué par une bille magnétique



Myoblaste (CD56 +)



Fibroblaste (CD56 -)

Figure 33. Enrichissement des cultures en myoblastes par tri cellulaire.

Après tri, la suspension cellulaire, bien qu'enrichie en myoblastes, comporte encore une assez forte proportion de fibroblastes. Par conséquent, comme les fibroblastes adhèrent plus rapidement que les myoblastes dans une boîte de culture, les cellules sontensemencées pendant 1 H à 37°C. Puis, la suspension cellulaire est transférée dans une autre boîte de culture et remise à 37°C. Ce traitement permet d'augmenter l'efficacité du tri cellulaire. Après amplification, les cellules sont récoltées et congelées dans un mélange cryoconservateur (Ham F10 65% SVF 25 % DMSO 10%).

I-D Culture cellulaire fibroblastes cutanés

Les biopsies cutanées ont été obtenues après consentement éclairé des patients.

Afin de produire des fibroblastes cutanées à partir d'une biopsie de peau, l'explant est dilacéré en petit morceaux dans une boîte P35 contenant 1,5ml de milieu de prolifération (RPMI SVF 20% Peniciline/Streptomycine1% Kanamycine 1% Amphotéricine B 1%). Les morceaux sont "incrûstés dans la boîte" afin de ne pas les perdre lors des changements de milieu. Celui-ci est partiellement renouvelé tous les deux jours. Les cellules endothéliales seront les premières à sortir des morceaux de biopsie dilacérés, puis les fibroblastes cutanés sortent. Une fois les cellules en expansion les morceaux de biopsie sont retirés. Les cellules seront amplifiées pour étude et congelées dans un milieu cryoconservateur (DMEM 4,5g/l glucose, SVF 25 % et DMSO 10%). Afin d'induire la ciliogénèse les fibroblastes confluent sont lavés 3 fois par du PBS, puis placés dans un milieu sans sérum (DMEM 4,5g glucose 1% PS) e pendant 42h.

II Oligonucléotides et anticorps

II-A Oligonucléotides

II-A-1 Amorce de PCR

projet RyR1

pCIneoF : 5' GTTCAATTACAGCTCTTAAG 3',
T3R : 5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'
CCL 28/2 F : 5' TCTGGAAGTTCGGGGTCATCTT 3'
CCL 28/2 R : 5' GCCATGCGGTGTCGTATCAA 3'
Mlul 101 bis F : 5' GGGACGCGTAGAGACACAGGCCACAATCC 3'
Sall 101 bis R : 5' GGGGTCGACGAGTGCAATGGCGTGATCT 3'

projet OCRL

-70F: 5' GTTCTCAAACGACACGCAG3'
322R : 5' CAAGAAGCTGTGACTG 3'
2812R 5'GGTAAAGGAGGGATTAGGAAACGC 3'

II-A-2 Sonde RT MLPA

Les sondes RPO sont marquées en 5' par un ion phosphate pour permettre la ligation

Sonde pseudo exon OCRL

LPO (Left Probe Oligonucléotides)

5'GGGTCCCTAAGGGTTGGAGATTGACATAGCTTCTAACAGTCTAATAAGATGACTGAAG3'

RPO (Right Probe Oligonucléotides)

5'PAATATCCATGGGATGGAGGTTATTGGTGAAGTTATCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC3'

Sonde OCRL TOT

LPO 5'GGGTCCCTAAGGGTTGGAGCTTCTAGTAGATCACCTATTCAAATACGCCTGTCACCAG3'

RPO 5'PGAGGACCTGTTCCAGACCCCTGGAATGCAGGAAGAGCTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC3'

Sonde gène de référence

LPO 5'GGGTTCCCTAAGGGTTGGACTTCCATGAACCAATCAAGCATTGCCCAAGATCGAG3'

RPO 5'PGTTATATGCAGAGGAACCCCCAGATGCCTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC3'

Sonde INPP5B

LPO 5'GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGAGCCAATCTTGACCTACCACTTGAAACCATTAGTGAGCTG3'

RPO 5'PACTCTGATGCCAGTATGGACTGGAGATGATGGGAGCCAGTTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC3'

Ces oligonucléotides ont été produits et purifiés par Eurogentec.

II-A- 3 Oligonucléotides antisens (AON)

Les oligonucléotides antisens ont été synthétisés et purifiés par Alpha DNA (Montréal, Canada). Ce sont des 2omers 2'-O-Méthyl ARN avec un squelette en phosphorothioate.

AON A	5' UCAUCCUAGAGUAAAAACUA 3'
AON B	5' GAACACAGUCAUCCAAGAGU 3'
AON C	5' AUGUGAGAGAACACAGUCAU 3'
AON D	5' GUUCUUUCCGUGUCCCCAGG 3'
AON E	5' CCACAGCGCCCGCAUACAC 3'
AON F	5' GGAUUAAAAGCGUGAGCCAC 3'
AON G	5' AUGAUCCACCUACCUUGGCC 3'
AON FITC	5' Fitc CCGUGUCCCAGGAUGUAG 3'
AON CTRL	5' GGAUUAAAAGCGUGAGCCAC 3'
AON 1	5' GAUUAUCUUCAGUCAUCUUA 3'
AON 2	5' CACCAAUAACCUCCAUCCCA 3'
AON 3	5' ACUUACCUGAAAUUGCUUUA 3'

II-A- 4 Séquence antisens intégrée dans la cassette U7 SmOPT

Projet RYR1

U7 D+E 5' CCACAGCGCCCGCAUACACUUGUUCUUC3'

U7 CTRL 5' GGUGUAUUGCAUGAUUAUGU3'

PROJET OCRL

U7 SKIP 5' AAUUGCUUUAAGUUCACCAAUAACCUCCA3'

U7 Ctrl 5' GGUGUAUUGCAUGAUUAUGU3'

II-B Anticorps utilisés

Tableau 1 : Anticorps primaires utilisés pour cette étude.

Anticorps	Espèces	Utilisation (dilution)	Origine
Anti-Desmine (MO724)	Souris	IF (1/500)	Dako
Anti-MyHC (MF20)	Souris	IF (1/500)	Devel.Studies Hybridoma bank Iowa
Anti – RyR	Lapin	IF (1/1000)	Anticorps du laboratoire
Anti γ Tubuline	Lapin	IF (1/1.000)	Sigma
Anti-Tubuline acétylée(6.11.B1)	Souris	IF (1/200)	Sigma
Anti-OCRL	Lapin	WB (1/2.000) et IP	Anticorps du laboratoire
Anti-aTubuline B512	Souris	WB 1/5000	Sigma

Tableau 2 : Anticorps secondaires couplés à un fluorochrome ou à une peroxydase

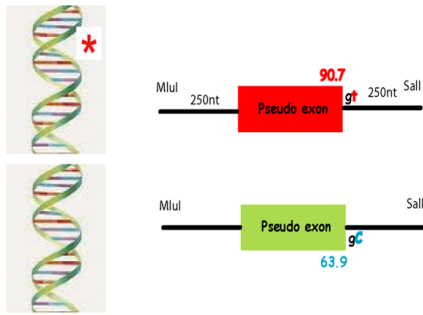
espèce ciblée	couplage	Utilisation	origine
Lapin	Alexa 488	IF 1/500 ^{ème}	Invitrogen
Souris	Cyanine 3	IF 1/500 ^{ème}	Jackson ImmunoResearch
Lapin	HRP	WB 1/10.000	Jackson ImmunoResearch
Souris	HRP	WB 1/10.000	Jackson ImmunoResearch

III-Biologie moléculaire

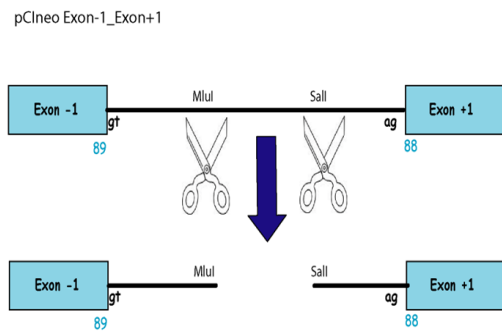
III-A Construction du minigène

Pour évaluer l'influence de la mutation RYR1 c.14646+2563C>T sur l'épissage, un test d'épissage par minigène a été développé en suivant le procédé développé par Roux-Buisson et al. (Roux-Buisson et al. 2011). L'ADN génomique du patient a été amplifié par PCR avec les amorces MluI 101F et Sall 101R, ces amorces possèdent en 5' des sites de restriction (MluI et Sall). Les produits d'amplification génèrent un fragment contenant 318 bases en amont et 205 bases en aval de la mutation. Les produits d'amplification sont digérés par les enzymes MluI et Sall pendant 1h30 à 37°C. Le plasmide pCineo Exon-1 Exon+1 est lui-même digéré par MluI et Sall à 37°C. Les fragments digérés sont mis en contact avec le plasmide ouvert pour la ligation. Ayant des bouts cohésifs, les amplifiats s'intègrent dans le plasmide ouvert dans le sens prévu. Des bactéries compétentes DH5-alpha^r (Invitrogen) sont transformées par le mélange de ligation. Les deux allèles du patient étant amplifiés, on obtient après clonage 2 plasmides: le plasmide Mut portant la mutation et le plasmide N ne la portant pas. Après vérification des plasmides par séquençage, ils sont transfectés dans les cellules HEK 293 (Figure 34).

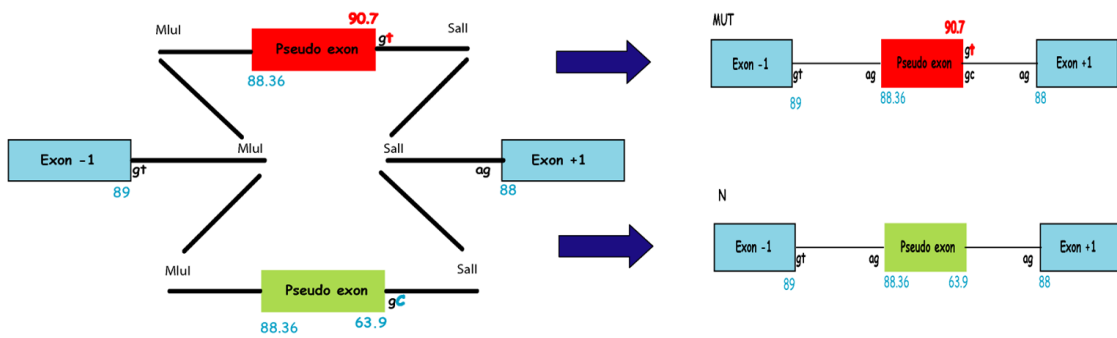
A) clonage des allèles du malade



B) Ouverture du plasmide pCIneo Exon-1_Exon+1



C) Insertion de la cassette et production des plasmides



D) Transfection des HEK par MUT et N

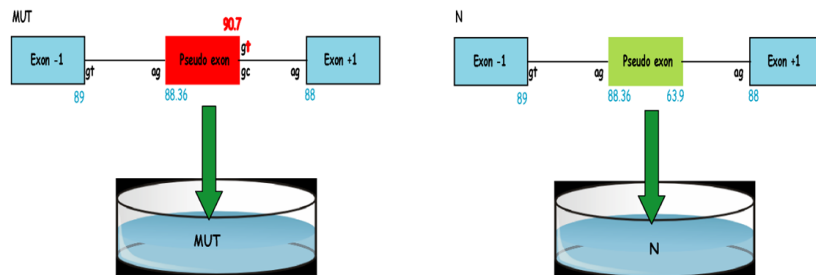


Figure 34. Mise au point du minigène d'épissage.

III-B Lentivirus U7

III-B-1 Construction des plasmides lentiviraux

Afin de construire le plasmide codant pour la cassette U7 SmOPT, avec la séquence antisens souhaitée, un clonage par PCR de Fusion a été réalisé. Deux PCRs sont réalisées sur le Plasmide U7 Detex23, il est utilisé pour le clonage au laboratoire du Dr Garcia à l'Institut de Myologie. Ce plasmide porte la séquence de la U7 SmOPT snRNA dirigées contre l'exon 23 de la dystrophine de souris. La première PCR (PCR1) amplifie la région terminal de la cassette U7 et la séquence avant la région antisens. La seconde PCR (PCR2) amplifie la région avant la séquence antisens jusqu'au promoteur U7. Les amplifiats sont alors purifiés sur gel. Après élution, les amplifiats de chaque PCR sont mélangés et une troisième PCR est réalisée permettant de fusionner les deux PCRs. Il est nécessaire que les amorces des PCRs 1 et 2 soient en partie complémentaires. Les amplifiats sont purifiés sur gel. Ils sont alors digérés tout comme le plasmide pWPXLd avec des enzymes de restriction, XhoI et XbaI (Fermentas) pendant 1h30. Les digestions sont alors purifiées sur gel. Le plasmide ouvert et les amplifiats digérés sont ligués et des bactéries compétentes sont transformées par choc thermique. Les bactéries sont alors étalées sur milieu LB+ampicilline. Au bout de 16h, les colonies sont screenées. Les plasmides sont alors séquencés.

III-B-2 Production de lentivirus

Seuls les lentivirus pour le projet OCRL ont été produits au laboratoire, ceux du projet RyR1 ont été produits par le Généthon.

Les lentivirus sont produits par des cellules HEK293T. A J0, les trois plasmides viraux, pWPXLd-U7, psPAX2 (plasmide 12260, Addgene, contenant les gènes *gag* et *pol*) et pVSV-G (plasmide 14888, Addgene, contenant les gènes de l'enveloppe virale) sont transfectés dans les cellules HEK293T (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Cat#631312, Clontech). A J+1, le milieu de culture est renouvelé. A J+2, le milieu de culture est prélevé et

centrifugé 5min à 2.000tours/minute pour se débarrasser des débris cellulaires. Le surnagent est filtré (filtre de 0.45µm) et centrifugé pendant 24h à 4400 trpm pour culotter les particules virales. A J+3 le culot est repris dans du milieu de culture puis il est aliquoté, congelé dans l'azote et conservé à -80°C.

IV Biochimie

IV-A Lyse des cellules dans du tampon RIPA

Les cellules en culture sont lavées avec du PBS et les boîtes sont placées sur de la glace. 250µl à 500µl de tampon de lyse RIPA (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS et inhibiteurs de protéases et de phosphatases) sont déposés sur les cellules. La lyse s'effectue durant 15min sur glace. Puis les cellules sont récoltées avec un racloir, et centrifugées 15min à 15.000 rpm, à 4°C. Le lysat protéique est dosé et congelé dans l'azote.

IV-B Lyse ménagée des cellules pour la mesure d'activité phosphatase

Pour les études d'activité, les cellules sont lavées dans du PBS et les boîtes sont disposées sur banc de glace. 500µl de tampon HEPES 50mM, NaCl 150mM MgCl₂ 10mM triton 0,1 % est ajouté pendant 20 min sous agitation. Le lysat est centrifugé à 4°C 15.000 rpm pendant 15 min.

IV-C Dosage des échantillons par la méthode de Folin-Lowry

Les échantillons (1 – 10 µl) et la gamme de BSA (0 à 60 µg) sont déposés dans des tubes à hémolyse de 5 ml. On ajoute 10µl de SDS, puis 2,5 ml d'un mélange 1 : 1 de EDTA – Cu²⁺ 0,05% et Na₂CO₃ 4% - NaOH 0,2 M, puis les tubes sont vortexés. On ajoute ensuite 0,125

ml de réactif de Folin pour colorer les protéines, puis les tubes sont vortexés à nouveau et placés 45 min à l'abri de la lumière. La densité optique est lue à 660 nm et la concentration protéique de l'échantillon est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe de la gamme BSA.

IV-D Western Blot

Les protéines (50 à 100µg) sont séparées par migration sur un gel à 8% d'acrylamide à 40 mA, puis transférées sur membrane Immobilon P (Millipore) pendant 1h30 à 0,7A dans du tampon de transfert (20% méthanol, Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,025%) . Les membranes sont saturées 30 min dans du tampon de saturation TBS-Tween 0,1%, 5% lait. Puis les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de saturation. Après 5 lavages de 5 min par du TBS-Tween 0,1% , les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (HRP) pendant 3 h. Les membranes sont lavées trois fois 10 min dans du TBS-Tween 0,1% puis la révélation est faite avec un substrat chémiluminescent de la peroxydase (Perkin Elmer).

IV-E IP et mesure de l'activité enzymatique,

Afin de mesurer l'activité Phosphatidyl inositol 5Phosphatase la protéine est d'abord immunoprécipitée.

20µl d'anticorps Anti OCRL est incubé en présence de 1mg de lysat protéique pendant 3h à 4°C sous agitation. Des billes sepharose couplé à la protéine A (10mg par point) sont quant à elles réhydratés dans le tampon de lyse sans triton. Les billes sont mis en présence du mélange anticorps-lysate toute la nuit sous agitation. Le lendemain, les tubes sont centrifugés 1min à 1.000 rpm, le surnageant est écarté. Après 5 lavages au tampon de lyse sans triton, Les billes sont congelées dans l'azote puis expédiées en carboglace. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées par le laboratoire du Pr Payraastre à Toulouse.

V Transfection et Transduction

V-A Transfection de Plasmide

Les cellules HEK293 (300.000 cellules) sontensemencées dans des boites P35 sur la nuit. Le lendemain matin les cellules sont transfectées par 3µg d'ADN des plasmides d'épissage Mut et N avec 10µl d'EXGEN 500 (Euromedex) en suivant le protocole fourni par le fabricant. Au bout de 48 heures, la transfection est arrêtée. Les cellules sont alors lavées avec du PBS puis incubées 5 minutes à 37°C avec une solution de Trypsine-EDTA. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 tours/minute. Le culot cellulaire est lavé dans du PBS et est ensuite dissous dans du TRIzol (Invitrogen).

V-B Transfection de myoblastes, myotubes et fibroblaste

Les myoblastes sont transfectés à 80% de confluence par 500 nmoles d'AON et 8,5µl d'EXGEN 500 (Euromedex) par ml de milieu. Une fois les cellules à confluence, elles sont placées en milieu de différenciation et retransfectées le lendemain en suivant le même protocole. La transfection est arrêtée à 4 jours de différenciation. Les myotubes sont alors lavés avec du PBS puis collectés par trypsination. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1.500 tours/minute. Le culot cellulaire est lavé dans du PBS puis solubilisé par du TRIzol (Invitrogen).

V-C Transduction virale

300.000 cellules sontensemencées dans 500 µl de milieu de culture. Les lentivirus sont ajoutés avec une MOI de 300. Les cellules sont incubées pendant 5 heures puis du milieu de prolifération est ajouté pendant 48h. Les cellules sont ensuite amplifiées pour étude et congélation.

VI Etudes des transcrits

VI-A Extraction et RT PCR

A partir des cellules solubilisées dans du TRIzol, les ARNs totaux sont extraits avec le kit RNAeasy (Invitrogen). L'intégrité de l'ARN est contrôlée sur gel d'agarose 1.5%. Les concentrations sont déterminées par mesure de densité optique à 260 nm. L'ADN complémentaire (ADNc) est ensuite synthétisé à partir de 750ng d'ARNs totaux en utilisant 0.5µl de Reverse Transcriptase (transcriptor, Roche), 0.3 µg d'oligodT et 0.5µl de RNA PROTECTOR (Roche). Les amorces pCineoF et T3R sont utilisées pour la PCR du test d'épissage, les amorces CCL28/2F et CCL28/2R pour la PCR des ADNc de RyR1.

VI-B Quantification par densitométrie

L'amplification des ADNc est obtenue par 25 cycles de PCR pour la quantification des transcrits, ou 30 cycles lorsque la quantification n'est pas nécessaire. Les fragments amplifiés sont séparés sur gel d'agarose 1% par électrophorèse et colorés avec du Gel Red (Roche). La quantification relative des transcrits amplifiés a été réalisée, à l'aide d'un CHEMIDOC (BIO RAD), par densitométrie avec le logiciel Quantity ONE (BIO RAD)(Spitali et al. 2010).

VI-C Quantification par RT MLPA

Les transcrits du gène OCRL n'étant que faiblement exprimés dans les fibroblastes, les quantifications par PCR ne pouvaient être réalisées. Le choix d'une technique sensible et spécifique se tourna sur la RT MLPA pour RT Multiplex Ligation Probe dependant Assay.

Cette approche se base sur la MLPA qui permet de quantifier les délétions et les duplications mais ici on utilise le principe de la MLPA pour quantifier les transcrits par quantification des cDNAs (Eldering et al. 2003 ; Coutton et al. 2013)

Pour ce faire, les cDNA sont dénaturés puis sont mis en contact avec les sondes pendant 16h pour permettre l'hybridation de celles-ci sur les cDNA.

Les sondes sont conçues pour s'hybrider chacune au niveau des jonctions exons-exons des transcrits. Après utilisation d'une ligase, les sondes situées à proximité seront fusionnées. On amplifera les sondes liguées par PCR. Les amplifiats seront déposés sur un séquenceur capillaire (ABI3130) afin de séparer les amplifiats selon leur taille. Les sondes sont ensuite quantifiées par la surface de chaque pic en utilisant le logiciel Genemapper (figure 35).

Pour cette étude, différents couples ont été utilisés :

- Un couple dirigé contre la jonction Exon 20-21 permettant la quantification des transcrits total d'OCRL
- un couple dirigé contre la jonction exonique pseudo exon 4bis_exon5 correspondant aux transcrits abérants
- un couple dirigé contre la jonction Exons 19-20 du gène INPP5B
- un couple dirigé contre la jonction Exon 5-6 du gène de référence (ARID1A) pour la normalisation de la quantité des transcrits.

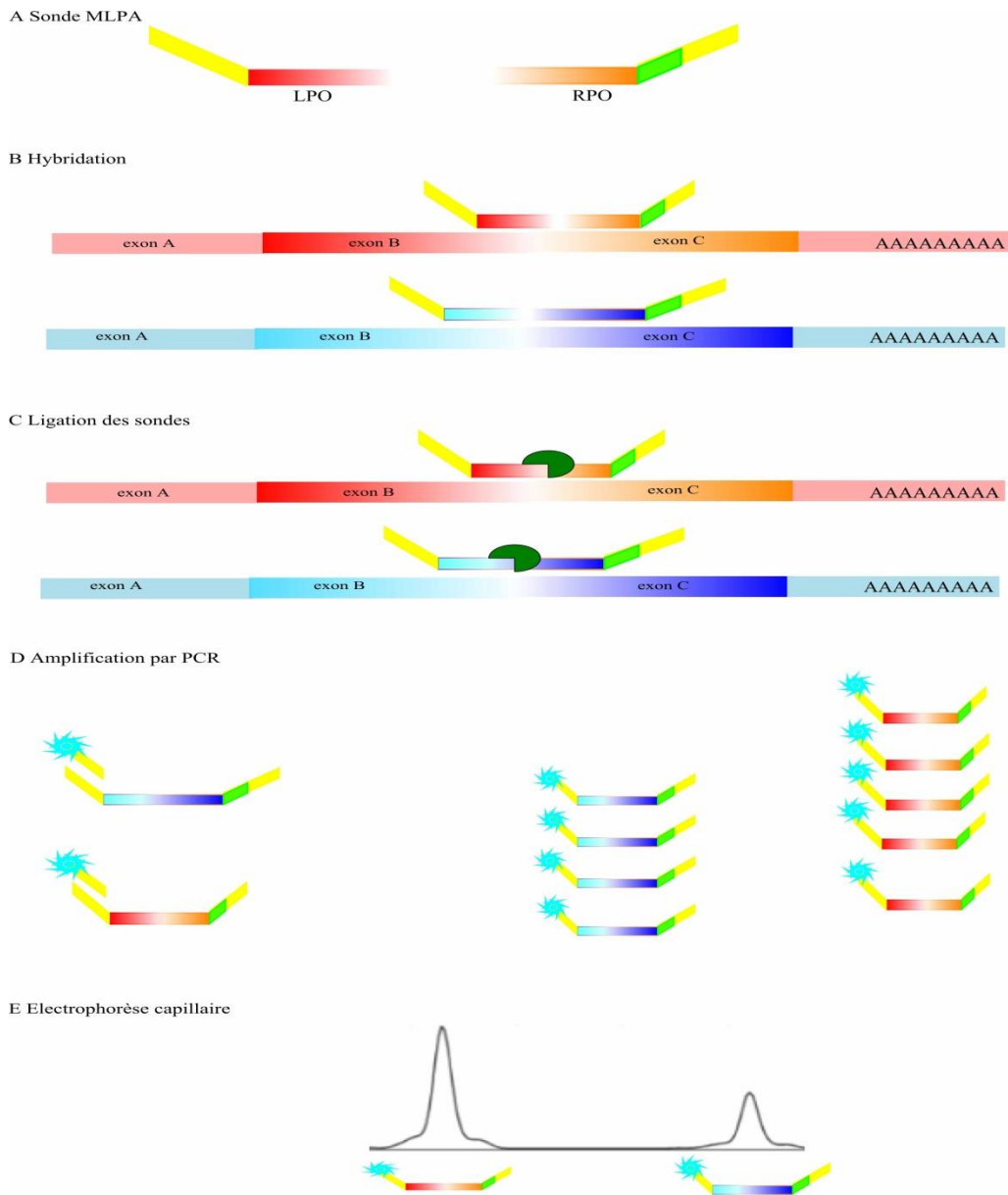


Figure 35 RTMLPA

A Couple de Sondes RT MLPA. Un couple est composé de deux sondes LPO et RPO (Left Probe Oligonucléotide et Right Probe Oligonucléotide)

Ces sondes sont composées : d'une partie spécifique de la région d'intérêt (en rouge, orange et bleu), d'une partie de taille variable permettant de séparer les sondes lors de l'électrophorèse capillaire (ici en vert). Aux extrémités de chaque sonde est située la séquence de fixation des amorces pour réaliser une PCR universelle

B,C,D,E étape de la RT MLPA. Les sondes s'hybrident aux transcrits (B). Ils sont alors fusionnés par l'action d'une ligase (en vert foncé) (C). Une étape d'amplification quantitative est réalisée (D). Les amplifiats sont séparés et quantifiés par électrophorèse capillaire suivant leur taille et la surface du pic. Ici le transcrit rouge est plus abondant que le transcrit bleu

VII. Biologie Cellulaire

VII-A Quantification protéique et étude morphologique

VII-A-1 Quantification protéique

Pour les expériences d'immunofluorescence indirecte, les myoblastes sont ensemencés dans des boîtes 35mm avec matrice élastique ESS (Ibidi, Biovalley) coatées à la laminine. Après prolifération/différenciation, les cellules sont fixées au méthanol pendant 6 min à -20°C. Les cellules sont ensuite placées dans du PBS-0.1% Tween 20 (PBS-T) durant 15 min. L'incubation des anticorps primaires anti RYR1 et anti MyHC dans du PBS-T est faite pendant 1h30 min à température ambiante. Après trois lavages dans du PBS-T, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires pendant 30 min. Après trois lavages, les boîtes sont ensuite montées directement dans du liquide de montage Fluorsave (Calbiochem). Les marquages sont observés au microscope confocal (Leica TCS SPE) à objectif X40. Pour chaque champs, cinq coupes en z espacées de 1,5µm ont été additionnées. Les images sont ensuite analysé par imageJ. Les intensités de RyR1 sont alors rapportées à la MyHC permettant ainsi de réaliser une estimation de la quantité de RyR1.

VII-A-2 étude morphologique

La largeur des myotubes a été évaluée. La distance mesurée est la plus grande largeur de chaque myotube par champ. Les valeurs sont ensuite classées en 4 catégories afin d'obtenir les différentes populations de myotubes. La moyenne des largeurs de myotubes est aussi calculée.

VII-B Imagerie Calcique sur cellules musculaires en culture

L'imagerie calcique est réalisée des cultures de cellules musculaires fœtales humaines différenciées. 50.000 cellules sont déposées dans une goutte de 50µl au centre d'une boîte de 35mm de diamètre. Après adhésion, elles placées en milieu de différenciation pendant 8 jours. Après lavage au PBS, les cellules sont ensuite chargées avec une sonde calcique, le Fluo4-AM (*Invitrogen, F-14217*) diluée dans du Krebs, une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS puis sont de nouveau placées dans du milieu de culture pendant 30 min à 37°C pour permettre la désestérification de la sonde. L'imagerie est réalisée dans du milieu Krebs au microscope confocal Leica SPE. Les cellules sont stimulées par ajout de KCl 140mM ou de 4 CmC 500µM (*4-chloro-m-cresol, Réf 24940, Fluka*) dilués dans du Krebs. La variation d'intensité de fluorescence obtenue correspondant à la réponse calcique aux différents stimuli est ensuite quantifiée et analysée par le logiciel ImageJ.

VI-C Mesure du Cil primaire des fibroblastes

Une fois à confluence les fibroblastes sont cultivés dans du milieu sans serum pendant 42 h. Les cellules sont alors fixées au méthanol pendant 6 min à -20°C. Les cellules sont ensuite placées dans du PBS-0.1%Tween 20 (PBS-T) durant 15 min. L'incubation des anticorps primaires (dilutions selon tableau 1) dans du PBS-T est faite pendant 1h30 min à température ambiante. Après trois lavages dans du PBS-T, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires (dilutions selon tableau 2) pendant 30 min. Après trois lavages, les noyaux sont colorés au Hoechst (intercalant de l'ADN) pendant 10 min. Les lames sont ensuite montées directement dans du liquide de montage Fluorsave (Calbiochem). Les marquages sont observés au microscope confocal (Leica TCS SPE) à objectif X40 ou x100. Afin de mesurer la taille du cil primaire de chaque cellule et d'avoir les cellules en trois dimensions, 10 coupes en z espacées de 1µm sont réalisées. Le cil est repéré par un marquage du centrosome (marqué par la gamma tubuline qui se trouve à sa base). La taille du cil est évaluée grâce au marquage du cil par la tubuline acétylée .

VIII Bio informatique

Différents logiciels bioinformatiques ont été utilisés durant ce projet.

La séquence utilisée dans les logiciels est présentée dans les annexes. L'étude de la séquence du pseudo exon a été réalisée grâce au logiciel Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF>). Ce logiciel utilise différents algorithmes pour identifier les sites consensus d'épissage, leur valeur ou leur « force » correspondant à la probabilité que le site soit reconnu par les systèmes d'épissage. Il reconnaît différentes séquences ESE, ESS, etc. Les séquences ESE sont définies par les protéines SR qui s'y fixent (comme SF2-ASF, SRp55, SC35, etc). Ce logiciel détermine aussi les séquences « Rescue ESE ». Ces séquences sont définies comme étant des séquences ESE retrouvées dans des exons avec des sites donneurs et accepteurs faibles. Les séquences hnRNP inhibant l'épissage sont aussi recherchées. La structure du transcrit primaire a été déterminée par le serveur mFOLD (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold). Les bases non appariées forment des structures dites « ouvertes », permettant une meilleure accessibilité de l'AON sur la cible. Les données concernant la stabilité de la liaison AON-transcrit primaire ont été déterminées par la fonction oligowalk du logiciel « RNA structure 4.5 ». Ce logiciel permet de déterminer les données thermodynamiques de la liaison AON-pre ARNm. Il indique :

- La température de fusion (T_m) des AONs permettant d'établir la force de la liaison AON-pre ARNm.
- La valeur (G) d'enthalpie libre correspondant à l'énergie à fournir pour casser le duplex AON-preARNm. Cette valeur prend mieux en compte les données entropiques du milieu et de la structure du pre ARNm que la température de fusion.
- La force des liaisons intra AON, qui doit être la plus proche de zéro. Si l'AON est replié sur lui-même, il ne pourra se fixer sur sa cible.
- La force des liaisons inter AON. Les AONs formant des dimères sont mieux transfectés mais pour être efficace, leur liaison ne doit pas être trop forte.

Résultats

Projet n°1

Thérapie Génique par saut d'exon appliquée à une myopathie à core

Présentation du cas RYR1

Pour ce projet je me suis intéressé à la mutation c.14646+2563 C>T du gène *RyR1* présente chez un patient atteint d'une forme sévère de myopathie structurale à cores (Monnier et al. 2008)

Un hydramnios et de très faibles mouvements foetaux furent mis en évidence au cours de la grossesse. Né à 35 semaines de gestation, il présenta à la naissance une hypotonie globale avec une difficulté à la déglutition, de multiples contractures, des difficultés respiratoires. Le patient n'a jamais acquis la marche et présente à ce jour une faiblesse musculaire et une amyotrophie sévère, avec insuffisance respiratoire. À l'examen anatomo-pathologique, des cores centraux ont été mis en évidence ainsi qu'une disproportion de la taille des fibres (figure 36). Le patient aura 15 ans cette année (figure 37).

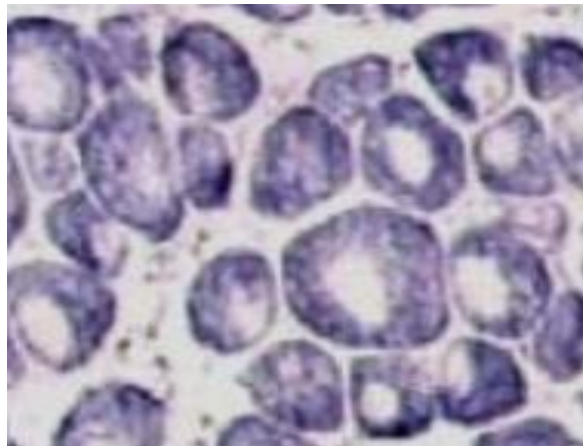


Figure 36 Biopsie musculaire réalisée chez le cas index

On peut noter la présence de cores centraux (adaptée de Monnier et al 2008)

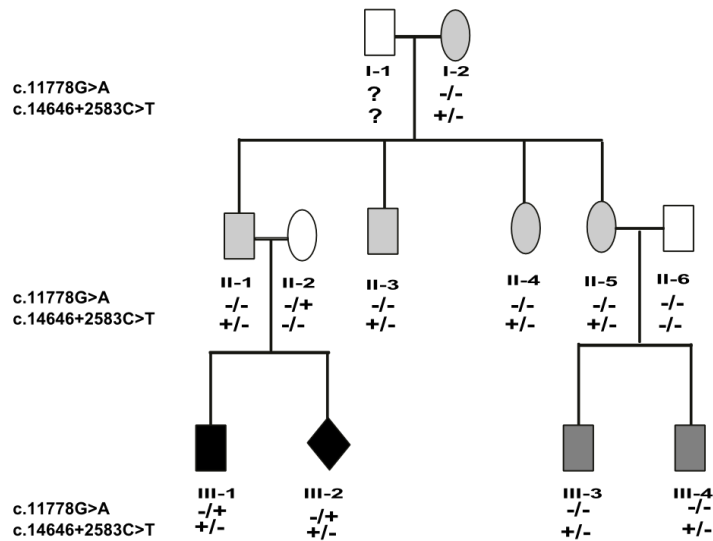


Figure 37 Généalogie de la famille étudiée.

Le cas index est le patient III-1. La sévérité de la pathologie est représentée en gris clair pour une myopathie faiblement symptomatique, en gris foncé pour une plus grande sévérité et en noir pour la forme néonatale.

Le patient (III-1) est hétérozygote composite pour le gène *RyR1* : il porte une mutation différente sur chacun de ses allèles. L'analyse du cDNA de l'allèle maternel révèle la mutation c.11778G>A du dernier nucléotide de l'exon 85. Cette mutation silencieuse change le dernier nucléotide de l'exon 85 et crée un site donneur d'épissage en aval du site donneur constitutif. En raison d'une pénétrance incomplète, deux transcrits sont générés : un normal et un transcrit portant un codon stop à la position 3926+4. Ce deuxième transcrit est très probablement dégradé par le processus de « non sense mediated mRNA decay » (NMD) (figure 38). Cette mutation est asymptomatique chez la mère (II-1).

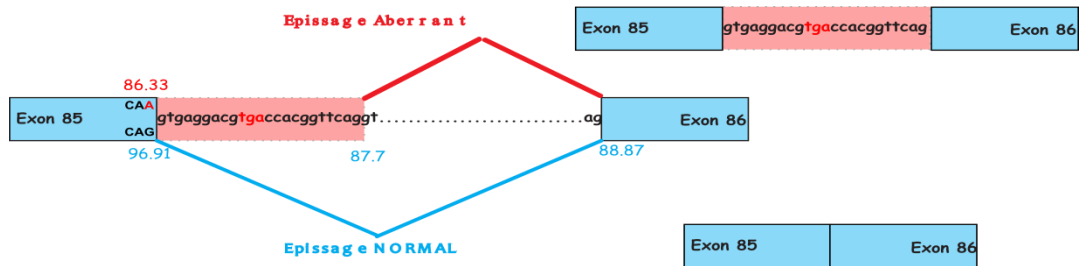


Figure 38 Conséquence de la mutation maternelle

La mutation c.11778G>A du gène *RYR1* est à l'origine de la diminution de la force du site physiologique de l'exon 85. Un site cryptique donneur en aval de la mutation s'active alors, étant à l'origine d'une rétention intronique partielle, représentée ici par le rectangle rouge. Cette rétention comporte un Codon STOP (TGA) en rouge

L'analyse du cDNA du second allèle révèle la mutation c.14646+2563 C>T dans l'intron 101 de *RyR1*. Cette mutation est une mutation d'épissage avec production d'un pseudo exon dans l'ARNm de *RyR1*. Cette mutation est présente sur trois générations. Le père du cas index (II-2), son l'oncle (II-3), ses tantes (II-4 et II-6) ainsi que sa grand mère maternelle (I-1) sont atteints d'une forme de myopathie mineure. L'étude par Western blot de l'expression de la protéine sur une biopsie musculaire chez l'oncle montre une déplétion importante (environ 44%) du récepteur de la ryanodine de type 1 (*RYR1*). Au niveau anatomopathologique, des cores typiques ont été retrouvées dans la famille (III-1, II-1, II-3). Des tests IVCT chez le père ont démontré une susceptibilité à l'hyperthermie maligne. Les enfants de la tante du cas index III-3 et III-4 sont plus sévèrement atteints par comparaison aux deux générations supérieures. Il n'est pas possible d'évaluer si la mutation a une variabilité intra familiale. Nous n'avons pas réalisé le séquençage de tous les exons de *RyR1* chez les 2 enfants III-3 et III-4

C'est la conjugaison des deux mutations qui est à l'origine de la pathologie sévère du patient. Le but de ce projet est d'étudier la faisabilité de thérapie génique par saut d'exon pour rétablir un épissage normal de l'allèle possédant le pseudo exon dans des cellules du malade et d'ainsi soigner ce patient. Ici, à la différence de la stratégie de saut d'exon développée dans la myopathie de Duchenne, la protéine obtenue sera totalement fonctionnelle. Si on « répare » l'expression de l'allèle paternel, il ne restera plus que l'allèle muté maternel qui, exprimé seul est asymptomatique.

Résultats, Discussion

I. Validation du modèle cellulaire

Pour réaliser ce projet de thérapie génique par saut d'exon, il fallait tester des oligonucléotides sur des cellules portant la mutation du patient. Les cellules de celui-ci n'étant pas disponibles, le laboratoire a obtenu une biopsie musculaire fœtale issue d'une interruption médicale de grossesse réalisée dans la famille du patient à la suite d'un conseil génétique (patient III-2 figure 37). Cette biopsie, que j'appellerai MF pour cette étude, provenait d'un fœtus portant les mêmes allèles pathogènes que le cas index. Je disposais également de cellules fœtales issues d'une interruption volontaire de grossesse réalisée au même stade fœtal. Elles sont considérées comme non porteuses de mutation sur RyR1. Ces cellules ont été utilisées comme témoin, elles ont été nommées FC pour cette étude.

Les premiers essais de mise en culture et de différenciation des cellules clonales MF et FC ne furent pas satisfaisants. Trop peu de cellules se différenciaient. Les cultures contenaient peu de myoblastes (environ 15%) et beaucoup de fibroblastes, ce qui ne favorisait pas la fusion des myoblastes en myotubes. Afin d'augmenter la proportion en myoblastes dans les cultures, un clonage par dilution a été réalisé. Ce clonage permet d'amplifier chaque cellule séparément, afin d'obtenir des colonies pures : soit 100% myoblastes soit 100% de fibroblastes.

Après un essai d'une purification d'une population clonale de myoblaste (clonage par dilution), les cellules se différenciant difficilement (peu de myotubes par boîte) nous avons plutôt choisi de réaliser une purification des cellules par tri cellulaire avec un kit de Miltenyi Biotec. Ce tri utilise des billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre l'antigène CD56, antigène spécifique des myoblastes.

Le tri permis de purifier les myoblastes. Un marquage par immunofluorescence utilisant l'anticorps anti desmine a permis d'évaluer le taux de myoblastes à 83% pour MF et 46% pour FC (figure 39).

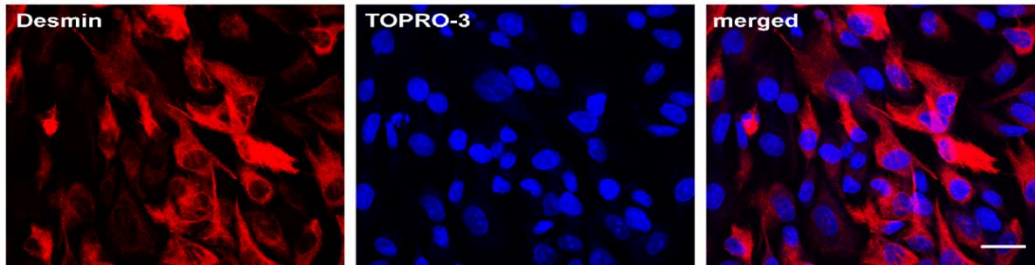


Figure 39 Culture cellulaire après tri.

Marquage immunologique des cellules MF par immunofluorescence indirecte avec anticorps dirigée contre la desmine (en rouge), les noyaux des cellules sont marquées au TOPRO3 (en bleu). 83% des cellules sont marquées desmine. La barre en bas à droite mesure 20µm. Images réalisées à l'objectif X60

Les myoblastes obtenus ont mis en différenciation pour obtenir des myotubes pour les deux échantillons (figure 40).

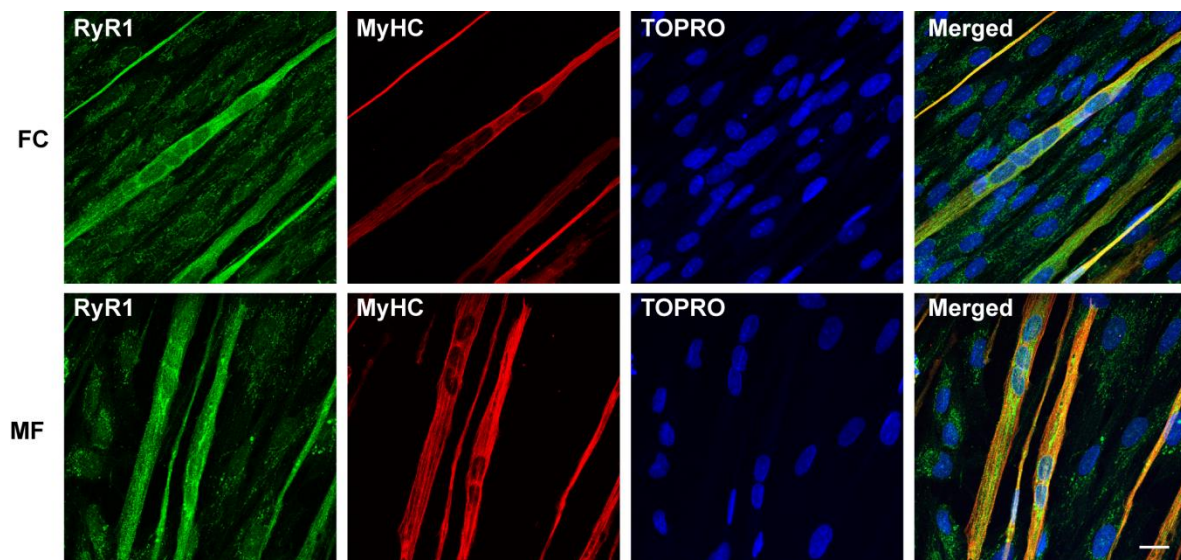


Figure 40 Différenciation des cultures après tri. Immunofluorescence indirecte dirigée contre RyR1 (en vert) et les chaînes lourdes de la myosine ou MyHC (en rouge). Les noyaux des cellules sont marqués au TOPRO3 (en bleu). La barre bas à droite mesure 20µm. Images A et B réalisées à l'objectif X 60

II Etude de la mutation

La seconde étape du projet consiste en l'étude de la mutation c.14646+2563 C>T. Cette mutation identifiée chez le patient provoque l'apparition d'un transcrit supplémentaire d'une taille supérieure à celle du transcrit normal (Monnier et al, 2008).

Après extraction des ARN totaux des cellules différenciées, une RT-PCR est réalisée sur les transcrits de RyR1 (figure 41). Pour les cellules FC, une seule bande à 600 paires de bases est visible sur gel et représente l'épissage normal de l'ARNm de RyR1. Pour les cellules MF, 2 bandes à 600 et de 700 paires de bases sont présentes. Celle de 600 paires de bases représente l'épissage normal, comme pour FC, tandis que celle de 700 paires de bases représente un épissage aberrant. Cet épissage inclut une séquence supplémentaire de 99 nucléotides, appelé pseudo exon, dans le transcrit de RyR1.



Figure 41. **Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats des ADNc de RyR1.**

Fragments issus de l'amplification des ADNc des cultures après 35 cycles de PCR. FC cellules foetales controle et MF, cellules foetales mutées. On observe une bande correspondant au transcrit normal dans les cellules CF et 2 bandes pour les cellules MF. Ces deux transcrits sont le transcrit normal et le transcrit porteur du pseudoexon. Photographie prise à saturation

Afin de mieux comprendre les mécanismes pathogéniques de la mutation sur l'épissage, une étude bio informatique a été réalisée à l'aide de logiciels dédiés.

II-a analyse bioinformatique

L'analyse par bioinformatique de l'intron 101 avec ou sans la mutation c.14646+2563 C>T révèle que la mutation crée un site donneur (logiciel Human Splicing Finder). En effet, la « force » du site passe de 63,9 à 90,7 avec la mutation, c'est à dire que le site devient équivalent au site donneur d'un exon constitutif. Par comparaison, la « force » du site donneur de l'exon 101 est de 90,9.

A 99 nucléotides en amont de la mutation, il existe un site accepteur à un niveau basal très fort (88,4), il est reconnu par le logiciel Human Splicing Finder comme étant équivalent à un site constitutif : c'est un site accepteur cryptique (figure 42).

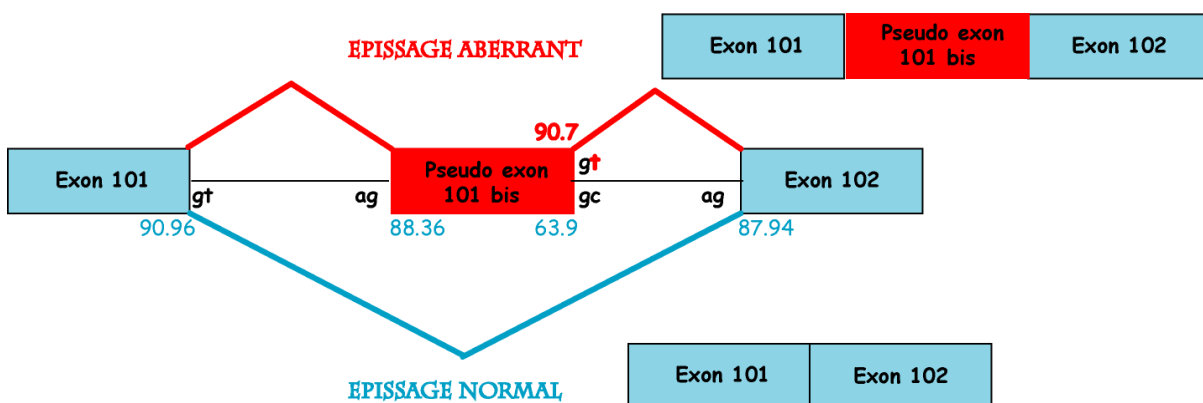


Figure 42 Schéma d'une partie du gène RyR1, montrant l'inclusion du pseudoexon retrouvé chez le patient. Les scores d'épissage sont indiqués à côté des sites donneurs et accepteurs d'épissage. La mutation c.14646+2563 C>T est indiquée en rouge

Ainsi, il semble que la mutation crée un site donneur, ce qui active en amont le site accepteur. Ceci pourrait expliquer en partie la sélection d'un pseudo exon, le pseudo exon 101bis, par la machinerie d'épissage.

Un grand nombre de séquences ESE sont retrouvées tout au long de la séquence du pseudo exon 101 bis. Des régions se démarquent: la région des nucléotides 15 à 30 est riche en ESE de type SF2/ASF; la région 34-45 comporte 6 séquences « RESCUE ESE », la région 46-58 contient 3 ESE de type SC35 et la région 59- 70 comporte 4 séquences « ESE fort ». (figure 43)



Figure 43. **Schéma représentant le pseudo exon 101 bis et les différentes séquences d'épissage retrouvées par bio informatique.**

PPyT correspond à la région riche en pyrimidine, SA et SD sont les sites accepteur (SA) et donneur (SD). La séquence est composée de site ESE (SF2/ASF en jaune, Rescue ESE en orange, SC35 en vert et en rose divers ESE fort).

Les séquences hnRNP inhibent l'inclusion des exons. Aucune n'a été recensée dans le pseudo exon. En revanche, plusieurs sont présentes les régions flanquantes. Ce qui pourrait expliquer pourquoi il n'y a pas d'autre pseudo exon malgré certains autres sites forts.

Toutes ces informations, les forces des sites consensus, d'une région riche en pyrimidine, le nombre de séquences ESE promouvant l'inclusion de l'exon et l'absence de région inhibitrice dans le pseudo exon permettent de prédire l'inclusion des 99 nucléotides dans les transcrits. Pour valider expérimentalement ce modèle et prouver que la mutation seule est responsable de l'inclusion du pseudo exon, un minigène a été construit et testé dans des cellules humaines.

II-b Etude de la mutation par minigène

Pour démontrer que la mutation c.14646+2563C>T produit un épissage aberrant, un test d'épissage a été réalisé *in vitro* à l'aide d'un minigène mis au point au laboratoire . Les séquences correspondant au pseudo exon et ses régions flanquantes ont été intégrées dans le plasmide pCineo-1+1. Ces séquences ont été clonées à partir des différents allèles

du patient. Deux plasmides ont ainsi été réalisés: le plasmide Mut portant la séquence de l'allèle muté et le plasmide N portant l'allèle sain. Ces plasmides ont été transfectés dans des cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney). Après 48h d'incubation, les ARN totaux ont été extraits. Une RT-PCR a été réalisée pour mettre en évidence les transcrits codés par les deux plasmides

Dans la figure 44, le puit « N » montre une seule bande (620 pb) correspondant à l'expression d'un transcrit sain épissé normalement. Le puit « Mut » quant à lui présente deux bandes : une correspondant au transcrit normalement épissé (620 pb) et une autre correspondant à l'inclusion du pseudo exon (719 pb). Ceci confirme que la mutation c.14546+2563C>T affecte l'épissage normal.



Figure 44. Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats des ADNc du minigène.

Pour le puit N : l'ADNc est issu de cellules HEK 293 transfectées par le plasmide N (plasmide ne portant pas la mutation). Pour le puit Mut : l'ADNc est issu de cellules HEK 293 transfectées par le plasmide M (plasmide portant la mutation). La taille des amplifiats est indiquée.

III Détermination des AONs

Les informations collectées par bio informatique sur le pseudo exon 101 bis et ses régions flanquantes m'ont servi de base pour le choix des oligonucléotides à utiliser pour réaliser un saut d'exon.

J'ai choisi des oligomères de 20 nucléotides. Cette séquence est assez longue pour une bonne spécificité et suffisamment courte pour éviter la formation de structures en épingle à cheveux. Je me suis basé ensuite sur les travaux réalisés sur la myopathie de Duchenne pour le design des oligonucléotides .

J'ai choisi des oligonucléotides recouvrant les sites ESE. J'ai aussi ciblé les sites donneur et accepteur d'épissage. Le point de branchement n'étant pas défini de manière certaine, j'ai choisi de ne pas le cibler.

Je me suis aussi intéressé à l'accessibilité du transcrit primaire pour l'AON, déterminée par les régions ouvertes du transcrit primaire identifiées par mFold.

Toutes les recommandations ne pouvant être retenues pour chaque oligonucléotide, j'ai réalisé mon choix en deux étapes:

- Choix des cibles par critères pondérés :
 - un point par nucléotide étant dans une zone ouverte
 - un point par nucléotide pour un ESE fort. La force est déterminé par HSF. Un ESE était considéré comme fort si sa valeur était supérieure à 25%
 - un point par nucléotide retrouvé dans une Séquence SC35
 - Un point par nucléotide retrouvé dans une Séquence Rescue ESE
 - Un point par nucléotide retrouvé dans un site consensus d'épissage

Ce choix permet de faire ressortir des séquences cibles dans la séquence du pseudo exon.

- Choix des AONs

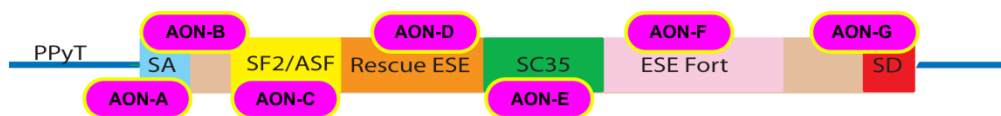
Parmi les AONs ainsi déterminés, j'ai sélectionné ceux dont la température de fusion T_m

et l'enthalpie libre (ΔG) du duplex transcrit primaire-AON étaient les plus meilleurs, permettant d'augmenter la stabilité de la liaisons AON-transcrit primaire. Les AONs pouvant former des dimères étaient préférés pour augmenter leur capacité de transfection.

Au final, 7 AONs ont finalement été choisis :

- AON A, ciblant une partie de la région riche en pyrimidine et le site accepteur
- AON B, ciblant le site accepteur et des ESE
- AON C, ciblant une région ESE (SF₂/ASF)
- AON D, ciblant une région riche en ESE de type RESCUE ESE
- AON E, ciblant une région riche en ESE SC35
- AON F, ciblant une région riche ESE fort
- AON G, ciblant le site donneur.

Leurs diverses caractéristiques des AON sont résumées dans la figure 45



AON	sequence (5'>3')	cible	accessibilité de la cible	Tm (°C)	ΔG duplex
A	UCAUCCUAGAGUAAAAACUA	PPyT+ SA	ouverte	76	-8
B	GAACACAGUCAUCCUAGAGU	SA +ESE	fermée	82,9	-24
C	AUGUGAGAGAACACAGUCAU	ESE (SF ₂ /ASF)	ouverte	80	-18,5
D	UUCUUUCCGUGUCCCCAGG	RESCUE ESE	ouverte	89,2	-21,2
E	CCACAGCGCCCGCAUACAC	ESE (SC35)	ouverte	94,1	-22,5
F	GGAUUAAAAGCGUGAGCCAC	zone riche ESE fort	fermée	93,7	-22,9
G	AUGAUCCACCUACCUUGGCC	SD	ouverte	89	-9,2

Figure 45. Oligonucléotides antisens (AON) : caractéristiques et cibles.

Les AONs ont été choisis en fonction de leur cible (représenté en haut) , de l'accessibilité de celle ci et de leur données thermodynamiques

IV Saut d'exon sur cellules foetales

IV-A Mise au point de la transfection

Une première étape de mise au point de la transfection a été réalisée avec un AON marqué à la fluorescéine (AON-Fitc), d'une part pour étudier l'efficacité de la transfection, d'autre part pour vérifier que les AONs avaient bien une localisation nucléaire.

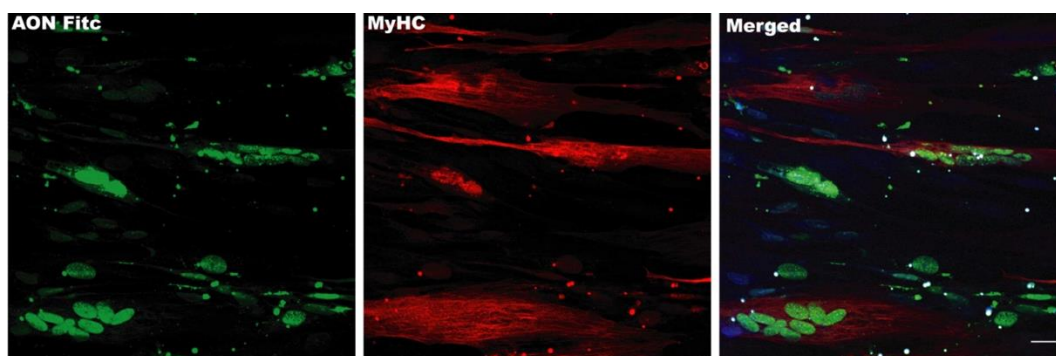


Figure 46. Transfection des myotubes FC par AON Fitc.

Les myotubes sont mis en évidence par le marquage par immunofluorescence indirecte dirigé contre la MyHC (en rouge). Les cellules FC sont transfectées par AON Fitc (en vert). Objectif X40. barre en bas à droite :20µm

Les résultats montrent que les AON-Fitc ont bien une localisation nucléaire, les myotubes présentant un faible niveau de transfection (figure 46). J'ai donc choisi de réaliser une double transfection des oligonucléotides: une première transfection réalisée au stade myoblaste et une deuxième après un jour de différenciation. Ceci permet de transfecter jusqu'à 70 % des cellules.

IV-B Saut d'exon

Après transfection des cellules, j'ai extrait l'ARN total puis j'ai procédé à l'amplification par RT-PCR des transcrits de RyR1 avec seulement 25 cycles de PCR pour réaliser la quantification. La quantification relative des transcrits normaux et aberrants a été réalisée par densitométrie. Ce type de quantification est fréquemment utilisé pour mesurer les modifications d'épissage (Spitali et al. 2010). Cette méthode donne des résultats équivalents à la méthode de référence (digital array) lorsque le nombre de cycle d'amplification reste inférieur à 30. Les résultats sont présentés dans la figure 47a et 47b

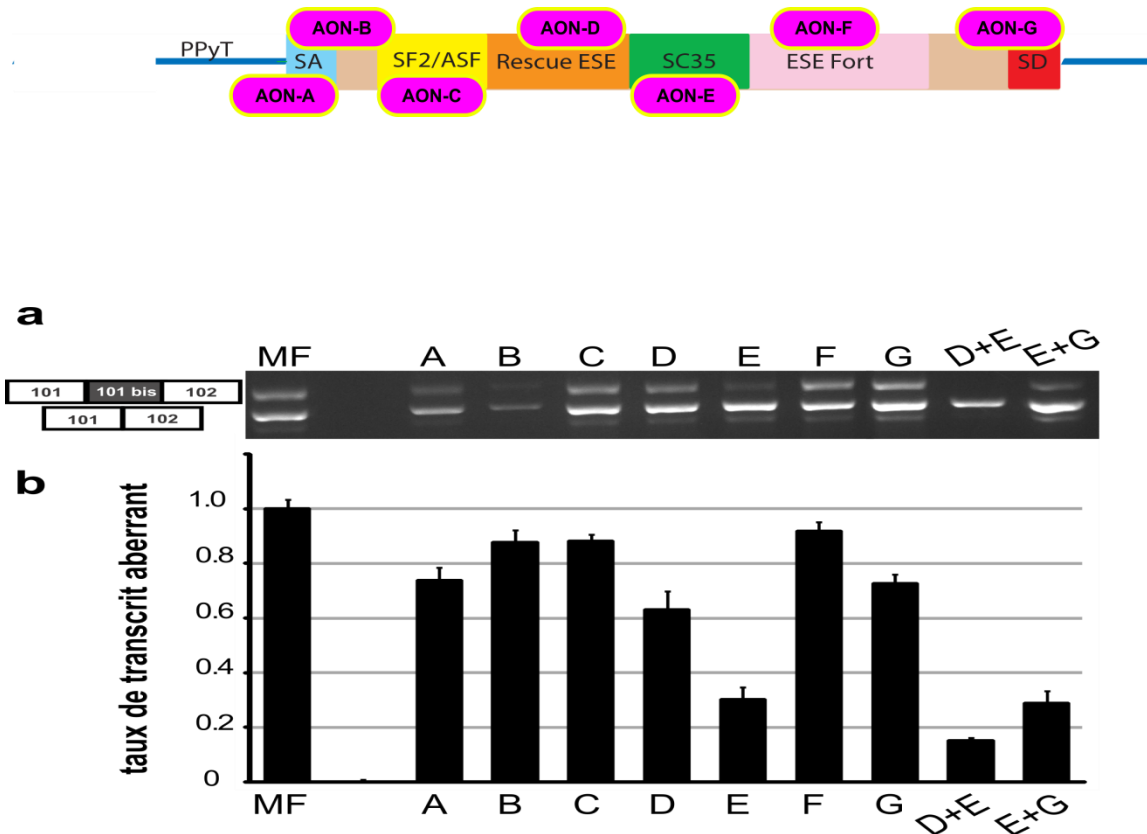


Figure 47. Saut d'exon par AONs

a Saut d'exon. Electrophorèse sur gel d'agarose des amplifiats des ADNc de RyR1. MF : cellules non transfectées. A, B, C, D, E, F, G, D+E, E+G : AON transfectés. Photographie prise à saturation. **b Quantification du saut d'exon par densitométrie.**

Quantité relative de transcrit aberrant, normalisée par rapport aux cellules MF non transfectées. MF : cellules mutées non transfectées. A, B, C, D, E, F, G, D+E, E+G : AON transfectés.

Dans les cellules non transfectées, le taux de transcrit anormal a été fixée à 100% (figure 47). Les AONs B, C et F ne permettent qu'une baisse très modérée du taux de transcrits aberrants par rapport aux cellules non transfectées.

Les quatre oligonucléotides restants présentent en revanche une efficacité non négligeable:

- Pour les AONs A, D et G, le taux de transcrit anormal n'est plus que de 63-75%
- Pour l'AON E, le taux de transcrit anormal n'est plus que de 30%.

Des tests ont alors été réalisés en transfectant les AONs les plus efficaces deux à deux, c'est à dire le couple AON D+E et le couple AON E+G. Le couple D+E permet une baisse supérieure aux AONs utilisés seuls. Le transcrit anormal ne représente alors plus que 18%. (figure 47)

Ce couple ciblant des régions riches en « Rescue ESE » et en ESE SC35 permet une chute drastique du transcrit aberrant, le faisant quasiment disparaître.

V Restauration par lentivirus U7 modifié

Ayant réussi à faire chuter l'expression des transcrits anormaux dans les cellules mutées, l'étape suivante est de vérifier que cette chute s'accompagne d'une expression du transcrit physiologique permettant de restaurer le taux de la protéine RyR1. Deux problèmes se dressent pour cette mise en évidence du retour à un taux physiologique de la protéine.

Le premier problème est lié à la détection de la protéine RyR1 dans les cellules foetales après mise en différenciation de celles-ci. La méthode de référence pour évaluer la quantité de RyR1 sur biopsies de patients est le Western Blot. Cette

technique donne de très bons résultats sur les biopsies musculaires, mais n'a pas produit les résultats escomptés sur les cellules foetales. En effet, les myotubes qui correspondent au premier stade de différenciation, contiennent beaucoup moins de protéine RyR1 que les fibres musculaires parfaitement différenciées. De plus, les cultures ne sont pas toujours assez riches en myotubes. Afin de remédier à ce problème de détection, j'ai mis point une méthode de quantification du signal par immunofluorescence.

Le deuxième problème concerne les AONs. En effet, un inconvénient majeur des AONs 2-O'-méthyl ARN avec squelette phosphorothioate est leur toxicité. Cette « chimie » de l'oligonucléotide permet de bons taux de transfection, idéales pour mettre en évidence le saut d'exon au niveau de l'ARNm, mais sa toxicité sur le long terme est un frein pour la mise en évidence du saut d'exon au niveau protéique puisque les cellules meurent. La transfection induit un stress cellulaire non négligeable de part la quantité d'AONs utilisée et de part la structure des AONs.

Pour pallier à ce problème, l'utilisation de lentivirus exprimant la cassette U7 snRNA a été envisagée. Je suis allé me former à l'Institut de Myologie dans l'équipe de Luis Garcia pour produire le plasmide pRRL dans lequel j'ai cloné la cassette U7 snRNA dirigé contre la séquence ciblé par les AONs D et E ciblaient : ces deux séquences étant contigues (séparé de deux nucléotides). L'antisens à intégrer a été choisi pour que le « Kiss » puisse se faire. L'appariement de la boucle en épingle à cheveu à 4 nucléotides de la séquence antisense serait un facteur clé pour obtenir une efficacité de saut d'exon importante.

La production virale a été réalisée par le Généthon pour le virus U7 ctrl et le virus U7_D+E

J'ai amplifié les cellules après transduction des myoblastes mutés par le virus U7 D+E ou par le virus contrôle. Une fois à confluence, les cellules ont été mises en différenciation. Les études sur l'ARN ont été réalisées à 4 jours post différenciation. Le même type de quantification par densitométrie a été réalisé.

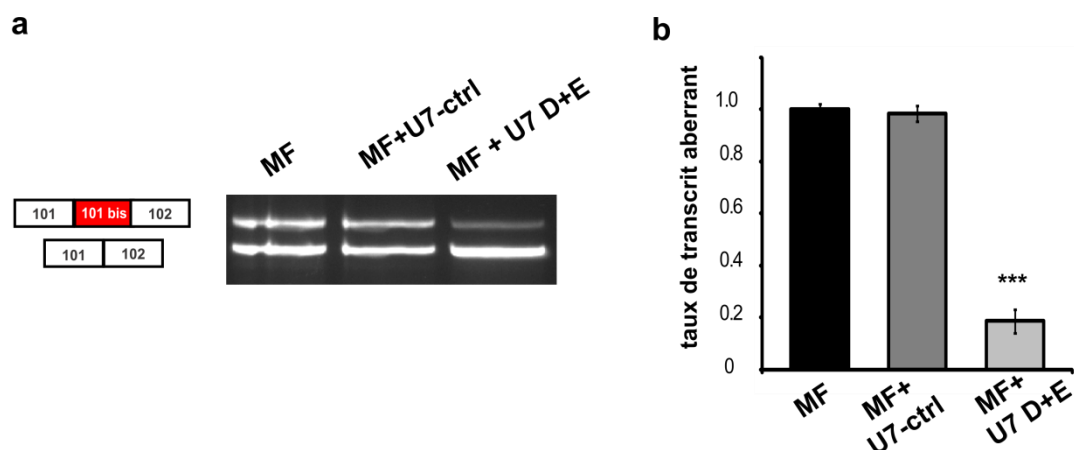


Figure 48 Mise en évidence du saut d'exon au niveau ARN

a Electrophorégramme des amplifiats des cDNA de RYR1. Des cellules non transduites (MF), transduites par le virus U7_Ctrl et par le virus U7 D+E

b quantification de l'effet des virus sur le transcrit aberrant. Les valeurs représentées sont des moyennes (+/- sem) de 4 expériences différentes. ANOVA et test de Student *** $p < 0,001$ entre MF+ U7D+E et les cellules Muté MF et MF+U7-ctrl

On peut voir que la transduction des cellules par le virus exprimant la cassette U7 smopt snRNA permet une diminution significative de l'expression du transcrit aberrant. Le virus contrôle ne modifie pas l'épissage de la mutation.

Restauration Protéique.

Comme rappelé précédemment, il n'est pas possible de réaliser un Western blot sur ces cellules foetales. Pour la quantification protéique, nous avons choisi une quantification par immunofluorescence. Ce type de quantification permet d'estimer le rapport de fluorescence entre deux fluorophores. Les prises d'images ayant été réalisées dans les mêmes conditions, les images pouvaient être comparées entre elles. La quantité de RyR1 a été estimée par rapport à la quantité de Myosine.

On peut observer que les cellules contrôles (FC) ont un rapport de fluorescence supérieur aux cellules mutés et aux cellules mutées transduites par le virus contrôle. Le virus U7 D+E permet de restaurer une expression de RyR1.

Ce type de quantification ne permet pas d'estimer précisément la quantité

de RyR1, la quantification par Immunofluorescence n'est pas assez précise mais a permis de mettre en évidence un effet du saut d'exon sur la quantité de protéine

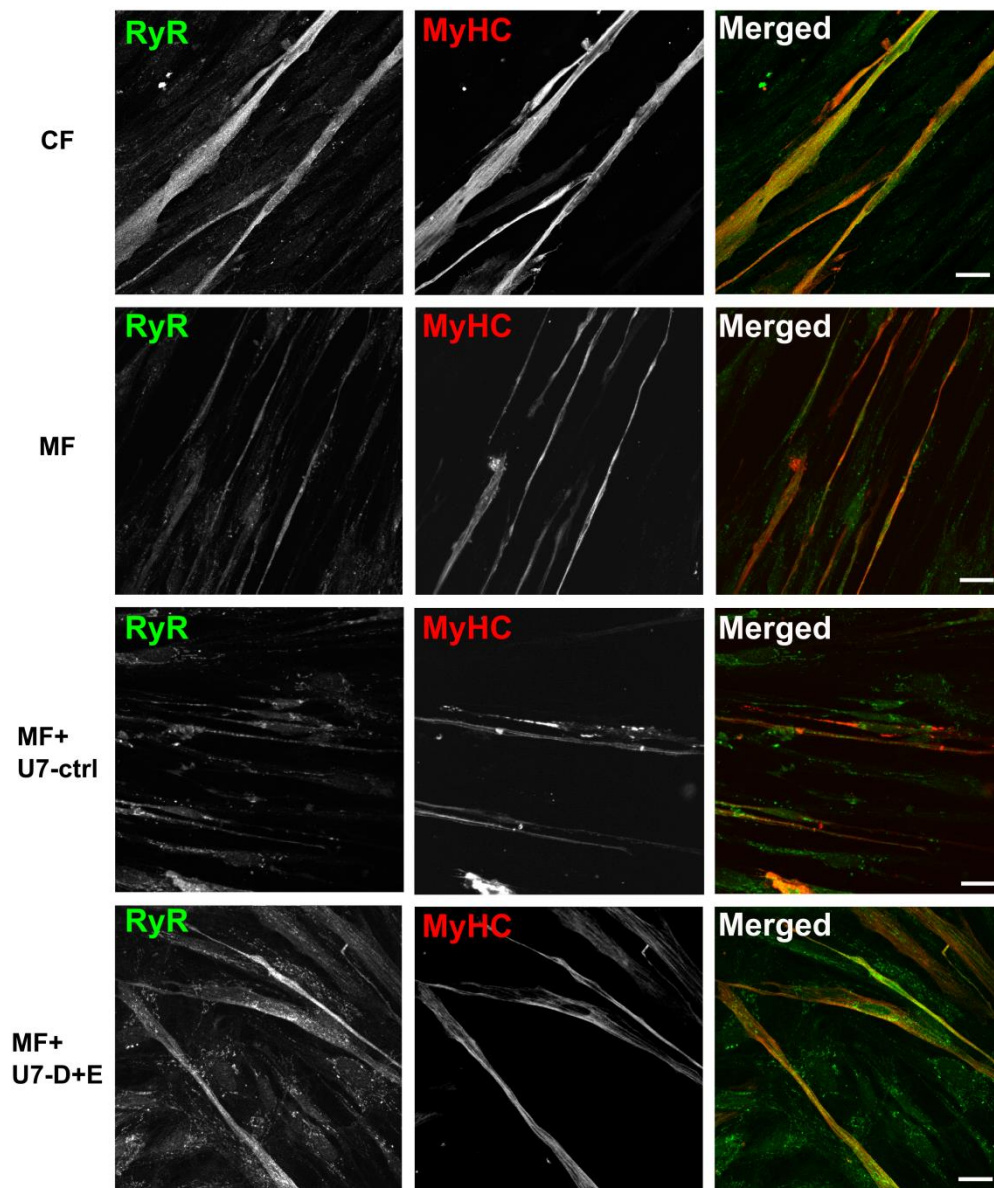


Figure 49 Restauration au niveau protéique et morphologique.

Immunofluorescence avec en vert un anticorps dirigé contre RyR1 et en rouge un anticorps dirigés contre les chaînes lourde de Myosine. Barre = 20µm

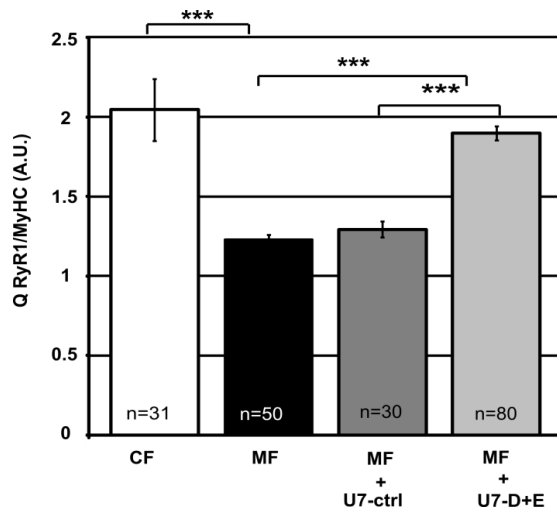


Figure 50 Quantification de la protéine RyR1 par rapport à la myosine.

ANOVA et test de Student test *** $p < 0,001$ n= le nombre de myotubes comptés par condition sont inscrit dans les barres du graphique

Morphologie.

Une différence morphologique est présente entre les différents myotubes. : les myotubes des cellules FC paraissent plus larges que les myotubes MC (figure 49 et 51), ce qui a été quantifié par la mesure de la largeur des myotubes. Une différence de largeur après saut d'exon a été observée, les myotubes transduits par le virus U7-D+E sont plus larges que les myotubes transduits par le virus U7-ctrl. La restauration de RyR1 s'accompagne d'une augmentation de la largeur des myotubes.

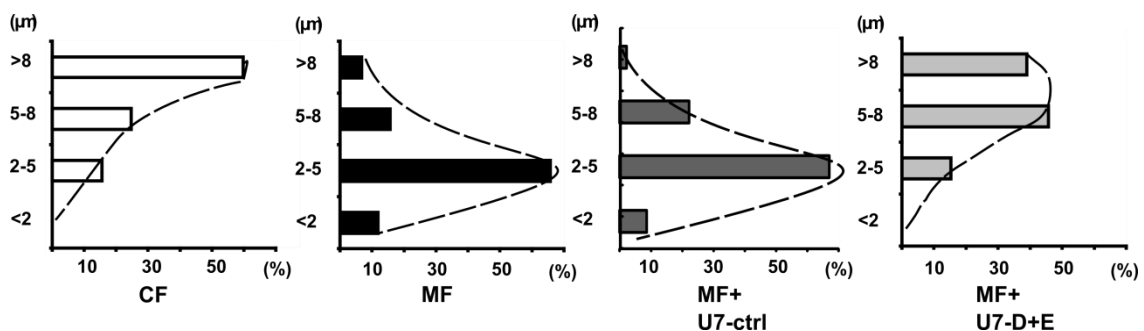


Figure 51 Histogramme des répartitions des largeurs des myotubes

les myotubes sont classés en 4 populations de tailles différentes.

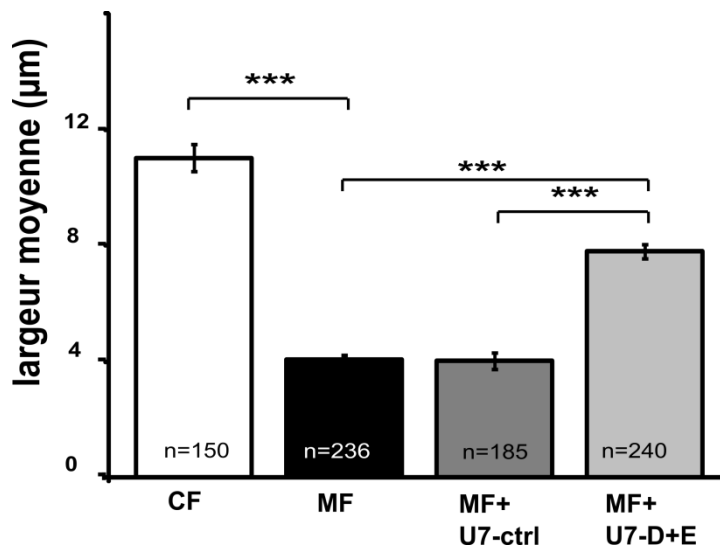


Figure 52 Largeur moyenne des myotubes (+/-sem)

Test de Student *** $p < 0,001$ n= le nombre de myotubes comptés par condition sont inscrit dans les barres du graphique

Retour de la fonctionnalité

Le récepteur de la ryanodine étant un canal calcique, il est possible d'étudier sa fonctionnalité par suivi des relachements de calcium grâce à la sonde calcique. Pour permettre l'ouverture du canal deux méthodes de stimulation ont été testées :

- La première est l'utilisation du 4-chloro-m-crésol (CmC). Cette drogue est un agoniste spécifique de RyR1. Son utilisation permet d'étudier la stimulation directe du canal calcique.
- La deuxième stimulation utilisée est une solution de Chlorure de potassium (KCl) 140mM. Le KCl à ce dosage permet de mimer une dépolarisation membranaire à 0 mV et ainsi de stimuler le DHPR qui activera le récepteur de la ryanodine (qui lui est physiquement couplé). Cette approche permet de tester le couplage excitation- relargage de calcium (et par extrapolation le couplage excitation contraction)

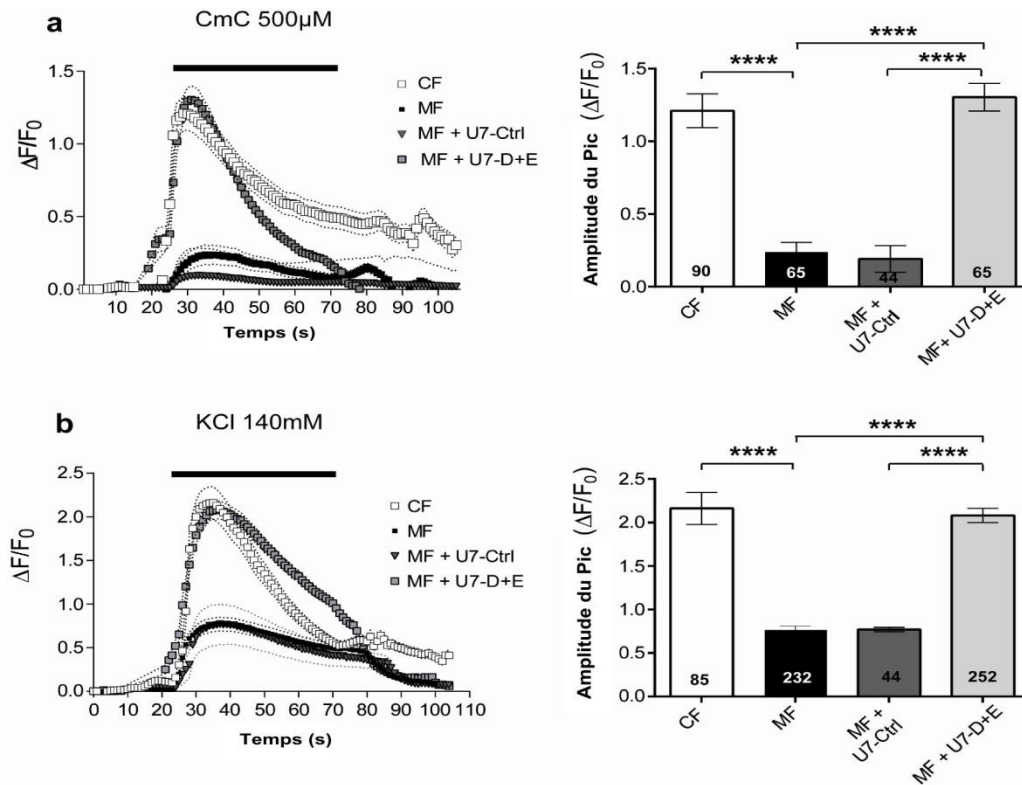


Figure 53. Restauration de la fonctionnalité par imagerie calcique

a) stimulation des cellules par du 4 Chloro-m-crésol(CmC) b) Stimulation par une solution de KCl. Le nombre de myotiques mesurés est inscrit dans chaque graphique. L'amplitude maximale est représentée dans le graphique. Le nombre de myotube est indiqué dans chaque barre du graphique.**** ANOVA suivi d'un test de Student ($p < 0,0001$)

L'utilisation de ces deux stimulations sur les cellules mutées permet de mettre en évidence une baisse de relâchement du calcium par rapport aux cellules FC pour l'activation avec le CmC et avec KCl. Il n'y a pas de différence entre les cellules MC et les cellules MC transduites par les virus U7 CTRL. Les expériences d'imagerie calcique avec les cellules transduites par le virus U7_D+E permettent de montrer un retour de la fonctionnalité du canal aussi bien après une stimulation du canal par le CmC que par une dépolarisation membranaire. Les cellules traitées par le virus U7 D+E présentent un canal RYR1 fonctionnel. Il n'y a pas de différence significative entre les cellules contrôle FC et les transduites U7 D+E.

Discussion et Perspectives

autour du projet RYR1

Cette étude constitue la première démonstration d'une restauration fonctionnelle après saut d'exon. C'est également la première étude de thérapie génique pour RyR1. La correction par saut d'exon de la mutation c.14646+2563C>T réalisée dans ce projet a permis pour la première fois pour une myopathie congénitale une restauration de la physiologie. De plus les thérapies de remplacement sont impossibles pour le récepteur de ryanodine étant donné sa taille. Cet essai est le premier s'intéressant à ce récepteur. Ce projet est centré sur une mutation intronique profonde non récurrente mais qui est présente dans toute une famille (au moins 7 personnes recensées). Cette mutation dominante induit une baisse importante de la quantité de RyR1 malgré une expressivité incomplète comme nous avons pu le voir sur l'étude minigène. L'étude a permis de montrer un épissage non total, avec deux transcrits différents: un sain et un comportant l'inclusion du pseudo exon. À la vue de la baisse protéique et du caractère non total de l'épissage, cette mutation a un effet dominant négatif. Le récepteur de la ryanodine étant un tétramère, une molécule mutée pourra déstabiliser le tétramère et provoquer sa dégradation.

J'ai pu aussi mettre en évidence un changement de la largeur des myotubes avec la mutation du projet RyR1. Pourquoi cette mutation induit-elle une fibre plus fine ? Y a-t-il d'autres mutations à l'origine d'un changement de morphologie ? Le couplage excitation contraction est peut être important pour la différenciation des myotubes. L'étude du Dr F. Pietri Rouxel et al. (Piétri-Rouxel et al. 2010) avait montré qu'un modèle murin déplété dans une sous unité du DHPR (la sous unité alpha-1S) était à l'origine d'une diminution du diamètre des fibres musculaires dans les animaux étudiés. La modification de l'homéostasie calcique pourrait bien modifier la transcription de certains gènes de la différenciation cellulaire.

Poursuite du projet

Nous avons pu obtenir récemment des myoblastes du cas index familial (Myobank). Je vais poursuivre l'étude sur ces cellules pour vérifier que le saut d'exon est possible directement sur les cellules du patient et restaure une activité équivalente à l'essai sur les cellules fœtales. Il serait également intéressant de poursuivre l'étude sur les enfants symptomatiques III-3 et III-4 (figure 54) :

- en séquençant la totalité des transcrits de RyR1 chez ces patients. Ce séquençage permettra d'établir si ces patients ont ou non une mutation supplémentaire qui expliquerait le phénotype plus sévère comparé à la génération précédente.

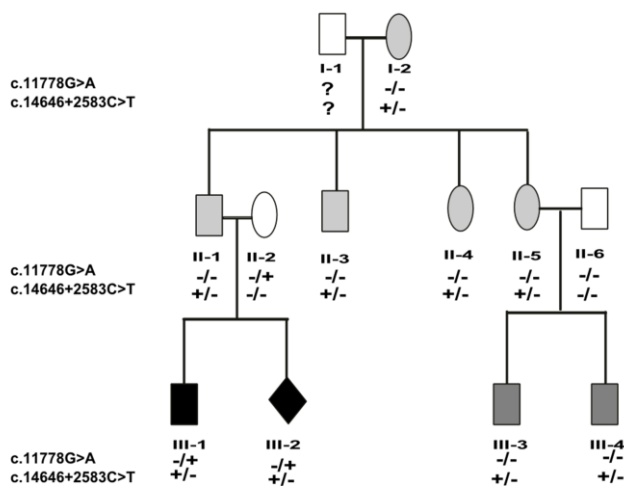


Figure 54 Généalogie de la famille étudiée.

Cousins symptomatique sIII-3 et III-4. Ces patients ont une myopathie plus sévère qu'à la génération précédente

- en caractérisant les cellules musculaires de ces patients

Ces informations nous permettront de peut-être développer une approche thérapeutique par AONs ou vecteurs viraux U7 pour plusieurs membres de cette famille.

Une question importante reste : est ce que la thérapie génique par

chirurgie des ARNm est applicable pour les myopathies congénitales dues aux mutations dans le gène RYR1?

Les premiers essais sur d'autres pathologies musculaires, comme la myopathie de Duchenne montrent que la thérapie génique est envisageable pour le muscle. Les tests AONs et U7 ont montré des résultats très encourageants avec une restauration de l'expression protéique et une amélioration du phénotype dans les modèles canins et dans les biopsies musculaires des patients. Le muscle peut donc être cibler par ces thérapies de saut d'exon.

Quel est le type de thérapie qui pourrait s'appliquer aux pathologies liées aux mutations dans RyR1 ?

Les thérapies par remplacement de gène étant pour l'instant impossible pour le gène RYR1 du fait de sa taille, peu d'alternatives sont possibles :

- Correction des mutations par le saut des pseudos exons

Quelques mutations introniques profondes ont été recensées au laboratoire. Toutes ces mutations sont privées. Il est possible de réaliser des études comme celle réalisé ici. Mais le développement d'une thérapie pour chaque mutation se révèle à l'heure actuelle limité par lourdeur des expérimentations, les démarches à réaliser et le cout engendré pour la mise en place de thérapie pour chacune de ces variations, même efficace. L'ère des thérapies personnalisées se rapprochant de plus en plus il sera possible d'envisager la correction de ce type de mutation.

- Saut des exons porteurs de mutation.

Une autre approche du saut d'exon pourrait être intéressante pour les myopathies liées à RyR1. On peut imaginer essayer d'induire un saut des exons porteurs de mutation et produire un "mini-RyR1". La protéine étant très grande peut être que tous les domaines de la protéine ne sont pas nécessaires au fonctionnement de la protéine. Un fonctionnement partiel pourrait être suffisant. S'il existe de telles régions, induire un saut de ces régions chez des patients pourrait permettre une amélioration de leur pathologie.

- Le trans épissage.

Le trans épissage serait peut être une des alternatives les plus polyvalentes pour la thérapie génique. Son utilisation pour les myopathies liées aux mutations dans RYR1 aurait tout son sens pour les myopathies à cores centraux. En effet, 85 à 90 % des patients ont des mutations situées dans la partie terminale du gène codant pour les fragments transmembranaires de la protéine. Donc une seule molécule de trans épissage permettrait de traiter la plupart de ces myopathes. Mais les approches de thérapie génique par trans épissage restent encore très difficiles à mettre en place. Il y a un travail important d'optimisation à réaliser pour le rendre plus efficace, moins toxique...

Mon travail à venir au sein de l'équipe sera de tester et mettre en place ces différentes thérapies.

Projet n°2

Thérapie génique par saut d'exon appliquée au syndrome de Lowe

Présentation du cas OCRL

En 2009, une étude moléculaire du gène *OCRL* me fut demandée par un médecin anglais pour un patient. Celui-ci présentait une cataracte congénitale bilatérale, une atteinte rénale, un retard de croissance et de développement psychomoteur. Il était traité par dialyse péritonéale. Après séquençage des exons et des bornes introniques du gène, aucune mutation ne fut identifiée. Nous avons alors demandé un prélèvement cutané du patient afin de réaliser une étude des transcrits du gène *OCRL* exprimé par les fibroblastes cutanés. La mutation c.238+4701 G>A fut alors mise en évidence (Hichri et al. 2011).

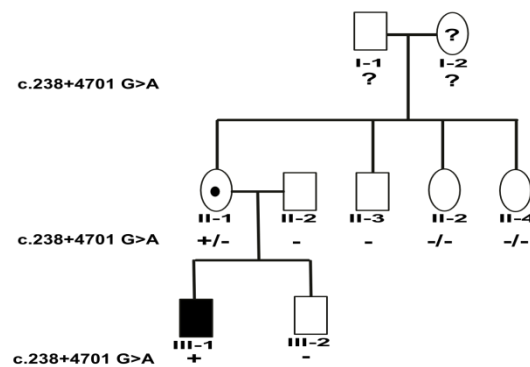


Figure 55 Généalogie de la famille étudiée. Le cas index est le III-1. la mère II-1 est porteuse de la mutation. Elle est conductrice

Concernant la famille (figure 55), la recherche de la mutation permet de définir le statut de la mère du cas index II-1. Elle est conductrice de la maladie. La mutation n'a pas été retrouvée dans le reste de sa fratrie. Le génotype de la grand mère n'a pas pu être réalisé, il est donc pour l'instant impossible de savoir si la mutation est survenue ou non chez II-1. L'impact de cette mutation au niveau épidémiologique reste faible : le laboratoire ayant un recrutement important, ce fut la première fois que nous avons mis en évidence cette mutation. Celle-ci est d'ailleurs inconnue des bases de données. La mutation est à l'origine d'une modification d'épissage équivalente à celle retrouvée

dans le premier projet. Ayant développé les technologies de saut d'exon d, j'ai utilisé la même approche que pour le premier projet en partant de l'hypothèse qu'un saut de l'exon supplémentaire de OCRL permettrait de corriger la pathologie dans cellule en culture du patient.

Résultats, Discussion

I Etude de la mutation

La mutation mise en évidence chez le patient est située dans l'intron 4 du gène OCRL et l'étude des transcrits met en évidence l'exonisation d'un fragment de 66 nucléotides dans la séquence du transcrit OCRL. La mutation générée aurait une expressivité totale puisque nous ne retrouvons pas de transcrit « sain » dans les fibroblastes du patient.

I-A Etude bio informatique

La séquence du pseudo exon est étudiée par bioinformatique. La séquence comportant la mutation est reconnue comme un site donneur fort. La force du site passe de 73,2 à 100 avec la mutation, c'est à dire que le site devient équivalent au site donneur d'un exon constitutif. Par comparaison, la force du site donneur de l'exon 4 est de 82,6.

66 nucléotides en amont de la mutation, il existe un site accepteur à un niveau basal fort (84,3), c'est un site accepteur cryptique (figure 56).

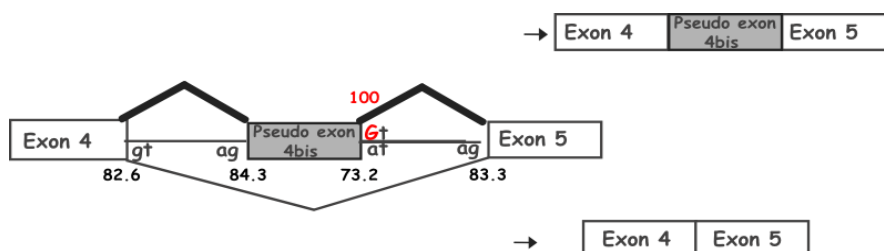


Figure 56. Schéma d'une partie du gène OCRL montrant l'inclusion du pseudoexon retrouvé chez le patient.

Les scores d'épissage sont indiqués à côté des sites donneurs et accepteurs d'épissage. La mutation c.238+4701 A>G est indiquée en rouge

Ainsi, il semble que la mutation crée un site donneur, ce qui active en amont le site accepteur. Ceci pourrait expliquer en partie la sélection d'un pseudo exon,

le pseudo exon 4bis, par la machinerie d'épissage.

Des séquences ESE sont retrouvées tout au long de la séquence du pseudo exon 4 bis. On peut trouver (figure 57) :

- un domaine avec un nombre important de séquences Rescue ESE
- une région portant une séquence SC35 forte
- une région ayant des séquences SRp40 fortes



Figure 57. Schéma représentant le pseudo exon et les différentes séquences d'épissage retrouvées par bio informatique.

PPyT correspond à la région riche en pyrimidine, SA et SD sont les sites accepteur (SA) et donneur (SD). La séquence est composée de site ESE (Rescue ESE en orange, SC35 en vert et SRp40 en rouge)

Comme pour le premier projet, on ne retrouve pas dans la séquence du pseudo exon de séquence inhibitrice de type hnRNPA1. On en retrouve autour du pseudoexon.

Ces séquences sont en faveur de l'exonisation de ce pseudoexon. Toutes ces informations, les forces des sites consensus, d'une région riche en pyrimidine, le nombre de séquences ESE promouvant l'inclusion de l'exon et l'absence de région inhibitrice dans le pseudo exon permettent de prédire l'inclusion des 66 nucléotides dans les transcrits.

I-B Etude des transcrits

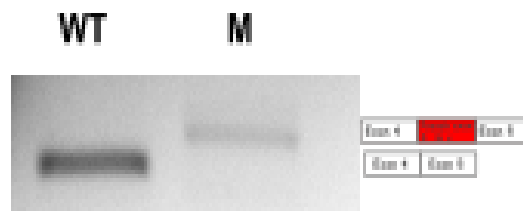
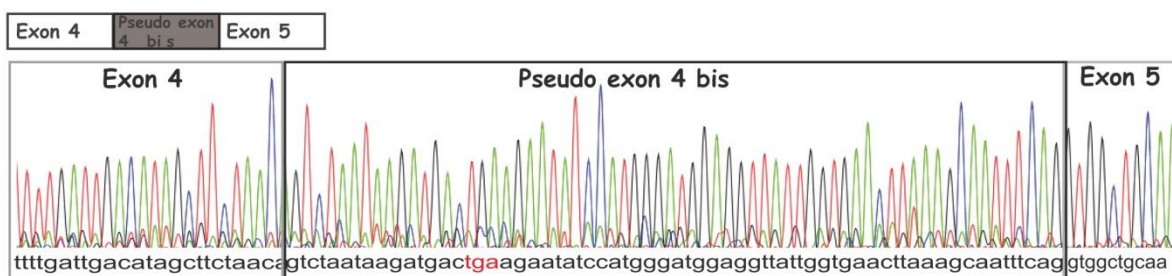


Figure 58 Electrophérogramme des amplifiats des transcrits du gène OCRL après retrotranscription.

WT : cellule témoin et M : cellule du patient muté.

La portion exonisée garde la phase de lecture, étant un multiple de 3, mais la quantité d'amplifiats présente après RT PCR paraît plus faible que celle des transcrits du témoin contrôle. Après étude de la séquence, on peut voir un codon stop au bout de 16 nucléotides nous orientant vers un effet de « non sense mediated mRNA Decay »(figure 58 et figure 59) .

a



b

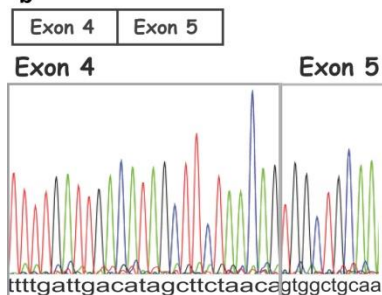


Figure 59 Séquençage des transcrits d' OCRL.

a séquençage des transcrits mutés du patient avec inclusion du pseudo exon. Le codon stop est indiqué en rouge. *b* séquençage des transcrits du témoin avec un enchainement normal des exons 4 et 5

I-C Etude protéique

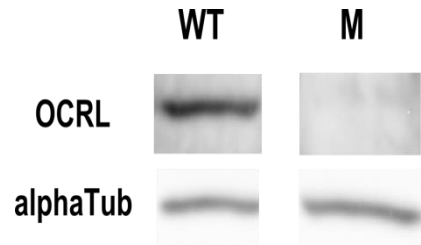


Figure 6o Quantification de la protéine OCRL par Western Blot.

L'alpha tubuline est un marqueur de dépôt. Les cellules mutées (M) expriment beaucoup moins d'OCRL que les cellule WT. La mutation induit une baisse important de protéine.

Après étude de la quantité de protéine OCRL produite dans les fibroblastes du patient et du témoin, on peut remarquer que la quantité de protéine se trouve diminuée chez le patient, la diminution de protéine validant la mutation (figure 6o).

II Choix des AONs et transfection

L'expérience du premier projet quant au choix des AONs m'a permis de dessiner 3 AONs. Les critères de sélection étaient d'utiliser des 2omères.

Les 2omères dessinés étaient des 2'O methylRNA avec un squelette ayant pour liaisons des phosphorothioates. Les oligoribonucléotides devaient cibler des zones ayant des ESEs fort et RESCUE ESE ceux ci devaient être situés dans des régions ouvertes (mFOLD), avec une enthalpie libre de liaison Duplex AON pré-ARNm la plus négative possible.

Le choix s'est donc porté sur les oligonucléotides suivants (figure 61):

- AON-1, dirigé contre une séquence Rescue ESE (séquence fermée)
- AON-2, dirigé contre une séquence SC35 (séquence ouverte)
- AON-3 dirigé contre une séquence SRp40 et le Site Donneur (séquence ouverte)



AON	sequence (5'>3')	cible	accessibilité de la cible	Tm (°C)	ΔG duplex
1	AUAUUCUUCAGUCAUCUUUAU	RESCUE ESE	fermée	72,2	-26,9
2	AAGUUCACCAAUAACCUCCA	ESE (SC35)	ouverte	82,7	-32,7
3	CACUACUUACCUGAAAUUGC	SD	ouverte	80	-31,5

Figure 61 Présentation et caractéristiques des oligonucléotides.

Transfection des AONs

Les cellules ont été transfectées avec le mélange EXGEN-AON. Après 48h d'incubation, les cellules sont récoltées puis lysées dans du Trizol. Après extraction d'ARNm et retro transcription, les cDNAs sont amplifiés.

Tous les AONs (figure 62) montrent une efficacité pour induire le saut du pseudo exon. Les AONs les plus efficaces sont l'AON 2 et 3, tous deux ciblent une région ouverte. Les transcrits n'étant que faiblement exprimés un grand nombre de cycles pour l'amplification fut réalisé, les valeurs de quantification par densitométrie (inscrite sous la figure 62) ne peuvent donc être qu'approximatives.

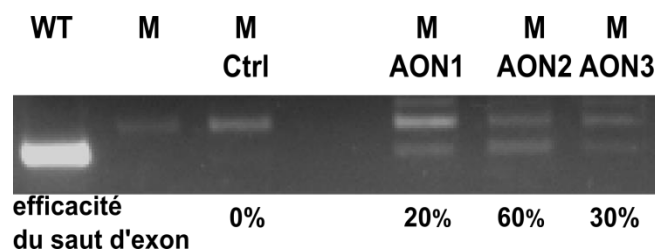


Figure 62: Electrophorèse des amplifiats de cDNA d'OCRL après transfection des AONs

Les amplifiats ont été déposés sur un gel à 2 % d'agarose . WT : les cellules contrôles, M les cellules Mutés non transduites, M U7_CTRL et M U7_SKIP les cellules mutés transduites par les virus contrôle et permettant le saut d'exon. L'effet des AONs a été estimé par densitométrie. Il est représenté ici par un pourcentage du transcrit normal par rapport au transcrits mutés.

III Saut d'exon par lentivirus U7

La transfection par phosphorotioate étant toxique pour les cellules, il m'était impossible de continuer ce projet vu la quantité importante de cellules nécessaires pour réaliser l'étude protéique et fonctionnelle. C'est pourquoi j'ai développé la même approche que pour le premier projet : des lentivirus U7 exprimant la séquence oligonucléotide efficace. La séquence efficace est celle de l'AON 2. Pour ce projet les virus ont été réalisés au laboratoire.

Après transduction virale et RT PCR on observe une quasi disparition du transcrit aberrant avec le Virus U7_SKIP. Le virus U7_CTRL n'a aucun effet sur l'épissage du pseudo exon (figure63).

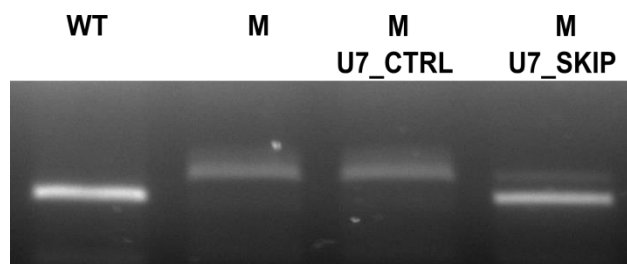


Figure 63 Electrophorèse des amplifiats de cDNA d'OCRL après transduction des cellules

Les amplifiats ont été déposés sur un gel à 1,5 % d'agarose. WT : cellules contrôles, M cellules Mutées non transduites, M U7_CTRL et M U7_SKIP cellules mutées transduites par les virus contrôle et permettant le saut d'exon

Les transcrits n'étant que faiblement exprimés dans les fibroblastes, il était impossible de les quantifier par densitométrie. Je me suis donc orienté vers une technique plus sensible et plus spécifique : la RT MLPA. La RT MLPA est une technique multiplex, il est donc possible de quantifier plusieurs transcrits différents dans la même tube. De plus, la technique de MLPA permet de quantifier de très faible quantité de d'ADN. La troisième raison à ce choix fut la facilité d'utilisation de cette technique facilement applicable au laboratoire de diagnostic.

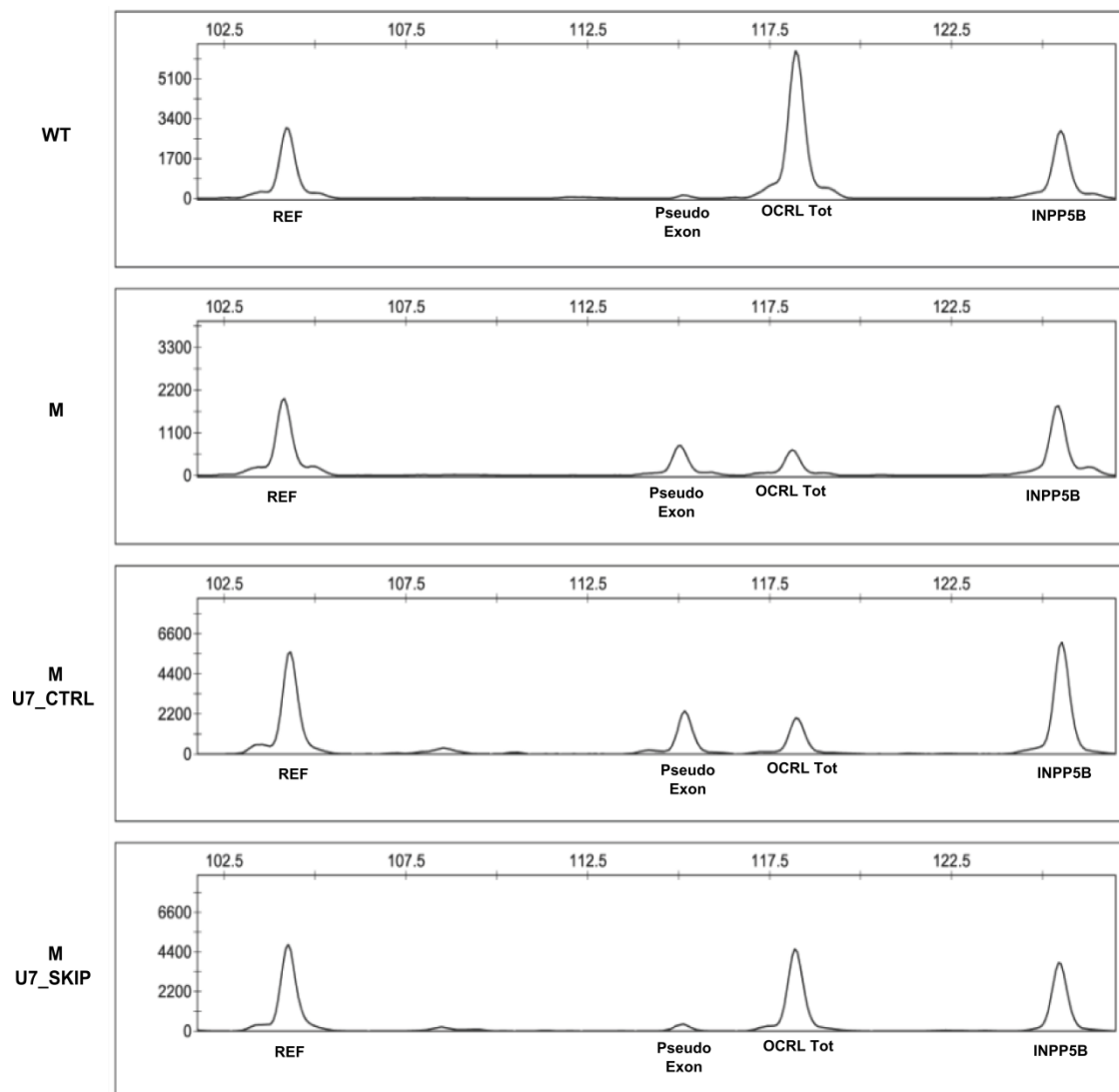


Figure 64 RT MPLA. Electrophérogramme des MLPAs réalisées après rétrotranscription.

Le premier pic indique (REF) quantifie un gène de référence. Le deuxième pic (Pseudo Exon) quantifie les transcrits d' OCRL portant le pseudo exonisation. Le troisième pic (OCRL Tot) quantifie les transcrits d'OCRL portant le pseudo exon ou les transcrits normaux. Le quatrième pic (INPP5B) quantifie les transcrits du gène *INPP5B*.

Dans le mix de sonde, j'ai choisi de mettre en premier un couple permettant de quantifier un gène de référence, suivi d'un couple permettant la quantification du transcrit aberrant, un autre couple situé sur les jonctions des exons 22-23 permettant la quantification des transcrits totaux d'OCRL et enfin un couple de sondes dirigé contre *INPP5B*.

Les taux de transcrit aberrant sont négligeables pour les cellules WT (figure 64), on peut voir un très faible pic qui doit être dû à un léger bruit de fond. Le couple de sonde mesurant la quantité total d'OCRL montre une diminution de la quantité d'OCRL dans les cellules mutées. Cette information nous permet d'extrapoler la présence d'un NMD (figure65).

Les cellules mutées et les cellules mutées transduites par le U7 CTRL ne révèlent aucune différence significative.

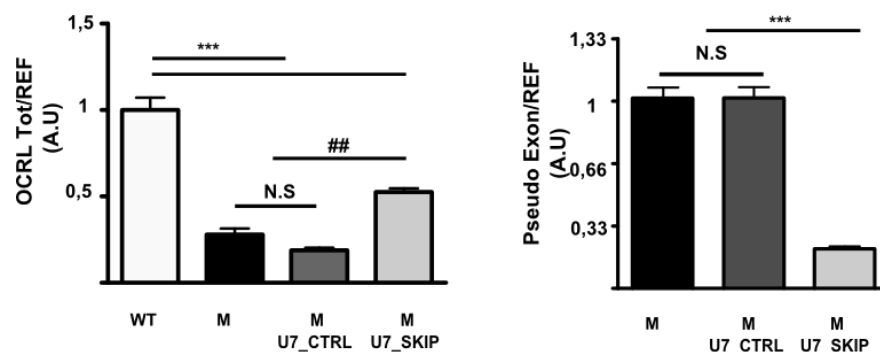


Figure 65 Quantification par RT MLPA

à gauche, quantification des transcrits totaux d'OCRL. ANOVA suivi d'un test de Student *** $p < 0,001$ ## $p < 0,01$; N.S différences non significatives .

à droite, quantification des transcrits porteurs du pseudo exon. ANOVA suivi d'un test de Student *** $p < 0,001$; N.S différences non significatives Résultat de 4 expériences indépendantes

Pour finir les cellules transduites par le virus U7_SKIP, ont des transcrits totaux d'OCRL qui sont supérieurs aux cellules transduites par le virus contrôle. De plus la quantité de transcrits aberrants est diminuée dans les cellules exprimant la cassette U7smOPT_SKIP. Ce qui permet de conclure que le saut d'exon permet la baisse du transcrit aberrant et de plus permet de diminuer le NMD, puisque les transcrits totaux sont augmentés. Cependant même si le saut d'exon est quasiment total, on ne peut obtenir une quantité de transcrit équivalente à celle du WT : le NMD se déroule en même temps que l'épissage. Ce phénomène est important quant à la réflexion sur une correction génique par modulation d'épissage. Si le NMD est trop important, il sera difficile de permettre une restauration.

Le dernier couple de sonde utilisé permet de quantifier les transcrits d'INPP5B. INPP5B est une phosphatase qui est très proche d'OCRL. Un certain nombre d'hypothèses ont été émises sur son rôle pour compenser une diminution d'OCRL (Luo et al. 2013).

Dans les expériences réalisées on peut observer qu'il n'y a pas de différence significative entre tous les points de quantification d'INPP5B. Ceci nous permet d'avoir un autre gène contrôle et de montrer qu'INPP5B ne varie pas dans nos modèles cellulaires et donc ne compense pas la perte d'OCRL (figure 66)

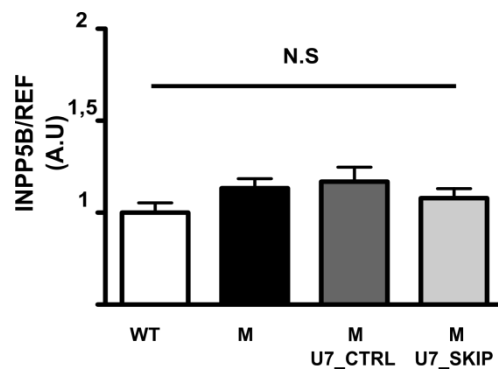


Figure 66 Expression des transcrits d'INPP5B mesurés par RT MLPA.

ANOVA suivi d'un test de Student N.S différences non significatives entre toutes les cellules.

Résultat de 4 expériences indépendantes

Restauration protéique

Le saut d'exon ayant été mis en évidence au niveau ARN, il fallait évaluer la restauration au niveau protéique, si la restauration ARNm permettrait un retour protéique.

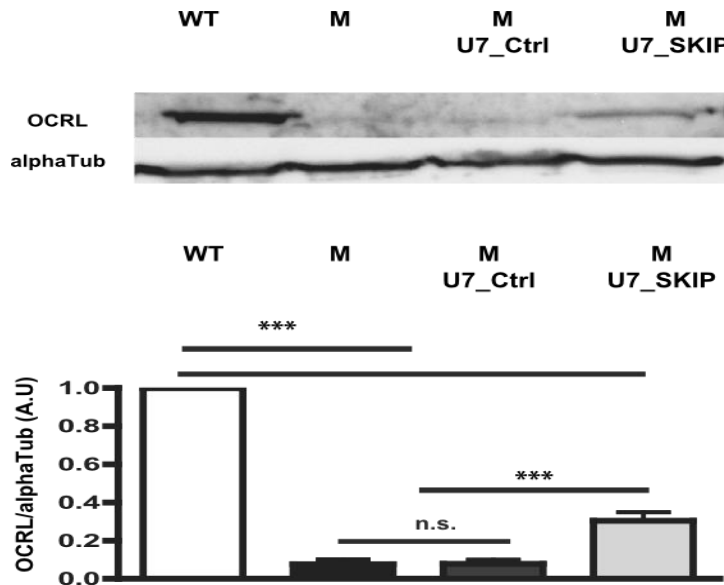


Figure 67 Quantification protéique par western blot.

La quantification est réalisée par évaluation du rapport OCRL/ alpha Tubuline. Avec WT : cellules controles, M cellules Mutés non transduites, M U7_CTRL et M U7_SKIP cellules mutés transduites par les virus contrôle et permettant le saut d'exon. Représentant les moyennes (+/- sem) d'au moins 4 expériences différentes. NS : différence non significative. ANOVA suivi d'un test de Student *** $p < 0,001$ e Résultat de 4 expériences indépendantes

La quantification d'OCRL réalisée par western Blot (figure 67) montre une baisse importante de la quantité de protéine pour les cellules mutées et les cellules mutées transduites. Ces deux groupes ne semblent pas significativement différents. Les cellules transduites par le virus U7_SKIP expriment une plus grande quantité d'OCRL. L'effet de saut d'exon permet de mettre en évidence un retour de l'expression protéique de 30%.

Mesure de l'activité

Le test utilisé jusqu'à présent au laboratoire pour mesurer l'activité enzymatique d'OCRL était réalisé avec du Ptd Ins(4,5)P₂ marqué au tritium. Le circuit des substances radioactives dans le service hospitalier est devenu particulièrement compliqué et lourd tant d'un point de vue pratique qu'administratif. De plus le coût de l'analyse et le besoin de cellule (3 T175) par point de manipulation, nous a conduit à arrêter cette analyse.

La mesure de l'activité enzymatique reste encore la technique de référence pour mettre en évidence un défaut dans le gène OCRL. Il est donc nécessaire de développer une technique permettant de réaliser cette mesure. Pour ce faire, en collaboration avec le laboratoire du Pr Payrastre sur Toulouse, j'ai mis au point une Immuno Précipitation de la protéine OCRL issue de la lyse ménagée de cellules du patient en culture, grâce à l'anticorps anti OCRL développé au laboratoire. Les immuno précipitats ont été envoyés au laboratoire du Pr Payrastre pour la mesure de l'activité avec phosphoinositide fluorescent.

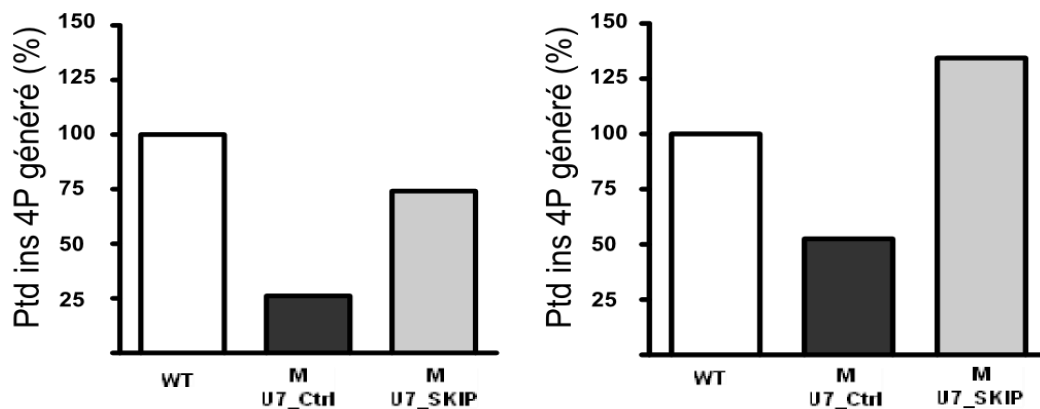


Figure 68. Restauration de l'activité enzymatique

Mesure de l'hydrolyse de Ptd Ins (4,5) P₂ en Ptd Ins 4P. Résultat de deux expériences indépendantes.

Les tests réalisés au laboratoire du Pr Payrastre permettent de mettre en évidence un retour de l'activité enzymatique dans les cellules transduites exprimant la cassette U7_SKIP.

Mesure de la ciliogénèse

Un certain nombre de tests cellulaires sont possibles pour mettre en évidence l'activité d'OCRL, dont le transport de la mégaline dans la cellule, la vitesse de pousse des cellules, la migration cellulaire... Coon et al.(Coon et al. 2012) ont mis en évidence l'implication d'OCRL dans la ciliogénèse. Par immuno fluorescence en utilisant un anticorps marquant le cil primaire, on peut mesurer ce cil à l'aide d'un microscope confocal. Ce cil primaire ne pousse que lorsque les cellules sont confluentes et déprivées en serum, j'ai choisi de façon arbitraire un temps de déprivation de 42H.

On peut observer que les cellules mutées ont un cil plus petit que chez les WT, ce qui confirme les résultats retrouvés dans la littérature (Coon et al. 2012, Luo et al. 2012) où une diminution d'OCRL induisait un cil de taille réduite. Le virus U7_Ctrl n'a pas d'effet. L'utilisation du virus U7 SKIP permet une restauration partielle de la taille du cil (figure 69 et 70).

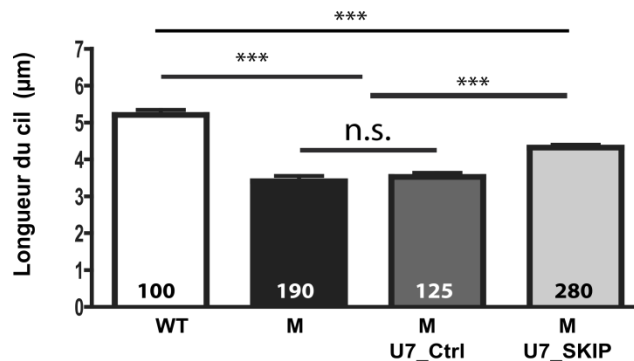


Figure 69 restauration de la ciliogénèse

Mesure de la restauration du cil primaire. Représentant les moyennes (+/- sem) n.s. : différence non significative. Test de Student *** $p < 0,001$.

Le nombre de cils primaires mesuré est inscrit dans chaque graphe. Résultat de 4 expériences indépendantes

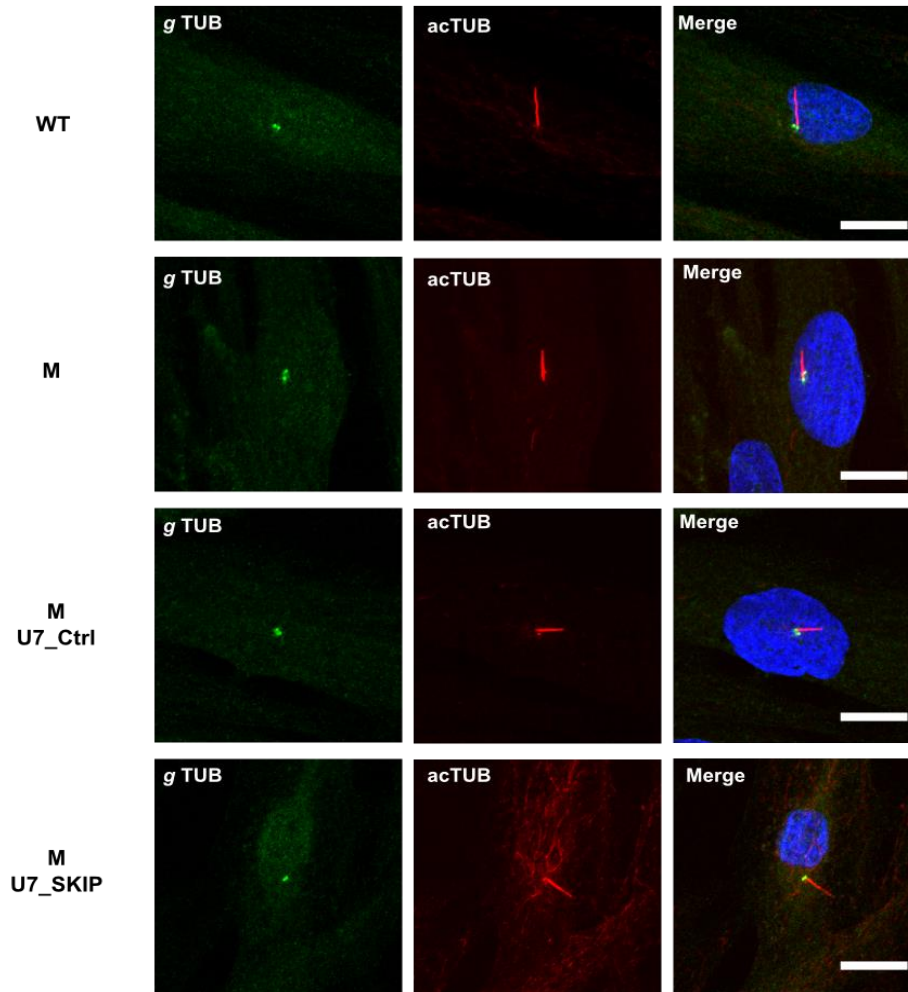


Figure 70 restauration du cil primaire.

En haut, Immunofluorescence des cellules avec en vert un anticorps dirigé contre le centrosome (la gamma tubuline, g TUB), en rouge le cil primaire marqué un anticorps dirigé la tubuline acétylée). En bleu un colorant nucléaire (le Hoechst). WT : les cellules contrôles, M : les cellules Mutées non transduites, M U7_CTRL et M U7_SKIP les cellules mutées transduites par le virus contrôle et pour le virus permettant le saut d'exon.

La restauration d'OCRL par saut d'exon permet un retour de la ciliogénèse.

Discussion, Perspectives autour du projet OCRL

Durant ce travail, j'ai réussi par saut d'exon à corriger la mutation c.238+4701A>G du gène OCRL. La mutation étudiée est responsable d'un syndrome de Lowe chez un patient étudié au laboratoire.

Ayant fait mes armes sur le projet RYR1, la mise en œuvre du projet OCRL fut « plus » simple. : un adage de l'équipe « Muscle et Pathologies » dit « quand on a fait du muscle on peut tout faire ».

J'ai développé au laboratoire le clonage et la production d'un lentivirus U7 permettant le saut d'exon. J'ai réussi à corriger par saut d'exon une mutation d'OCRL au niveau des transcrits, de l'expression de la protéine et aussi de la fonctionnalité.

Ce travail de correction génique est le premier pour le syndrome de Lowe et fait partie d'un des premiers essais de correction génique sur une pathologie lié à des défauts de cil primaire.

La preuve de concept ayant été réalisée dans ce travail, est-il possible d'aller plus loin et de proposer à termes une thérapie génique chez les patients atteints de syndrome de Lowe ?

Là où les essais sur les pathologies neuromusculaires sont très avancés, rien n'a pour l'instant été proposé pour le syndrome de Lowe.

Néanmoins, une difficulté subsiste pour le gène OCRL, il a été montré qu'une sur expression du gène OCRL était pathogène : une duplication comportant le gène OCRL identifiée chez un patient était à l'origine d'une atteinte autistique chez le patient. Donc

les thérapies géniques par remplacement seront difficiles à mettre en place pour avoir une transduction fine des cellules ne dépassant pas un taux délétère d'OCRL.

Les approches par modulation des ARNm devraient être une approche intéressante. Ces approches permettent au mieux un retour de l'expression endogène de la protéine.

Les données des études du laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire montre que la plupart des mutations faux sens induisent une dégradation de la protéine. La protéine est d'ailleurs très conservée à travers le règne animal. Une variation trop importante dans la protéine pourra conduire à la dégradation de celle-ci. Une approche de "mini-OCRL", comme celle imaginée pour RyR1, semble donc être difficilement envisageable. Par contre une approche par trans épissage devrait être intéressante pour permettre la correction d'un maximum de patient. Les mutations se retrouvent majoritairement entre les exons 9 à 24 du gène, imaginer une molécule de trans épissage permettant la correction de toutes les mutations retrouvées dans ces exons offre de grandes perspectives cliniques.

Le syndrome de Lowe étant une maladie systémique, sera-t-il possible de corriger les différentes atteintes ?

Concernant la cataracte bilatérale congénitale, des essais sur l'amaurose de Leber due à une mutation intronique profonde du gène CEP290 traité par AON a montré que chez la souris il était possible de corriger l'atteinte du cristallin (communication orale Xavier Gerard et al. Assise de génétique 2014). Néanmoins pour le syndrome de Lowe, le début de la pathologie se faisant en phase embryonnaire, l'atteinte est trop précoce pour être traitée.

Il en est de même pour l'atteinte du système nerveux. Les patients étant affectés d'une hypotonie congénitale, on peut se demander si la réversion de la mutation en période post-natale aurait un quelconque effet. Le système nerveux étant déjà grandement formé l'impact d'une correction risque d'être faible.

En ce qui concerne l'atteinte rénale, qui constitue la part évolutive de la maladie, tous

les patients développent à terme une insuffisance rénale chronique terminale. Cette insuffisance rénale si elle n'est pas jugulée rapidement est responsable du décès du patient. Le seul traitement pour cette insuffisance rénale est la greffe rénale, et les enfants atteints de syndrome de Lowe n'en bénéficiant pas décèdent rapidement. Pour palier à la greffe, des dialyses peuvent être réalisées mais les patients affectés par le syndrome de Lowe ayant par ailleurs des troubles comportementaux, ce traitement est lourd et compliqué à mettre en place. Dans ce contexte, un traitement par thérapie génique ciblant même uniquement le rein pourrait avoir un réel bénéfice. Il serait plus facile à mettre en œuvre qu'un traitement de l'ensemble de l'organisme, il permettrait de traiter l'aspect le plus vital de l'atteinte, et améliorerait les conditions de vie des patients.

Pour conclure ce projet, le travail réalisé ici est la première preuve de faisabilité de saut d'exon pour le syndrome de Lowe. Durant ce travail j'ai réussi à corriger une mutation d'épissage, au niveau des transcrits, protéique et fonctionnel permettant d'ouvrir la voie à d'autres essais de thérapie pour le syndrome de Lowe. Les outils pour mesurer la restauration de la protéine et de sa fonctionnalité ont été développés et validés durant ce travail.

Les suites de ce travail seront tout d'abord de terminer la caractérisation de la restauration d'OCRL au niveau cellulaire, il faudrait cependant réaliser un nouveau test d'étude d'activité d'OCRL afin de consolider les premiers résultats.

Contrairement aux myopathies liées à RyR1, le syndrome de Lowe possède un point chaud de néo mutation qui est récurrent : la mutation c.2581 G>A du gène OCRL qui a été retrouvé dans 10 familles différentes à travers le monde. Cette mutation induit la perte de reconnaissance du site donneur d'épissage de l'exon 22 et conduit au saut de cet exon. Je développe actuellement une approche de rétention d'exon par U1 thérapie pour corriger cette mutation (Pinotti et al. 2008).

Conclusion générale

Au cours de cette thèse, j'ai pu étudier deux mutations introniques profondes à l'origine de l'inclusion d'un pseudo exon dans la séquence des transcrits des gènes *RYR1* et *OCRL*. J'ai testé, sur les cellules des patients porteurs de ces mutations, l'effet d'oligonucléotides antisens dirigés contre des séquences endogènes permettant l'épissage naturel de ce pseudo exon. Ces AONs empêchent l'épissage du pseudo exon. Afin d'améliorer l'efficacité la correction, j'ai intégré la séquence des AONs dans une cassette U7 snRNA. J'ai pu montrer une restauration de la quantité de protéine ainsi qu'un retour de la fonctionnalité de la protéine. La faisabilité de thérapie par chirurgie des ARNm a donc désormais été prouvée, pour les myopathies liées à *RyR1* ou pour le syndrome de Lowe. De plus différents outils et techniques ont été mis au point ou testés dans ce travail afin d'étudier le suivi de la restauration comme par exemple la RT MLPA, la quantification protéique par immunofluorescence, la mesure du cil primaire et l'imagerie calcique. La mise au point de tests est essentiel pour évaluer une thérapie lorsqu'elle sera possible.

Nous assistons aujourd'hui à une véritable révolution des techniques de séquençage. Il est estimé qu'en 2025 le séquençage du génome humain sera possible en une heure, et que son coût n'excédera pas la centaine d'euros.

L'étape suivante est le développement des thérapies pour les mutations identifiées par ces techniques de haut débit. C'est pourquoi il est essentiel aujourd'hui de montrer la faisabilité de ce qui n'était encore hier qu'un concept théorique, et c'est ce à quoi ce travail s'est attelé tout au long de cette thèse.

Nos résultats montrent donc que la thérapie génique est applicable dans les myopathies, et qu'elle peut même occuper une place de choix dans le traitement de ces pathologies, toujours incurables à ce jour.

Bibliographie

- Aartsma-Rus, Annemieke, Anneke A M Janson, Wendy E Kaman, Mattie Bremmer-Bout, Johan T den Dunnen, Frank Baas, Gert-Jan B van Ommen, and Judith C T van Deutekom. 2003. "Therapeutic Antisense-Induced Exon Skipping in Cultured Muscle Cells from Six Different DMD Patients." *Human Molecular Genetics* 12 (8): 907–14.
- Aartsma-Rus, Annemieke, and Gert-Jan B van Ommen. 2007. "Antisense-Mediated Exon Skipping: A Versatile Tool with Therapeutic and Research Applications." *RNA (New York, N.Y.)* 13 (10): 1609–24. doi:10.1261/rna.653607.
- Aartsma-Rus, Annemieke, Laura van Vliet, Marscha Hirschi, Anneke A M Janson, Hans Heemskerk, Christa L de Winter, Sjef de Kimpe, Judith C T van Deutekom, Peter A C 't Hoen, and Gert-Jan B van Ommen. 2009. "Guidelines for Antisense Oligonucleotide Design and Insight into Splice-Modulating Mechanisms." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (3): 548–53. doi:10.1038/mt.2008.205.
- Amburgey, Kimberly, Angela Bailey, Jean H. Hwang, Mark A. Tarnopolsky, Carsten G. Bonnemann, Livija Medne, Katherine D. Mathews, James Collins, Jasper R. Daube, and Gregory P. Wellman. 2013. "Genotype-Phenotype Correlations in Recessive RYR1-Related Myopathies." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8 (1): 117.
- Balla, T. 2013. "Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation." *Physiological Reviews* 93 (3): 1019–1137. doi:10.1152/physrev.00028.2012.
- Baralle, D, and M Baralle. 2005. "Splicing in Action: Assessing Disease Causing Sequence Changes." *Journal of Medical Genetics* 42 (10): 737–48. doi:10.1136/jmg.2004.029538.
- Berget, S M, and P A Sharp. 1977. "A Spliced Sequence at the 5'-Terminus of Adenovirus Late mRNA." *Brookhaven Symposia in Biology*, no. 29 (May): 332–44.
- Bish, Lawrence T, Meg M Sleeper, Sean C Forbes, Bingjing Wang, Caryn Reynolds, Gretchen E Singletary, Dennis Trafny, et al. 2012. "Long-Term Restoration of Cardiac Dystrophin Expression in Golden Retriever Muscular Dystrophy Following rAAV6-Mediated Exon Skipping." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (3): 580–89. doi:10.1038/mt.2011.264.
- Blaese, R. Michael, Kenneth W. Culver, A. Dusty Miller, Charles S. Carter, Thomas Fleisher, Mario Clerici, Gene Shearer, Lauren Chang, Yawen Chiang, and Paul Tolstoshev. 1995. "T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA- SCID: Initial Trial Results after 4 Years." *Science* 270 (5235): 475–80.
- Blumenthal, Thomas. 2012. "Trans-Splicing and Operons in *C. Elegans*." *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, 1–11. doi:10.1895/wormbook.1.5.2.

- Bolisetty, Mohan T, and Karen L Beemon. 2012. "Splicing of Internal Large Exons Is Defined by Novel Cis-Acting Sequence Elements." *Nucleic Acids Research* 40 (18): 9244–54. doi:10.1093/nar/gks652.
- Bosone, I, S Bortolotto, T Mongini, C Doriguzzi, L Chiadò-Piat, I Ugo, R Mutani, and L Palmucci. 2001. "Late Onset and Very Mild Course of Xp21 Becker Type Muscular Dystrophy." *Clinical Neuropathology* 20 (5): 196–99.
- Buratti, Emanuele, and Francisco E Baralle. 2004. "Influence of RNA Secondary Structure on the Pre-mRNA Splicing Process." *Molecular and Cellular Biology* 24 (24): 10505–14. doi:10.1128/MCB.24.24.10505-10514.2004.
- Buratti, Emanuele, Martin Chivers, Gyulin Hwang, and Igor Vorechovsky. 2011. "DBASS3 and DBASS5: Databases of Aberrant 3'- and 5'-Splice Sites." *Nucleic Acids Research* 39 (Database issue): D86–91. doi:10.1093/nar/gkq887.
- Cartegni, Luca, Jinhua Wang, Zhengwei Zhu, Michael Q Zhang, and Adrian R Krainer. 2003. "ESEfinder: A Web Resource to Identify Exonic Splicing Enhancers." *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3568–71.
- Castellanos, Elisabeth, Imma Rosas, Ares Solanes, Isabel Bielsa, Conxi Lázaro, Cristina Carrato, Cristina Hostalot, et al. 2013. "In Vitro Antisense Therapeutics for a Deep Intronic Mutation Causing Neurofibromatosis Type 2." *European Journal of Human Genetics: EJHG* 21 (7): 769–73. doi:10.1038/ejhg.2012.261.
- Cavalieri, Simona, Elisa Pozzi, Richard A Gatti, and Alfredo Brusco. 2012. "Deep-Intronic ATM Mutation Detected by Genomic Resequencing and Corrected in Vitro by Antisense Morpholino Oligonucleotide (AMO)." *European Journal of Human Genetics: EJHG*, December. doi:10.1038/ejhg.2012.266.
- Cavazzana-Calvo, M. 2000. "Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease." *Science* 288 (5466): 669–72. doi:10.1126/science.288.5466.669.
- Chang, Wen-Cheng, Hung-Hsi Chen, and Woan-Yuh Tarn. 2008. "Alternative Splicing of U12-Type Introns." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13: 1681–90.
- Cheng, Zhi, and Thomas M Menees. 2011. "RNA Splicing and Debranching Viewed through Analysis of RNA Lariats." *Molecular Genetics and Genomics: MGG* 286 (5-6): 395–410. doi:10.1007/s00438-011-0635-y.
- Choudhury, R., C. J. Noakes, E. McKenzie, C. Kox, and M. Lowe. 2009. "Differential Clathrin Binding and Subcellular Localization of OCRL1 Splice Isoforms." *Journal of Biological Chemistry* 284 (15): 9965–73. doi:10.1074/jbc.M807442200.
- Choudhury, Rawshan, Aipo Diao, Fang Zhang, Evan Eisenberg, Agnes Saint-Pol, Catrin Williams, Athanasios Konstantakopoulos, et al. 2005. "Lowe Syndrome Protein

- OCRL1 Interacts with Clathrin and Regulates Protein Trafficking between Endosomes and the Trans-Golgi Network.” *Molecular Biology of the Cell* 16 (8): 3467–79. doi:10.1091/mbc.E05-02-0120.
- Chow, L T, R E Gelinas, T R Broker, and R J Roberts. 1977. “An Amazing Sequence Arrangement at the 5’ Ends of Adenovirus 2 Messenger RNA.” *Cell* 12 (1): 1–8.
- Cirak, Sebahattin, Virginia Arechavala-Gomez, Michela Guglieri, Lucy Feng, Silvia Torelli, Karen Anthony, Stephen Abbs, et al. 2011. “Exon Skipping and Dystrophin Restoration in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy after Systemic Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer Treatment: An Open-Label, Phase 2, Dose-Escalation Study.” *Lancet* 378 (9791): 595–605. doi:10.1016/S0140-6736(11)60756-3.
- Coon, Brian G, Victor Hernandez, Kayalvizhi Madhivanan, Debarati Mukherjee, Claudia B Hanna, Irene Barinaga-Rementeria Ramirez, Martin Lowe, Philip L Beales, and R Claudio Aguilar. 2012. “The Lowe Syndrome Protein OCRL1 Is Involved in Primary Cilia Assembly.” *Human Molecular Genetics* 21 (8): 1835–47. doi:10.1093/hmg/ddr615.
- Coon, Brian G, Debarati Mukherjee, Claudia B Hanna, David J Riese 2nd, Martin Lowe, and R Claudio Aguilar. 2009. “Lowe Syndrome Patient Fibroblasts Display Ocr1-Specific Cell Migration Defects That Cannot Be Rescued by the Homologous Inpp5b Phosphatase.” *Human Molecular Genetics* 18 (23): 4478–91. doi:10.1093/hmg/ddp407.
- Cooper, Thomas A. 2005. “Use of Minigene Systems to Dissect Alternative Splicing Elements.” *Methods (San Diego, Calif.)* 37 (4): 331–40. doi:10.1016/j.ymeth.2005.07.015.
- Coutton, C, M Bidart, J Rendu, F Devillard, G Vieville, F Amblard, G Lopez, P-S Jouk, and V Satre. 2013. “190-Kb Duplication in 1p36.11 Including PIGV and ARID1A Genes in a Girl with Intellectual Disability and Hexadactyly.” *Clinical Genetics*, March. doi:10.1111/cge.12113.
- Crow, J. F. 1992. “Sixty Years Ago: The 1932 International Congress of Genetics.” *Genetics* 131 (4): 761–68.
- Cui, Shanshan, Christopher J Guerriero, Christina M Szalinski, Carol L Kinlough, Rebecca P Hughey, and Ora A Weisz. 2010. “OCRL1 Function in Renal Epithelial Membrane Traffic.” *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 298 (2): F335–345. doi:10.1152/ajprenal.00453.2009.
- Cui, Yanfang, Han-Shen Tae, Nicole C Norris, Yamuna Karunasekara, Pierre Pouliquin, Philip G Board, Angela F Dulhunty, and Marco G Casarotto. 2009. “A Dihydropyridine Receptor alpha1s Loop Region Critical for Skeletal Muscle

- Contraction Is Intrinsically Unstructured and Binds to a SPRY Domain of the Type 1 Ryanodine Receptor.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (3): 677–86. doi:10.1016/j.biocel.2008.08.004.
- Dambournet, Daphné, Mickael Machicoane, Laurent Chesneau, Martin Sachse, Murielle Rocancourt, Ahmed El Marjou, Etienne Formstecher, Rémi Salomon, Bruno Goud, and Arnaud Echard. 2011. “Rab35 GTPase and OCRL Phosphatase Remodel Lipids and F-Actin for Successful Cytokinesis.” *Nature Cell Biology* 13 (8): 981–88. doi:10.1038/ncb2279.
- De Conti, Laura, Marco Baralle, and Emanuele Buratti. 2013. “Exon and Intron Definition in Pre-mRNA Splicing.” *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 4 (1): 49–60. doi:10.1002/wrna.1140.
- Delleman, J W, E M Bleeker-Wagemakers, and A W van Veelen. 1977. “Opacities of the Lens Indicating Carrier Status in the Oculo-Cerebro-Renal (Lowe) Syndrome.” *Journal of Pediatric Ophthalmology* 14 (4): 205–12.
- Desmet, François-Olivier, Dalil Hamroun, Marine Lalande, Gwenaëlle Collod-Bérout, Mireille Claustres, and Christophe Bérout. 2009. “Human Splicing Finder: An Online Bioinformatics Tool to Predict Splicing Signals.” *Nucleic Acids Research* 37 (9): e67. doi:10.1093/nar/gkp215.
- Devuyst, Olivier, and Rajesh V Thakker. 2010. “Dent’s Disease.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5: 28. doi:10.1186/1750-1172-5-28.
- Di Paolo, Gilbert, and Pietro De Camilli. 2006. “Phosphoinositides in Cell Regulation and Membrane Dynamics.” *Nature* 443 (7112): 651–57. doi:10.1038/nature05185.
- Dirksen, R. 2002. “Altered Ryanodine Receptor Function in Central Core Disease Leaky or Uncoupled Ca²⁺ Release Channels?” *Trends in Cardiovascular Medicine* 12 (5): 189–97. doi:10.1016/S1050-1738(02)00163-9.
- Divina, Petr, Andrea Kvitkovicova, Emanuele Buratti, and Igor Vorechovsky. 2009. “Ab Initio Prediction of Mutation-Induced Cryptic Splice-Site Activation and Exon Skipping.” *European Journal of Human Genetics: EJHG* 17 (6): 759–65. doi:10.1038/ejhg.2008.257.
- Dlamini, N., N.C. Voermans, S. Lillis, K. Stewart, E.-J. Kamsteeg, G. Drost, R. Quinlivan, et al. 2013. “Mutations in RYR1 Are a Common Cause of Exertional Myalgia and Rhabdomyolysis.” *Neuromuscular Disorders* 23 (7): 540–48. doi:10.1016/j.nmd.2013.03.008.
- Dominski, Z, and R Kole. 1993. “Restoration of Correct Splicing in Thalassemic Pre-mRNA by Antisense Oligonucleotides.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18): 8673–77.

- Dressman, M A, I M Olivos-Glander, R L Nussbaum, and S F Suchy. 2000. "Ocr1, a PtdIns(4,5)P(2) 5-Phosphatase, Is Localized to the Trans-Golgi Network of Fibroblasts and Epithelial Cells." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 48 (2): 179–90.
- Dunckley, M G, M Manoharan, P Villiet, I C Eperon, and G Dickson. 1998. "Modification of Splicing in the Dystrophin Gene in Cultured Mdx Muscle Cells by Antisense Oligoribonucleotides." *Human Molecular Genetics* 7 (7): 1083–90.
- Eldering, E. 2003. "Expression Profiling via Novel Multiplex Assay Allows Rapid Assessment of Gene Regulation in Defined Signalling Pathways." *Nucleic Acids Research* 31 (23): 153e–153. doi:10.1093/nar/gng153.
- Erdmann, Kai S, Yuxin Mao, Heather J McCrea, Roberto Zoncu, Sangyoon Lee, Summer Paradise, Jan Modregger, Daniel Biemesderfer, Derek Toomre, and Pietro De Camilli. 2007. "A Role of the Lowe Syndrome Protein OCRL in Early Steps of the Endocytic Pathway." *Developmental Cell* 13 (3): 377–90. doi:10.1016/j.devcel.2007.08.004.
- Evans, B K, and C Goyne. 1991. "Duchenne's Muscular Dystrophy: Review and Recent Scientific Findings." *The American Journal of the Medical Sciences* 302 (2): 118–23.
- Fairbrother, William G, Ru-Fang Yeh, Phillip A Sharp, and Christopher B Burge. 2002. "Predictive Identification of Exonic Splicing Enhancers in Human Genes." *Science (New York, N.Y.)* 297 (5583): 1007–13. doi:10.1126/science.1073774.
- Galej, Wojciech P, Chris Oubridge, Andrew J Newman, and Kiyoshi Nagai. 2013. "Crystal Structure of Prp8 Reveals Active Site Cavity of the Spliceosome." *Nature* 493 (7434): 638–43. doi:10.1038/nature11843.
- Garcia, Luis, Denis Furling, Cyriaque Beley, and Thomas Voit. 2011. "Modified u7 Snrnas for Treatment of Neuromuscular Diseases."
- Giulietti, M., F. Piva, M. D'Antonio, P. D'Onorio De Meo, D. Paoletti, T. Castrignano, A. M. D'Erchia, et al. 2012. "SpliceAid-F: A Database of Human Splicing Factors and Their RNA-Binding Sites." *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D125–D131. doi:10.1093/nar/gks997.
- Goonasekera, Sanjeewa A, Nicole A Beard, Linda Groom, Takashi Kimura, Alla D Lyfenko, Andrew Rosenfeld, Isabelle Marty, Angela F Dulhunty, and Robert T Dirksen. 2007. "Triadin Binding to the C-Terminal Luminal Loop of the Ryanodine Receptor Is Important for Skeletal Muscle Excitation Contraction Coupling." *The Journal of General Physiology* 130 (4): 365–78. doi:10.1085/jgp.200709790.

- Gorman, L, D Suter, V Emerick, D Schümperli, and R Kole. 1998. "Stable Alteration of Pre-mRNA Splicing Patterns by Modified U7 Small Nuclear RNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (9): 4929–34.
- Groh, S, I Marty, M Ottolia, G Prestipino, A Chapel, M Villaz, and M Ronjat. 1999. "Functional Interaction of the Cytoplasmic Domain of Triadin with the Skeletal Ryanodine Receptor." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (18): 12278–83.
- Gupta, Vandana A., Gianina Ravenscroft, Ranad Shaheen, Emily J. Todd, Lindsay C. Swanson, Masaaki Shiina, Kazuhiro Ogata, et al. 2013. "Identification of KLHL41 Mutations Implicates BTB-Kelch-Mediated Ubiquitination as an Alternate Pathway to Myofibrillar Disruption in Nemaline Myopathy." *The American Journal of Human Genetics* 93 (6): 1108–17. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.020.
- Hichri, Haifa, John Rendu, Nicole Monnier, Charles Coutton, Olivier Dorseuil, Rosa Vargas Poussou, Geneviève Baujat, et al. 2011. "From Lowe Syndrome to Dent Disease: Correlations between Mutations of the OCRL1 Gene and Clinical and Biochemical Phenotypes." *Human Mutation* 32 (4): 379–88. doi:10.1002/humu.21391.
- Hnilicová, Jarmila, and David Staněk. 2011. "Where Splicing Joins Chromatin." *Nucleus (Austin, Tex.)* 2 (3): 182–88. doi:10.4161/nucl.2.3.15876.
- Hoffman, Eric P, and Elizabeth M McNally. 2014. "Exon-Skipping Therapy: A Roadblock, Detour, or Bump in the Road?" *Science Translational Medicine* 6 (230): 230fs14. doi:10.1126/scitranslmed.3008873.
- Hou, Xiaomin, Nina Hagemann, Stefan Schoebel, Wulf Blankenfeldt, Roger S Goody, Kai S Erdmann, and Aymelt Itzen. 2011. "A Structural Basis for Lowe Syndrome Caused by Mutations in the Rab-Binding Domain of OCRL1." *The EMBO Journal* 30 (8): 1659–70. doi:10.1038/emboj.2011.60.
- Houdayer, Claude, Virginie Caux-Moncoutier, Sophie Krieger, Michel Barrois, Françoise Bonnet, Violaine Bourdon, Myriam Bronner, et al. 2012. "Guidelines for Splicing Analysis in Molecular Diagnosis Derived from a Set of 327 Combined in Silico/in Vitro Studies on BRCA1 and BRCA2 Variants." *Human Mutation* 33 (8): 1228–38. doi:10.1002/humu.22101.
- Hwang, Jean H, Francesco Zorzato, Nigel F Clarke, and Susan Treves. 2012. "Mapping Domains and Mutations on the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Channel." *Trends in Molecular Medicine* 18 (11): 644–57. doi:10.1016/j.molmed.2012.09.006.
- Ittig, Damian, Daniel Schümperli, and Christian J Leumann. 2008. "Tc-DNA Modified siRNA." *Nucleic Acids Symposium Series (2004)*, no. 52: 501–2. doi:10.1093/nass/nrn254.

- Jean-Philippe, Jacques, Sean Paz, and Massimo Caputi. 2013. "hnRNP A1: The Swiss Army Knife of Gene Expression." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (9): 18999–24. doi:10.3390/ijms140918999.
- Jungbluth, Heinz. 2007a. "Central Core Disease." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2 (1): 25. doi:10.1186/1750-1172-2-25.
- Jungbluth. 2007b. "Multi-Minicore Disease." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2 (1): 31. doi:10.1186/1750-1172-2-31.
- Jungbluth, Heinz, Carina Wallgren-Pettersson, and Jocelyn Laporte. 2008. "Centronuclear (myotubular) Myopathy." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 3: 26. doi:10.1186/1750-1172-3-26.
- Kohyama, J, F Niimura, K Kawashima, Y Iwakawa, and I Nonaka. 1989. "Congenital Fiber Type Disproportion Myopathy in Lowe Syndrome." *Pediatric Neurology* 5 (6): 373–76.
- Kühbacher, Andreas, Daphné Dambournet, Arnaud Echard, Pascale Cossart, and Javier Pizarro-Cerdá. 2012. "Phosphatidylinositol 5-Phosphatase Oculocerebrorenal Syndrome of Lowe Protein (OCRL) Controls Actin Dynamics during Early Steps of *Listeria Monocytogenes* Infection." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (16): 13128–36. doi:10.1074/jbc.M111.315788.
- Kuhn, A N, Z Li, and D A Brow. 1999. "Splicing Factor Prp8 Governs U4/U6 RNA Unwinding during Activation of the Spliceosome." *Molecular Cell* 3 (1): 65–75.
- Lasne, Dominique, Geneviève Baujat, Tristan Mirault, Joël Lunardi, Françoise Grelac, Marion Egot, Rémi Salomon, and Christilla Bachelot-Loza. 2010. "Bleeding Disorders in Lowe Syndrome Patients: Evidence for a Link between OCRL Mutations and Primary Haemostasis Disorders." *British Journal of Haematology* 150 (6): 685–88. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08304.x.
- Le Hir, Maëva, Aurélie Goyenvalle, Cécile Peccate, Guillaume Précigout, Kay E. Davies, Thomas Voit, Luis Garcia, and Stéphanie Lorain. 2013. "AAV Genome Loss From Dystrophic Mouse Muscles During AAV-U7 snRNA-Mediated Exon-Skipping Therapy." *Molecular Therapy* 21 (8): 1551–58. doi:10.1038/mt.2013.121.
- Liu, Jian, Yidi Sun, David G. Drubin, and George F. Oster. 2009. "The Mechanochemistry of Endocytosis." Edited by Fred Hughson. *PLoS Biology* 7 (9): e1000204. doi:10.1371/journal.pbio.1000204.
- Loi, Mario. 2006. "Lowe Syndrome." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1: 16. doi:10.1186/1750-1172-1-16.

- Long, Jennifer C, and Javier F Caceres. 2009. "The SR Protein Family of Splicing Factors: Master Regulators of Gene Expression." *The Biochemical Journal* 417 (1): 15–27. doi:10.1042/BJ20081501.
- Lorain, Stéphanie, Cécile Peccate, Maëva Le Hir, and Luis Garcia. 2010. "Exon Exchange Approach to Repair Duchenne Dystrophin Transcripts." *PLoS ONE* 5 (5): e10894. doi:10.1371/journal.pone.0010894.
- LOWE C, TERREY M, and MacLACHLAN EA. 1952. "Organic-Aciduria, Decreased Renal Ammonia Production, Hydrophthalmos, and Mental Retardation: A Clinical Entity." *A.M.A. American Journal of Diseases of Children* 83 (2): 164–84. doi:10.1001/archpedi.1952.02040060030004.
- Luo, Na, Akhilesh Kumar, Michael Conwell, Robert N. Weinreb, Ryan Anderson, and Yang Sun. 2013. "Compensatory Role of Inositol 5-Phosphatase INPP5B to OCRL in Primary Cilia Formation in Oculocerebrorenal Syndrome of Lowe." Edited by Sudipto Roy. *PLoS ONE* 8 (6): e66727. doi:10.1371/journal.pone.0066727.
- Luo, Na, Callah C West, Carlos A Murga-Zamalloa, Lou Sun, Ryan M Anderson, Clark D Wells, Robert N Weinreb, Jeffrey B Travers, Hemant Khanna, and Yang Sun. 2012. "OCRL Localizes to the Primary Cilium: A New Role for Cilia in Lowe Syndrome." *Human Molecular Genetics* 21 (15): 3333–44. doi:10.1093/hmg/dds163.
- Maunakea, Alikea K, Iouri Chepelev, Kairong Cui, and Keji Zhao. 2013. "Intragenic DNA Methylation Modulates Alternative Splicing by Recruiting MeCP2 to Promote Exon Recognition." *Cell Research*, August. doi:10.1038/cr.2013.110.
- Meur, Gargi, Andrew K. T. Parker, Fanni V. Gergely, and Colin W. Taylor. 2007. "Targeting and Retention of Type 1 Ryanodine Receptors to the Endoplasmic Reticulum." *Journal of Biological Chemistry* 282 (32): 23096–103. doi:10.1074/jbc.M702457200.
- Monnier, Nicole, Isabelle Marty, Julien Faure, Claudia Castiglioni, Claude Desnuelle, Sabrina Sacconi, Brigitte Estournet, et al. 2008. "Null Mutations Causing Depletion of the Type 1 Ryanodine Receptor (RYR1) Are Commonly Associated with Recessive Structural Congenital Myopathies with Cores." *Human Mutation* 29 (5): 670–78. doi:10.1002/humu.20696.
- Nogués, Guadalupe, Manuel J Muñoz, and Alberto R Kornblihtt. 2003. "Influence of Polymerase II Processivity on Alternative Splicing Depends on Splice Site Strength." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (52): 52166–71. doi:10.1074/jbc.M309156200.
- Nussbaum, R L, B M Orrison, P A Jänne, L Charnas, and A C Chinault. 1997. "Physical Mapping and Genomic Structure of the Lowe Syndrome Gene OCRL1." *Human Genetics* 99 (2): 145–50.

- Ousterout, David G., Pablo Perez-Pinera, Pratiksha I. Thakore, Ami M. Kabadi, Matthew T. Brown, Xiaoxia Qin, Olivier Fedrigo, Vincent Mouly, Jacques P. Tremblay, and Charles A. Gersbach. 2013. "Reading Frame Correction by Targeted Genome Editing Restores Dystrophin Expression in Cells From Duchenne Muscular Dystrophy Patients." *Molecular Therapy* 21 (9): 1718–26. doi:10.1038/mt.2013.111.
- Piétri-Rouxel, France, Christel Gentil, Stéphane Vassilopoulos, Dominique Baas, Etienne Mouisel, Arnaud Ferry, Alban Vignaud, et al. 2010. "DHPR alpha1S Subunit Controls Skeletal Muscle Mass and Morphogenesis." *The EMBO Journal* 29 (3): 643–54. doi:10.1038/emboj.2009.366.
- Pinotti, M., L. Rizzotto, D. Balestra, M. A. Lewandowska, N. Cavallari, G. Marchetti, F. Bernardi, and F. Pagani. 2008. "U1-snRNA-Mediated Rescue of mRNA Processing in Severe Factor VII Deficiency." *Blood* 111 (5): 2681–84. doi:10.1182/blood-2007-10-117440.
- Piva, Francesco, Matteo Giulietti, Alessandra Ballone Burini, and Giovanni Principato. 2012. "SpliceAid 2: A Database of Human Splicing Factors Expression Data and RNA Target Motifs." *Human Mutation* 33 (1): 81–85. doi:10.1002/humu.21609.
- Pooga, M, T Land, T Bartfai, and U Langel. 2001. "PNA Oligomers as Tools for Specific Modulation of Gene Expression." *Biomolecular Engineering* 17 (6): 183–92.
- Pozzoli, U, and M Sironi. 2005. "Silencers Regulate Both Constitutive and Alternative Splicing Events in Mammals." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (14): 1579–1604. doi:10.1007/s00018-005-5030-6.
- Prokic, Ivana, Belinda S Cowling, and Jocelyn Laporte. 2014. "Amphiphysin 2 (BIN1) in Physiology and Diseases." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, March. doi:10.1007/s00109-014-1138-1.
- Rbaibi, Youssef, Shanshan Cui, Di Mo, Marcelo Carattino, Rajeev Rohatgi, Lisa M Satlin, Christina M Szalinski, et al. 2012. "OCRL1 Modulates Cilia Length in Renal Epithelial Cells." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13 (9): 1295–1305. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01387.x.
- Raponi, Michela, Jana Kralovicova, Ellen Copson, Petr Divina, Diana Eccles, Peter Johnson, Diana Baralle, and Igor Vorechovsky. 2011. "Prediction of Single-Nucleotide Substitutions That Result in Exon Skipping: Identification of a Splicing Silencer in BRCA1 Exon 6." *Human Mutation* 32 (4): 436–44. doi:10.1002/humu.21458.
- Ravenscroft, Gianina, Satoko Miyatake, Vilma-Lotta Lehtokari, Emily J. Todd, Pauliina Vornanen, Kyle S. Yau, Yukiko K. Hayashi, et al. 2013. "Mutations in KLHL40 Are a Frequent Cause of Severe Autosomal-Recessive Nemaline Myopathy." *The*

- American Journal of Human Genetics* 93 (1): 6–18. doi:10.1016/j.ajhg.2013.05.004.
- Renneberg, Dorte, Emilie Bouliong, Ulrich Reber, Daniel Schümperli, and Christian J Leumann. 2002. “Antisense Properties of Tricyclo-DNA.” *Nucleic Acids Research* 30 (13): 2751–57.
- Reuter, Jessica S, and David H Mathews. 2010. “RNAstructure: Software for RNA Secondary Structure Prediction and Analysis.” *BMC Bioinformatics* 11: 129. doi:10.1186/1471-2105-11-129.
- Ritchie, Dustin B., Matthew J. Schellenberg, and Andrew M. MacMillan. 2009. “Spliceosome Structure: Piece by Piece.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1789 (9–10): 624–33. doi:10.1016/j.bbagr.2009.08.010.
- Roca, Xavier, Adrian R. Krainer, and Ian C. Eperon. 2013. “Pick One, but Be Quick: 5′ Splice Sites and the Problems of Too Many Choices.” *Genes & Development* 27 (2): 29–44. doi:10.1101/gad.209759.112.
- Rodríguez-Pascau, Laura, Maria Josep Coll, Lluïsa Vilageliu, and Daniel Grinberg. 2009. “Antisense Oligonucleotide Treatment for a Pseudoexon-Generating Mutation in the NPC1 Gene Causing Niemann-Pick Type C Disease.” *Human Mutation* 30 (11): E993–E1001. doi:10.1002/humu.21119.
- Rosenberg, Henry, Mark Davis, Danielle James, Neil Pollock, and Kathryn Stowell. 2007. “Malignant Hyperthermia.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2: 21. doi:10.1186/1750-1172-2-21.
- Rosenberg, S A, P Aebersold, K Cornetta, A Kasid, R A Morgan, R Moen, E M Karson, M T Lotze, J C Yang, and S L Topalian. 1990. “Gene Transfer into Humans—Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction.” *The New England Journal of Medicine* 323 (9): 570–78. doi:10.1056/NEJM199008303230904.
- Roux-Buisson, Nathalie, John Rendu, Isabelle Denjoy, Pascale Guicheney, Alice Goldenberg, Nadine David, Laurence Faivre, et al. 2011. “Functional Analysis Reveals Splicing Mutations of the CASQ2 Gene in Patients with CPVT: Implication for Genetic Counselling and Clinical Management.” *Human Mutation* 32 (9): 995–99. doi:10.1002/humu.21537.
- Sarantis, Helen, Daniel M. Balkin, Pietro De Camilli, Ralph R. Isberg, John H. Brumell, and Sergio Grinstein. 2012. “Yersinia Entry into Host Cells Requires Rab5-Dependent Dephosphorylation of PI(4,5)P2 and Membrane Scission.” *Cell Host & Microbe* 11 (2): 117–28. doi:10.1016/j.chom.2012.01.010.
- Schroer, Richard J, Arthur L Beaudet, Marwan Shinawi, Trilochan Sahoo, Ankita Patel, Qin Sun, Cindy Skinner, and Roger E Stevenson. 2012. “Duplication of OCRL and

- Adjacent Genes Associated with Autism but Not Lowe Syndrome.” *American Journal of Medical Genetics. Part A* 158A (10): 2602–5. doi:10.1002/ajmg.a.35566.
- Shapiro, M B, and P Senapathy. 1987. “RNA Splice Junctions of Different Classes of Eukaryotes: Sequence Statistics and Functional Implications in Gene Expression.” *Nucleic Acids Research* 15 (17): 7155–74.
- Sierakowska, H, M J Sambade, S Agrawal, and R Kole. 1996. “Repair of Thalassaemic Human Beta-Globin mRNA in Mammalian Cells by Antisense Oligonucleotides.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23): 12840–44.
- Spitali, Pietro, Hans Heemskerk, Rolf H A M Vossen, Alessandra Ferlini, Johan T den Dunnen, Peter A C ’t Hoen, and Annemieke Aartsma-Rus. 2010. “Accurate Quantification of Dystrophin mRNA and Exon Skipping Levels in Duchenne Muscular Dystrophy.” *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 90 (9): 1396–1402. doi:10.1038/labinvest.labinvest201098.
- Stojdl, D F, and J C Bell. 1999. “SR Protein Kinases: The Splice of Life.” *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire* 77 (4): 293–98.
- Suchy, Sharon F, and Robert L Nussbaum. 2002. “The Deficiency of PIP2 5-Phosphatase in Lowe Syndrome Affects Actin Polymerization.” *American Journal of Human Genetics* 71 (6): 1420–27. doi:10.1086/344517.
- Talukdar, Indrani, Supriya Sen, Rodolfo Urbano, James Thompson, John R Yates 3rd, and Nicholas J G Webster. 2011. “hnRNP A1 and hnRNP F Modulate the Alternative Splicing of Exon 11 of the Insulin Receptor Gene.” *PloS One* 6 (11): e27869. doi:10.1371/journal.pone.0027869.
- Tennyson, C N, H J Klamut, and R G Worton. 1995. “The Human Dystrophin Gene Requires 16 Hours to Be Transcribed and Is Cotranscriptionally Spliced.” *Nature Genetics* 9 (2): 184–90. doi:10.1038/ng0295-184.
- Tong, J, H Oyamada, N Demarex, S Grinstein, T V McCarthy, and D H MacLennan. 1997. “Caffeine and Halothane Sensitivity of Intracellular Ca²⁺ Release Is Altered by 15 Calcium Release Channel (ryanodine Receptor) Mutations Associated with Malignant Hyperthermia And/or Central Core Disease.” *The Journal of Biological Chemistry* 272 (42): 26332–39.
- Tong, J. 1999. “Measurement of Resting Cytosolic Ca²⁺ Concentrations and Ca²⁺ Store Size in HEK-293 Cells Transfected with Malignant Hyperthermia or Central Core Disease Mutant Ca²⁺ Release Channels.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 693–702. doi:10.1074/jbc.274.2.693.
- Tsai, Kun-Nan, and Daryi Wang. 2012. “Identification of Activated Cryptic 5’ Splice Sites Using Structure Profiles and Odds Measure.” *Nucleic Acids Research* 40 (10): e73.

doi:10.1093/nar/gks061.

- Turunen, Janne J., Elina H. Niemelä, Bhupendra Verma, and Mikko J. Frilander. 2013. "The Significant Other: Splicing by the Minor Spliceosome." *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 4 (1): 61–76. doi:10.1002/wrna.1141.
- Umen, J G, and C Guthrie. 1995. "The Second Catalytic Step of Pre-mRNA Splicing." *RNA (New York, N.Y.)* 1 (9): 869–85.
- Van Deutekom, J C, M Bremmer-Bout, A A Janson, I B Ginjaar, F Baas, J T den Dunnen, and G J van Ommen. 2001. "Antisense-Induced Exon Skipping Restores Dystrophin Expression in DMD Patient Derived Muscle Cells." *Human Molecular Genetics* 10 (15): 1547–54.
- Van Deutekom, Judith C, Anneke A Janson, Ieke B Ginjaar, Wendy S Frankhuizen, Annemieke Aartsma-Rus, Mattie Bremmer-Bout, Johan T den Dunnen, et al. 2007. "Local Dystrophin Restoration with Antisense Oligonucleotide PRO051." *The New England Journal of Medicine* 357 (26): 2677–86. doi:10.1056/NEJMoa073108.
- Vicinanza, Mariella, Antonella Di Campi, Elena Polishchuk, Michele Santoro, Giuseppe Di Tullio, Anna Godi, Elena Levtchenko, et al. 2011. "OCRL Controls Trafficking through Early Endosomes via PtdIns4,5P₂-Dependent Regulation of Endosomal Actin." *The EMBO Journal* 30 (24): 4970–85. doi:10.1038/emboj.2011.354.
- Vorechovsky, Igor. 2010. "Transposable Elements in Disease-Associated Cryptic Exons." *Human Genetics* 127 (2): 135–54. doi:10.1007/s00439-009-0752-4.
- Vulin, Adeline, Inès Barthélémy, Aurélie Goyenvalle, Jean-Laurent Thibaud, Cyriaque Beley, Graziella Griffith, Rachid Benchaouir, et al. 2012. "Muscle Function Recovery in Golden Retriever Muscular Dystrophy After AAV1-U7 Exon Skipping." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, September. doi:10.1038/mt.2012.181. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22968479>.
- Wallgren-Pettersson, Carina, Caroline A Sewry, Kristen J Nowak, and Nigel G Laing. 2011. "Nemaline Myopathies." *Seminars in Pediatric Neurology* 18 (4): 230–38. doi:10.1016/j.spen.2011.10.004.
- Wilton, S D, F Lloyd, K Carville, S Fletcher, K Honeyman, S Agrawal, and R Kole. 1999. "Specific Removal of the Nonsense Mutation from the Mdx Dystrophin mRNA Using Antisense Oligonucleotides." *Neuromuscular Disorders: NMD* 9 (5): 330–38.
- Wojtowicz, Woj M., John J. Flanagan, S. Sean Millard, S. Lawrence Zipursky, and James C. Clemens. 2004. "Alternative Splicing of *Drosophila* Dscam Generates Axon Guidance Receptors That Exhibit Isoform-Specific Homophilic Binding." *Cell* 118

(5): 619–33. doi:10.1016/j.cell.2004.08.021.

Woscholski, R, and P J Parker. 1997. “Inositol Lipid 5-Phosphatases--Traffic Signals and Signal Traffic.” *Trends in Biochemical Sciences* 22 (11): 427–31.

Wu, Shiwen, M Carlos A Ibarra, May Christine V Malicdan, Kumiko Murayama, Yasuko Ichihara, Hirosato Kikuchi, Ikuya Nonaka, Satoru Noguchi, Yukiko K Hayashi, and Ichizo Nishino. 2006. “Central Core Disease Is due to RYR1 Mutations in More than 90% of Patients.” *Brain: A Journal of Neurology* 129 (Pt 6): 1470–80. doi:10.1093/brain/awl077.

Xiao, Xinshu, Zefeng Wang, Minyoung Jang, and Christopher B Burge. 2007. “Coevolutionary Networks of Splicing Cis-Regulatory Elements.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (47): 18583–88. doi:10.1073/pnas.0707349104.

Yeo, Gene, and Christopher B Burge. 2004. “Maximum Entropy Modeling of Short Sequence Motifs with Applications to RNA Splicing Signals.” *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology* 11 (2-3): 377–94. doi:10.1089/1066527041410418.

Yokota, Toshifumi, Qi-Long Lu, Terence Partridge, Masanori Kobayashi, Akinori Nakamura, Shinichi Takeda, and Eric Hoffman. 2009. “Efficacy of Systemic Morpholino Exon-Skipping in Duchenne Dystrophy Dogs.” *Annals of Neurology* 65 (6): 667–76. doi:10.1002/ana.21627.

Zhang, X, A B Jefferson, V Auethavekiat, and P W Majerus. 1995. “The Protein Deficient in Lowe Syndrome Is a Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 5-Phosphatase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (11): 4853–56.

Zuker, Michael. 2003. “Mfold Web Server for Nucleic Acid Folding and Hybridization Prediction.” *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3406–15.

Article

Exon Skipping as a Therapeutic Strategy Applied to an *RYR1* Mutation with Pseudo-Exon Inclusion Causing a Severe Core Myopathy

John Rendu,^{1–3} Julie Brocard,^{1,2} Eric Denarier,^{2–5} Nicole Monnier,^{1,3} France Piétri-Rouxel,⁶ Cyriaque Beley,⁶ Nathalie Roux-Buisson,^{1–3} Brigitte Gilbert-Dussardier,⁷ Marie José Perez,⁸ Norma Romero,⁹ Luis Garcia,⁶ Joël Lunardi,^{1–3} Julien Fauré,^{1–3} Anne Fourest-Lieuvain,^{1,2,4,*} and Isabelle Marty^{1,2,*}

Abstract

Central core disease is a myopathy often arising from mutations in the type 1 ryanodine receptor (*RYR1*) gene, encoding the sarcoplasmic reticulum calcium release channel RyR1. No treatment is currently available for this disease. We studied the pathological situation of a severely affected child with two recessive mutations, which resulted in a massive reduction in the amount of RyR1. The paternal mutation induced the inclusion of a new in-frame pseudo-exon in RyR1 mRNA that resulted in the insertion of additional amino acids leading to the instability of the protein. We hypothesized that skipping this additional exon would be sufficient to restore RyR1 expression and to normalize calcium releases. We therefore developed U7-AON lentiviral vectors to force exon skipping on affected primary muscle cells. The efficiency of the exon skipping was evaluated at the mRNA level, at the protein level, and at the functional level using calcium imaging. In these affected cells, we observed a decreased inclusion of the pseudo-exon, an increased RyR1 protein expression, and a restoration of calcium releases of normal amplitude either upon direct RyR1 stimulation or in response to membrane depolarization. This study is the first demonstration of the potential of exon-skipping strategy for the therapy of central core disease, from the molecular to the functional level.

Introduction

TYPE 1 RYANODINE RECEPTOR (RyR1), encoded by the *RYR1* gene (MIM#180901), is the main sarcoplasmic reticulum calcium channel in skeletal muscles. RyR1 and its major partner in the calcium release complex, the voltage gated calcium channel—dihydropyridine receptor (DHPR)—are responsible for the excitation–contraction coupling process (Lanner *et al.*, 2010).

Mutations in the *RYR1* gene have been associated with congenital myopathies: central core disease (CCD; MIM#117000) (Lynch *et al.*, 1999; Monnier *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2003) and

multiminicore disease (MIM#602771) (Feirero *et al.*, 2002; Jungbluth *et al.*, 2002; Monnier *et al.*, 2003). CCD is characterized by the presence of cores in type 1 muscle fibers. Those are large areas of abnormal myofibrillar architecture characterized by sarcomeric disorganization and absence of mitochondria (Monnier *et al.*, 2001; De Cauwer *et al.*, 2002). CCD presents either an autosomal dominant or a recessive transmission pattern and is clinically heterogeneous. Clinical presentation ranges from mild phenotype, with moderate hypotonia during early childhood, delayed motor abilities, and slowly progressive proximal muscle weakness, to severe phenotype, including fetal akinesia, respiratory insufficiency at birth, and generalized

¹INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Muscle et Pathologies, 38000 Grenoble, France.

²Université Joseph Fourier, 38000 Grenoble, France.

³Centre Hospitalier Régional Universitaire de Grenoble, Hôpital Michallon, Biochimie Génétique et Moléculaire, 38000 Grenoble, France.

⁴Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Direction des Sciences du Vivant, CEA, 38000 Grenoble, France.

⁵INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe Physiopathologie du cytosquelette, 38000 Grenoble, France.

⁶UM76-UPMC/U974-Inserm/UMR7215-CNRS, Institut de Myologie, 75015 Paris, France.

⁷Génétique Médicale, Centre de Référence Anomalies du Développement Ouest, CHU Poitiers, 86000 Poitiers, France.

⁸Foetopathologie, Département de Génétique Médicale, CHRU Montpellier, Arnaud De Villeneuve, 34295 Montpellier, France.

⁹Unité de Morphologie Neuromusculaire, Institut de Myologie–UPMC-Paris6 UR76, INSERM UMR974, CNRS UMR 7215, GHU La Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France.

*These two authors contributed equally to this work.

muscle weakness (Romero *et al.*, 2003; Jungbluth, 2007). No treatment is currently available for this disease.

We have previously described a patient affected by a recessive form of the disease with a very severe phenotype (Monnier *et al.*, 2008). He presented at birth with a major respiratory insufficiency associated with hypotonia. At six, he showed a generalized muscle weakness and significant scoliosis. He was unable to walk and was under respiratory assistance. A muscle biopsy, performed when he was 1 year old, showed the presence of well-delimited large cores in type 1 fibers. He was diagnosed as being affected with CCD. Genetic analysis showed that he was compound heterozygous for the *RYR1* gene, with one mutation on the maternal allele of incomplete penetrance leading to a STOP codon, and a deep intronic mutation on the paternal allele leading to the introduction of an additional exon, called pseudo-exon 101bis. The consequence of both mutations was a massive loss in the amount of the RyR1 protein, although RyR1 transcript levels were unaffected (Monnier *et al.*, 2008).

The exon-skipping therapeutic strategy has been successfully applied to different genetic diseases (Wein *et al.*, 2010; Hammond and Wood, 2011; Taniguchi-Ikeda *et al.*, 2011; Spitali and Aartsma-Rus, 2012). The principle of exon skipping is to block some specific splice sites during mRNA maturation with antisense oligonucleotides (AONs) in order to restore the reading frame at the transcript level. This approach has been used in mouse and dog animal models of Duchenne muscular dystrophy (Goyenvalle *et al.*, 2004; Vulin *et al.*, 2012), demonstrating its ability to restore an internally truncated but functional protein, and is now used in clinical trials (Cirak *et al.*, 2011). Initially focused on Duchenne muscular dystrophy, exon skipping has been further applied to other muscle diseases, for example, the Fukuyama muscular dystrophy and dysferlinopathy (Wein *et al.*, 2010; Taniguchi-Ikeda *et al.*, 2011). In the present study, we have developed an exon-skipping strategy to force the skipping of the additional 101bis pseudo-exon in RyR1 pre-mRNA and thus restore the expression of a normal protein. This strategy, applied to human primary muscle cultures having the mutation, led to an increase in the amount of the RyR1 protein. In addition, the restored protein was functional, as observed by normalization of the amplitude of calcium releases in treated cells. This study is the first demonstration of a possible treatment for an RyR1-related myopathy.

Materials and Methods

Ethics statement

Investigations on patient material were performed after signature of an informed consent by the patients according to French regulation and have received approval from the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Est).

RYR1 reference sequence

The *RYR1* sequence used in this work is accessible as NCI RefSeq NM_000540.2.

Quantitative Western blot analysis

The amount of RyR1 present in the muscle sample was determined by quantitative Western blot analysis using

antibodies directed against RyR1 (Marty *et al.*, 1994) and normalized to the amount of γ -sarcoglycan (antibody from Novo Castra) as described previously (Monnier *et al.*, 2008). Signals were detected using a chemiluminescent HRP substrate and quantified using a ChemiDoc XRS apparatus (Biorad) and the Quantity One software (Biorad).

Cell culture, cell sorting, and differentiation

HEK293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen).

Fetal muscle biopsies were obtained from 14-week-old fetuses after medical abortion in the case of the mutant fetal (MF) cells and legal in-request abortion in the case of the control fetal (CF) cells. Primary cultures obtained from these biopsies were further enriched in myoblasts using a MACS sorting kit (CD56 microbeads; Miltenyi Biotec SAS), according to manufacturer's protocol. The amount of myoblasts in each culture was evaluated by desmin immunolabeling and was estimated to 83% for MF cells and 46% for CF cells.

MF and CF myoblasts were grown in proliferation medium (HamF10 supplemented with 20% fetal bovine serum, 2% Ultrosor [Pall Biosepra], and 1% penicillin/streptomycin). Differentiation was induced by shifting cells to differentiation medium (DMEM 1% glucose supplemented with 2% horse serum), during 4 days for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments, or 8–10 days for RyR1 protein detection and calcium imaging experiments.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Cells were lysed in TRIzol reagent (Invitrogen, Life Technologies SAS) and total RNA was extracted with the Ambion PureLink kit (Life Technologies SAS) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA was synthesized from 500 to 750 ng of total RNA using 0.5 μ l of Transcriptor (Roche) and 0.3 μ g of oligo-dT as described (Monnier *et al.*, 2001). PCR with 25 amplification cycles were then performed with the following primers: pCIneoF and T3R for the minigene splicing assay; CCL28/2F and CCL28/2R for amplification of the fragment of *RYR1* comprising exons 101 and 102. Primers (see sequences in Table 1) were produced and purified by Eurogentec. After PCR, the amplified products were separated by electrophoresis on agarose gels and quantified with a Chemidoc XRS apparatus and Quantity One software (Bio-Rad).

Minigene splicing assay

A PCR was performed on the genomic DNA of individual III.1 with *Mlu*I-101bis-F and *Sall*I-101bis-R primers (Table 1) to amplify a region of 496 bp encompassing the c.14646+2563C>T mutation, and the amplified fragments from both alleles were inserted in a pCIneo plasmid modified as described previously (Roux-Buisson *et al.*, 2011). Two minigene plasmids were cloned and sequenced, one with the wild-type sequence, called C construct, and one with the c.14646+2563C>T mutation, called M construct. Transfections were performed on 3.10^5 HEK293 cells using ExGen500 (Euro-medex) with a DNA:ExGen ratio of 3:10, according to manufacturer's instructions. Forty hours after transfection, cells

TABLE 1. SEQUENCES OF PRIMERS AND ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES USED IN THIS STUDY

Primer	Sequence	Use
pCIneoF	5' gttcaattacagctcttaag 3'	RT-PCR
T3R	5' aattaaccctcactaaaggg 3'	RT-PCR
CCL28/2F	5' tctggaagttcgggtcatctt 3'	RT-PCR
CCL28/2R	5' gccatgctggtgctatcaa 3'	RT-PCR
MluI-101bis-F	5' gggacgcgtagagacacagg ccacaatcc 3'	Minigene
Sall-101bis-R	5' ggggtcgcagcagtgcaatggcg tgatct 3'	Minigene
U7-D+E antisense	5' ccacagcggccgcauacacuu guucuc 3'	Lentivirus
U7-CTRL antisense	5' gguguauugcaugauaugu 3'	Lentivirus
AON-A	5' ucauccuagaguaaaaacua 3'	Exon skipping
AON-B	5' gaacacagucaucaagagu 3'	Exon skipping
AON-C	5' augugagagaacacagucau 3'	Exon skipping
AON-D	5' guucuuuccgugucccagg 3'	Exon skipping
AON-E	5' ccacagcggccgcauacac 3'	Exon skipping
AON-F	5' ggauuuuuagcgugagccac 3'	Exon skipping
AON-G	5' augauccaccuaccuugcc 3'	Exon skipping

RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

were collected by trypsinization and processed for RT-PCR, using primers pCIneoF and T3R.

AON design and transfection

AONs were chosen according to several criteria: type and accessibility of the target and stability of the AON-pre mRNA binding energy (Aartsma-Rus *et al.*, 2009). The 101bis pseudo-exon and its intronic junctions in the *RYR1* sequence were analyzed by the Human splicing Finder software (Desmet *et al.*, 2009), in order to identify the splice sites and to find potential exonic splicing enhancers (ESE). The accessibility was determined by analysis of the pre-mRNA with Mfold software (Zuker, 2003): open structures in the pre-mRNA strand were considered to have a better accessibility than appaired ones. Within these regions defined as interesting targets (splice sites or ESE in the pseudo-exon), seven AONs were designed according to their binding energy using the "Oligowalk" option in the RNA structure 4.5 software (Reuter and Mathews, 2010). The sequences of the AONs are indicated in Table 1. The seven 2'-O-methyl AONs with a phosphorothioate backbone were produced and purified by Alpha DNA.

MF or CF myoblasts (10^5 cells) were seeded in 35 mm dishes and were transfected with 8.5 μ l of Exgen500 and 500 nM AONs (Aartsma-Rus *et al.*, 2003). After 2 days in the proliferation medium, the cells were switched to a differentiation medium. After 24 hr of differentiation, cells underwent a second transfection following the same protocol and were collected 3 days after for RT-PCR analyses (4 days post-differentiation).

U7 small nuclear RNA lentiviral vectors and transduction

The U7 DNA fragments were engineered from the previously described U7SmOPT (Gorman *et al.*, 1998; Wein *et al.*, 2010), with antisense sequence targeting the histone pre-

mRNA replaced by the specific antisense sequences (Table 1) targeting the human pre-mRNA of *RYR1*. The U7-CTRL and U7-D+E fragments were subcloned into a plasmid pRRL-cPPT-mcs-WPRE, derived from the pRRL-cPPT-hPGK-eGFP-WPRE construct (Naldini, 1998), and sequences of constructs were checked by sequencing. Lentiviral vectors were produced at Genethon as previously described by transient quadri-transfection into HEK293T cells. Viral titers (infectious particles) were determined by transduction of HCT116 cells and assayed by quantitative real-time PCR on genomic DNA (Charrier *et al.*, 2005). For myoblast transduction, 3×10^5 MF or CF cells were seeded in a 500 μ l drop of a proliferating medium in 60 mm culture dishes. Lentiviral particles (MOI 300) were added in the drop, and after 8 hr of incubation at 37°C, 2 ml of proliferating medium was added and cells were allowed to grow for 48 hr. After amplification to 10^7 cells, cells were trypsinized and split into several dishes to perform RT-PCR, immunofluorescence and calcium imaging assays in parallel.

Immunofluorescence microscopy

Myotubes (8–10 days of differentiation) grown on plastic Ibidi dishes (Biovalley) coated with laminin were washed with PBS and fixed 6 min in methanol at -20°C . Myotubes were then processed for immunolabeling with a monoclonal antibody against myosin heavy chain (MyHC), as a marker of differentiation (MF20; Developmental Studies Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa) and a polyclonal antibody against RyR1 (Marty *et al.*, 1994). After a 15 min permeabilization with PBS-0.1% Tween 20 (PBS-T), cells were incubated for 1 hr 30 min with primary antibodies in PBS-T at room temperature. After three washes with PBS-T, cells were incubated for 30 min at room temperature with fluorescent secondary antibodies, and washed again before mounting in Fluorsave (Merck Chemicals). The secondary antibodies were either coupled to Alexa-488 (Molecular Probes, Life Technologies SAS) or Cy3 (Jackson ImmunoResearch Europe). The samples were analyzed using a Leica SPE confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems SAS).

RyR1 quantification and myotubes width measurements by image analysis

For RyR1 quantification in myotubes, images of five focal planes separated by 1.5 μ m were acquired with identical confocal settings between the different images and the different experimental conditions (transduced and non-transduced myotubes). Settings were adjusted in order to avoid any pixel saturation, both for RyR1 and for MyHC staining. Z-projections of the five planes were performed and the Sum images were used for quantification, as described below. Relative expression levels of the RyR1 protein in myotubes were quantified using ImageJ software (version 1.44i, NIH) and a home-made macro. The macro performed different operations: myotubes were first delineated in regions of interest (ROIs) using the MyHC image; the mean pixel intensities of the MyHC staining were measured inside ROIs and MyHC background was measured outside the ROIs; the same ROIs were reported on the RyR1 staining image, and the RyR1 signal mean intensity and the RyR1 background were measured. The ratio of RyR1 to MyHC intensities was calculated as follows: (RyR1 mean pixel

intensity – RyR1 global background)/(MyHC mean pixel intensity – MyHC global background). For myotube width measurements, the maximal width per myotube was measured on MyHC z-projections images, using ImageJ software.

Calcium imaging assays

Changes in intracellular calcium were measured using the calcium-dependent fluorescent dye Fluo4-AM (Molecular Probes, Life Technologies SAS), as described before (Rezgui *et al.*, 2005). Myotubes were incubated for 1 hr at room temperature with Fluo-4-AM 10 μ M, in Krebs buffer (136 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES pH 7.4). Uptake of the dye was facilitated by the addition of 0.02% pluronic F-127 acid (Sigma). After loading, myotubes were washed for 1 hr at 37°C to allow de-esterification of the dye. Calcium imaging was performed in Krebs buffer. 4-Chloro-m-Cresol (CmC) was prepared as stock solution in Krebs buffer and used at final concentrations of 500 μ M. In the depolarization solution, NaCl was replaced by KCl (140 mM final concentration). Fluorescence was measured by confocal laser scanning microscopy, using a Leica TCS-SPE operating system, in the xyt mode. The fluorescence images were collected every 0.9 sec, during 2–4 min, and then analyzed frame by frame. Fluorescence curves are expressed as a function of time, as $\Delta F/F_0$, where F_0 represents the baseline fluorescence immediately before depolarization and ΔF represents the fluorescence changes from baseline. Data are given as mean \pm SEM, and n represents the number of myotubes in each condition.

Statistics

Statistics were performed using Student's *t*-test or analysis of variance followed by Bonferroni *t*-test for multiple comparisons, on Prism 6.0 software (GraphPad), with n = number of myotubes in at least three different experiments, and after checking the normal distribution of the samples.

Results

Case description

The proband (individual III:1; Fig. 1a), first described in Monnier *et al.* (2008), harbored two *RYR1* mutations, one inherited from his father (c.14646+2563C>T), and one from his mother (c.11778G>A). The c.1464+2563C>T change in intron 101 of the paternal allele created a donor splice site and activated an upstream acceptor site responsible for the insertion of a 99 bp pseudo-exon, called 101bis, at the junction of exons 101 and 102 (Fig. 1c). Because the 101bis pseudo-exon was in frame, this led to the insertion of 33 amino acids within the last luminal loop of RyR1 (Fig. 1d) that is involved in the interaction between RyR1 and its protein partner triadin (Lee *et al.*, 2004). The mutation was found in the proband's father (individual II:2) and paternal uncle (individual II:3), both mildly affected. On the maternal allele, a silent c.11778G>A change of the last nucleotide of exon 85 (p.Gln3926Gln) unveiled a cryptic donor site downstream from the regular donor site. As a consequence of an incomplete penetrance, the maternal mutation generated two transcripts. In the first transcript, the splicing was unaffected and the presence of a CAA instead of a CAG

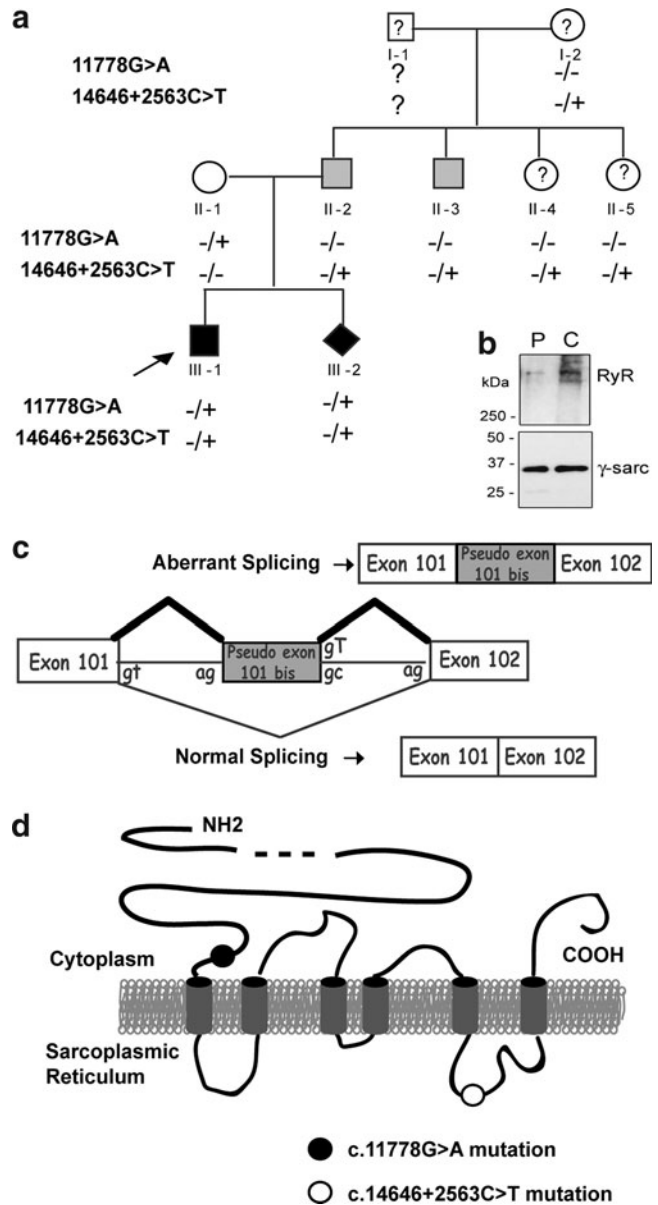


FIG. 1. Case description. **(a)** Pedigree of the family. Black symbols denote the symptomatic individuals, gray symbols correspond to pauci-symptomatic individuals, open symbols indicate asymptomatic individuals, and question marks refer to individuals with an unknown clinical status. The arrow indicates the proband. Diamond symbol represents the fetus. Signs + and – refer to the presence and absence of a mutation in the *RYR1* gene, respectively. **(b)** Western blot analysis of the amount of RyR1 in a muscle biopsy from the patient (P, ind III:1) compared with an age-matched control (C). Amount of RyR1 was normalized to the amount of γ -sarcoglycan. **(c)** Representation of the consequences of the c.14646+2563C>T paternal intronic mutation on the splicing of the *RYR1* pre-mRNA. The additional pseudo-exon inserted in the mRNA after aberrant splicing is in gray. **(d)** Schematic representation of the RyR1 protein with the approximate localizations of the maternal c.11778G>A and paternal c.14646+2563C>T mutations. The six transmembrane domains of RyR1 are represented in gray, in the sarcoplasmic reticulum membrane. RyR1, type 1 ryanodine receptor.

codon did not modify the glutamine at position 3926. In the second transcript, the use of the cryptic donor site resulted in a premature STOP codon at position p.3926+4 (Monnier *et al.*, 2008). The mother (individual II:1) was considered healthy.

A protein analysis performed on a muscle biopsy from the proband's uncle (individual II:3, who had only the c.14646+2563C>T paternal mutation at heterozygous state) showed a residual amount of RyR1 of $57\% \pm 3\%$ of a control, without alteration of the amount of the RyR1 transcript (Monnier *et al.*, 2008). As this mutation induced the addition of 33 amino acids in the channel part of RyR1, it can be assumed that this most probably led to an abnormal folding of the protein and to its degradation. Because the maternal mutation induced the presence of a premature STOP codon, the amount of the RyR1 protein in muscles of the proband (III:1) with the two mutations was expected to be much lower than that of his uncle (II:3). This very low amount of protein could explain the severe phenotype of the proband (Monnier *et al.*, 2008). The amount of the RyR1 protein in a biopsy of the proband III:1 was analyzed in the present study (Fig 1b). Although evaluation of the RyR1 amount by Western blot analysis could be performed only twice because of the limited biopsy available, it confirmed a major reduction in the amount of RyR1 for the proband (35% of protein remaining compared with an age-matched control biopsy) (Fig. 1b).

Mutation analysis

A prenatal diagnosis was subsequently performed in this family and led to a medical abortion because the fetus (ind.

III:2; Fig. 1a) was bearing the two very same mutations identified in the proband. Affected fetal primary muscle cells, called MF cells, were produced from a muscle biopsy of the fetus. CF primary muscle cells were produced from an age-matched normal fetus. The effect of the c.14646+2563C>T intronic mutation on RYR1 expression was studied by RT-PCR using MF and CF cell cultures. An amplification of RyR1 mRNA was performed on the region spanning nucleotides 14438–15030 that contained exons 101 and 102. Two amplicons were obtained in MF cells (Fig. 2a, lane 2): one of normal 593 bp size, as in control CF cells (lane 1), and one of 692 bp size, which corresponded to the insertion of the 99 bp of exon 101bis. This result on MF cells confirmed the insertion of the pseudo-exon that was described for patient III:1 (Monnier *et al.*, 2008). However, it was not possible to know if the residual normal-sized 593 bp fragment was because of incomplete penetrance of maternal or paternal mutation. The penetrance of the paternal mutation was analyzed using a minigene assay. The DNA sequence encoding the pseudo-exon and its flanking 5' and 3' regions was inserted into a pCIneo plasmid (Fig. 2b). Two constructs were developed, one with the normal sequence as a control (C construct) and one with the c.14646+2563C>T mutation (M construct). Each minigene was transfected in HEK293 cells, which do not express any endogenous RyR1. Two days after transfection, an RT-PCR analysis of minigene splicing was performed (Fig. 2b). Only one fragment was amplified from cells transfected with the control C construct (Fig.2b, lane 1), while two fragments were amplified from cells transfected with the mutant M construct (Fig. 2b, lane 2). This confirmed that the paternal intronic c.14646+2563C>T mutation by

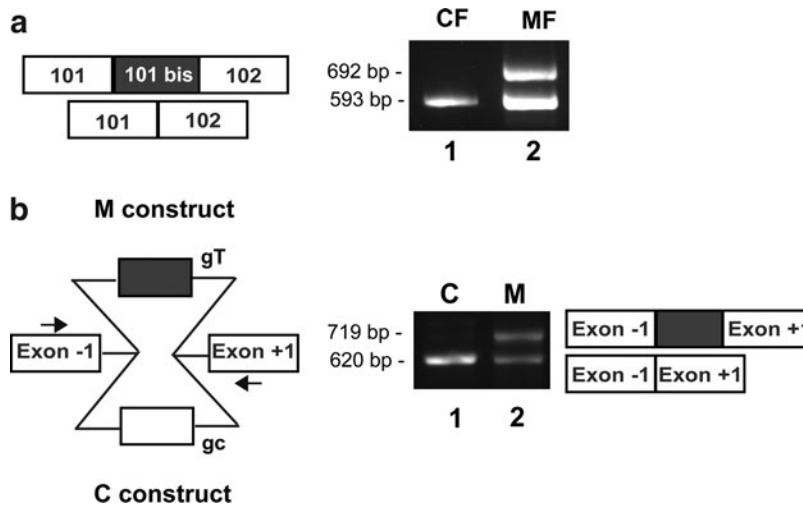


FIG. 2. Characterization of the paternal c.14646+2563C>T mutation. **(a)** RT-PCR performed on CF and MF cells differentiated during 4 days. RT-PCR amplification was performed on the region c.14438–15030 of RYR1 including exons 101 and 102. Size analysis of the amplified fragments showed the presence of a normal-sized fragment of 593 bp and of an abnormal 692 bp fragment in MF cells (lane 2), while only the normal-sized fragment is present in CF cells (lane 1). **(b)** Scheme of the minigene constructs used for the analysis of the c.14646+2563C>T mutation. RYR1 intronic regions containing sequence of the pseudo-exon, with (gray) or without (white) the mutation, were inserted into a pCIneo vector between exons -1 and +1. An RT-PCR amplification using a forward primer in exon -1 and a reverse primer in exon +1 (arrows) was performed on HEK 293 cells transfected with each minigene construct. Size analysis of the amplified fragments showed the presence of a unique fragment of 620 bp in HEK293 cells transfected with the C construct (lane 1), corresponding to the normal splicing, and of two fragments of 620 and 719 bp in HEK293 cells transfected with M construct (lane 2), corresponding to the inclusion of the pseudo-exon. The identity of these fragments was confirmed by sequencing. CF, control fetal; MF, mutant fetal; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

itself was sufficient to induce the insertion of a 99 bp sequence and that the mutation was of incomplete penetrance, at least in HEK293 cells.

Exon-skipping strategy for removal of the 101bis pseudo-exon

We have previously shown that the insertion of the 99 bp pseudo-exon in RyR1 mRNA considerably lowered the amount of the RyR1 protein in skeletal muscles (ind II:3) without affecting the total amount of RyR1 transcripts (Monnier *et al.*, 2008). In the present study, we tested whether a removal of the pseudo-exon by exon skipping would restore the normal transcript expression, increase the RyR1 protein expression and restore Ca^{2+} releases. We designed seven 2'-O-methyl AONs (A to G; Table 1) with a phosphorothioate backbone. The ability of these AONs to force the skipping of the pseudo-exon was evaluated by transfection of MF cells with each AON followed by their differentiation into myotubes. Total RNA was extracted from transfected myotubes and RT-PCR was performed on RyR1 mRNA to amplify the region including exons 101 and 102 (Fig. 3a). The efficiency of each AON, evaluated by quantification of the relative amount of abnormal splicing compared with the total amount of PCR products (normal transcript plus abnormal transcript), is presented on Figure 3b. Results showed that AON-D and AON-E, targeting putative ESE of pseudo-exon 101bis, were the most efficient in reducing the relative amount of abnormal splicing (respectively, 37% and 70% of aberrant transcript reduction) (Fig. 3b). These AONs were tested pair-wisely by simultaneous transfection, and the D+E pair induced the most

effective exon skipping (Fig. 3b, 82% reduction of aberrant transcript).

Lentiviral-induced skipping of pseudo-exon 101bis

Cell transfection with the different AONs allowed us to select the most efficient ones. However, transfection induced a large mortality of the cells incompatible with their subsequent characterization by calcium imaging. We therefore decided to use lentiviral vectors to insert the AONs into the cells. Recent advances have been made in antisense approaches using small nuclear RNAs (snRNAs) and U7 snRNP has been used for splicing modulation as it offers many advantages: stability of the antisense sequence, specific subcellular co-localization with target pre-mRNAs, and the possibility of a long-term correction when introduced with viral vectors (for review, cf. Benchaouir and Goyenvalle, 2012). U7-snRNAs with antisense sequences corresponding to AONs D+E (called U7-D+E), and with a fluorescein-isothiocyanate-labeled scramble AON (U7-Ctrl; Table 1) were developed and inserted in lentiviral vectors. MF cells were transduced with these vectors, differentiated, and analyzed for RyR1 transcripts as previously described. As expected, RT-PCR analysis showed that U7-D+E was very efficient in skipping the 101bis pseudo-exon at the mRNA level (reduction of 80% of the relative amount of aberrant transcript), while the U7-Ctrl had no effect (Fig. 3c and d). To assess that no modification in the total amount of RyR1 transcripts was observed between the three conditions (MF, MF+U7-CTRL, and MF+U7-D+E), a PCR amplification of exons 103–105 of RyR1 mRNA was performed and normalized to the reference gene human acidic phosphoprotein—PO (data not shown).

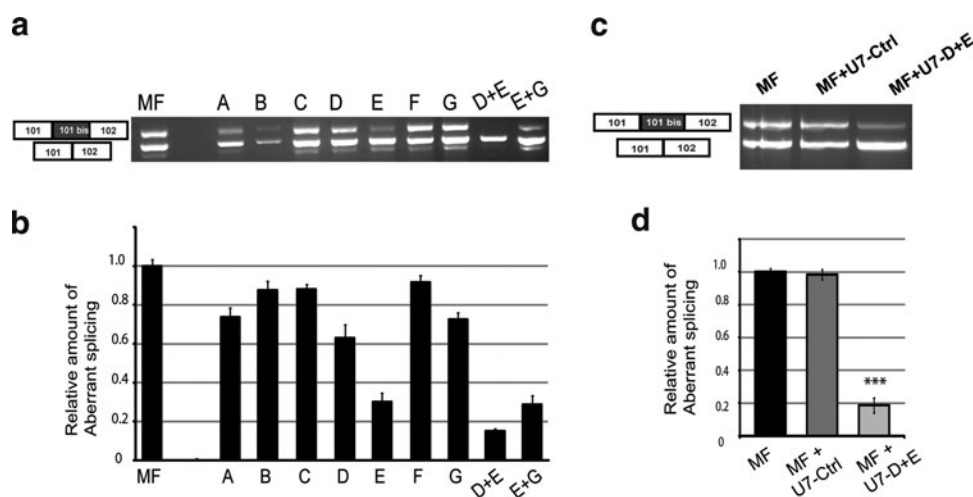


FIG. 3. Test of AONs and lentiviral vectors to skip the 101bis pseudo-exon. (a) Seven AONs (A to G) were tested on MF cells for their capacity to skip the pseudo-exon. MF cells were either not transfected (lane MF) or transfected with each of the AONs (A to G) or with pairs of AONs (D+E or E+G). Cells were then induced to differentiate for 4 days and RT-PCR was performed using same primers as in Fig. 2a. (b) Ratios of the amount of pseudo-exon-containing fragment versus the total amount of amplified fragments (normal + pseudo-exon containing fragments) were calculated for each condition and normalized to 1 for nontransfected MF cells. Results are given as mean \pm SEM of three experiments. (c) Lentiviral U7-snRNA vectors containing antisense sequences corresponding to a nonrelevant control AON (U7-Ctrl) or to AONs D+E (U7-D+E) were tested for their efficacy to skip the pseudo-exon. MF cells were either not transduced (lane MF), or transduced with U7-Ctrl or U7-D+E vectors. Cells were then induced to differentiate for 4 days and RT-PCR was performed as in (a). (d) Quantifications were performed as in (b), and the mean \pm SEM of four experiments is plotted. *** $p < 0.001$, Student's *t*-test comparison of MF and MF U7-D+E cells. AONs, antisense oligonucleotides; snRNA, small nuclear RNA.

Skipping of the 101bis pseudo-exon in MF myotubes increases amount of the RyR1 protein and has a trophic effect

Quantification of the RyR1 protein in differentiated myotubes could not be assessed using Western blot because RyR1 levels in whole cell homogenates were below the detection limits of the technique. Therefore, we used image analysis after immunofluorescent staining of the myotubes to evaluate the relative amount of RyR1 compared with MyHC. Similar image analysis methods have been used to quantify dystrophin in dystrophinopathy muscle specimens (Taylor *et al.*, 2012). MyHC is a marker of differentiation whose expression increases during differentiation as observed for RyR1. Hence, the quantification of RyR1 compared with MyHC allowed to get rid of a possible altered differentiation related to RyR1 reduction (Porter *et al.*, 2002). The relative amounts of RyR1 were evaluated in differentiated control (CF) or mutant (MF) cells with or without transduction with U7-Ctrl or with U7-D+E (Fig. 4a and c). RyR1 presented the typical dotted pattern found in immunofluorescent staining of muscle cells (Fig 4a insets). The relative amounts of RyR1 in MF myotubes were about twofold lower than those in control CF myotubes (Fig. 4c), in good correlation with the results obtained in Western blot on muscle biopsy from ind III:1 (Fig 1b). Treatment of MF cells with U7-Ctrl did not change the level of RyR1 in myotubes. In contrast, treatment of MF cells with U7-D+E raised the relative amounts of RyR1 by approximately 1.5-fold (Fig. 4c).

In addition, an effect on the morphology of myotubes concomitant to the increase in the relative amount of RyR1 was observed (Fig. 4a, b, and d). CF myotubes were significantly larger than MF myotubes (mean width $11 \pm 0.4 \mu\text{m}$ for CF myotubes and $4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ for MF myotubes, $p < 0.001$; Fig. 4d). Treatment of MF cells with U7-D+E induced a significant increase in the width of myotubes compared with untreated MF myotubes (mean width after treatment $7.8 \pm 0.3 \mu\text{m}$, $p < 0.001$; Fig. 4d), with a redistribution of widths toward those of normal CF myotubes (Fig. 4b). Treatment of MF cells with U7-Ctrl had no effect on myotubes' width. Altogether, the lentiviral vector U7-D+E increased RyR1 protein levels in MF cells, and favored a restoration of the myotubes' width.

Skipping of the 101bis pseudo-exon restores calcium release capacities in affected cells

Functionality of the RyR1 protein was further tested by calcium imaging. RyR1 is specifically expressed in differentiated muscle cells, where it is the main intracellular calcium channel involved in excitation–contraction coupling (Brillantes *et al.*, 1994; Kyselovic *et al.*, 1994; Tarroni *et al.*, 1997). Depolarization of the muscle plasma membrane activates the DHPR, which induces the opening of RyR1 and the release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. Therefore, activity of RyR1 calcium channel was tested using calcium imaging on cultured myotubes, by direct RyR1 stimulation using its agonist CmC to assay the channel function of the restored protein, and by plasma membrane depolarization to assay its functional coupling to DHPR.

Calcium imaging experiments were performed on myotubes produced from control CF cells, untreated MF cells, or MF cells transduced with U7-Ctrl or U7-D+E (Fig. 5). Direct

RyR1 stimulation was first assayed by 4-Chloro-m-Cresol (Fig. 5a), at a concentration resulting in maximal calcium release ($EC_{50} \approx 100 \mu\text{M}$; Hermann-Frank *et al.*, 1996). Addition of $500 \mu\text{M}$ CmC to MF myotubes induced a calcium release of reduced amplitude compared with CF myotubes ($\Delta F/F_0 = 0.24 \pm 0.06$, $n = 65$ and $\Delta F/F_0 = 1.21 \pm 0.11$, $n = 90$, for MF and CF myotubes, respectively, $p < 0.0001$), the peak amplitude in MF myotubes being 20% of control CF myotubes (Fig. 5a). This reduced calcium release was not significantly modified by transduction by U7-Ctrl, and fully restored by transduction with U7-D+E ($p < 0.0001$). Function of the whole calcium release complex, and functional coupling between DHPR and RyR1 were further tested by membrane depolarization. Addition of 140mM KCl in the presence of extracellular calcium induces a membrane depolarization close to 0mV , and leads to an almost maximal stimulation of DHPR (Rezgui *et al.*, 2005). It resulted in a calcium release of much lower amplitude in MF cells ($\Delta F/F_0 = 0.77 \pm 0.03$, $n = 232$) than in control CF cells ($\Delta F/F_0 = 2.18 \pm 0.18$, $n = 85$, $p < 0.0001$), the amplitude of the peak in MF myotubes corresponding to 35% of the amplitude observed in CF myotubes (Fig. 5b). Transduction of MF cells with U7-Ctrl had no effect, the amplitude of depolarization-induced calcium release being identical to MF cells. On the opposite, transduction with U7-D+E almost fully restored normal depolarization, the amplitude of the calcium release being not statistically different from control cells ($\Delta F/F_0 = 2.08 \pm 0.08$, $n = 252$ for MF cells transduced with U7-D+E, $p = 0.64$ between CF and MF U7-D+E, and $p < 0.0001$ between MF and MF U7-D+E). Using both stimulations (CmC and KCl) the levels of calcium release in MF myotubes treated with U7-D+E were therefore comparable to those in control CF myotubes. These results demonstrated that the RyR1 calcium channel restored by exon skipping using the lentiviral vector U7-D+E was fully functional, correctly coupled to DHPR, and able to sustain calcium release from the sarcoplasmic reticulum to the cytoplasm.

Discussion

This study is the first example of an exon-skipping strategy applied to a congenital core myopathy—in this case, a severe form of CCD. The disease was caused by compound heterozygous mutations on the *RYR1* gene, inducing an important drop in the amount of the RyR1 protein. The intronic paternal mutation resulted in a reduction in the amount of protein to 57% of a control muscle, the affected heterozygous individuals being pauci symptomatic (Monnier *et al.*, 2008). In the severely affected child, the maternal mutation induced a further reduction in RyR1 to 35% of the amount observed in a control. We applied an exon-skipping strategy to skip the paternal pseudo-exon in order to restore an asymptomatic phenotype as observed for the mother. The goal of this study was thus to increase the amount of the RyR1 protein in affected muscle cells, and to test the functionality of the restored protein.

Exon skipping was performed on fetal muscle MF cells with the two mutations, using U7-AON vectorized in lentiviral vectors. The efficiency of exon skipping, shown by RT-PCR at the mRNA level, was further evaluated at the protein level by immunofluorescent staining and image analysis. The relative amount of the RyR1 protein in MF myotubes was

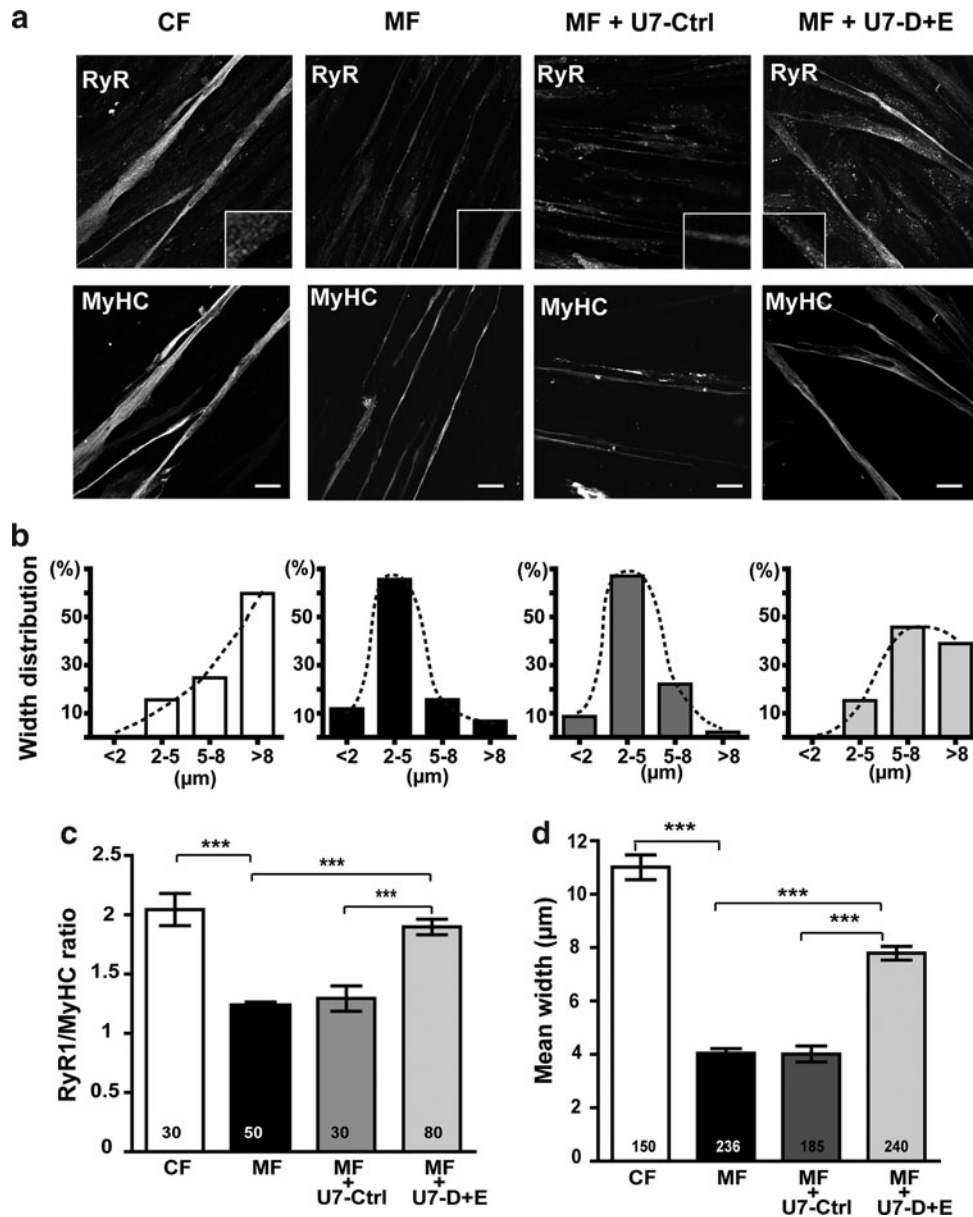


FIG. 4. Lentiviral vector treatments restore amounts of the RyR1 protein and affect the size of differentiated MF cells. **(a)** Control CF cells, untreated MF cells, or MF cells treated with U7-Ctrl vector or with U7-D+E vector were induced to differentiate for 8 days, and immunolabeled with antibodies against RyR1 and myosin heavy chain (MyHC). A magnification of RyR1 labeling is presented in the insets. Scale bars = 20 μm . **(b)** Width distribution of myotubes. Each myotube was classified in one of the four categories according to its largest measured width (<2 μm , 2–5 μm , 5–8 μm , and >8 μm). The distribution of the myotube population in the four categories is represented for each condition (number of myotubes indicated in **(d)**). **(c)** Quantification by image analysis of the mean fluorescence intensity of RyR1 staining in myotubes relative to the mean fluorescence intensity of MyHC staining, presented as mean \pm SEM. The mean fluorescence intensity of MyHC staining is not statistically different between the different conditions. The number of myotubes used for quantification is indicated in each bar of the plot. **(d)** Mean width of myotubes was calculated and results given in μm as mean \pm SEM of the number of myotubes indicated in each bar. *** $p < 0.001$, ANOVA analysis followed by Bonferroni multiple comparison test. ANOVA, analysis of variance.

reduced compared with CF myotubes, and significantly restored after treatment of MF cells by U7-D+E lentiviral vector. The precise evaluation of the amount of RyR1 in treated MF cells was not possible, but theoretically could not reach the amount in control cells because of the conjugated effect of the uncorrected maternal mutation and the incomplete skipping of pseudo-exon 101bis. Nevertheless, we

showed that the abnormal RyR1 transcript was reduced five times by exon skipping, which suggested that the amount of the RyR1 protein in corrected cells was probably almost similar to the amount in the asymptomatic mother.

Functional studies using calcium imaging on MF myotubes allowed us to evaluate whether the RyR1 protein recovered by exon skipping was functional. Amplitude of

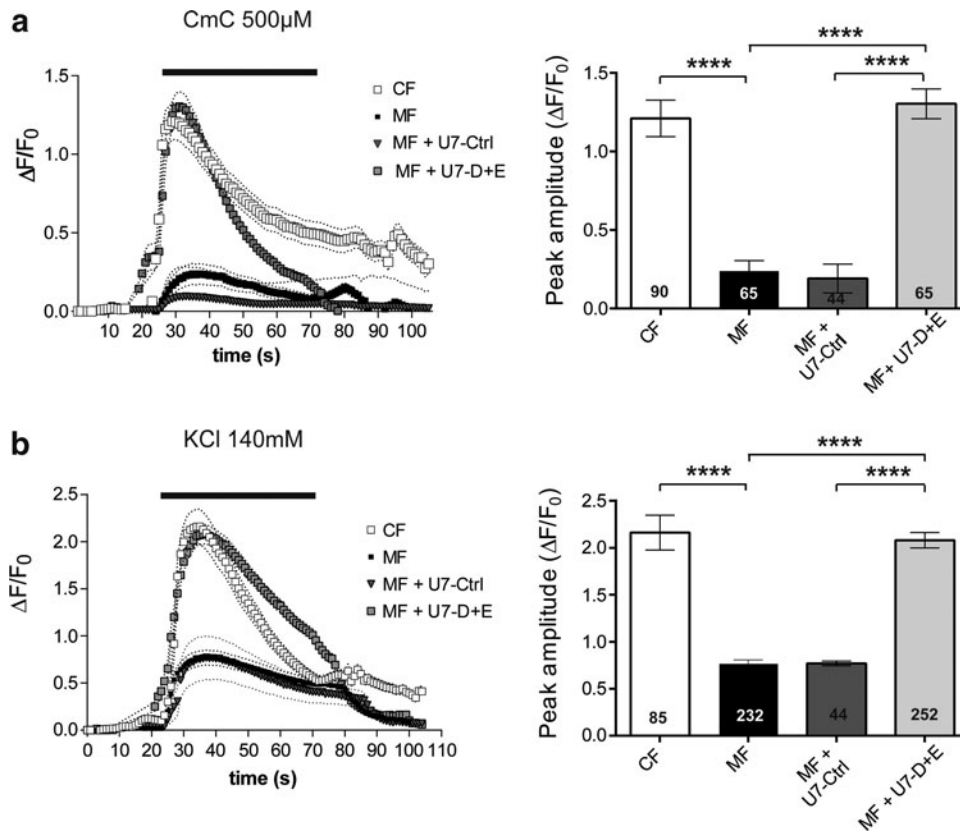


FIG. 5. Lentiviral vector treatments restore the RyR1 calcium release activity in differentiated MF cells. Calcium imaging performed on control CF cells (empty square), untreated MF cells (black square), and MF cells treated with U7-Ctrl vector (black triangle) or with U7-D+E vector (gray square), and differentiated for 8–10 days before calcium imaging. **(a)** Fluorescence variation curves induced by application during 50 sec (black bar) of CmC ($500\ \mu\text{M}$) in the presence of $2\ \text{mM}$ external calcium, presented as mean (symbols) \pm SEM (dotted lines). The maximal amplitude of the peak for each curve is presented in the bar plots on the right, with the number of myotubes analyzed in each bar. **(b)** Fluorescence variation curves induced by membrane depolarization (KCl $140\ \text{mM}$) applied during 50 sec (black bar) in the presence of $2\ \text{mM}$ external calcium, presented as mean (symbols) \pm SEM (dotted lines). **** $p < 0.0001$, ANOVA analysis followed by Bonferroni multiple comparison test. CmC, 4-Chloro-m-Cresol.

calcium releases in untreated MF cells was about 20–35% of that in control cells, in good correlation with the massive reduction in the RyR1 amount observed in the proband III.1 (remaining RyR1 quantity evaluated to 35%). Treatment of MF myotubes with the U7-D+E vector resulted in calcium releases of amplitude equivalent to that observed in control myotubes. This increase in calcium releases of amplitude showed that restored RyR1 was functional. Moreover, it suggested that the restored level of RyR was sufficient to trigger calcium release of normal amplitude, raising the question of the quantity of RyR1 necessary for a correct muscle function. Interestingly, individual II-3, with an RyR1 amount of 57% of a control, showed only mild signs of muscle weakness. Patients with null mutations, that is, resulting in the absence of expression of one allele of *RYR1* and leading to a 50% reduction in the amount of RyR1 at a protein level, have been shown to be asymptomatic or to present with mild phenotype (Zhou *et al.*, 2007; Monnier *et al.*, 2008). In the same way, and although no muscle biopsy was available to precisely quantify RyR1, the presence of a heterozygous splice mutation in the asymptomatic mother (ind II-1) was likely to result in a reduced expression of RyR1. On the basis of this observation, it can thus be hy-

pothesized that reaching an RyR1 expression of 100% is not necessary to sustain a normal muscle function. Such an observation has already been done when exon-skipping strategy was applied to the chloride channel in myotonic dystrophy (Wheeler *et al.*, 2007).

Our data demonstrate that exon skipping could be a relevant therapeutic strategy for an *RYR1* splicing mutation resulting in the inclusion of a pseudo-exon and involved in CCD, because (i) the restored protein is a completely normal one, in contrast with the truncated dystrophin or the mini-dysferlin re-expressed after exon skipping in Duchenne muscular dystrophy (DMD) or dysferlinopathy (Goyenvall *et al.*, 2004; Wein *et al.*, 2010), and (ii) it is not necessary to reach a full correction of the abnormal transcript and to restore 100% of the normal protein to reach normal levels of calcium release. Splice mutations account for 10–15% of *RYR1* mutations involved in CCD, and pseudo-exon creating mutations constitute about 1–2% of RyR1 mutations identified up to now. This proportion is probably underestimated because these mutations are difficult to identify and need the analysis of RyR1 mRNA from a muscle biopsy. Exon-skipping strategy could most probably not be applied to any *RYR1* mutation, and it would not be possible to suppress a whole

exon affected by a point mutation, as it has been done for dystrophin or dysferlin. Indeed, a number of the central exons of dystrophin have been shown to be skippable, with no or only mild effect. This is not the case for RyR1, in which no exon has been identified as needless up to now.

An unexpected observation was the effect of exon skipping on myotube morphology: MF myotubes were very thin compared with control myotubes, and this morphologic feature was reversed by transduction with U7-D+E lentivirus. This effect on myotube morphology was specific of the vector inducing a skipping of the aberrant RyR1 pseudo-exon. An effect of the aberrant transcript *per se* cannot be ruled out (either a toxic effect on myotube differentiation or an induction of a degradation pathway), but it was most probably the increase in the normal RyR1 transcript/protein that was the cause of this trophic effect. The molecular mechanisms underlying the link between restoration of the RyR1 normal mRNA/protein and the trophic effect on myotubes are not yet understood. They could be related to an altered differentiation in the absence of RyR1. Even if expressed mainly in differentiated muscle cells with a major function in the calcium releases for contraction, other functions could be associated to this calcium channel in early maturation steps. The RyR1 protein has already been described as important for normal myofiber morphogenesis and muscle development *in vivo*. Indeed, the RyR1-null mice exhibited muscular degeneration associated with excitation-contraction uncoupling (Takeshima *et al.*, 1994; Barone *et al.*, 1998). Similar muscle degeneration was observed in the *mdg* mouse line, devoid of the alpha-1 subunit of DHPR (Banker, 1977; Chaudhari, 1992). Therefore, deletion of RyR1 or alpha-1 could alter the first steps of muscle formation. We have also recently observed that *in vivo* downregulation of the alpha-1 subunit of skeletal muscle DHPR induced massive muscle atrophy (Pietri-Rouxel *et al.*, 2010). The situation is less clear for *in vitro* studies using cultured cells. Primary cultures produced from atrophic RyR1-null muscles or alpha-1-null muscles are, nevertheless, still able to form myotubes *in vitro*. In contrast, perturbation of intracellular calcium levels by several drugs targeting either RyR1 or its partner the DHPR inhibits myoblast differentiation (Seigneurin-Venin *et al.*, 1996; Porter *et al.*, 2002). Therefore, it is tempting to speculate that the presence of RyR1 and DHPR, or the precise control of intracellular calcium level, is important not only for muscle contraction during the excitation-contraction coupling, but also for myotube formation and/or for maintenance of muscle mass. In this case, the trophic effect of U7 exon-skipping vectors on MF cells reflects the restoration of a functional RyR1 protein in an indirect manner.

Overall, the present study describes a successful exon-skipping strategy for the correction of the genetic cause of a core myopathy in affected human cells. In the case studied here, the severe form of CCD was caused by a massive drop of RyR1 calcium channel expression, and the exon-skipping strategy was efficient both to increase the amount and to restore the activity of RyR1. This is the first time that such an efficient functional restoration is observed after exon skipping. In DMD, the ongoing clinical trials demonstrate an increase in dystrophin expression up to 18% of normal level after exon skipping, but this level seems too low to restore a correct muscle function. It has been shown very recently that molecules able to block RyR1 (dantrolene, ryanodine, S107)

improve the efficiency of exon skipping in DMD patients cells (Kendall *et al.*, 2012). The underlying mechanisms are still unknown, but it can be hypothesized that the improved exon-skipping efficiency in presence of these chemicals is related to their ability to reduce the amount of calcium released in the cytoplasm, which could affect the splicing through the calcium regulation of spliceosomal components (Krebs, 2009). In the case presented here, the cytosolic calcium reduction is a direct consequence of the mutation, and therefore could also be responsible for the high efficiency of the exon skipping. Therefore, this model study paves the way for therapies for core myopathies, even beyond similar *RYR1* splicing alterations. Indeed, other therapies targeting mRNA such as trans-splicing or exon exchange are extremely promising, but as they have a much lower efficiency (Lorain *et al.*, 2010) their use in future therapies is related to improvement of splicing. If improved splicing in skeletal muscle is correlated to reduced function of RyR1, then therapies based on exon exchange could be assayed for patients with any *RYR1* mutation leading to a reduced RyR1 function, for whom it would be possible to successfully exchange the mutant exon(s) for normal one(s). All the tools developed in this work (calcium imaging, myotube morphology, etc.) will help for evaluation of any gene therapy aimed at the restoration of functional RyR1.

Acknowledgments

We thank all family members for their contribution to this study. We thank the Myocastor study group for fruitful discussions and the Genethon (Evry, France) for lentiviral production. This work was supported by grants from the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (INSERM), the "Association Française contre les Myopathies" (AFM), the "Fondation Daniel Ducoin," the "Direction de la Recherche Clinique du CHU Grenoble," and the "Vivier de la Recherche de la Faculté de Médecine de Grenoble."

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist for this study.

References

- Aartsma-Rus, A., Janson, A.A., Kaman, W.E., *et al.* (2003). Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum. Mol. Genet.* 12, 907–914.
- Aartsma-Rus, A., van Vliet, L., Hirschi, M., *et al.* (2009). Guidelines for antisense oligonucleotide design and insight into splice-modulating mechanisms. *Mol. Ther.* 17, 548–553.
- Banker, B.Q. (1977). Muscular dysgenesis in the mouse (*mdg/mdg*). I. Ultrastructural study of skeletal and cardiac muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 36, 100–127.
- Barone, V., Bertocchini, F., Bottinelli, R., *et al.* (1998). Contractile impairment and structural alterations of skeletal muscles from knockout mice lacking type 1 and type 3 ryanodine receptors. *FEBS Lett.* 422, 160–164.
- Benchaouir, R., and Goyenvalle, A. (2012). Splicing modulation mediated by small nuclear RNAs as therapeutic approaches for muscular dystrophies. *Curr. Gene Ther.* 12, 179–191.
- Brillantes, A.M., Bezprozvannaya, S., and Marks, A.R. (1994). Developmental and tissue-specific regulation of rabbit skeletal

- and cardiac muscle calcium channels involved in excitation-contraction coupling. *Circ. Res.* 75, 503–510.
- Charrier, S., Stockholm, D., Seye, K., *et al.* (2005). A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knockout mice. *Gene Ther.* 12, 597–606.
- Chaudhari, N. (1992). A single nucleotide deletion in the skeletal muscle-specific calcium channel transcript of muscular dystogenesis (mdg) mice. *J. Biol. Chem.* 267, 25636–25639.
- Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., *et al.* (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* 378, 595–605.
- Davis, M.R., Haan, E., Jungbluth, H., *et al.* (2003). Principal mutation hotspot for central core disease and related myopathies in the C-terminal transmembrane region of the RYR1 gene. *Neuromuscul. Disord.* 13, 151–157.
- De Cauwer, H., Heytens, L., and Martin, J.J. (2002). Workshop report of the 89th ENMC International Workshop: Central Core Disease, 19–20 January 2001, Hilversum, The Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* 12, 588–595.
- Desmet, F.O., Hamroun, D., Lalande, M., *et al.* (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 37, e67.
- Ferreiro, A., Monnier, N., Romero, N.B., *et al.* (2002). A recessive form of central core disease, transiently presenting as multi-minicore disease, is associated with a homozygous mutation in the ryanodine receptor type 1 gene. *Ann. Neurol.* 51, 750–759.
- Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., *et al.* (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 4929–4934.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougousse, F., *et al.* (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796–1799.
- Hammond, S.M., and Wood, M.J. (2011). Genetic therapies for RNA mis-splicing diseases. *Trends Genet.* 27, 196–205.
- Herrmann-Frank, A., Richter, M., Sarközi, S., *et al.* (1996) 4-Chloro-m-cresol, a potent and specific activator of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1289, 31–40.
- Jungbluth, H. (2007). Central core disease. *Orphanet J. Rare Dis.* 2, 25.
- Jungbluth, H., Muller, C.R., Halliger-Keller, B., *et al.* (2002). Autosomal recessive inheritance of RYR1 mutations in a congenital myopathy with cores. *Neurology* 59, 284–287.
- Kendall, G.C., Mokhonova, E.I., Moran, M., *et al.* (2012) Dantrolene enhances antisense-mediated exon skipping in human and mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 4, 164ra160.
- Kyselovic, J., Leddy, J.J., Ray, A., *et al.* (1994). Temporal differences in the induction of dihydropyridine receptor subunits and ryanodine receptors during skeletal muscle development. *J. Biol. Chem.* 269, 21770–21777.
- Krebs, J. (2009). The influence of calcium signaling on the regulation of alternative splicing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1793, 979–984.
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003996.
- Lee, J.M., Rho, S.H., Shin, D.W., *et al.* (2004). Negatively charged amino acids within the intraluminal loop of ryanodine receptor are involved in the interaction with triadin. *J. Biol. Chem.* 279, 6994–7000.
- Lorain, S., Peccate, C., Le Hir, M., and Garcia, L. (2010). Exon exchange approach to repair Duchenne dystrophin transcripts. *PLoS One.* 5, e10894.
- Lynch, P.J., Tong, J., Lehane, M., *et al.* (1999). A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal Ca²⁺ release channel function and severe central core disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4164–4169.
- Marty, I., Robert, M., Villaz, M., *et al.* (1994). Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2270–2274.
- Monnier, N., Romero, N.B., Lerale, J., *et al.* (2001). Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2581–2592.
- Monnier, N., Ferreiro, A., Marty, I., *et al.* (2003). A homozygous splicing mutation causing a depletion of skeletal muscle RYR1 is associated with multi-minicore disease congenital myopathy with ophthalmoplegia. *Hum. Mol. Genet.* 12, 1171–1178.
- Monnier, N., Marty, I., Faure, J., *et al.* (2008). Null mutations causing depletion of the type 1 ryanodine receptor (RYR1) are commonly associated with recessive structural congenital myopathies with cores. *Hum. Mutat.* 29, 670–678.
- Naldini, L. (1998). Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 457–463.
- Pietri-Rouxel, F., Gentil, C., Vassilopoulos, S., *et al.* (2010). DHPR alpha1S subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J.* 29, 643–654.
- Porter, G.A. Jr., Makuck, R.F., and Rivkees, S.A. (2002). Reduction in intracellular calcium levels inhibits myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 277, 28942–28947.
- Reuter, J.S., and Mathews, D.H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics* 11, 129.
- Rezgui, S.S., Vassilopoulos, S., Brocard, J., *et al.* (2005). Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J. Biol. Chem.* 280, 39302–39308.
- Romero, N.B., Monnier, N., Viollet, L., *et al.* (2003). Dominant and recessive central core disease associated with RYR1 mutations and fetal akinesia. *Brain* 126, 2341–2349.
- Roux-Buisson, N., Rendu, J., Denjoy, I., *et al.* (2011). Functional analysis reveals splicing mutations of the CASQ2 gene in patients with CPVT: implication for genetic counselling and clinical management. *Hum. Mutat.* 32, 995–999.
- Seigneurin-Venin, S., Parrish, E., Marty, I., *et al.* (1996). Involvement of the dihydropyridine receptor and internal Ca²⁺ stores in myoblast fusion. *Exp. Cell Res.* 223, 301–307.
- Spitali, P., and Aartsma-Rus, A. (2012). Splice modulating therapies for human disease. *Cell* 148, 1085–1088.
- Takekura, H., Iino, M., Takekura, H., *et al.* (1994). Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369, 556–559.
- Taniguchi-Ikeda, M., Kobayashi, K., Kanagawa, M., *et al.* (2011). Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 478, 127–131.
- Tarroni, P., Rossi, D., Conti, A., and Sorrentino, V. (1997). Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272, 19808–19813.

- Taylor, L.E., Kaminoh, Y.J., Rodesch, C.K., and Flanigan, K.M. (2012). Quantification of dystrophin immunofluorescence in dystrophinopathy muscle specimens. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38, 591–601.
- Vulin, A., Barthelemy, I., Goyenville, A., *et al.* (2012). Muscle function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping. *Mol. Ther.* 20, 2120–2133.
- Wein, N., Avril, A., Bartoli, M., *et al.* (2010). Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum. Mutat.* 31, 136–142.
- Wheeler, T.M., Lueck, J.D., Swanson, M.S., *et al.* (2007). Correction of ClC-1 splicing eliminates chloride channelopathy and myotonia in mouse models of myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* 117, 3952–3957.
- Zhou, H., Jungbluth, H., Sewry, C.A., *et al.* (2007). Molecular mechanisms and phenotypic variation in RYR1-related congenital myopathies. *Brain* 130, 2024–2036.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.

Address correspondence to:

Dr. Isabelle Marty
GIN Inserm U836
Eq. 4, Bat EJ Safra
Chemin Fortune Ferrini
38700 La Tronche
France

E-mail: isabelle.marty@ujf-grenoble.fr

Received for publication March 3, 2013;
accepted after revision June 15, 2013.

Published online: June 27, 2013.