



HAL
open science

Physiopathologie et validation préclinique dans les myopathies centronucleaires

Hichem Tasfaout

► **To cite this version:**

Hichem Tasfaout. Physiopathologie et validation préclinique dans les myopathies centronucleaires. Rhumatologie et système ostéo-articulaire. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ066 . tel-03202487

HAL Id: tel-03202487

<https://theses.hal.science/tel-03202487v1>

Submitted on 20 Apr 2021

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

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



École doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire

THÈSE présentée par :

Hichem TASFAOUT

soutenue le : 25 Septembre 2017

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Science de la vie, biologie, biochimie

**Physiopathologie et validation
préclinique dans les myopathies
centronucléaires**

THÈSE dirigée par :

Mr. LAPORTE Jocelyn

docteur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme. PILOT-STORCK Fanny

docteur, école nationale vétérinaire d'Alfort

Mr. GARCIA Luis

docteur, université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Mme. RICHARD Isabelle

docteur, université Evry Val d'Essonne

Mme. FRIANT Sylvie

docteur, université de Strasbourg

*Je dédie cette thèse à mon grand-père maternel El-Bachir que je n'ai pas connu,
à mon grand-père paternel Abdeslem de qui je ne garde qu'un vague souvenir
et à mes deux grand-mères Fatima-Zohra et Aïcha*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury, le Dr **Fanny PILOT-STORCK**, le Dr **Isabelle RICHARD**, le Dr **Sylvie FRIANT** et le Dr **Luis GARCIA**, pour avoir accepté mon invitation et m'avoir accordé du temps pour évaluer mon travail de thèse. Je souhaite aussi remercier le Dr **Antoine KICHLER** et le Dr **Luis GARCIA** d'avoir participé au suivi de ce travail depuis le début. Vos conseils et suggestions m'ont grandement aidé à concevoir de nouvelles expériences et interpréter les résultats obtenus.

Ensuite, je souhaite remercier chaleureusement mes deux co-encadrants, **Belinda** et **Jocelyn**. Merci à toi Jocelyn de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire, de m'avoir confié ce projet et de m'avoir fait confiance pendant toutes ces années passées dans ton équipe. Un énorme merci à Bélinda. Je te remercie pour ta supervision, ta patience, ta positivité et ton enthousiasme. Du fond du cœur, merci à tous les deux pour la liberté que vous m'avez accordée, votre disponibilité sans limite et vos conseils.

Un gigantesque merci à la « MAD team », où plutôt la « MAD family ». J'ai vécu avec vous une des plus agréables phases de ma vie. Vous étiez tous formidables. Merci à tous ces bons gâteaux, glaces, crêpes, resto...etc. Vous pouvez être contents car à cause de vous j'ai remplacé 10 kilos de muscle par 10 kilo de gras, heureusement que je me suis marié au début de ma thèse...ouf ! Vous avez tous contribué à mon épanouissement pendant cette aventure.

Une aventure qui n'aurait jamais pu commencer si **Johann** (mon tuteur de U.E souris transgéniques pendant mon master de pharmaco, que toutes les filles trouvaient beau et charmant) n'avait pas transmis ma candidature pour le stage de Master à Jocelyn. Merci Johjoh pour tes lumières en génétique et en clonage. Je te souhaite bon courage dans ton exploration du monde des TAM.

Un énorme merci à **Suzie** qui m'a aidé dans l'élaboration des manip, l'interprétation des résultats et pour son soutien moral. J'ai vraiment apprécié ta compagnie, t'es une personne magnifique et je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite. Je suis sûr que tu seras un atout majeur dans la réussite de Dynacure. Par la même occasion, je souhaite une bonne continuation à l'équipe Dynacure : **Catherine, Anne, Marion, Leen, Stéphane** et **Frédéric**. Je suivrai de très près l'évolution de cette start-up que j'ai vu naître.

Un grand merci à dame violette, **Cricri**. Ta joie communicative et ta bonne humeur a facilité mon intégration dans l'équipe. Merci pour ta bienveillance, ton assistance et ton aide précieuse.

A toi petite **Pèche**, merci pour ton amitié, ta gentillesse et aussi tes coups de gueule de camerounaise. Nous avons commencé en même temps nos thèses mais t'as soutenu 9 mois avant moi, ce qui fait 9 long mois de respect. Je te souhaite beaucoup de bonheur ma chère **Arielle** dans ta vie personnelle et professionnelle.

Vient ensuite mon poto, mon tuteur dans les activités paternelles, mon DJ préféré, j'ai nommé **Pascal**. Tu as rejoint l'équipe qu'à la 2^{ème} moitié de ma thèse mais tu m'as aidé à la terminer

dans la joie et la folie. Merci à toi et à **Magalie** de nous avoir aidé à préparer la naissance de mon fils.

Je pense également à **Anne-Sophie**. Merci m'avoir proposé ton aide pour les corrections de mon manuscrit. Je garderai en tête de très bons souvenirs des 2 années passées avec toi. Tes critiques scientifiques très constructives, ton organisation, ta gentillesse et ta disponibilité pour les autres font de toi un exemple à suivre pour tous les jeunes chercheurs. Merci du fond du cœur.

Merci à mes voisins de paillasse. **Ivana**, tu m'as initié à la recherche et j'ai appris beaucoup de choses grâce à toi. Merci de m'avoir aidé au début, d'avoir été toujours à l'écoute et d'être très ouverte d'esprit. **Aymen**, tout d'abord merci pour les boites Masmoudi et ses gâteaux tunisiens. A cause de toi, je n'ai pas pu respecter un seul régime ! Merci pour ta disponibilité et ta générosité. Keep going, tu vas changer toutes les mutations génétiques avec tes CRISPR-CAS9. **Matthieu**, un vrai guide Michelin celui-là. Tu connais tous les restaurants de la région. Merci pour les discussions qu'on a eues et bon courage pour ta future carrière d'enseignant.

Un grand merci à « Bridget Jones » du groupe, **Vale** et sa maladresse. Grazie mille pour ta folie, ta bonne humeur et ton aide. Merci aux généticiennes de l'équipe : **Vanessa** et **Xavière**. Merci d'avoir partagé avec moi vos petits secrets de clonage et surtout vos petits tubes. A chaque fois, il suffisait de rajouter un petit microlitre de vos enzymes et pouf... ça marche du feu de Dieu.

Merci à **Maximus Sartorius** pour ses questions très pointues et ses critiques des choix des tests statistiques, sans oublier ses blagues qui me reviennent en tête lors des repas de famille !

Je souhaite bon courage aux nouveaux de l'équipe. Ma compatriote **Sarah**, **Roberto** et **Vasugi**. Juste un petit conseil, prenez du plaisir à faire vos manips et éclatez-vous car ça sera des moments inoubliables.

A tous ceux que j'ai croisé dans l'équipe MAD : **Karim**, **Ursula**, **Christos**, **Osorio**, **Manuela**, **Barbara**, **Thierry**, **Lavanya**, **Léa**, **Julien**, **Chrystel**, **Nicolas** et **Gilles**. Merci à tous pour ces moments qu'on a partagés ensemble.

Merci à **Vincent BISCHOFF**, **Ségolène PERIN** et **Rémi DROLLER** d'avoir financé et suivi la maturation de ce projet. Un grand merci à **Shuling GUO** et **Brett MONIA** et tous nos collaborateurs à IONIS pharmaceuticals de nous avoir fourni les ASO ainsi que pour leur expertise.

Je remercie également tous ceux qui m'ont apporté leur aide : **Nadia**, **Pascale**, **Marc**, **Jean-Marie**, **Olivia**, **Hugues**, **Deborah**, **Armelle**, **William**, **Alexandre** et tous les animaliers. Je remercie tous les membres des équipes Puccio, Trottier et Mandel pour leurs conseils et amitié. Je vous souhaite à toutes et à tous une bonne continuation pour la suite.

Je souhaite terminer en remerciant mes amis et ma famille. Merci à toi tonton **Larbi**, **Souad** et toute ta famille. Vous étiez mon refuge à Strasbourg, ma deuxième famille. Merci pour votre

accueil et votre générosité. Vous étiez toujours là quand j'avais besoin de discuter de mes soucis d'expatrié. Merci à **Dalila** et **Amina**, j'ai passé un agréable moment avec vous. Nos soirées du mois de Ramadan resteront pour toujours dans ma tête. Merci à **Dalila** et **Boumediene** pour leur aide et soutien moral. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Merci à ma tante **Hafida** et son mari **Hbib** pour leurs encouragements et les moments partagés à Oran et aussi à Strasbourg. Vous êtes des êtres exceptionnels. Merci à mon oncle **Abdeljabar** pour son soutien moral et ses visites furtives à Strasbourg. Je dois ma réussite à ma tante **Halima** et son mari **Mohamed** qui ont gentiment accepté de financer une partie de mes études en France. Vous n'auriez probablement jamais l'occasion de lire ces quelques mots mais sachez que vous m'avez aidé à réaliser ce que je voulais faire. Pour cela je vous exprime toute ma reconnaissance et mon respect absolu. Enfin, je termine avec ma petite famille. Mon frerot **Nabil** qui s'est toujours moqué de moi. Dorénavant, j'exige que tu m'appelles DOCTEUR Hichem. Merci à vous, **Aicha** et **Adnane** d'être toujours sincères dans votre amour fraternel. Merci pour tous les moments de fous rires. A vous, mes chers parents, **Karima** et **Abdelghani**. Je vous dois tout ce que je suis. Sans vous, je ne serais pas là aujourd'hui. Vous m'avez permis de poursuivre mes études dans de très bonnes conditions. Vous m'avez fait confiance et j'espère que je ne vous ai jamais déçu. Merci à celui à qui j'ai transmis 23 chromosomes, mon fils **Harone**. Je ne te remercie pas pour ces nuits blanches, par contre ton sourire me fait oublier tous les soucis de la vie. J'espère que tu seras fier de moi. **Asmaa**, tu es une source inépuisable de patience et d'amour. Merci de m'avoir soutenu tout au long de ce parcours. Tu étais là dans les moments difficiles. Tu as tout simplement rendu ma vie plus belle et joyeuse.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES BOITES, FIGURES ET TABLEAUX	3
RÉSUMÉ.....	4
INTRODUCTION.....	8
1. Le muscle squelettique et les myopathies :	8
2. Les myopathies centronucléaires :	8
2.1 La myopathie centronucléaire liée au chromosome X :.....	9
2.2 La myopathie centronucléaire récessive :	12
2.3. La myopathie centronucléaire autosomique dominante :	14
2.4. Autres formes proches des myopathies centronucléaires :	17
3. Les essais précliniques dans les myopathies centronucléaires :	20
4. La voie de signalisation MAD (Myotubularine1, Amphiphysine2 et Dynamine2) :	44
4.1. Une interaction moléculaire directe :	44
4.2. Une régulation indirecte via les phospholipides :	44
4.3. Une voie de signalisation affectée par les mutations génétiques :.....	45
5. DNM2, une cible thérapeutique :	46
6. Le virus adéno-associé (AAV) :	47
6.1. Mécanisme d'action :	47
6.2. Sérotypes et tropisme cellulaire :	48
6.3. Les virus AAV recombinants :	49
6.4. Les shRNA :	50
7. Les oligonucléotides antisens (ASO) :	51
7.1. Première génération :	51
7.2. Deuxième génération :	52
7.3. Troisième génération :	52
8. Le projet de thèse :	54
RESULTATS	56
1. Diminution de DNM2 par approche virale basée sur l'utilisation de virus AAV-shRNA :	57
Publication 1 : “ Single intramuscular injection of AAV-shRNA reduces DNM2 and prevents myotubular myopathy in mice”	57
a) Contexte de l'étude :	57

b) Résultats :	58
c) Contribution :	58
d) Conclusion :	58
2. Diminution de DNM2 par approche non-virale basée sur l'utilisation d'oligonucléotide antisens :	72
Publication 2 : "Antisense oligonucleotides-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice "	72
a) Contexte de l'étude :	72
b) Résultats :	73
c) Contribution :	73
d) Conclusion :	74
DISCUSSION & PERSPECTIVES	98
1. Réduction de DNM2, une nouvelle cible thérapeutique :	98
1.1. Réduction de DNM2 dans la myopathie myotubulaire :	98
1.2. Réduction de DNM2 dans la forme autosomique récessive de myopathie centronucléaire :	105
1.3. Réduction de DNM2 dans la forme autosomique dominante de myopathie centronucléaire :	108
1.4. Autres maladies musculaires :	109
1.5. Autres maladies non-musculaires :	111
2. AAV-shRNA versus ASO, que choisir ?	112
2.1. Avantages et inconvénients des AAV-shRNA :	112
2.2. Avantages et inconvénients des ASO :	113
3. Autres approches pour inhiber DNM2 :	114
4. Autres approches thérapeutiques très prometteuses :	114
Conclusion générale :	116
ANNEXE	117
3. Epistasie génétique entre Bin1 et Dnm2 dans le muscle squelettique :	118
Publication 3 : " Antagonistic epistasis between amphiphysin 2 (BIN1) and dynamin 2 is essential for normal muscle development, structure and function "	118
a) Contexte de l'étude :	118
b) Résultats :	118
c) Contribution :	119
d) Conclusion :	119
BIBLIOGRAPHIE	133

LISTE DES ABREVIATIONS

AAP : Assembly-Activating Protein
AAV : adeno associated virus (virus adéno-associé)
ADNc : ADN complémentaire
AMPH2 : Amphiphysine 2
APP : Amyloid Precursor Protein
ARNi : interférence d'ARN
ASO : Antisense oligonucleotide (Oligonucléotide antisens)
ASO-*Dnm2* : Oligonucléotide antisens ciblant *Dnm2*
BIN1 : Bridging integrator-1
CCDC78 : Coiled-coil domain-containing 78
Cre-ER^{T2} : Cre-recombinase couplée au récepteur des œstrogènes.
DHPR : récepteur de la dihydropyridine
DMD : dystrophie musculaire de Duchenne
DMPK : dystrophy myotonic protein kinase
DNM2 : Dynamine 2
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases
FGFR-1 : facteur de croissance de type 1 des fibroblastes
HGFR : récepteur du facteur de croissance des hépatocytes
HSA : human α -skeletal actin
HSPG : protéoglycane héparan sulfate
HTZ : hétérozygote
ITR : inverted terminal repeat
Kpb : kilo paire de base
KO : knock-out
KI : knock-in
LamR : récepteur laminine
LNA : locked nucleic acid
*Mtm1*KO : Myotubularin1 knock-out
MBLN : Muscleblind-like protein
MHCK7 : α -myosin heavy-chain Creatine kinase 7
miRNA : microRNA
MiTMAB : myristyl trimethyl ammonium bromide
MTM1 : Myotubularine 1
RISC : RNA-induced silencing complex
OctMAB : octadecyltrimethyl ammonium bromide
PDGFR α : récepteur α du facteur de croissance dérivé des plaquettes
PMO : Phosphorodiamidate morpholino oligo
PNA : acides nucléiques peptidiques
PS : Phosphorothioate
PTGS : Post Transcriptional Gene Silencing
RVS : virus du sarcome de Rous

RYR1 : récepteur de la ryanodine1
shRNA : short hairpin RNA
sh*Dnm2* : shRNA ciblant *Dnm2*
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA : small interfering RNA
smRNA : small modulatory RNA
SPEG : Striated Muscle Preferentially Expressed Protein Kinase
tncRNA : tiny non-coding RNA
T_m : température de fusion
VIH : virus d'immunodéficience humaine
WT : Wild-type

LISTE DES BOITES, FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

Figure 1 : 10
Figure 2 : 11
Figure 3 : 11
Figure 4 : 12
Figure 5 : 12
Figure 6 : 14
Figure 7 : 14
Figure 8 : 16
Figure 9 : 18
Figure 10 : 18
Figure 11 : 19
Figure 12 : 45
Figure 13 : 46
Figure 14 : 47
Figure 15 : 50
Figure 16 : 51
Figure 17 : 52
Figure 18 : 53
Figure 19 : 54
Figure 20 : 106

Boîtes :

Boîte 1 : 11
Boîte 2 : 13
Boîte 3 : 16

Tableaux :

Tableau 1 : 9
Tableau 2 : 48

RÉSUMÉ

Résumé

Les myopathies centronucléaires sont des maladies congénitales rares caractérisées cliniquement par une faiblesse musculaire très handicapante. Les biopsies musculaires des patients atteints de myopathie centronucléaire présentent une atrophie des fibres et des noyaux anormalement positionnés au centre de la fibre en l'absence de régénération musculaire excessive. Plusieurs formes de myopathie centronucléaire ont été décrites selon le mode de la transmission génétique. La forme liée au chromosome X, aussi appelée myopathie myotubulaire, est la forme la plus sévère. Elle est causée par des mutations au niveau du gène *MTM1* qui code pour la myotubularine (MTM1), une phosphatase déphosphorylant les phosphoinositides membranaires et par conséquent contrôlant les propriétés physicochimiques et le trafic des membranes. Dans la quasi majorité des cas, ces mutations induisent une absence totale de la protéine. D'autre part, des mutations du gène *DNM2* sont associées à une forme relativement moins sévère : la forme autosomique dominante. *DNM2* code pour la dynamine 2 (DNM2) qui est une mécano-enzyme impliquée dans divers processus biologiques tels que l'endocytose, l'exocytose, la tubulation membranaire ou encore l'organisation du cytosquelette. Différentes études *in vitro* suggèrent que ces mutations mèneraient à une augmentation de l'activité GTPase de DNM2 et à des oligomères plus stables proposant ainsi un mécanisme de gain de fonction des formes mutées. A ce jour, aucune thérapie spécifique n'est disponible pour traiter les myopathies centronucléaires. De plus, les mécanismes physiopathologiques de cette maladie ne sont pas tous encore élucidés.

Le rôle commun joué par MTM1 et DNM2 dans le remodelage des membranes cellulaires ainsi que leur implication dans la même maladie laissent supposer l'existence d'un lien entre ces deux protéines. En effet, une étude menée au sein du laboratoire d'accueil a démontré que les échantillons de muscle de patients atteints de la forme liée à l'X et de modèle murin déficient en MTM1 présentent une surexpression de DNM2. La réduction de DNM2 par croisement génétique permet l'amélioration des signes cliniques de la maladie, notamment une force musculaire normale et une structure correcte des fibres musculaires. Les animaux qui auparavant décédaient de la myopathie au bout de 2 mois, atteignent l'âge de 2 ans, la durée de vie normale des souris. L'identification de DNM2 comme nouvelle cible thérapeutique suscite de grands espoirs pour une application thérapeutique, à condition qu'un composé injectable ciblant DNM2 puisse être validé. Dans ce but, mes travaux de thèse consistaient à développer, tester et valider des composés qui ciblent DNM2 et diminuent son niveau. Pour cela, deux approches thérapeutiques ont été développées, l'une basée sur l'utilisation de virus adéno-associés (AAV) exprimant des « petits ARNs en épingle à cheveux » (ou shRNA), l'autre sur les oligonucléotides antisens (ou ASO).

Résumé

Les vecteurs AAV sont des virus génétiquement modifiés capables de porter des séquences codantes hétérologues. Ces vecteurs ont été étudiés et utilisés de manière intensive ces 30 dernières années. Ils font l'objet de nombreux essais cliniques sur les maladies monogéniques conduisant à la commercialisation de nombreux médicaments de thérapie génique. Les vecteurs AAV sont surtout utilisés pour remplacer un gène défectueux. Toutefois, de nombreuses études ont démontré leur efficacité à réprimer l'expression des gènes lorsqu'ils portent des séquences shRNA complémentaires au gène cible.

D'autre part, les ASO sont de plus en plus utilisés dans les maladies neuromusculaires dues soit à un gain de fonction de la protéine mutée ou bien une perte de la protéine causée par des mutations affectant le cadre de lecture. Simples brins, les ASO sont des petits fragments d'ARN chimiquement modifiés capables d'entrer dans une cellule et de migrer vers le noyau afin d'affecter l'expression d'un gène cible. Ils se lient spécifiquement à l'ARNm par complémentarité des séquences induisant ainsi soit la dégradation de l'ARNm muté soit le rétablissement du cadre de lecture par effet sur l'épissage. De nombreuses études cliniques ont démontré leur efficacité et innocuité ce qui a permis la commercialisation de divers médicaments basés sur cette technologie.

A cet effet, durant mes quatre années de thèse j'ai testé l'efficacité de plusieurs candidats AAV-shRNA ou bien ASO à réduire la DNM2 dans la forme liée à l'X des myopathies centronucléaires et à évaluer les effets positifs de ces deux approches dans un modèle de souris déficient en MTM1.

Afin de sélectionner le meilleur shRNA, différentes séquences shRNA complémentaires à l'ARNm de DNM2 (*shDnm2*) ont été testées *in vitro* sur des cellules et leur efficacité à réduire l'expression de la DNM2 a été évaluée par western blot. Ce premier criblage a permis d'identifier cinq candidats *shDnm2*. Par la suite, des AAV exprimant les différents candidats sélectionnés ont été produits. L'injection locale d'une seule dose de ces AAV dans les muscles de souris sauvages ou bien invalidées pour le gène *Mtm1* (*Mtm1KO*) entraîne une réduction de 50% de DNM2. Cette réduction est corrélée à une augmentation de la masse ainsi qu'à la force des muscles injectés des souris *Mtm1KO*. Les muscles injectés avec des AAV contrôles demeurent atrophiques avec une force musculaire quasi inexistante. L'analyse histologique des muscles injectés avec les AAV contrôles révèle différentes anomalies structurelles des fibres musculaires telles qu'une sévère atrophie, une position centrale des noyaux en plus d'une distribution anarchique des mitochondries. Au contraire, les muscles injectés avec des AAV-*shDnm2* présentent une histologie quasi-normale qui ressemble à celle des muscles des souris

Résumé

sauvages. Les fibres musculaires sont plus grandes avec des noyaux positionnés à la périphérie ainsi qu'une distribution normale des mitochondries.

Ces résultats confirment le potentiel thérapeutique de la réduction de la DNM2 et montrent l'efficacité des vecteurs AAV à maintenir des effets positifs plusieurs semaines après une seule injection intramusculaire.

En parallèle de la méthode AAV-shRNA, et en collaboration avec IONIS Pharmaceuticals, leader mondial de la technologie antisens, plusieurs centaines d'ASO ont été criblés *in vitro*. Au vu de leur efficacité à réduire DNM2 et leur rapport dose-réponse, trois ASO ont été choisis. Ces ASO ont été injectés dans des muscles de souris sauvages ou *MtmIKO*. Tout comme les AAV-sh*Dnm2*, les ASO réduisent efficacement le niveau de DNM2 améliorant ainsi la masse et la force des muscles *MtmIKO*. L'examen histologique des coupes transversales de muscle *MtmIKO* montre une normalisation de la taille des myofibres avec des noyaux correctement positionnés à la périphérie.

Ces résultats très prometteurs obtenus par des injections locales des ASO ciblant le transcrite *Dnm2* (ASO-*Dnm2*) montrent l'efficacité de ces composés à réduire DNM2 et à restaurer la fonction des muscles injectés. Cependant, les myopathies centronucléaires se caractérisent par une atrophie et hypotonie musculaires généralisées qui entraînent une paralysie et une détresse respiratoire causant la mort prématurée des individus affectés. Afin d'évaluer le potentiel des ASO-*Dnm2* à prévenir l'apparition de ce phénotype multi-systémique, l'ASO-*Dnm2* le plus efficace a été administré par voie intrapéritonéale à des souris *MtmIKO* asymptomatiques. Tandis que les souris *MtmIKO* traitées avec un ASO contrôle présentent une myopathie très sévère et une survie assez courte de 7 semaines en moyenne, les souris *MtmIKO* traitées avec l'ASO-*Dnm2* survivent jusqu'à la fin de cette étude (12 semaines) et ne montrent aucun signe de myopathie. Leurs poids sont normalisés et elles sont capables d'effectuer des tests cliniques avec la même force et endurance que les souris sauvages. De même, une amélioration de la force musculaire mesurée *in situ* ainsi qu'une correction de l'histologie musculaire sont notées chez les souris injectées avec l'ASO-*Dnm2*. Différents paramètres sérologiques et biochimiques montrent que cette approche est très bien tolérée. Aucun signe de toxicité ou d'effets secondaires n'a été observé suite aux injections répétées de l'ASO-*Dnm2* dans les souris *MtmIKO*.

Ces observations reflètent l'efficacité des ASO à traverser les différentes barrières biologiques et à réduire efficacement DNM2 lorsqu'ils sont injectés en systémique. De plus, l'administration des ASO avant l'apparition des symptômes cliniques de la myopathie centronucléaire permet de les prévenir. Or, les patients atteints de la forme liée à l'X sont

Résumé

sévèrement affectés dès leur naissance. Il est nécessaire que la stratégie thérapeutique appliquée à cette forme de myopathie centronucléaire soit en mesure de corriger des muscles très affectés. Pour vérifier cela, un deuxième protocole d'injection a été testé sur des souris *Mtm1KO* présentant plusieurs signes de myopathie centronucléaire tels que : une diminution du poids, une incapacité de bouger ainsi que des défauts comme une scoliose ou un ptosis. La première injection de l'ASO-*Dnm2* à ces souris très affectées a rapidement stabilisé l'évolution des symptômes alors que la deuxième injection était suivie d'une amélioration de tous les signes cliniques. Les souris *Mtm1KO* injectées avec l'ASO-*Dnm2* étaient capables de marcher de nouveau et présentaient une force quasi normale. L'examen histologique des coupes transversales de muscle squelettique montraient une taille des fibres similaire à celle des souris sauvages avec des noyaux à la périphérie. Ces résultats montrent qu'il est possible de restaurer la fonction musculaire des souris très affectées. De plus cette réversion est corrélée avec une normalisation du niveau de DNM2 dans les muscles de souris traitées. Cette observation suggère qu'il n'est pas nécessaire de réduire le taux de DNM2 en dessous de la normale pour atteindre des effets positifs ce qui minimiserait d'éventuels effets secondaires relatifs à la réduction de DNM2.

Pour résumer, durant mes quatre années de thèse j'ai pu développer, tester et valider deux approches thérapeutiques visant à réduire et contrôler le niveau de DNM2, une protéine surexprimée dans les muscles de patients atteints de la forme liée à l'X de la myopathie centronucléaire. J'ai démontré que les injections locales des vecteurs AAV-sh*Dnm2* ou bien les ASO-*Dnm2* pouvaient corriger les différents défauts histologiques et fonctionnels des muscles injectés. De plus, l'administration systémique des ASO-*Dnm2* pouvait non seulement prévenir l'apparition des différents symptômes de cette myopathie mais aussi corriger et restaurer les défauts cliniques et histopathologiques chez des souris très affectées. Ces résultats extrêmement encourageants font l'objet d'un programme de développement préclinique qui sera validé très prochainement avec des composés spécifiques à la DNM2 humaine pour des essais cliniques chez les patients. Ces travaux sont concrétisés par deux publications scientifiques et un brevet, ainsi que par la création d'une start-up (Dynacure).

INTRODUCTION

1. Le muscle squelettique et les myopathies :

Le muscle squelettique est le plus abondant des tissus de l'organisme humain. Il représente environ 40 à 50% de la masse totale d'un adulte (Brooks 2003). Environ 600 muscles squelettiques ont été dénombrés et tous jouent un rôle fondamental dans le maintien de la posture, le déplacement ainsi qu'un rôle essentiel dans l'équilibre métabolique et la thermogénèse grâce à la chaleur produite par la contraction musculaire. Toute anomalie fonctionnelle ou structurelle des muscles squelettiques se traduit par une baisse du tonus qui peut varier d'une légère faiblesse musculaire à des complications plus sévères telles qu'une paralysie, des troubles de déglutition ou encore une défaillance respiratoire mettant en jeu la vie des individus.

Plusieurs pathologies ont été associées à des défauts fonctionnels des muscles squelettiques. Elles sont acquises ou héréditaires et peuvent être classées en cinq grandes familles : les dystrophies musculaires, les myotonies congénitales, les myopathies métaboliques, les myopathies inflammatoires et les myopathies congénitales (Tableau 1). Cependant, d'autres pathologies présentent une atteinte musculaire secondaire à des troubles de transmission neuromusculaire ou bien des défauts de motoneurones.

Les myopathies congénitales représentent un groupe hétérogène de maladies rares qui se caractérisent par une faiblesse musculaire présente dès la naissance avec une évolution lente et non dystrophique (Magee and Shy 1956). Toutefois, certaines peuvent se manifester tardivement et leur gravité est variable d'une myopathie congénitale à une autre (Ravenscroft, Laing et al. 2015). Elles sont subdivisées en plusieurs sous-groupes selon l'anomalie histopathologique observée en microscopie sur un échantillon musculaire, et portent souvent le nom de cette dernière (Tableau1). Les formes néonatales et infantiles sont souvent très sévères voire mortelles alors que les formes qui se révèlent à l'âge adulte sont relativement moins sévères avec une évolution moins dramatique (North, Wang et al. 2014). A ce jour, toutes les myopathies congénitales restent orphelines et donc sans aucune thérapie spécifique contrairement à d'autres myopathies, comme les glycogénoses et lipidoses musculaires, pour lesquelles des traitements de remplacement enzymatique ont été déjà commercialisés.

2. Les myopathies centronucléaires :

Les myopathies centronucléaires constituent un sous-groupe de myopathies congénitales. Elles sont caractérisées cliniquement par une faiblesse musculaire généralisée très handicapante et, dans certains cas, la réduction des mouvements fœtaux (De Angelis, Palmucci et al. 1991).

Dystrophies musculaires	Myotonies congénitales	Myopathies métaboliques	Myopathies inflammatoires	Myopathies congénitales	Pathologies avec une atteinte musculaire secondaire
Dystrophies musculaires congénitales	Myotonies congénitales de Thomsen	Glycogénoses musculaires	Polymyosite	Myopathie congénitale à cores centraux	Myasthenia Gravis*
Dystrophie musculaire de Duchenne	Myotonies congénitales de Becker	Lipidoses musculaires	Dermatomyosite	Myopathie à multi-minicores	Myasthénie congénitale*
Dystrophie musculaire de Becker	Paramyotonie congénitale	Myopathies mitochondriales	Myosite à inclusions sporadique	Myopathie à némaline	Syndrome myasthénique de Lambert-Eaton*
Dystrophie facio-scapulo-humérale	Paralysie périodique familiale			Myopathie à cap	Sclérose latérale amyotrophique§
Dystrophie musculaire des ceintures				Myopathie à agrégats tubulaires	Atrophie musculaire progressive§
Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss				Myopathie avec disproportion des types de fibres	Le syndrome post-poliomyélite§
Dystrophie musculaire distale				Myopathie sarco-tubulaire	Sclérose latérale primitive§
Dystrophie musculaire oculo-pharyngée				Myopathie avec accumulation de myosine	Amyotrophies spinales et bulbo-spinales§
Dystrophies myotoniques (type 1 & 2)				Myopathies centronucléaire	Paraplégie spastique familiale§

Tableau 1 : Liste non exhaustive des pathologies avec une atteinte primaire ou secondaire de la fonction musculaire squelettique. * Maladie due à des troubles de transmission neuromusculaire. § Maladie due à des défauts de motoneurone.

L'analyse microscopique des biopsies musculaires de patients atteints de myopathie centronucléaire montrent une atrophie des fibres et des noyaux anormalement positionnés au centre des fibres en l'absence de régénération musculaire excessive (Romero 2010). Plusieurs formes de myopathie centronucléaire ont été décrites selon le mode de transmission génétique.

2.1 La myopathie centronucléaire liée au chromosome X :

La myopathie centronucléaire liée au chromosome X fut décrite la première fois par Alfred SPIRO en 1966 (Spiro, Shy et al. 1966). Il lui attribua le nom de « myopathie myotubulaire » pensant que la petite taille des fibres ainsi que la position centrale des noyaux étaient dues à un arrêt de maturation des fibres musculaires au stade de myotube. Cette hypothèse a depuis été contredite par les différents travaux qui seront abordés dans ce chapitre. La myopathie myotubulaire est la forme la plus sévère et la plus fréquente des myopathies centronucléaires. En France, elle touche environ 1 garçon sur 50.000 nouveau-nés (Jungbluth, Wallgren-Pettersson et al. 2008). Même si cette forme reste exclusivement masculine, quelques rares cas de femmes atteintes ont été décrits avec une faiblesse musculaire légère probablement à cause de l'inactivation en mosaïque du chromosome X (Sutton, Winer et al. 2001, Schara, Kress et al. 2003, Penisson-Besnier, Biancalana et al. 2007, Drouet, Ollagnon-Roman et al. 2008).

2.1.1. Les manifestations cliniques :

Chez les garçons porteurs de cette forme, les signes cliniques peuvent se manifester bien avant la naissance. Certains rapports décrivent une réduction des mouvements fœtaux souvent associée à un hydramnios (excès de liquide amniotique pendant la grossesse qui pourrait suggérer une accumulation de ce dernier en absence de réflexes normaux comme la déglutition) (Sher, Rimalovski et al. 1967, Barth, Van Wijngaarden et al. 1975, De Angelis, Palmucci et al. 1991).

A la naissance, les nouveau-nés présentent souvent une hypotonie néonatale très sévère avec quelques caractéristiques physiques comme un visage allongé, dolichocéphalie, une diplégie faciale, une paralysie des muscles oculomoteurs (ophtalmoparésie), un ptosis ainsi qu'une déformation du thorax qui peut évoluer en une scoliose (Figure 1a, b) (Cahill, Rinella et al. 2007, Abath Neto, Silva et al. 2016). Des troubles de succion et de déglutition sont également observés mais l'insuffisance respiratoire nécessitant une assistance respiratoire voire une trachéotomie reste la complication la plus handicapante pour les nouveau-nés ainsi que leurs familles (Barth, Van Wijngaarden et al. 1975, McEntagart, Parsons et al. 2002). L'espérance de vie varie de quelques jours jusqu'à l'adolescence. Si l'enfant atteint survit à la période néonatale, il reste hypotonique et présente une atrophie musculaire très sévère ce qui requiert

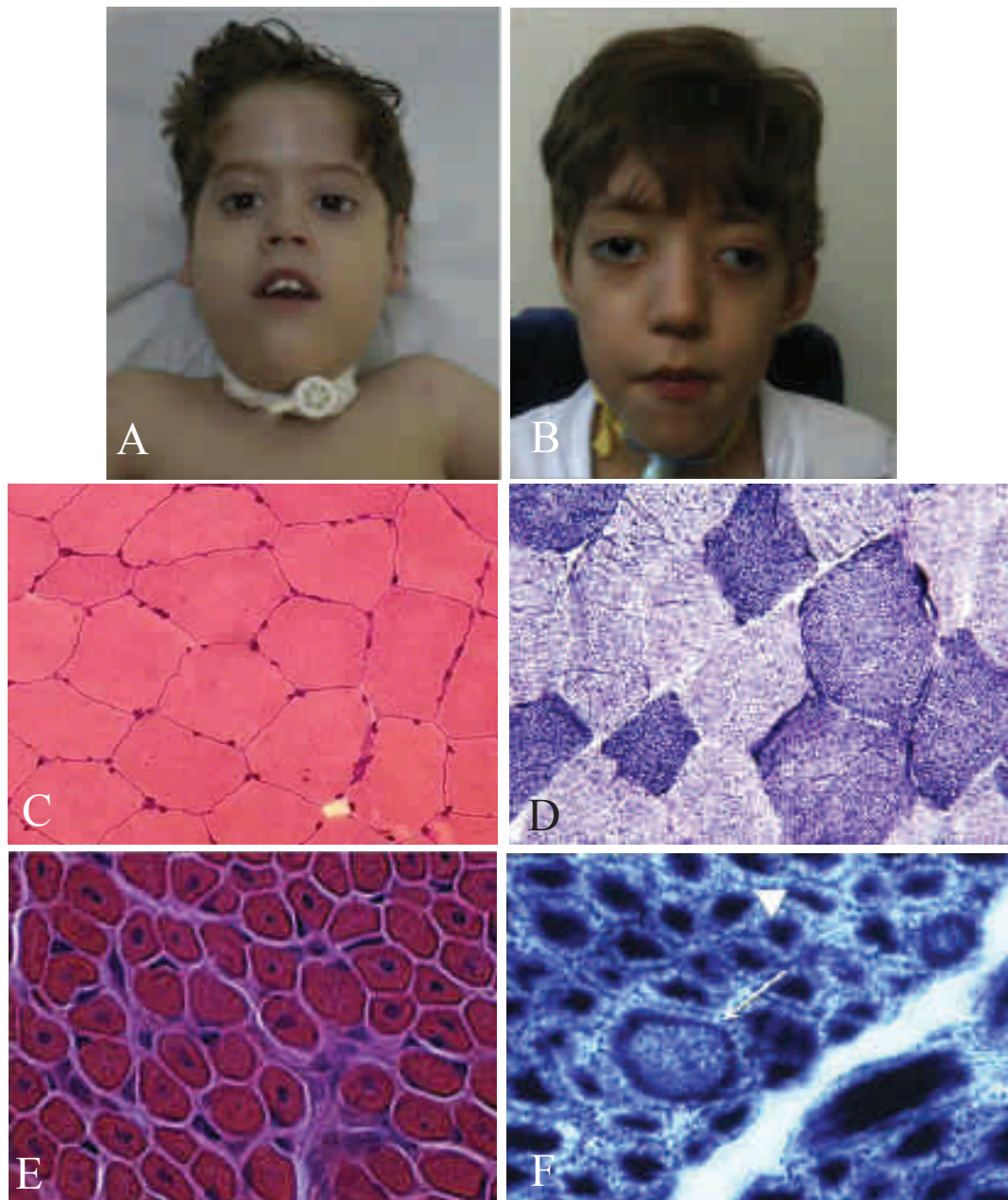


Figure 1 : Principales caractéristiques cliniques et histologiques des patients atteints de la myopathie centronucléaire liée au chromosome X.

(A, B) Deux patients atteints de myopathie myotubulaire avec une trachéotomie et présentant une parésie faciale, un visage allongé, un ptosis et une ophthalmoparésie. Coloration hématoxyline et éosine (C) et NADH-TR (D) d'une biopsie musculaire d'un individu sain. Les noyaux sont maintenus à la périphérie en plus d'une distribution homogène de l'activité mitochondriale dans des fibres polygonales. (E) Coupe transversale de biopsie musculaire d'un patient atteint de myopathie myotubulaire colorée par hématoxyline et éosine montrant des fibres de forme ronde avec des noyaux centraux. (F) Après coloration NADH-TR, ces fibres hypotrophiées présentent des anomalies de distribution mitochondriale formant des agrégats au centre ou un halo (flèches blanches) (agrandissement de 40x, A, B, E et F adaptés de Abath Neto, Silva et al. 2016 ; C et D adaptés de http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids_104_musclenerve_path/student_musclenerve/subpages/nl.he.html et de <http://frontalcortex.com/?page=oll&topic=24&qid=86>).

l'usage permanent d'une chaise roulante. Outre les symptômes musculaires, quelques anomalies peuvent apparaître chez la population atteinte avec une espérance de vie plus longue telles qu'une cryptorchidie, des calculs rénaux et biliaires, des complications endocriniennes ou encore une hémorragie hépatique entraînant la mort de plusieurs patients (Herman, Finegold et al. 1999, Cahill, Rinella et al. 2007), mais contrairement à d'autres myopathies où la fonction cardiaque est atteinte, ces patients myopathes ne présentent pas de problème cardiaque. L'évaluation du quotient intellectuel et du système nerveux périphérique ne révèle aucune anomalie particulière (van Wijngaarden, Fleury et al. 1969). En revanche, l'analyse par microscopie électronique des jonctions neuromusculaires a mis en évidence quelques défauts structuraux comme un élargissement de la surface de la synapse et une simplicité des invaginations (Ambler, Neave et al. 1984, Fidzianska and Goebel 1994). Une étude a même montré l'existence de nécrose et de régénération nerveuse (Sarnat, Roth et al. 1981). Aucune étude ne montre l'implication directe du système nerveux et il semble que ces anomalies seraient la conséquence d'un remodelage des synapses et une adaptation à l'absence de réponse musculaire.

2.1.2. Les caractéristiques histologiques :

Contrairement à des fibres musculaires saines où les noyaux sont maintenus à la périphérie de fibres polygonales (Figure 1 c, d), les biopsies musculaires des patients atteints de la myopathie myotubulaire présentent de nombreuses fibres de petite taille et de forme arrondie avec des noyaux anormalement localisés au centre, d'où le nom de myopathie « centronucléaire » (Figure 1e) (Romero 2010, Abath Neto, Silva et al. 2016). Ces noyaux centraux sont généralement entourés d'une zone dépourvue de matériel contractile. De plus, les mitochondries s'agrègent dans cette zone périnucléaire et forment souvent un halo visible avec des colorations spéciales telles que la coloration « succinate déshydrogénase » (communément abrégée en SDH) ou « nicotinamide adénine dinucléotide tetrazolium réductase » (NADH-TR) (Figure 1f). Ces colorations révèlent aussi une prédominance des fibres de type I pouvant atteindre 78% du nombre total des fibres musculaires (Helliwell, Ellis et al. 1998). Une autre particularité de cette forme est la désorganisation de l'appareil sarcoplasmique et l'agrégation de nombreuses protéines telles que la desmine (Hnia, Tronchere et al. 2011), le récepteur de la dihydropyridine (DHPR) ou le récepteur de la ryanodine (RYR1) (Romero and Bitoun 2011). L'analyse par microscopie électronique met en évidence un défaut d'alignement des lignes Z des sarcomères et une absence quasi-totale des triades.

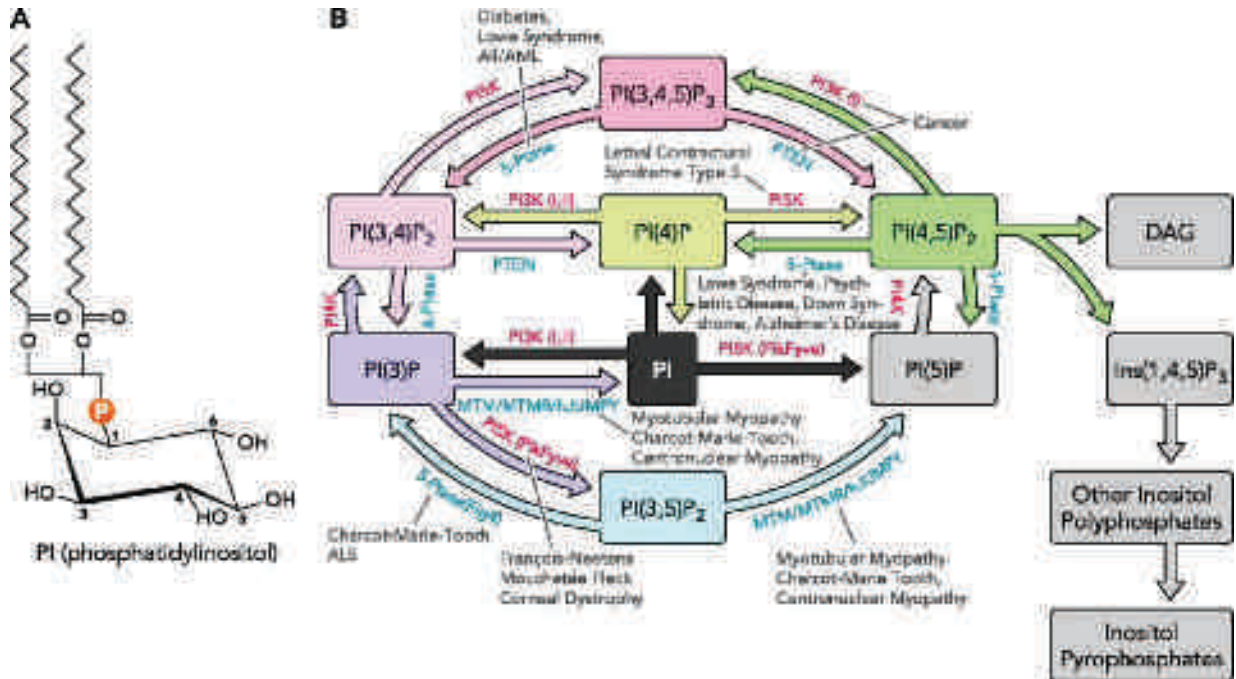


Figure 2 : Métabolisme des phosphoinositides et maladies associées.

(A) Structure chimique du phosphatidylinositol. Les numéros présentent les différents sites de phosphorylation. (B) Principales voies de phosphorylation/déphosphorylation des différents phosphoinositides. Les phosphatases et les kinases qui régulent cette interconversion ainsi que les maladies associées sont indiquées (d'après McCrea, De Camilli. 2009)

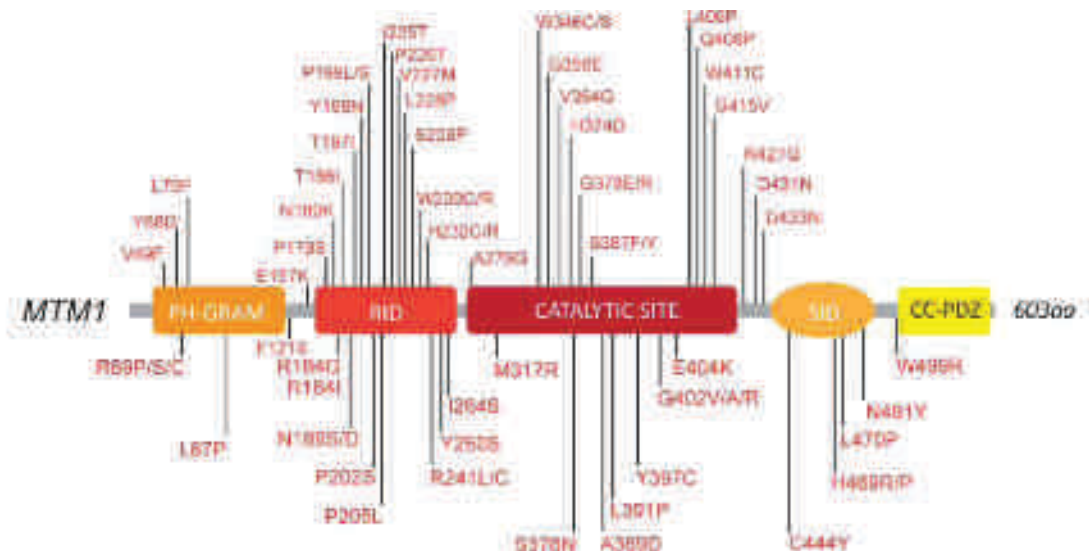


Figure 3 : Présentation schématique des différents domaines constituant MTM1 avec quelques mutations responsables de l'apparition de myopathie myotubulaire.

MTM1 est composée de cinq domaines : PH-GRAM domain (pleckstrin homology-glycosyltransferase rab-like GTPase activators and myotubularins), RID (rac-induced recruitment domain), SID (SET-interacting domain), CC-PDZ (coiled-coil-PDZ binding motif). Les mutations causant la myopathie myotubulaire se retrouvent tout le long du gène *MTM1* (adapté de Cowling, Toussaint et al. 2012).

2.1.3. Identification du gène impliqué :

Le caractère gonosomique de la transmission de la myopathie myotubulaire a permis de restreindre les recherches du gène impliqué au chromosome X (Bucher, Boltshauser et al. 1986). Par la suite, les recherches ont été d'avantage limitées à une portion de 280kpb grâce à l'utilisation des microsatellites sur des ADN de patients issus de familles consanguines (Starr, Lamont et al. 1990, Hu, Laporte et al. 1996, Hu, Laporte et al. 1996, Smolenicka, Laporte et al. 1996). Ce n'est qu'en 1996 que le gène responsable de cette pathologie a été cloné et identifié (Laporte, Hu et al. 1996). Il s'agit d'un gène de 15 exons nommé *MTM1* qui code pour une protéine baptisée « myotubularine1 ». D'expression ubiquitaire et ayant un site catalytique, cette enzyme est impliquée dans la déphosphorylation des phospholipides membranaires de faible abondance appelées les phosphoinositides et plus précisément du phosphatidylinositol-(3)-phosphate et du phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate (abrégiés respectivement en PtdIns(3)P et PtdIns(3,5)P₂), déphosphorylés en position D3 de l'anneau inositol (Taylor, Maehama et al. 2000). Les phospholipides jouent un rôle important dans l'homéostasie cellulaire en général. Ils sont considérés comme des messagers secondaires et sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation (Di Paolo and De Camilli 2006). Bien que leur taux ne dépasse pas les 10% dans la membrane cellulaire, leur phosphorylation est minutieusement régulée par l'action antagoniste de différentes phosphatases et kinases telles que les myotubularines ou les phosphoinositide 3-kinases de classe I, II ou III (Figure 2). Plus de 200 mutations (faux-sens, non-sens, délétion, insertion) de *MTM1* ont été répertoriées chez des patients atteints de myopathie myotubulaire et la quasi majorité induit une absence totale de la protéine entraînant ainsi un déséquilibre de la phosphorylation des phosphoinositides (Figure 3). De plus, *MTM1* interagit directement avec plus de 30 protéines ce qui rend son expression capitale pour de nombreux processus cellulaires. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que *MTM1* joue un rôle important dans le trafic des endosomes (Tsujita, Itoh et al. 2004), le couplage excitation-contraction (Al-Qusairi, Weiss et al. 2009), l'organisation des filaments intermédiaires (Hnia, Tronchere et al. 2011), les structures des jonctions neuromusculaires

Boîte 1 : la ressemblance clinique et histopathologique entre la myopathie myotubulaire et la dystrophie myotonique congénitale peut porter à confusion. Le diagnostic différentiel entre les deux pathologies se fait par un séquençage génétique afin d'identifier des mutations de *MTM1* ou des expansions de trinuécléotide CTG au niveau du gène DMPK (dystrophy myotonic protein kinase). En cas de résultat positif pour une expansion CTG, le diagnostic peut être confirmé par un marquage de MBLN (Muscleblind-like protein) qui se fixe sur les expansions CUG au niveau de l'ARN et forme des agrégats nucléaires.

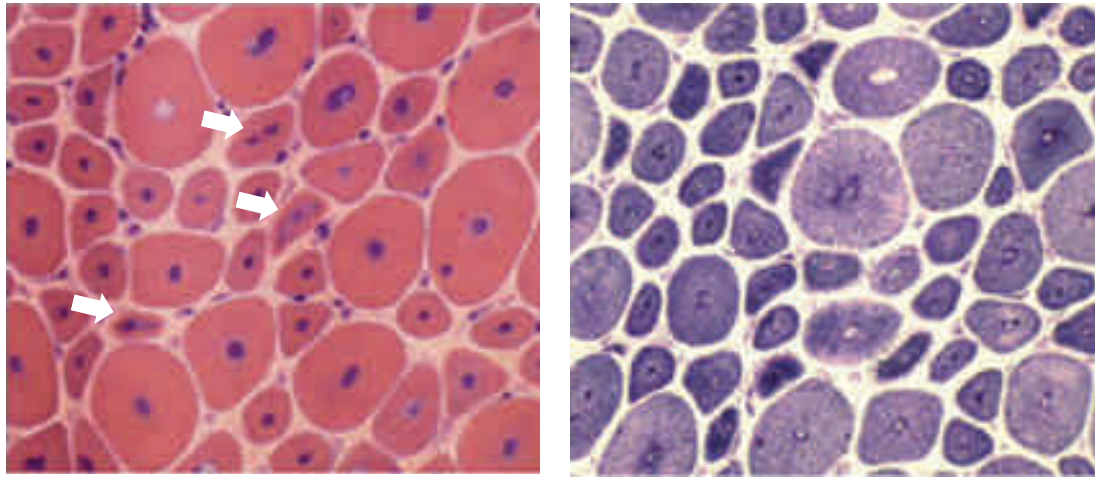


Figure 4 : Coupes histologiques de biopsie musculaire de patient atteint de la forme autosomique récessive de myopathie centronucléaire.

(A) La coloration hématoxyline et éosine permet de voir la position centrale dans presque toutes les fibres musculaires avec parfois deux noyaux au sein de la même fibre (flèches blanches). (B) La coloration NADH-TR révèle une accumulation des mitochondries au centre de la fibre musculaire entourant une zone dépourvue de coloration qui correspond au noyau central. (Adapté Romero 2010).



Figure 5 : Présentation schématique des différents domaines constituant l'isoforme musculaire de BIN1 avec les mutations connues à l'origine de deux formes de myopathie centronucléaire.

BIN1 est formé de quatre domaines : N-BAR (Hélice amphipathique N-terminale & Bin/Amphiphysin/Rvs167), PI (PI(4,5)P₂ binding domain, spécifique à l'isoforme musculaire), MBD (myc binding domain) et SH3 (Scr homology 3).

En haut, les mutations responsables de la forme récessive. En bas, les mutations causant la forme dominante (adapté de Cowling, Toussaint et al. 2012).

(Robb, Sewry et al. 2011), la prolifération des cellules satellites (Lawlor, Viola et al. 2014) ainsi que l'apoptose et l'autophagie cellulaires (Al-Qusairi, Prokic et al. 2013, Fetalvero, Yu et al. 2013).

2.2 La myopathie centronucléaire récessive :

2.2.1. *Les manifestations cliniques :*

Cette forme de myopathie centronucléaire se caractérise par une faiblesse musculaire progressive d'apparition variable allant de la naissance jusqu'à l'adolescence et touche indifféremment les hommes et les femmes (Wallgren-Pettersson, Clarke et al. 1995). L'hypotonie touche les muscles proximaux et/ou distaux, mais aussi les muscles oculomoteurs ce qui permet de distinguer trois sous-populations (Jeannet, Bassez et al. 2004):

- La forme précoce avec ophtalmoparésie, souvent avec un phénotype très sévère,
- La forme précoce sans ophtalmoparésie,
- La forme tardive sans ophtalmoparésie.

D'autres anomalies peuvent s'ajouter comme une hypotonie des muscles masticateurs, une arcade palatine haute, une scoliose et quelques anomalies au niveau des pieds (Siegel 1983). Enfin, une cardiomyopathie sporadique a été décrite chez quelques patients (Verhiest, Brucher et al. 1976, Gospe, Armstrong et al. 1987, Bataille, Guillon et al. 1991).

2.2.2. *Les caractéristiques histologiques :*

L'analyse histologique des biopsies musculaires de patients atteints de cette forme montre de nombreuses fibres rondes avec des noyaux centraux et de taille variable (Figure 4) (Romero 2010). De plus, ces fibres présentent une zone périnucléaire dépourvue de matériel contractile où les mitochondries et des protéines, telle que la desmine, RYR1, DHPR, caveoline3, s'accumulent formant ainsi un halo autour du noyau central (Romero and Bitoun 2011). Une légère augmentation du tissu conjonctif et un remplacement du tissu fibro-adipeux sont souvent associés à cette forme.

2.2.3. *Identification du gène impliqué :*

Ce n'est qu'en 2007 que le laboratoire d'accueil a identifié le gène responsable de cette forme. Trois mutations homozygotes ont été trouvées par séquençage direct chez trois familles consanguines au niveau du gène bridging integrator-1 (*BINI*) situé en 2q14.3 (Figure 5) (Nicot, Toussaint et al. 2007). Ce gène code pour une protéine ubiquitaire appelée Amphiphysine2/BIN1 qui est exprimée sous dix isoformes grâce à un épissage alternatif, parmi lesquels on distingue une isoforme spécifique au muscle (isoforme 8) (Prokic, Cowling et al.

2014). Une mutation qui affecte l'épissage alternatif de *BIN1* a été identifiée dans une famille consanguine et un chien myopathe de race Dogue allemand (Bohm, Vasli et al. 2013). De nombreux rôles ont été attribués à BIN1 notamment la courbure et la tubulation des membranes cellulaires ainsi que l'endocytose. En effet, cette protéine est capable, par le biais de ses domaines N-BAR-PI, de détecter des courbures membranaires, de se fixer sur les phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) et de former un homodimère (en forme de banane) ce qui permet de courber d'avantage les membranes (Wigge, Kohler et al. 1997, Lee, Marcucci et al. 2002). Par ailleurs, d'autres études ont montré que le domaine SH3 de BIN1 est responsable de son interaction moléculaire avec d'autres protéines par exemples : clathrine, l'adaptateur AP-2 ou encore dynamin2 (Lee, Marcucci et al. 2002, Nicot, Toussaint et al. 2007).

2.2.4. Implication de BIN1 dans une forme dominante :

En plus des mutations homozygotes décrite ci-dessus, des mutations hétérozygotes de *BIN1* ont été associées à une forme moins sévère et d'apparition tardive de myopathie centronucléaire (Figure 5) (Bohm, Biancalana et al. 2014, Garibaldi, Bohm et al. 2016). Les patients présentent une myopathie progressive avec une légère faiblesse des membres inférieurs.

Dans les deux formes (autosomique récessive et dominante), l'expression de la protéine est maintenue au niveau physiologique ce qui suggère une altération de la fonction de BIN1. Une étude réalisée sur des liposomes a montré que les mutations impliquées dans la forme récessive impactent la capacité de BIN1 à former des tubules (Wu, Shi et al. 2014), alors que des expériences *in vitro* montrent que les mutations dominantes altèrent le recrutement des protéines BIN1 mutées au niveau des membranes par les protéines BIN1 non mutées

Boîte 2 : BIN1 est associé à différentes pathologies. En plus de son implication directe dans la forme récessive et dominante de myopathie centronucléaire, un défaut d'épissage de l'exon 11 (qui code pour le domaine PI spécifique au muscle squelettique) est partiellement responsable du phénotype musculaire des dystrophies myotoniques (Fugier, Klein et al. 2011). De plus, son expression est fortement réduite dans le cancer du sein, de la prostate, du colon et d'autres cancers (Ge, DuHadaway et al. 1999, Ge, DuHadaway et al. 2000, Korshunov, Sycheva et al. 2007), tandis que des variants ont été associés à la forme tardive de la maladie d'Alzheimer induisant une surexpression de certaines isoformes au niveau cérébral (Chapuis, Hansmann et al. 2013). Enfin, une élévation des anticorps anti-Amphiphysine a été décrite dans quelques rares cas de syndrome de l'homme raide (Stiff-Man syndrome) (Decamilli, Thomas et al. 1993).

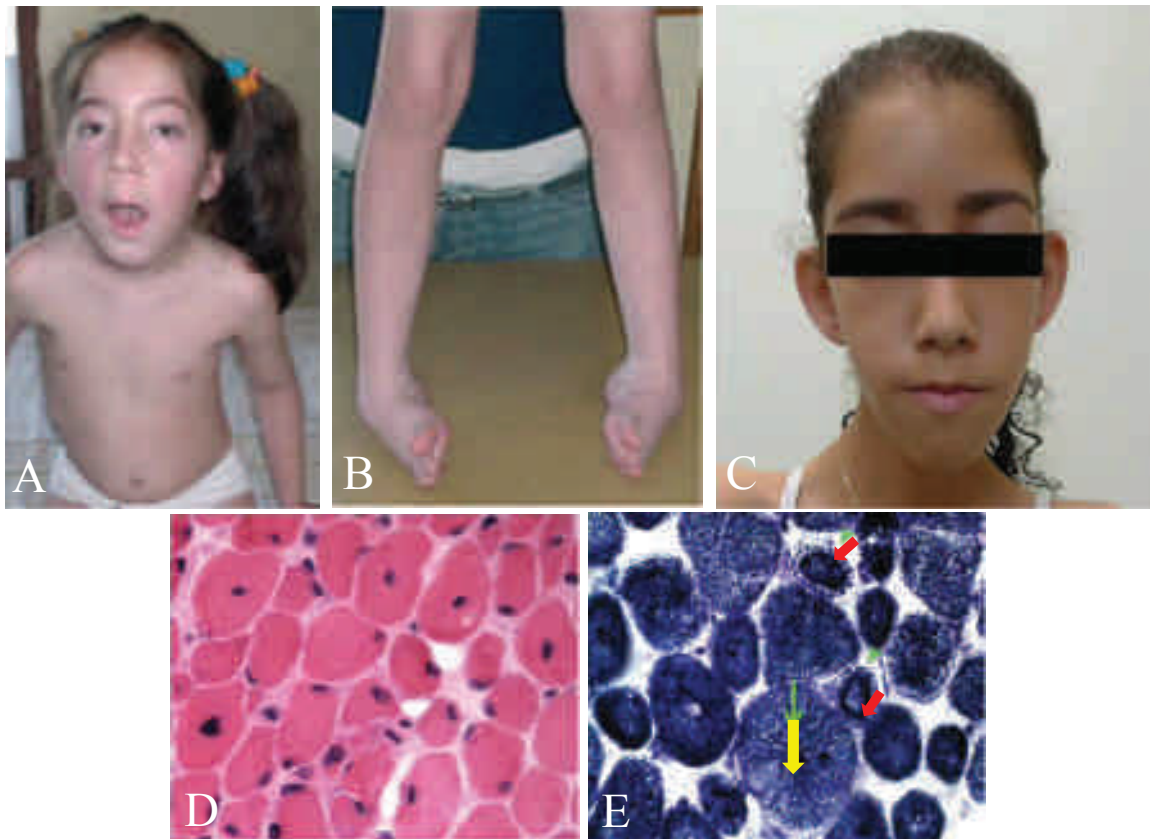


Figure 6 : Description clinique et histologique de deux cas atteints de la forme autosomique dominante de myopathie centronucléaire.

(A, B) Agée de cinq ans, la jeune patiente présentait de manière précoce des signes de myopathie très sévère avec des déformations squelettiques (C) Une autre patiente atteinte d'une forme moins sévère avec une faiblesse musculaire généralisée et un visage allongé. (D) Biopsie musculaire colorée par hématoxyline et éosine montrant des fibres hypotrophiées avec des noyaux centraux. (E) La coloration NADH-TR met en évidence des fibres avec des stries sarcoplasmique en forme de « rayon de roue » (flèche jaune) ou bien une coloration foncée à la périphérie en forme d'anneau (flèches rouges) (D, E agrandissement de 40x ; A, B adaptés de Bitoun, Bevilacqua et al. 2007 ; C, D, E adapté de Abath Neto, Martins et al. 2015).

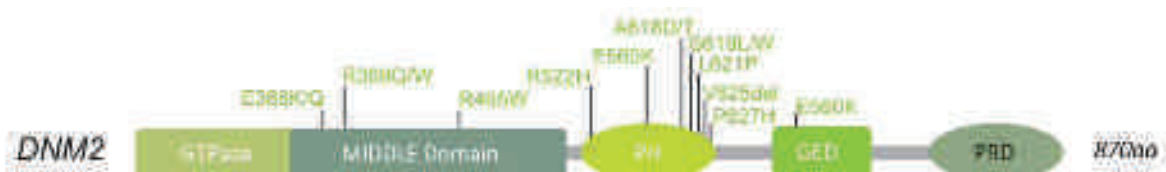


Figure 7 : Présentation schématique des différents domaines constituant DNM2 avec les mutations à l'origine de de la forme autosomique dominante de myopathie centronucléaire.

DNM2 est constitué des domaines suivants : GTPase, le domaine intermédiaire (middle domain), PH (pleckstrin homology domain), GED (GTPase effector domain), PRD (Proline rich domain). En haut, les différentes mutations identifiées chez les patients atteints de la forme autosomique dominante de myopathie centronucléaire (adapté de Cowling, Toussaint et al. 2012).

(Bohm, Biancalana et al. 2014). La différence de sévérité entre les deux formes pourrait être expliquée par la perte totale ou partielle de la fonction de BIN1.

2.3. La myopathie centronucléaire autosomique dominante :

2.3.1. *Les manifestations cliniques :*

Cette forme est la moins sévère des myopathies centronucléaires. Toutefois, des cas avec un phénotype très sévère ont été décrits (Bitoun, Bevilacqua et al. 2009). Cette forme concerne, elle aussi, les deux sexes et se caractérise par une hypotonie progressive légère des muscles proximaux et/ou distaux à laquelle peuvent s'ajouter des déformations orthopédiques, une faiblesse des muscles du visage, une ophtalmoplégie et un ptosis (Figure 6a-c) (Bitoun, Bevilacqua et al. 2007, Abath Neto, Martins Cde et al. 2015). On distingue trois catégories de présentation clinique :

- Les cas sévères : souvent sporadiques avec une apparition précoce (Bitoun, Bevilacqua et al. 2007),
- Les cas intermédiaires : se manifestent au début de l'enfance (Bitoun, Bevilacqua et al. 2009),
- Les cas moins sévères : d'apparition de l'adolescence à l'âge adulte (Bitoun, Maugenre et al. 2005).

2.3.2. *Les caractéristiques histologiques :*

Les fibres musculaires de ces patients présentent trois défauts morphologiques : un taux élevé de fibre avec des noyaux centralisés, une prédominance des fibres de type I avec hypotrophie et présence de réarrangement du matériel intermyofibrillaire du centre vers la périphérie donnant ainsi un aspect de « rayon de roue » facilement reconnaissable par une coloration NADH-TR (Figure 6d, e) (Romero 2010, Romero and Bitoun 2011).

2.3.3. *Identification du gène impliqué :*

Plusieurs mutations ont été identifiées au niveau du gène *DNM2* (Bitoun, Maugenre et al. 2005, Bitoun, Bevilacqua et al. 2007, Bitoun, Bevilacqua et al. 2009, Bohm, Biancalana et al. 2012). Situé en 19p13.2, ce gène code pour une mécano-enzyme ubiquitaire appelée dynamine2 (Figure 7). Cette protéine appartient à une super-famille de GTPases comportant des dynamines et « dynamine-related » qui sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme l'endocytose (Warnock, Baba et al. 1997), l'exocytose (Di, Nelson et al. 2003, Arneson, Segovis et al. 2008), la fission (Oh, McIntosh et al. 1998, Hinshaw 2000), la tubulation des membranes (Galkina, Fedorova et al. 2015) et l'organisation du cytosquelette cellulaire (Figure

8) (McNiven, Kim et al. 2000, Mooren, Kotova et al. 2009, Yamada, Takeda et al. 2016). Elles ont la particularité d'être plus grandes par rapport aux autres GTPase et elles sont capables d'interagir avec les lipides membranaires (Sontag, Fykse et al. 1994, Praefcke and McMahon 2004). De plus, elles se distinguent par leur faible affinité au GTP, leur activité GTPase dépendent de leur oligomérisation et lorsque leurs masses dépassent un certain seuil, elles peuvent s'autoactiver même en absence de certains effecteurs comme les GEF (Guanine nucleotide exchange factor) qui sont indispensables aux autres GTPases comme Ras (Sweitzer and Hinshaw 1998).

Chez les mammifères, il existe trois dynamines. DNM1 fut la première identifiée et est exprimée essentiellement dans les neurones où elle joue un rôle très important dans l'exocytose et le recyclage des neurotransmetteurs (Shpetner and Vallee 1989, Obar, Collins et al. 1990, Chen, Obar et al. 1991, Maffucci and Falasca 2014). DNM3 est présente au niveau post-synaptique, les testicules, le cœur et les poumons (Romeu and Arola 2014) tandis que DNM2 est ubiquitaire. Paradoxalement, les mutations de la *DNM2* causent deux maladies restreintes à deux organes : le muscle squelettique pour la myopathie centronucléaire et le système nerveux pour la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Cook, Urrutia et al. 1994, Bitoun, Maugenre et al. 2005, Zuchner, Noureddine et al. 2005). Au moins six isoformes existent dont une est spécifique au muscle squelettique (données obtenues par le laboratoire d'accueil et pas encore publiées).

Toutes les dynamines se composent des domaines suivants (Figure 7) :

- Un domaine GTPase : nécessaire à l'interaction avec le GTP et à son hydrolyse grâce à quatre motifs de liaison de G1 à G4 (Warnock, Baba et al. 1997).
- Un domaine intermédiaire appelé aussi « middle domain » : moins étudié que les autres domaines mais certaines études suggèrent son implication dans la localisation et la cohésion des centrosomes (Thompson, Cao et al. 2004, McNiven 2005).
- Un domaine d'homologie à la Pleckstrine : responsable de la fixation des dynamines sur les membranes via une liaison au $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Zoncu, Perera et al. 2007, Yasar, Surka et al. 2008). Il permet également de réguler indirectement l'activité GTPase par régulation négative de l'oligomérisation (Muhlberg, Warnock et al. 1997).
- Un domaine GED (GTPase effector domain) : qui interagit directement avec le domaine GTPase tout en l'activant (Okamoto, Tripet et al. 1999, Sever, Muhlberg et al. 1999, Smirnova, Shurland et al. 1999, Chen, Zhang et al. 2004). Il remplace donc les activateurs de GTPase qui sont indispensables aux autres GTPases permettant ainsi aux dynamines de s'autoactiver (Sweitzer and Hinshaw 1998).

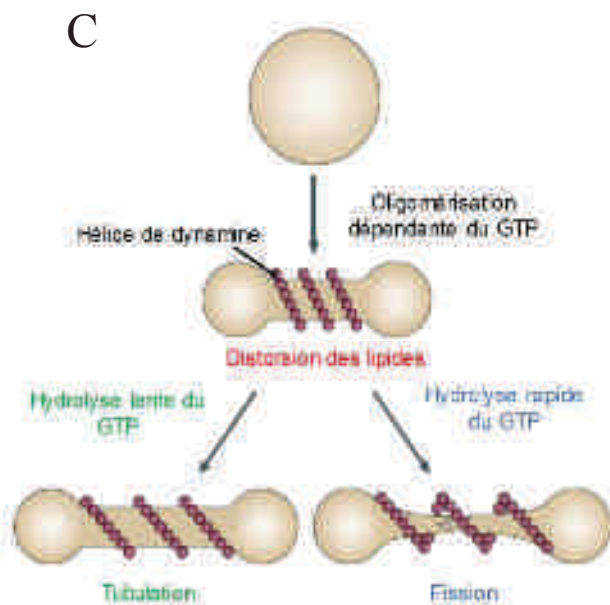
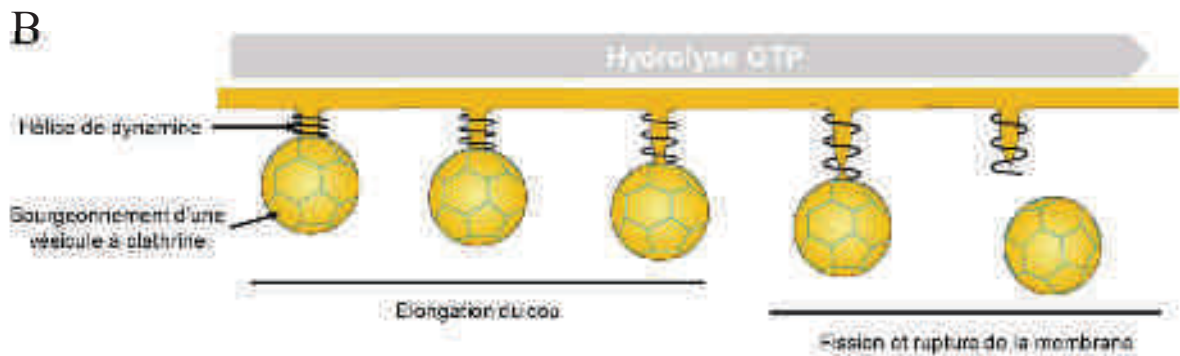
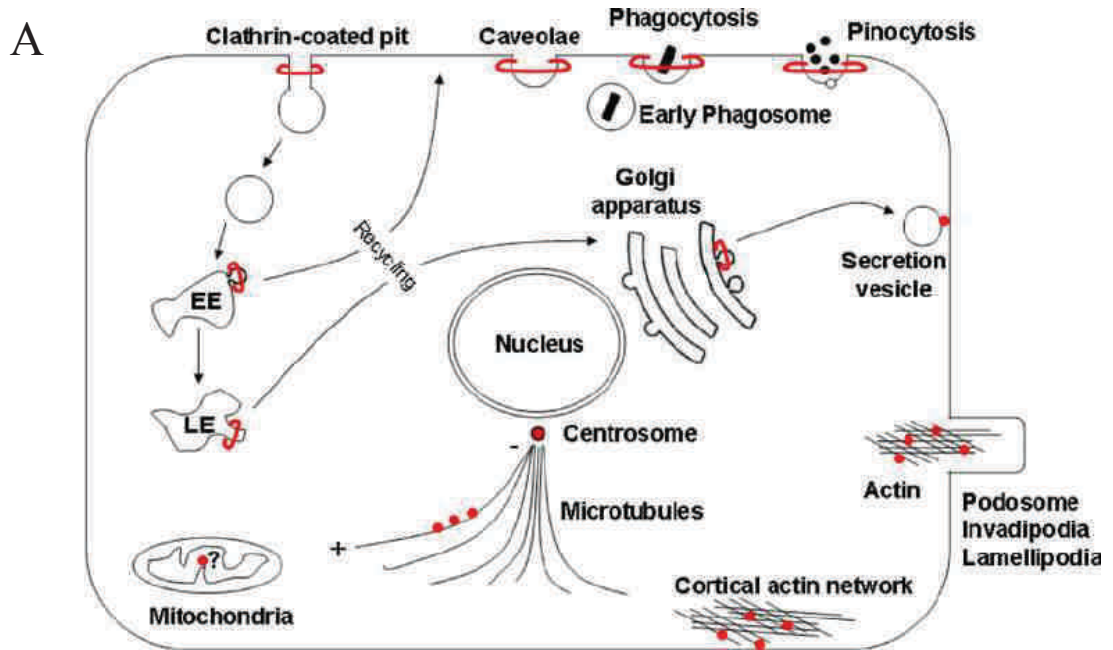


Figure 8 : Fonctions cellulaires de DNM2.

(A) DNM2 joue un rôle important dans différents évènements du trafic membranaire comme l'endocytose (dépendante à la clathrine ou aux cavéoles), la phagocytose et la pinocytose. De plus, elle est impliquée dans le réarrangement des structures cellulaires lors de la division et la migration des cellules (d'après Durieux, Prudhon et al. 2010).

Représentation schématique des différentes étapes de l'endocytose médiée par DNM2 (B) et de son action selon l'activité GTPase (C) (adapté de Praefcke, et MvMahon 2004, <http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/hmm/Dynamin/>).

- Un domaine riche en proline (PRD domain) : situé à l'extrémité C-terminale, il permet l'interaction des dynamines avec le domaine SH3 de nombreuses protéines telles que l'endophiline, l'intersectine, la synaptojanine, la syndapine et l'amphiphysine1 (McPherson, Takei et al. 1994, David, McPherson et al. 1996, McNiven 2005).

2.3.4. Rôle de DNM2 :

2.3.4.1. L'endocytose :

La fonction principale et la mieux étudiée de la DNM2 est la scission des vésicules à clathrine lors de l'endocytose. En effet, DNM2 s'oligomérisent et forment une hélice autour du cou de vésicules à clathrine ce qui stimule son activité GTPase (Warnock, Baba et al. 1997). Par conséquent, DNM2 hydrolyse la GTP et l'énergie produite engendre une torsion de la protéine puis une fission de la membrane. Cette fission n'est possible que dans le cas d'une hydrolyse rapide (Sever, Skoch et al. 2006). En revanche, quand l'hydrolyse est lente, cette torsion est maintenue à un stade de tubule. Il semblerait que le domaine SH3 des Amphiphysines joue un rôle dans la modulation de ces deux réactions en plus du recrutement de la DNM2 au niveau des puits recouverts de clathrine (Takei, Slepnev et al. 1999, Marks, Stowell et al. 2001, Yoshida, Kinuta et al. 2004).

Boîte 3 : le rôle des dynamines dans l'endocytose a été initialement découvert chez les drosophiles *Shibire* (Koenig and Ikeda 1989, Chen, Obar et al. 1991). Ces mutants se retrouvaient paralysés à une certaine température et Chen et ses collègues ont identifié des mutations thermosensibles dans le domaine GTPase du seul homologue des dynamines chez la drosophile, *Shibire*. Cette paralysie rapide et réversible serait due à une endocytose défectueuse conduisant à une accumulation des neurotransmetteurs dans la fente synaptique.

D'autre part, DNM2 est impliqué dans d'autres événements de trafic membranaire comme l'endocytose dépendante des cavéoles (Shajahan, Timblin et al. 2004), la phagocytose des pathogènes (Gold, Underhill et al. 1999, Nakanishi, Abe et al. 2008, Otsuka, Abe et al. 2009), la micropinocytose des fluides (Damke, Baba et al. 1995, Cao, Chen et al. 2007) ainsi que le trafic des endosomes au niveau des membranes du trans-golgi (Cao, Thompson et al. 2000) (Figure 8).

2.3.4.2. Régulation du Cytosquelette

La Dynamine, comme son nom l'indique, est une protéine dotée de propriétés motrices. Elle est impliquée dans différentes phases de la division cellulaire et a été localisée au niveau du

fuseau mitotique lors de la métaphase (Thompson, Skop et al. 2002). Dans des cultures cellulaires d'hépatocyte, une interaction entre DNM2, via son domaine intermédiaire, et la γ tubuline a été observée au niveau des centrioles, alors que dans un homogénat de foie de rat, elle a été isolée dans un complexe protéique contenant l'actine, les tubulines α et γ (Thompson, Cao et al. 2004). Ces résultats suggèrent un rôle de DNM2 dans la formation du centrosome. Cette hypothèse a été renforcée lorsqu'il a été observé qu'une réduction de plus de 80% de DNM2 (par des siRNA sur une culture cellulaire) entraînait une augmentation des microtubules acétylés, ce qui suggère une déstabilisation de la cohésion des centrosomes (déséquilibre entre polymérisation/ dépolymérisation des microtubules) (Thompson, Cao et al. 2004). Ces travaux pointent vers le rôle essentiel de DNM2 dans la dynamique des microtubules lors de la division cellulaire.

D'autre part, DNM2 joue un rôle dans la polymérisation de l'actine à travers une interaction indirecte avec N-WASP (Neuronal Wiskott–Aldrich Syndrome protein), un régulateur majeur de la polymérisation de l'actine (Hussain, Jenna et al. 2001). Cette interaction serait médiée par SNX9, l'intersectine-1 et la syndapine (Lundmark and Carlsson 2003, Schafer 2004). En plus de son interaction directe avec Apm1 (actin-binding protein 1) et Cortactin, DNM2 active indirectement Cdc42 par le biais de Tuba et intersectine-1 (Orth and McNiven 2003). Cdc42 est un autre acteur majeur de la polymérisation d'actine. Cette régulation peut se traduire au niveau cellulaire par le maintien de la forme de la cellule ainsi que des réarrangements des structures cellulaires lors la migration ou bien la phagocytose.

Toutes ces observations reflètent le rôle crucial de cette enzyme dans les différentes étapes de la vie cellulaire.

2.4. Autres formes proches des myopathies centronucléaires :

Bien que d'autres myopathies congénitales partagent quelques signes cliniques et histopathologiques avec les trois formes classiques décrites ci-dessus, leur classification comme myopathie centronucléaire est sujette à controverse du fait de leur rareté, leur hétérogénéité ou bien un spectre phénotypique plus large avec des signes cliniques et histologiques additionnels.

2.4.1. Implication de *RYR1* :

Des mutations récessives du gène *RYR1* qui code pour le récepteur à la ryanodine ont été identifiées chez des patients avec une hypotonie néonatale souvent associée à une réduction des mouvements fœtaux (Wilmshurst, Lillis et al. 2010). *RYR1* est un canal calcique localisé au niveau du réticulum sarcoplasmique (Fleischer, Ogunbunmi et al. 1985). Il est responsable du

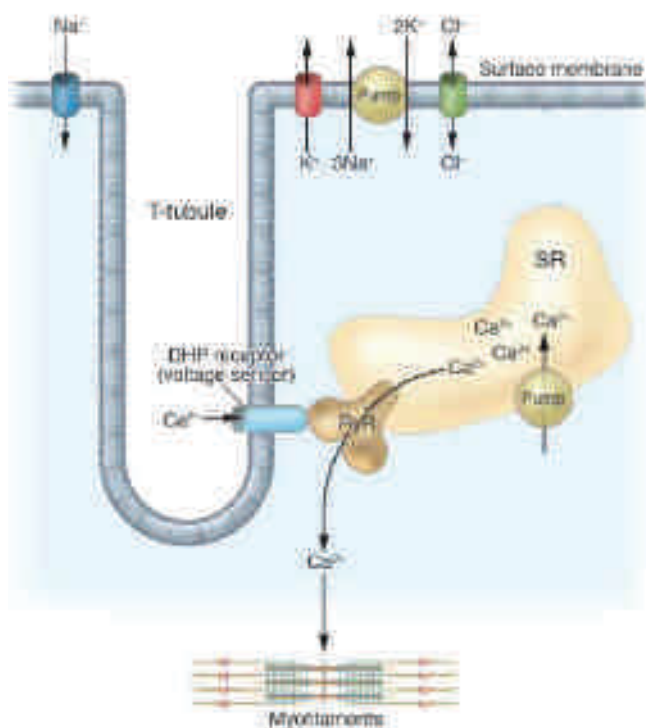


Figure 9 : Schéma du mécanisme de couplage excitation-contraction.

Sous l'effet d'une dépolarisation de la membrane sarcoplasmique, le canal calcique voltage dépendant DHPR (récepteur de la dihydropyridine) change de conformation ce qui provoque l'ouverture du canal calcique RYR1. Cette ouverture permet de libérer une quantité très importante des ions calcium depuis le réticulum sarcoplasmique (SR) vers le cytosol. Les myofibrilles se contractent en présence du calcium libéré qui sera rapidement reconduit vers le réticulum sarcoplasmique grâce à des pompes ATPase-dépendantes appelées SERCA1 (d'après Jurkat-Rott, Lehmann-Horn et al. 2005).

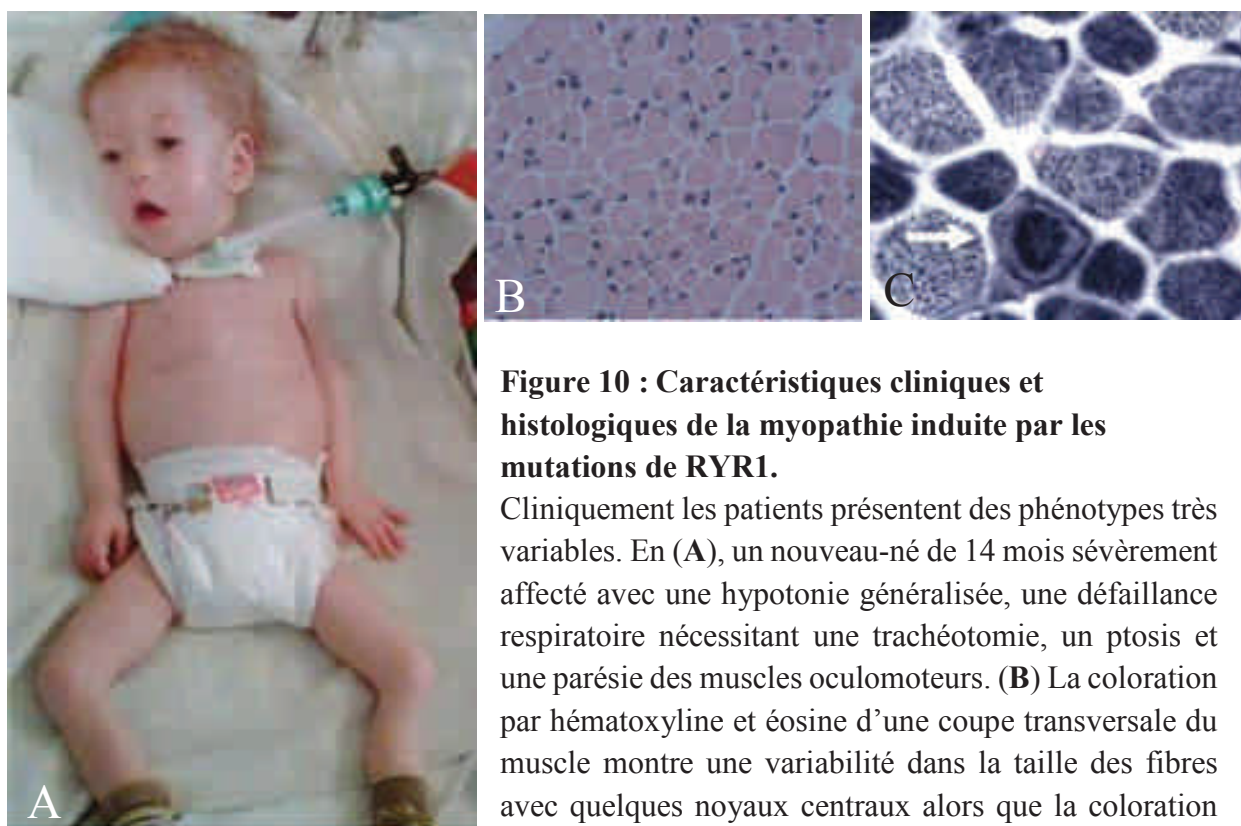


Figure 10 : Caractéristiques cliniques et histologiques de la myopathie induite par les mutations de RYR1.

Cliniquement les patients présentent des phénotypes très variables. En (A), un nouveau-né de 14 mois sévèrement affecté avec une hypotonie généralisée, une défailillance respiratoire nécessitant une trachéotomie, un ptosis et une parésie des muscles oculomoteurs. (B) La coloration par hématoxyline et éosine d'une coupe transversale du muscle montre une variabilité dans la taille des fibres avec quelques noyaux centraux alors que la coloration NADH-TR (C) montre des anomalies de l'activité

oxydative avec une accumulation centrale des mitochondries (flèche blanche) (adapté de Wilmshurst, Lillis et al. 2010).

couplage excitation-contraction et son ouverture, déclenchée par la dépolarisation membranaire, cause une libération brusque et massive du calcium sarcoplasmique dans le sarcoplasme, ce qui provoque une contraction musculaire (Figure 9).

L'analyse histologique des biopsies musculaires mettait en évidence des fibres de petites tailles avec des noyaux centraux (le centre géométrique de la fibre) ou internalisés (proche du sarcolemme mais toujours dans le cytoplasme) (Figure 10) (Wilmshurst, Lillis et al. 2010). Les mutations de *RYR1* sont associées à d'autres pathologies telles que l'hyperthermie maligne (Sei, Sambuughin et al. 2004), la myopathie congénitale à cores centraux et la myopathie congénitale à mini-cores (Robinson, Brooks et al. 2002, Romero, Monnier et al. 2003, Wu, Ibarra et al. 2006), dont les deux dernières partagent quelques signes cliniques avec les formes classiques des myopathies centronucléaires. De plus, l'observation de quelques formes ressemblant à des cores par microscopie électronique dans des biopsies des patients avec une prédominance de noyaux centraux accentuent la particularité de cette forme due à des mutations de *RYR1*, tout en mettant le doute sur leur classification comme une myopathie centronucléaire classique.

2.4.2. Implication de *hJUMPY* :

Deux cas de myopathie avec des noyaux centraux ont été décrits avec une mutation missense du gène *hJUMPY* (aussi appelé *MTMR14*) (Tosch, Rohde et al. 2006). Ce gène code pour une phosphatase à phosphoinositide très proche de *MTM1* et est capable de déphosphoryler les mêmes substrats, le $\text{PtdIns}(3)P$ et $\text{PtdIns}(3,5)P_2$. Une étude a montré que *hJUMPY* est également impliqué dans la régulation de *RYR1* via une accumulation des $\text{PtdIns}(3,5)P_2$ (Shen, Yu et al. 2009).

Les biopsies musculaires montraient une histologie similaire à celle des formes classiques des myopathies centronucléaires avec une prédominance des petites fibres et des noyaux centraux. Cependant, chez un patient, une autre mutation au niveau de *DNM2* a été identifiée et le caractère héréditaire n'était pas clair dans les deux cas. A ce jour, l'implication directe de *hJUMPY* dans cette forme de myopathie centronucléaire reste incertaine et il reste à déterminer si ces variants sont la cause ou de simples modificateurs du phénotype musculaire.

2.4.3. Implication de *SPEG* :

Dans deux études différentes, cinq mutations du gène *SPEG* ont été décrites comme des causes de myopathie centronucléaire (Agrawal, Pierson et al. 2014, Wang, Castiglioni et al. 2017). *SPEG* est une kinase exprimée essentiellement dans les muscles striés. Elle a été initialement identifiée comme une protéine interagissant avec *MTM1* (Agrawal, Pierson et al. 2014). Par la

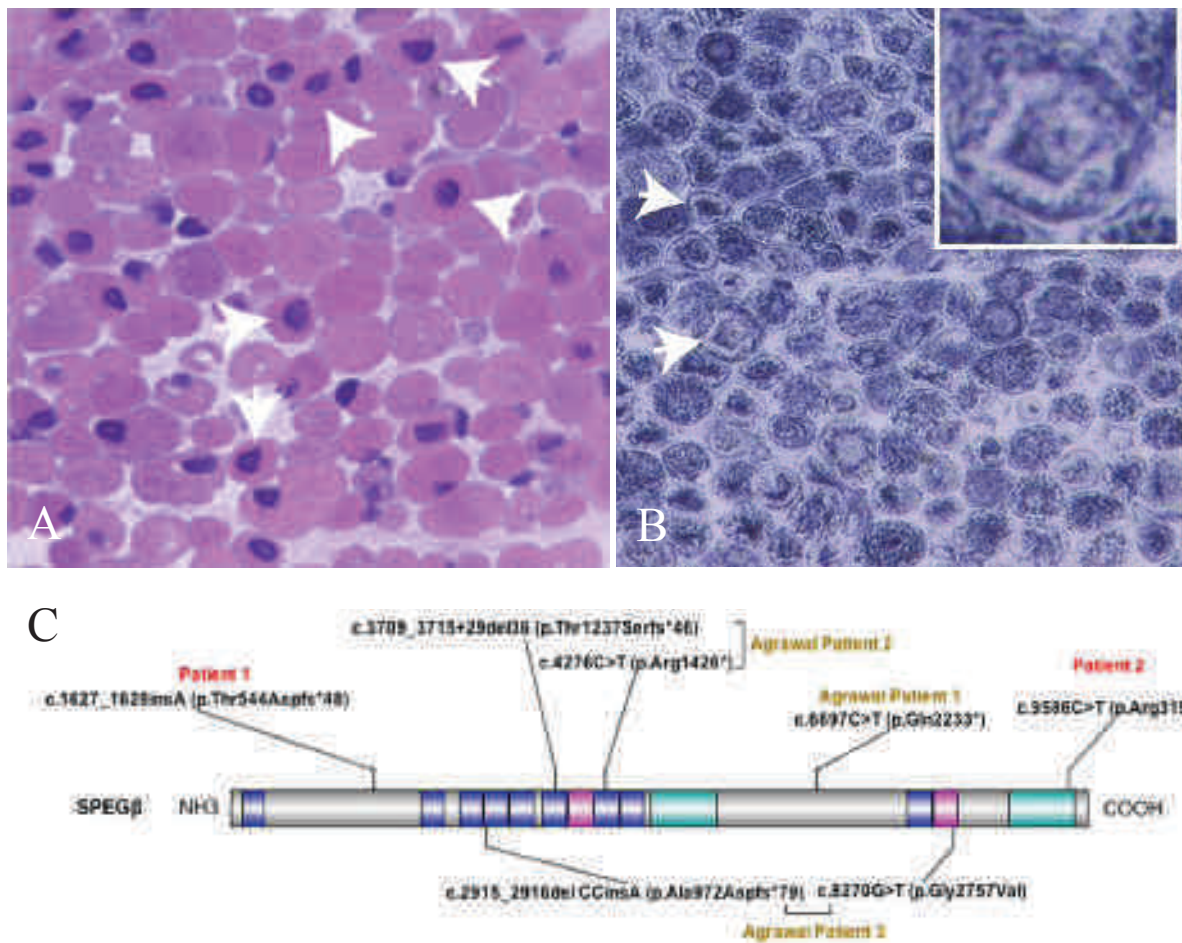


Figure 11 : Coupes histologiques de la myopathie induite par des mutations de *SPEG*, structure de la protéine et mutations identifiées.

Biopsie musculaire de patient ayant une mutation du gène *SPEG* colorée par hématoxyline et éosine (A) ou NADH-TR (B) qui montre la présence de petites fibres rondes avec une localisation centrale des noyaux et une accumulation des mitochondries au centre ou à la périphérie. (C) Représentation schématique des différents domaines de *SPEG* avec les différentes mutations identifiées (adapté de Agrawal, Pierson et al. 2014 ; Wang, Castiglioni et al. 2017).

suite, les auteurs ont trouvé des mutations récessives de *SPEG* dans trois individus. Les patients présentaient une hypotonie sévère à la naissance. D'autres anomalies comme une cardiomyopathie, une ophtalmoplégie, un ptosis ou une faiblesse musculaire faciale ont été rapportées chez différents individus. Les muscles des patients montrent une augmentation du nombre de petites fibres avec des noyaux localisés au centre (Figure 11). Sa présence au niveau des triades de fibres musculaires saines, suggère un rôle de *SPEG* dans la formation ou le maintien des triades.

2.4.4. Implication de la Titine :

Titine est la plus grande protéine connue chez l'homme et la 3ème plus abondante du muscle strié. Cette protéine géante est constituée d'environ 30.000 acides aminés et s'étend de la ligne Z à la ligne M (Labeit, Kolmerer et al. 1997). Son rôle principal est d'assurer le maintien de la fibre lors de la contraction/relâchement musculaire grâce à son élasticité (Labeit and Kolmerer 1995). Plusieurs mutations de *TTN* (un gène de 363 exons qui code pour la Titine) ont été associées à un phénotype de myopathies centronucléaires (Ceyhan-Birsoy, Agrawal et al. 2013). Les patients porteurs de ces mutations présentent une faiblesse musculaire généralisée, qui apparaît au début de l'adolescence et souvent associée à une défaillance respiratoire. Contrairement aux autres formes de myopathies centronucléaires, aucune atteinte des muscles oculomoteurs n'a été décrite alors qu'une élévation des créatines kinases peut être observée. Les biopsies musculaires présentent un grand nombre de fibres avec plusieurs noyaux centraux. D'autre part, des mutations de la Titine ont été identifiées dans d'autres maladies neuromusculaires comme la dystrophie musculaire tibiale (Hackman, Vihola et al. 2002, Hackman, Marchand et al. 2008), la dystrophie musculaire des ceintures type 2J (Sarparanta, Blandin et al. 2010), la dysplasie ventriculaire droite arythmogène (Taylor, Graw et al. 2011) ou une cardiomyopathie dilatée (Gerull, Gramlich et al. 2002). Cependant, plusieurs variants tronquants ont été identifiés chez la population normale (Herman, Lam et al. 2012, Akinrinade, Koskenvuo et al. 2015).

2.4.5. Implication de *CCDC78* :

Une seule famille a été décrite avec une mutation au niveau du site accepteur de l'épissage de l'exon 2 de *CCDC78* (Majczenko, Davidson et al. 2012). La protéine *CCDC78* (Coiled-coil domain-containing 78) n'est pas encore caractérisée. Elle serait impliquée dans la régulation de la fonction ou la structure des triades mais aucune étude n'apporte de preuves tangibles.

Il est intéressant de noter que les protéines impliquées dans la génèse des myopathies centronucléaires classiques (MTM1, BIN1 et DNM2) ainsi que celles décrites comme la cause de myopathies proches des centronucléaires (RYR1, hJUMPY, SPEG et CCDC78) sont directement ou indirectement liées à la formation, le maintien ou le bon fonctionnement des triades. Le nom de « triadopathie » a même été proposé pour regrouper ces différentes formes de myopathie (Dowling, Lawlor et al. 2014).

3. Les essais précliniques dans les myopathies centronucléaires :

Les myopathies centronucléaires demeurent orphelines et aucune thérapie n'est disponible pour les patients. Cependant, la génération de différents modèles animaux a permis de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques, et d'établir un lien entre les différentes protéines incriminées et les phénotypes observés. Ainsi, plusieurs hypothèses ont été émises par les différents groupes ce qui a permis de tester diverses approches thérapeutiques. Certaines ont montré des effets locaux ou limités dans le temps, alors que d'autres approches conduisent à des améliorations phénotypiques très prometteuses et font l'objet de développement clinique.

Ces stratégies thérapeutiques ainsi que les modèles animaux utilisés pour évaluer leur efficacité sont discutés dans la revue suivante.



Wide-ranging therapies for centronuclear myopathies

Hichem TASFAOUT, Belinda S. COWLING, Jocelyn LAPORTE

Wide-ranging therapies for centronuclear myopathies

Hichem Tasfaout^{1,2,3,4}, Belinda S. Cowling^{1,2,3,4}, Jocelyn Laporte^{1,2,3,4}

¹Department of Translational Medicine and Neurogenetics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France

²INSERM U964, Illkirch, France

³CNRS UMR7104, Illkirch, France

⁴FMTS, Strasbourg University, Illkirch, France

Abstract:

Centronuclear myopathies (CNM) are a group of inherited muscle disorders characterized by genetic heterogeneity and severe muscle weakness. Mutations in *MTM1*, *DNM2* or *BINI* genes have been identified to cause respectively: X-linked, autosomal-dominant or autosomal-recessive forms. Numerous animal models of CNM have been generated over the last 15 years, ranging from invertebrate to large mammalian models. Their characterization participated in understanding the pathomechanisms of these diseases and allowed the validation of various hypotheses. In this article, we focus on the different therapeutic strategies that have been tested so far in preclinical trial for CNM that might be applied for human affected by this rare muscle disease.

Introduction:

Since the first clinical and histopathological description of a 12-year-old affected boy with myotubular myopathy in 1966 by Spiro *et al.* (1), remarkable advances have been made in understanding the physiopathology of centronuclear myopathies (CNM). The first and major step was the identification of the causative genetic anomalies. Myotubularin1 (*MTM1*) was the first identified gene causing the most severe form of CNM: X-linked myotubular myopathy (XLMTM)(2). This form is clinically characterized by a severe hypotonia and a generalized muscle weakness often leading to respiratory failure and swallowing difficulties (3, 4). In the vast majority of cases, loss-of-function mutations cause a strong decrease of the MTM1 protein (5, 6), a phosphoinositides phosphatase implicated in multiple cellular processes like endosomal trafficking (7), excitation contraction coupling (8, 9), intermediate filament organization (10), neuromuscular junction (NMJ) structure (11, 12), satellite cells proliferation (13, 14), apoptosis (13, 14) and autophagy (15, 16). The mildest CNM form is the autosomal dominant (ADCNM)

34 form that is caused by mutations in Dynamin2 (*DNM2*) gene (17). The severity of the affected
35 patients ranges from severe in infants to mild in the adult age (18). In severe early onset cases,
36 infant have generalized muscle weakness, hypotonia with facial weakness in addition to
37 ophtalmoplegia (19), while in the late onset mild cases, young adult patients present a moderate
38 muscle weakness leading to motor defects (20). *DNM2* is a GTPase enzyme involved in
39 endocytosis (21), exocytosis (22, 23), intracellular membrane trafficking (24-26) and
40 cytoskeleton organization (27-29). *In vitro* studies of *DNM2* with CNM mutations showed an
41 increase in GTPase activity and higher stability of *DNM2* polymers suggesting a gain-of-
42 function mechanism in the ADCNM(30). Finally, mutations in *BIN1* gene have been reported
43 in few individuals with two modes of inheritance: autosomal recessive(31) or autosomal
44 dominant(32). In both cases, normal protein level was detected but *in vitro* studies showed that
45 these mutations induce functional defects supporting a loss-of-function mechanism(33). The
46 affected patients present a large variability in phenotype severity, however the main consistent
47 presentation is muscular atrophy with a diffuse weakness(34-36). *BIN1* is implicated in
48 membrane curvature and tabulation through its BAR domain(37, 38), while its SH3 domain is
49 involved in recruitment of endocytotic proteins such as *DNM2*(39, 40). In addition, *MTM1* was
50 identified as binding partner of *BIN1*(41), suggesting a common pathway where *MTM1*, *BIN1*
51 and *DNM2* are involved.

52 Nevertheless, mutations in Ryanodin receptor 1 (*RYR1*)(42), myotubularin-related protein 14
53 (*MTMR14*) (43) and Titin (*TTN*) (44) have been reported to cause congenital myopathies with
54 CNM-like phenotype. However, due to their rarity, heterogeneity or clinical and
55 histopathological features overlapping with other neuromuscular disorders, their classification
56 as CNM remains controversial. It is worth noting that many patients with CNM-like phenotype
57 remain without genetic diagnostic which may imply mutations of other unknown genes causing
58 a CNM pathology.

59 Development of different animal models and their characterization greatly accelerated the
60 understanding of clinical, physiopathological and molecular aspects of CNMs. Moreover, they
61 represent precious tools to test and validate the different therapeutic approaches in preclinical
62 stage before embarking on clinical trials. This review provides a summary of the different
63 preclinical therapeutic trials that have been explored for CNM with a focus on XLMTM and
64 ADCNM forms.

65 Understanding CNMs through animal model phenotyping:

66 Different animal models were developed to mimic the XLMTM human phenotype. *Mtm1*
67 knockout (KO) (also called *Mtm1* δ 4, *Mtm1*-null or *Mtm1*-/*y*) was the first animal to be
68 generated and remains the most studied model. This mouse model was created by homologous
69 recombination and produces a large deletion of the exon 4 leading to a complete knockdown of
70 MTM1 protein(45). It presents a progressive myopathy starting from week 3-5 with a shortened
71 lifespan to around 7 weeks of age. In the terminal symptomatic period, severely affected mice
72 exhibit the similar CNM features to XLMTM patients: muscle atrophy and severe weakness
73 most probably due to myofiber atrophy. Muscle sections present a high frequency of abnormal
74 localization of nuclei and disorganized mitochondrial distribution. Additional studies have
75 shown that this defect in mitochondrial dynamics is due in part to the accumulation of
76 aggregated Desmin intermediate filament caused by alteration in autophagy and ubiquitin-
77 proteasome pathways(10, 16). Ultrastructural analysis of *Mtm1*KO muscles revealed dramatic
78 decrease of triads(8), membrane invagination implicated in excitation coupling machinery, as
79 well as sarcomere disorganization and enlargement of NMJ(12). This strong phenotype, that
80 mimics the human one, makes the *Mtm1*KO mice very attractive and most frequently used in
81 preclinical trials. In addition, more recently other mouse models have been created and studied.
82 A knock-in (KI) mouse carrying the p.R69C, mutation that had been identified in XLMTM
83 human patients with a milder phenotype, was generated to study the effect of residual
84 expression of MTM1 (46). In fact, the p.R69C mutation results in exon 4 skipping leading to
85 premature termination of myotubularin translation. However, some full-length MTM1 protein
86 was still expressed in this model, resulting in a milder phenotype compared to *Mtm1*KO mouse
87 suggesting that expression of a very small amount of MTM1 would have significant clinical
88 benefits in XLMTM cases. Although, these mice exhibit abnormal localization of nuclei and
89 organelles within hypotrophic myofibers with enlargement of NMJ(12, 46). A third mouse
90 model, the *Mtm1*^{gt/y}, was generated for XLMTM using a gene trap strategy (16). These mice
91 presented a milder phenotype than *Mtm1*KO mice with a similar histopathology including
92 hypotrophic fibers with mild increase in mislocalized organelle and internal nuclei with a
93 defective autophagy process. In addition to murine models, a zebrafish model of XLMTM was
94 generated using morpholinos(9). Injection of antisense oligonucleotides into embryos results in
95 reduction of myotubularin expression and caused CNM phenotype similar to XLMTM patient
96 such as myofiber atrophy, centralization of nuclei as well as mislocalization of organelle and
97 NMJ defects(9, 11). This defect in muscle structure causes abnormal dorsal curvature with

98 impairment in spontaneous movements and swimming capacities. More recently, a novel
99 zebrafish model for XLMTM was created using zinc finger nucleases(47). This model was
100 generated following a deletion of an 8-base pair (bp) in exon 5 of the *mtm1* gene causing a
101 frameshift and premature stop codon. In addition to a shortened survival (8-9 days), they present
102 a severe muscular phenotype similar to morphant model, including reduced motor abilities,
103 morphological and muscle structural defects. Finally, 2 naturally occurring canine models were
104 identified; a Labrador Retriever dog and a Rottweiler dog with progressive myotubular
105 myopathy were identified with p.N155K and p.Q384P mutations, respectively, in the *MTMI*
106 gene(48, 49). The two affected puppies show CNM clinical features such as gait abnormalities
107 with muscle weakness. The histopathology analysis of the muscle biopsies revealed
108 hypotrophic fibers with an increase in mispositioned nuclei and organelles.

109 Concerning ADCNM, a KI mouse model harboring the most frequent ADCNM mutation
110 R465W was generated (50). The homozygous KI mice present a neonatal lethality due to
111 metabolic defect including hypoglycemia, increased liver glycogen content and hepatomegaly
112 (51), whereas the heterozygous KI are viable and develop a progressive myopathy with
113 impairment of muscle contractile properties, atrophy and defect in mitochondria and reticular
114 network (50). Similarly to *Mtm1*-deficient mice, alterations of autophagy, ubiquitin-proteasome
115 pathways in addition to defective clathrin-dependent endocytosis and calcium homeostasis
116 were reported (50-52). As an alternative to germline mouse mutation approach, adeno-
117 associated virus (AAV) expressing R465W mutated DNM2 were intramuscularly injected into
118 WT mice and resulted in development of several ADCNM features such as: fiber atrophy,
119 histological abnormalities and muscle contraction defects, despite the endogenous expression
120 of DNM2 (53). These results suggest DNM2-CNM is not due to haploinsufficiency of DNM2,
121 and support other *in vitro* observations suggesting that DNM2 mutations leading to CNM may
122 act in a dominant manner (30, 54). Lastly, another more severe DNM2-CNM mutation, S619L,
123 was tested in animal models (55, 56). Overexpression of DNM2-S619L in zebrafish larvae
124 resulted in severe weakness and motor defects with histopathological and NMJ abnormalities.

125 Overall, these animal models recapitulate many clinical CNM features and have contributed to
126 identification of new pathomechanisms. As these models recapitulate the phenotype observed in
127 patients, many preclinical studies have been attempted with varying success, and will be
128 described and discussed below in detail.

129 Preclinical development of therapies for CNM:

130 Myotubularin gene and enzyme replacement strategy:

131 Gene therapy is a promising therapeutic approach for many monogenic disorders. Recent
132 progress has greatly increased the prospects for successful gene transfer(57-59). Among the
133 different options, AAV vectors have emerged as effective and potentially safe candidates for
134 certain indications (60, 61). This is reflected by the increasing number of successful clinical
135 trials that have driven the approval and marketing of different products based on AAV-gene
136 delivery, such as alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) (commercial name: Glybera®) for
137 lipoprotein lipase deficiency (LPLD)(62, 63). *MTM1* gene replacement was tested in murine
138 *Mtm1*KO as well as XLMTM Labrador dogs making this therapeutic option the most advanced
139 and the closest to clinical trials(64, 65). First, intramuscular injection of *Mtm1*KO with AAV
140 expressing *Mtm1* cDNA under desmin promoter corrected nuclei position, mitochondrial
141 distribution and autophagy defects in myofibers with recovery of muscle mass and force(15,
142 66). Based on these encouraging outcomes, AAV-*Mtm1* was then administered systemically to
143 deliver the myotubularin gene to muscles body wide in both mice and dogs lacking MTM1(64,
144 65). Significant improvements of survival and whole-body rescue were noted few weeks after
145 a single injection, with increase of muscle force and mass as well as correction of
146 histopathological hallmarks of CNM in absence of toxicity or immune response. This proof-of-
147 concept demonstrates the efficacy of gene therapy based approaches in both small and large
148 animals and indicates that post-natal gene replacement can reverse XLMTM phenotype.
149 However, several questions remain unanswered and should be investigated before this approach
150 can be used to treat XLMTM patients.

151 Selection of the best AAV serotype and promoter that controls the *MTM1* expression is essential
152 for effective and safe gene delivery. Although XLMTM patients exhibit mainly a muscular
153 phenotype, MTM1 is ubiquitously expressed and might have other key roles in other tissues
154 and organs. Tissue-tropism of AAV-*Mtm1* must respect the natural tissue-distribution of
155 MTM1 with equal expression level specific to each organ. The desmin promoter is highly active
156 in skeletal muscle, however, systemic delivery results in massive overexpression of MTM1 in
157 mouse heart (>600 fold) with an impact on cardiac histology. Thus, myotubularin promoter
158 could be the ideal regulator of myotubularin expression in the different tissues. Furthermore,
159 since MTM1 is barely expressed in XLMTM patient cells, it would be necessary to ensure that
160 delivering an exogenous protein will not trigger an intracellular reaction against the transgene.
161 Also, following the transduction, AAVs are present within cells as non-integrated episomes,

162 normal muscle turnover will likely lead to loss of transgene expression and reduce the efficacy.
163 Re-administration of these viral vectors several years after the initial infusion may thus be
164 necessary, in which case must be performed without eliciting immunoresponse. Finally,
165 production of an effective dose of AAV vectors for human administration presents a
166 manufacturing challenge and requires high titer solutions for effective gene delivery to every
167 single affected muscle.

168 Enzymotherapy or enzyme replacement is another approach that was tested to deliver MTM1
169 protein to myofibers (67). This strategy was developed based on the comparison of phenotype
170 severity between *Mtm*IKO, which is severely affected and is unable to produce any functional
171 myotubularin, and the *Mtm*IKI p.R69C mouse that is less affected and produce small amount
172 of myotubularin (46), suggesting that presence of small amount of myotubularin is sufficient to
173 improve the XLMTM phenotype. MTM1 was fused with a single chain fragment derived from
174 a mouse monoclonal antibody 3E10 (3E10Fv) (67). 3E10Fv-fused protein cellular uptake is
175 due to the interaction of 3E10Fv with the equilibrative nucleoside transporter 2 (ENT2), a
176 plasma membrane receptor widely distributed in mammalian tissues with particularly
177 abundance in skeletal muscle (68). Interestingly, the phosphatase activity of the fused
178 myotubularin-3E10Fv was similar to the none-fused myotubularin suggesting that this fusion
179 does not interfere with the enzymatic activity. Intramuscular injection of 3E10Fv-MTM1 into
180 *Mtm*IKO mice significantly improved the muscle function with an increase in muscle
181 contraction observed, that may be due to the increase in correctly positioned triads and T-
182 tubules observed by electronic microscopy. However, no improvement was seen in the light
183 microscopy of general muscle histology. Assessment of the beneficial effect of 3E10Fv-MTM1
184 was limited to intramuscular injections. Due to the generalized muscle defect in XLMTM
185 disease, systemic delivery will be required. The efficacy or systemic wide delivery of 3E10Fv-
186 MTM1 remains to be elucidated. The major advantage of this approach is the flexibility in
187 dosing but the short effect duration will necessitate a repeated re-administration, which may
188 induce an immunoresponse against the 3E10Fv-MTM1 complex. Similar therapeutic strategies
189 have been successfully employed especially in multisystemic lysosomal storage disorders
190 including alglucosidase alpha (Myozyme®) for Pompe disease, Agalsidase alpha (Replagal®)
191 or Agalsidase beta (Fabrazyme®) for Fabry disease and Imiglucerase (Cerezyme®) for
192 Gaucher disease(69-72). These marketed enzymotherapies showed the feasibility of such
193 approaches and may be used as roadmap for therapeutic approach based on myotubularin
194 enzyme replacement for myotubular myopathy.

195 **Rebalancing phosphoinositides level:**

196 MTM1 is a phosphoinositide phosphatase enzyme, responsible for de-phosphorylation at the 3-
 197 position of phosphoinositol (PI) ring. Different XLMTM animal models have shown an
 198 increase in phosphoinositol-3-phosphate (PI3P) as a direct consequence of loss of MTM1 (9,
 199 46, 73). This low-abundant phospholipid is a key regulator of different cellular processes like:
 200 membrane trafficking and intracellular signaling, and its cellular level is tightly controlled
 201 through kinases and phosphatases (74, 75). Normalization of PI3P level strategy was tested as
 202 therapeutic target to restore the myopathic phenotype in *Mtm1*KO mice.

203 **Blocking the PI3P-generating kinases:**

204 Several kinases are implicated in the generation of PI3P: including class II (PIK3C2 β) and III
 205 (PIK3C3) kinases. Thus, reducing the elevated PI3P into XLMTM was investigated via
 206 blocking these PI3P-generating kinases(47). Based on the observation made in *Drosophila*
 207 *melanogaster* showing depletion of the class II PI3-kinase Pi3K68D can rescue the defects
 208 caused by *mtm* (orthologue of both MTM1 and MTMR2) deficiency(76), depletion of the class
 209 II PIK3C2 β was investigated in *Mtm1*KO mice (double knockout: *Mtm1*KO/muscle-specific
 210 *Pikc2 β* KO)(47). Genetic reduction of PIK3C2 β before or after disease onset prevented or
 211 reverted the myopathy by extending the life expectancy, improving the body weight and
 212 restoring muscular force and histology. Surprisingly, genetic reduction of PIK3C3 in *Mtm1*KO
 213 mice (*Mtm1*KO/*Pik3c3* heterozygous) worsened the CNM phenotype suggesting that MTM1
 214 and PIK3C2 β may control the same subpopulation of PI3P and that blocking the phosphorylation
 215 activity of PIK3C2 β , but not PIK3C3, would be a therapeutic target for XLMTM. To develop
 216 this approach the identification of drugs that can specifically target PIK3C2 β is required. In the
 217 same study, a drug screening trial was set up on the zebrafish model of XLMTM, where several
 218 PI3K inhibitors were tested. Specific inhibitors of PI3K class I or III, GDC-0941 or VPS34-
 219 IN1 respectively, did not improve the motor function and morphological defects. However, in
 220 the absence of specific class II inhibitor, unspecific inhibitors were tested including: PI-103,
 221 LYS294002 and Wortmannin, and significant improvements of the survival, motor function
 222 and morphology were observed in the treated larvae. The motor function amelioration is most
 223 likely due to the improvement in Ca²⁺ release defects as shown in isolated muscle fibers from
 224 *Mtm1*KO mice(77). In addition, treatment of *Mtm1*KO with Wortmannin prolonged the survival
 225 and ameliorated the CNM phenotype and histology(47, 77). All together, these findings shed
 226 light on the therapeutic potential of rebalancing the phosphoinositides via lowering the
 227 expression or the activity of class II PI3P-kinases in XLMTM that could be also applied to other

228 more common disease like: acute myeloid leukemia, glioblastoma multiform, neuroblastoma
 229 and medulloblastoma, where PIKC2 β is overexpressed(78-81). Furthermore, homozygous
 230 “knock-in” with kinase-dead inactivating mutation in PIKC2 β (PIKC2 β ^{D1212A/D1212A}) mouse
 231 present increased glucose tolerance and reduced circulating insulin with protection against
 232 steatosis (82), suggesting the wide interest of inhibiting the PIKC2 β kinase activity as
 233 therapeutic target for metabolic diseases such: type 2 diabetes or non-alcoholic fatty liver
 234 disease. It is noteworthy that, in contrast to PIKC2 β , inactivation of the PIKC2 α or PIKC2 γ in
 235 mouse results in negative metabolic defects like obesity, insulin resistance and glucose
 236 intolerance(83, 84). Other studies showed that PI3K class II play distinct and critical cellular
 237 roles compared with other PI3Ks(85), thereby blocking this non-redundant kinase may have
 238 unknown side effects in other non-investigated tissues. Inhibiting specifically PIKC2 β in
 239 muscle represent a very promising therapeutic approach in XLMTM, however development of
 240 specific PIKC2 β inhibitors is required for this approach to be developed further.

241 Modulating MTMR2:

242 In *Mtm*IKO, PI3P normalization was also obtained by overexpressing MTMR2, a close
 243 homolog of MTM1. Indeed, 14 myotubularins have been identified. They share different
 244 domains like PH-GRAM and coiled-coil, that are implicated in phosphoinositide binding and
 245 their oligomerization, respectively (86). However, 6 myotubularins do not have an enzymatic
 246 activity, and are named dead-phosphatase while 8 display a phosphatase activity(86). MTM1
 247 and MTMR2 share 65% of amino acid sequence identity and show a potent phosphatase activity
 248 (87). 2 MTMR2 isoforms were identified (88). The most studied isoform presents an N-terminal
 249 extension prior the PH GRAM domain. This long isoform (643 amino acids) results from the
 250 exclusion of alternative exons 1a and 2a. Similarly to MTM1, a short MTMR2 isoform (571
 251 amino acids) was identified without the N-terminal extension. It results from alternative start
 252 site in exon 3 due to inclusion of exons 1a and/or 2a. This isoform displays an MTM1-like
 253 activity and was found to be downregulated in *Mtm*IKO muscle (Raess et al. accepted). Using
 254 AAVs, local overexpression of short MTMR2 isoform ameliorates the muscular phenotype in
 255 *Mtm*IKO, with increase in muscle mass and force as well as muscle histology correction.
 256 Nevertheless, overexpression of the long isoform improves some myopathic features in
 257 *Mtm*IKO but was less prominent. In addition, overexpression of the short MTMR2 isoform
 258 normalizes the elevated PI3P level in *Mtm*IKO muscles, while the long isoform displays an
 259 intermediate reduction. This observation suggests that the additional N-terminal extension
 260 upstream the PH-GRAM domain is responsible of the functional difference between MTM1

261 and MTMR2. Thus, exogenous overexpression of short MTMR2 isoform or alternative splicing
262 modulation of endogenous MTMR2 transcripts through exclusion of N-terminal extension
263 appears very promising strategy to compensate the absence of MTM1 and could be applied as
264 therapeutic approach to normalize the PI3P level and therefor to treat XLMTM.

265 Reducing DNM2

266 Dynamins are large family of GTPase enzymes that are involved in key cellular processes (21-
267 26). Initially, DNM1 (the neuronal form) was the most extensively studied(89-91). However,
268 identification of the ubiquitous DNM2 isoform and demonstration of its implication in two
269 distinct human pathologies emphasize the importance of this mechanoenzyme in both
270 physiological and pathological contexts(17, 92, 93). More than 20 genetic mutations have been
271 described to cause either the autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth peripheral neuropathy
272 (CMTD1B) or ADCNM(18, 94). In addition, DNM2 was found to be upregulated in pancreatic
273 ductal carcinoma(95), acute lymphoblastic leukemia(96), glioblastoma(97), Duchenne
274 muscular dystrophy(98) as well as XLMTM(99) patient samples. In the latter case, due to their
275 common implication in the same congenital myopathy, dysregulated expression of DNM2 in
276 the absence of MTM1 may indicate their involvement in a common pathway where MTM1
277 might negatively control DNM2 and suggests its reduction as a therapeutic target in XLMTM.
278 Indeed, genetic reduction of DNM2 in *Mtm1*KO mice (*Mtm1*KO/*Dnm2* heterozygous) restored
279 CNM clinical features including: lifespan, whole-body weight, muscle histology, mass and
280 force(99). These data were confirmed recently using antisense oligonucleotides (ASO)
281 targeting specifically *Dnm2* transcript (100). Systemic delivery of these small fragments of
282 DNA into *Mtm1*KO mice knocked down DNM2 expression and prevented the development of
283 CNM in pre-symptomatic phase. Moreover, post-symptomatic ASO treatment reverted CNM
284 phenotype within 2 weeks by normalizing DNM2 expression, indicating that maintaining
285 DNM2 level within the normal 'healthy' range can restore muscle function in severely affected
286 mice thereby reducing any side effects related to DNM2 reduction. These observations make
287 the reduction of DNM2 by ASO injection a very attractive therapeutic approach. In addition,
288 many clinical trials using ASO have made considerable progress with some ASO-based drugs
289 approved for use in clinic, such as: Fomivirsen in Cytomegalovirus retinitis (local
290 administration), or systemic delivery : mipomersen for Familial hypercholesterolemia, and
291 more recently nusinersen and eteplirsen Spinal muscular atrophy and DMD, respectively(101).
292 Nevertheless, certain ASOs has been reported to accumulate into liver and kidney causing a
293 toxicity of these two vital organs(102-105). Thus, translation of this approach into XLMTM

294 patients will require the development of efficient and safe human ASO candidate. Taking
295 together, these data confirm the epistasis between MTM1 and DNM2 and validate DNM2 as a
296 potential therapeutic target for XLMTM. Whether reducing DNM2 has therapeutic potential in
297 other forms of CNM remains to be determined.

298 Targeting muscle hypertrophy / atrophy signaling pathways

299 XLMTM is characterized by a severe muscle atrophy, highlighted by the small muscle fiber
300 size consistent across several species due to loss of MTM1 (9, 35, 45, 48). Moreover, a clear
301 correlation between myofiber size, *MTM1* mutation type and clinical outcome has been
302 documented by comparing histology of XLMTM infant muscle biopsies and prognosis(106).
303 Indeed, larger myofibers were associated with relatively less severe clinical cases. This
304 observation indicates that myofiber size could be used as a surrogate marker to evaluate the
305 efficiency of drugs in future clinical trials and suggests that increasing fiber size as a new
306 therapeutic target. The regulation of muscle mass and fiber size is reflected by the balance
307 between protein synthesis and degradation which is controlled by different intracellular
308 signaling pathways. The two major pathways implicated to date are: IGF1-AKT-mTOR
309 (positive regulator of protein synthesis leading to muscle hypertrophy) and myostatin-Smad2/3
310 (negative regulator of protein synthesis causing muscular atrophy)(107). These two pathways
311 represent very interesting therapeutic targets that were investigated for XLMTM.

312 Targeting muscle growth: Activin Receptor type IIB inhibition

313 Myostatin, a member of TGF β (transforming growth factor beta), is a highly conserved negative
314 regulator of skeletal muscle bulk(108). Furthermore, natural deficiency or pharmacological
315 inhibition of the myostatin pathway has been reported to stimulate muscle growth by increasing
316 myofiber size and muscle mass(109-113), which makes anti-myostatin based therapeutic
317 approaches very attractive to different muscle wasting conditions including: Duchenne
318 muscular dystrophy(114), amyotrophic lateral sclerosis(115), sarcopenia(116) and cancer
319 cachexia(117, 118). Indeed, various myostatin inhibitor approaches have been identified and
320 tested in preclinical or clinical trials with varying efficacies, e.g. gene delivery of follistatin and
321 homologues(113), myostatin propeptide(119, 120), myostatin antibodies(114) and more
322 recently a soluble form of myostatin receptors(121, 122). In *Mtm1*KO, administration of a
323 soluble form of the extracellular region of ActRIIB (myostatin receptor) fused to the Fc portion
324 of human IgG results in a modest increase in body weight and myofiber size, that was reflected
325 clinically by extension of lifespan and muscle mass and force(123), whereas no clinical
326 improvements were noted following ActRIIB injection in the less severely affected *Mtm1* KI

327 p.R69C mice except hypertrophy of gastrocnemius muscle(14). Histology analysis of skeletal
328 muscles of both *Mtm*IKO or *Mtm*1 KI p.R69C, showed that the hypertrophy was restricted to
329 only myofiber type 2b suggesting that inhibiting myostatin has an effect only on fibers with low
330 oxidative capacities. However, in XLMTM cases, muscle biopsies are characterized by
331 predominance of highly oxidative type 1 fibers(35), which may compromise the efficacy of this
332 strategy in XLMTM patients. In addition to its skeletal muscle expression, myostatin is also
333 expressed at much lower level in the heart and adipose tissue. Myostatin null mice exhibit
334 cardiac hypertrophy with changes in structure and contractile parameters(124). Unlike muscular
335 dystrophies, where anti-myostatin drugs has been tested in the clinic(125), no study reported
336 cardiac abnormalities in XLMTM and systemic administration of anti-myostatin drugs would
337 block the cardiac myostatin which may induce a cardiac phenotype. Consequently, the
338 benefit/risk balance for anti-myostatin approach in XLMTM should be considered before
339 application on patients with XLMTM.

340 Targeting muscle degradation: Autophagy normalization

341 Ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosomal pathways play a vital role in cell homeostasis
342 by degrading damaged organelles, and unnecessary or dysfunctional components(126). Defects
343 of these two cellular processes have been reported in different *Mtm*1-deficient animals(14-16).
344 Analysis of muscles from *Mtm*IKO mice revealed an accumulation of ubiquitinated proteins
345 and defective mitochondria as well as a low conversion rate of LC3I to LC3II suggesting a
346 blockade of the late stage of autophagy (degradation step)(15, 16). In addition, loss of MTM1
347 was associated with hyperactivation of IGF1R/AKT/mTOR reflected by an
348 hyperphosphorylation of S6K1^{Thr389}, S6^{ser240/244} and 4EBP1^{Thr37/46} and increase of the autophagy
349 induction marker phospho-ULK1^{Ser757} (14-16). On the other hand, hypophosphorylation of the
350 FoxO3a^{ser318/321} (transcription factor implicated in muscle protein degradation) was noted in
351 MTM1-deficient muscles resulting in increased atrogene transcription (genes involved in
352 muscle atrophy) such as: Atrogin1, Murf1, Nedd4 and ZNF2016(15). Taken together, these
353 results indicate that MTM1-deficiency results in a defect in cellular clearance pathways and
354 suggests that activating the autophagy process may maintain homeostasis of the muscle fibers.
355 Pharmacological inhibition of mTOR using an allosteric inhibitor RAD001 or the ATP-
356 competitive inhibitor AZD8055 remarkably normalized autophagy markers by lowering p62
357 and increasing LC3I/LC3II conversion(16). Moreover, AZD8055 treatment in MTM-deficient
358 mice was associated with positive clinical effects such as muscle hypertrophy. These
359 encouraging results highlight the implication of MTM1 in autophagy-lysosome and ubiquitin-

360 proteasome pathways and propose autophagy normalization as a new therapeutic target for
361 XLMTM. It is worthy to note that DNMT2 was also reported to be implicated in autophagy(50,
362 51). Liver, skeletal muscle and fibroblasts of R465W KI mice presented increase of LC3 with
363 impairment of the degradation of the autolysosomes(51). These findings point out to an
364 additional common molecular defect between XLMTM and ADCNM, and broaden the
365 therapeutic interest of the autophagy normalization approach.

366 Cell transplantation or cell therapy:

367 Cell transplantation has been tested in the clinic for many diseases with variable positive
368 outcomes(127). At present, most successful trials have been achieved in hematological diseases
369 using bone marrow cells which are relatively easy to harvest, manipulate and replace with good
370 safety profiles(128-131). In contrast, due to a large tissue distribution and slow cellular
371 turnover, stem cell transplantation showed very limited beneficial effects when used in
372 musculoskeletal disorders(132). In this field, the majority of trials focused on Duchenne
373 muscular dystrophy (DMD) which is characterized by myofiber degeneration/regeneration and
374 satellite cell pool exhaustion(133-136). Similarly, *Mtm1*-deficient mice present a decrease in
375 satellite cells(13, 14). In addition, *Mtm1*KO myoblasts have been reported to be apoptotic with
376 slow proliferation and poor cell engraftment indicating an inability of satellite cells to “rebuild”
377 damaged skeletal muscle(13) and suggesting cell replacement as a viable therapeutic option.
378 Syngeneic myoblast transplantation has been tested in *Mtm1*KI p.R69C mice (137). In this less
379 severe mouse model of XLMTM, injection of syngeneic skeletal muscle-derived myoblasts
380 from WT into gastrocnemius of *Mtm1*KI p.R69C results in moderated improvements in skeletal
381 muscle mass and force. This encouraging, albeit limited, positive effects demonstrated the
382 potency of this approach in XLMTM disease. Furthermore, tremendous progress has been
383 achieved in the isolation of muscle satellite cells and understanding the molecular and cellular
384 mechanisms that control their activity(133, 138-141). Combination of autologous cell therapy
385 with other approaches like: *ex vivo* genome editing or *ex vivo* gene replacement may present a
386 safe and an efficient way to achieve a successful cell therapy-based approach, while avoiding
387 immunoreactions to exogenous cells in case of allo-transplantation. Interestingly, myostatin
388 inhibition-based approach (described above) showed a significant increase of satellite cells
389 activation(14) and, more importantly, increases the success of myoblast transplantation(142)
390 indicating that inhibition of myostatin could be used in parallel to improve the efficacy of
391 myoblast transfer. Nonetheless, systemic delivery of stem cells to repopulate all affected
392 skeletal muscles represents the major limitation of this approach due to the large size, limited

393 survival and migration. Overall, this approach has promising future and encouraging
394 perspectives in XLMTM disease.

395 **Acetylcholinesterase inhibition:**

396 Defects of NMJ have been documented in XLMTM patients, and mouse and zebrafish models
397 of myotubular myopathy(11, 12, 143, 144). This chemical synapse, where a motoneuron
398 activates muscle contraction upon the arrival of an action potential at the presynaptic neuron
399 leading to a release of neurotransmitters, is well studied in congenital myasthenic syndromes
400 (CMS) that share many clinical features with CNM. Previous studies described the structural
401 and functional defect of NMJ in some patients with CNM without genetic diagnosis at that
402 time(143, 144). Using electron microscopy, muscle biopsies from CNM affected neonates
403 showed shallow primary synaptic clefts with few large synaptic vesicles indicating a poor NMJ
404 transmission. In addition, remarkable clinical improvements were noted in confirmed cases of
405 either XLMTM or ADCNM following treatment with pyridostigmine (an acetylcholinesterase
406 inhibitor which increases of acetylcholine within the synapse and commonly used to treat
407 myasthenia gravis and CMS)(11, 55). Furthermore, similar defects have been observed in a
408 zebrafish model of XLMTM (MTM1 hypomorphic morpholino model) or ADCNM (transiently
409 overexpressing the most severe DNM2-S619L mutation)(11, 55). In fact, these zebrafish
410 models exhibit an abnormal distribution of acetylcholine receptors that was associated with a
411 decrease in swimming capacities, while treatment with edrophonium (another
412 acetylcholinesterase inhibitor) dramatically enhanced both spontaneous and touch evoked
413 movement. Finally, additional work confirmed the NMJ defect in two mouse models of
414 XLCNM, *Mtm1*KO and *Mtm1*KI pR69C(12). In *Mtm1*KO, NMJs appear larger and
415 ultrastructural examination reveal simplification of post junctional folds with presence of many
416 vacuolar structures resembling NMJ ultrastructure described in XLMTM patients. In all, these
417 findings indicate the contribution of NMJ defects in muscle weakness of CNM patients and the
418 role of the two CNM-causing genes (MTM1 and DNM2) in the regulation of NMJ. Both MTM1
419 and DNM2 play an important role in membrane remodeling and trafficking and their mutations
420 could affect the NMJ function. Diminished muscle activity caused by dysregulation of Ca²⁺
421 homeostasis due to tubulation defects seen in both XLMTM and ADCNM may explain in part
422 the NMJ remodeling. Thus, increasing acetylcholine half-life in the synapse may represent an
423 effective symptomatic therapy for patient with CNM.

Approach	Species & CNM form	Strategy validation	Positive outcomes					References	Adve ntage	dis advantage
			Lifes pan	body weight	Muscle mass and/or force	Muscle histology	Additional observations			
Myotubularin gene delivery AAV-Mtm1	<i>Mtm1</i> KO mouse	Local (intramuscular)	N/A	N/A	+++	+++	Autophagy normalization	Buj-Bello A. <i>et al.</i> 2008	Single injection Long-term expression in transduced myofibers No integration of transgene in the genome Organ-specificity: promoters, serotypes	Possible immunogenicity to AAV in human Possible intracellular reaction to exogenous MTMI Possible loss of episome due to normal muscle turnover Not "finetunable" Treatment interruption: impossible once injected
		Systemic (Intravenous)	+++	+++	+++	/	Al-Qusairi L. <i>et al.</i> 2013			
	Local (intramuscular)	N/A	N/A	+++	+++	/	Childers M.K. <i>et al.</i> 2014			
PI3K inhibition	XLMTM dog	Systemic (Intravenous)	+++	+++	+++	+++	/	Childers M.K. <i>et al.</i> 2014	Organ-specificity: promoters, serotypes	Not "finetunable" Treatment interruption: impossible once injected
		Genetic homozygous knockout of <i>Pik3c2b</i>	+++	+++	+++	+++	/	Maek D.L. <i>et al.</i> 2017		
	<i>Mtm1</i> KO mouse	+	-	N/D	+	/	Sebhia N. <i>et al.</i> 2017	No specific inhibitor of PIK2β		
DNN2 knockdown	<i>mtm1</i> KO zebrafish	Dilution of LY5294002, Wortmannin, VPS34-IN1, GDC0941 or PI-103 in culture dishes	+++	N/A	++	N/D	/	Kutchukian <i>et al.</i> 2016	Total PIK2β knockdown/blockade is needed	
		Genetic heterozygous knockout of <i>Dnm2</i>	+++	+++	+++	+++	/	Sebhia N. <i>et al.</i> 2017		
	<i>Mtm1</i> KO mouse	N/A	N/A	+++	+++	/	Tasfaout H. <i>et al.</i> 2017	Very tolerated "Finetunable" Treatment interruption: possible Sequence substitution: possible		
Myotubularin enzyme delivery	<i>Mtm1</i> pR69C KI mouse	Local (Intramuscular injection of ASO)	+++	+++	+++	+++	Improvement in diaphragm	Tasfaout H. <i>et al.</i> 2017	Short-term effect: readministration No organ specificity Possible kidney and liver toxicity	
		Local (Intramuscular injection of MTMI-3E10Fv)	N/A	N/A	+	+	/	Lawlor M. W. <i>et al.</i> 2013		"Finetunable" Treatment interruption: possible
	XLMTM patient	N/D	N/D	+	N/D	/	Robb S.A. <i>et al.</i> 2011			
Acetylcholinesterase inhibition	ADCNM patient	Systemic (oral pyridostigmine)	N/D	N/D	+	N/D	/	Gibbs E.M. <i>et al.</i> 2013	Symptomatic treatment Gastrointestinal side-effects	
		Dilution of endophormium in culture dishes	N/D	N/A	+++	N/D	/	Robb S.A. <i>et al.</i> 2011		FDA approved Already used for myopathies
	dm2-S619L KI zebrafish	N/D	N/A	+++	N/D	/	Gibbs E.M. <i>et al.</i> 2013			
Myostatin inhibition	<i>Mtm1</i> KO mouse	Systemic (intraperitoneal of ActRIIB-mFc)	+	+	+	+	/	Lawlor M. W. <i>et al.</i> 2011	Symptomatic treatment Hypotrophy restricted to fiber Type 2b	
	<i>Mtm1</i> pR69C KI mouse		N/D	-	+	increase in satellite cells number	Lawlor M. W. <i>et al.</i> 2014			
Autophagy activation	<i>Mtm1</i> gr/y	Systemic (oral gavage allosteric inhibitor RAD001 ATP-competitive inhibitor AZD8055)	N/D	N/D	+	N/D	Autophagy normalization	Fatahvero K. M. <i>et al.</i> 2013	Unknown side-effect in the other organs	

Table 1: Comparison between the different therapeutic approaches with their respective pros and cons. ND: no data. NA: not applicable

424 **Conclusions and perspectives:**

425 Substantial advances have been achieved in our understanding of the molecular
426 pathomechanisms causing CNM, which have allowed the emergence of new therapeutic
427 strategies targeting different cellular defects (see figure1), and the creation of several companies
428 dedicated to developing these approaches to clinic However, the functional links between
429 mutated genes and the different cellular abnormalities are not well understood. In addition, the
430 overlap observed in clinical features, histology and some cellular defects between different
431 CNM forms suggest a common pathway where the different mutated protein may be involved.
432 Moreover, some therapeutic approaches have been tested in different forms while, in case of
433 XLMTM, another strategy demonstrates that targeting another CNM-causing gene (*Dnm2*) than
434 the one mutated (*Mtm1*) can rebalance the muscle function which clearly illustrate the epistasis
435 between MTM1 and DNM2. Many individuals with CNM-like phenotype remain without
436 genetic diagnosis suggesting other genes implicated in this disease. Identification of new
437 candidate genes will certainly contribute into characterization of new defective cellular
438 pathways which would explain the molecular link between the different CNM forms.

439 Finally, despite the promising rescue observed in XLMTM animal models with the three
440 strategies: myotubularin gene replacement, inhibition of the class II of Pi3K and knockdown of
441 DNM2, there are a number of hurdles to overcome before implantation of these therapeutic
442 strategies in clinical trials, such as effectiveness, sustainability, toxicity, tissue specific delivery,
443 and side effects. Each of these therapeutic approaches has its own pros and cons (summarized
444 in Table 1) that make their use challenging or in contrast accelerate their translation to the clinic.

445

446 **References:**

- 447 1. Spiro AJ, Shy GM, Gonatas NK. Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an
448 adolescent boy. Arch Neurol. 1966;14(1):1-14.
- 449 2. Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, Coy JF, et al. A gene mutated in X-linked
450 myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. Nat
451 Genet. 1996;13(2):175-82.
- 452 3. Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J. Centronuclear (myotubular) myopathy.
453 Orphanet J Rare Dis. 2008;3:26.
- 454 4. Herman GE, Finegold M, Zhao W, de Gouyon B, Metzenberg A. Medical complications in long-
455 term survivors with X-linked myotubular myopathy. J Pediatr. 1999;134(2):206-14.
- 456 5. Laporte J, Kress W, Mandel JL. Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by detection of
457 myotubularin. Ann Neurol. 2001;50(1):42-6.

- 458 6. Tosch V, Vasli N, Kretz C, Nicot AS, Gasnier C, Dondaine N, et al. Novel molecular diagnostic
459 approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations.
460 *Neuromuscul Disord.* 2010;20(6):375-81.
- 461 7. Tsujita K, Itoh T, Ijuin T, Yamamoto A, Shisheva A, Laporte J, et al. Myotubularin regulates the
462 function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate
463 interaction. *J Biol Chem.* 2004;279(14):13817-24.
- 464 8. Al-Qusairi L, Weiss N, Toussaint A, Berbey C, Messaddeq N, Kretz C, et al. T-tubule
465 disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin
466 lipid phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(44):18763-8.
- 467 9. Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, Gibbs EM, Kuwada JY, Bonnemann CG, et al. Loss of
468 myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular
469 myopathy. *PLoS Genet.* 2009;5(2):e1000372.
- 470 10. Hnia K, Tronchere H, Tomczak KK, Amoasii L, Schultz P, Beggs AH, et al. Myotubularin controls
471 desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal
472 muscle. *J Clin Invest.* 2011;121(1):70-85.
- 473 11. Robb SA, Sewry CA, Dowling JJ, Feng L, Cullup T, Lillis S, et al. Impaired neuromuscular
474 transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies.
475 *Neuromuscul Disord.* 2011;21(6):379-86.
- 476 12. Dowling JJ, Joubert R, Low SE, Durban AN, Messaddeq N, Li X, et al. Myotubular myopathy
477 and the neuromuscular junction: a novel therapeutic approach from mouse models. *Dis Model Mech.*
478 2012;5(6):852-9.
- 479 13. Lawlor MW, Alexander MS, Viola MG, Meng H, Joubert R, Gupta V, et al. Myotubularin-
480 deficient myoblasts display increased apoptosis, delayed proliferation, and poor cell engraftment.
481 *Am J Pathol.* 2012;181(3):961-8.
- 482 14. Lawlor MW, Viola MG, Meng H, Edelstein RV, Liu F, Yan K, et al. Differential muscle
483 hypertrophy is associated with satellite cell numbers and Akt pathway activation following activin
484 type IIB receptor inhibition in *Mtm1* p.R69C mice. *Am J Pathol.* 2014;184(6):1831-42.
- 485 15. Al-Qusairi L, Prokic I, Amoasii L, Kretz C, Messaddeq N, Mandel JL, et al. Lack of myotubularin
486 (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-
487 proteasome pathways. *FASEB J.* 2013;27(8):3384-94.
- 488 16. Fetalvero KM, Yu Y, Goetschkes M, Liang G, Valdez RA, Gould T, et al. Defective autophagy
489 and mTORC1 signaling in myotubularin null mice. *Mol Cell Biol.* 2013;33(1):98-110.
- 490 17. Bitoun M, Maugenre S, Jeannet PY, Lacene E, Ferrer X, Laforet P, et al. Mutations in dynamin
491 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet.* 2005;37(11):1207-9.
- 492 18. Bohm J, Biancalana V, Dechene ET, Bitoun M, Pierson CR, Schaefer E, et al. Mutation
493 spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal
494 dominant centronuclear myopathy. *Hum Mutat.* 2012;33(6):949-59.
- 495 19. Bitoun M, Bevilacqua JA, Prudhon B, Maugenre S, Taratuto AL, Monges S, et al. Dynamin 2
496 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann Neurol.* 2007;62(6):666-
497 70.
- 498 20. Susman RD, Quijano-Roy S, Yang N, Webster R, Clarke NF, Dowling J, et al. Expanding the
499 clinical, pathological and MRI phenotype of DNM2-related centronuclear myopathy. *Neuromuscul*
500 *Disord.* 2010;20(4):229-37.
- 501 21. Warnock DE, Baba T, Schmid SL. Ubiquitously expressed dynamin-II has a higher intrinsic
502 GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal dynamin-I. *Mol Biol Cell.*
503 1997;8(12):2553-62.
- 504 22. Di A, Nelson DJ, Bindokas V, Brown ME, Libunao F, Palfrey HC. Dynamin regulates focal
505 exocytosis in phagocytosing macrophages. *Mol Biol Cell.* 2003;14(5):2016-28.
- 506 23. Arneson LN, Segovis CM, Gomez TS, Schoon RA, Dick CJ, Lou Z, et al. Dynamin 2 regulates
507 granule exocytosis during NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 2008;181(10):6995-7001.
- 508 24. Maier O, Knoblich M, Westermann P. Dynamin II binds to the trans-Golgi network. *Biochem*
509 *Biophys Res Commun.* 1996;223(2):229-33.

- 510 25. Jones SM, Howell KE, Henley JR, Cao H, McNiven MA. Role of dynamin in the formation of
511 transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science*. 1998;279(5350):573-7.
- 512 26. Kreitzer G, Marmorstein A, Okamoto P, Vallee R, Rodriguez-Boulan E. Kinesin and dynamin
513 are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):125-7.
- 514 27. McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW. Regulated interactions between
515 dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol*. 2000;151(1):187-98.
- 516 28. Mooren OL, Kotova TI, Moore AJ, Schafer DA. Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin
517 filaments. *J Biol Chem*. 2009;284(36):23995-4005.
- 518 29. Yamada H, Takeda T, Michiue H, Abe T, Takei K. Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is
519 implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells. *Int J*
520 *Oncol*. 2016;49(3):877-86.
- 521 30. Wang L, Barylko B, Byers C, Ross JA, Jameson DM, Albanesi JP. Dynamin 2 mutants linked to
522 centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem*. 2010;285(30):22753-7.
- 523 31. Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, et al. Mutations in
524 amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive
525 centronuclear myopathy. *Nat Genet*. 2007;39(9):1134-9.
- 526 32. Bohm J, Biancalana V, Malfatti E, Dondaine N, Koch C, Vasli N, et al. Adult-onset autosomal
527 dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations. *Brain*. 2014;137(Pt 12):3160-70.
- 528 33. Wu T, Shi Z, Baumgart T. Mutations in BIN1 associated with centronuclear myopathy disrupt
529 membrane remodeling by affecting protein density and oligomerization. *PLoS One*.
530 2014;9(4):e93060.
- 531 34. Bohm J, Yis U, Ortac R, Cakmakci H, Kurul SH, Dirik E, et al. Case report of intrafamilial
532 variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel BIN1 stop mutation.
533 *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:35.
- 534 35. Romero NB. Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord*.
535 2010;20(4):223-8.
- 536 36. Claeys KG, Maisonobe T, Bohm J, Laporte J, Hezode M, Romero NB, et al. Phenotype of a
537 patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation. *Neurology*.
538 2010;74(6):519-21.
- 539 37. Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, et al. Misregulated
540 alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic
541 dystrophy. *Nat Med*. 2011;17(6):720-5.
- 542 38. Meunier B, Quaranta M, Daviet L, Hatzoglou A, Leprince C. The membrane-tubulating
543 potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein
544 170 (CLIP-170). *Eur J Cell Biol*. 2009;88(2):91-102.
- 545 39. Kojima C, Hashimoto A, Yabuta I, Hirose M, Hashimoto S, Kanaho Y, et al. Regulation of Bin1
546 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO J*. 2004;23(22):4413-22.
- 547 40. Dong J, Misselwitz R, Welfle H, Westermann P. Expression and purification of dynamin II
548 domains and initial studies on structure and function. *Protein Expr Purif*. 2000;20(2):314-23.
- 549 41. Royer B, Hnia K, Gavriilidis C, Tronchere H, Tosch V, Laporte J. The myotubularin-amphiphysin
550 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep*. 2013;14(10):907-15.
- 551 42. Wilmschurst JM, Lillis S, Zhou H, Pillay K, Henderson H, Kress W, et al. RYR1 mutations are a
552 common cause of congenital myopathies with central nuclei. *Ann Neurol*. 2010;68(5):717-26.
- 553 43. Tosch V, Rohde HM, Tronchere H, Zanoteli E, Monroy N, Kretz C, et al. A novel PtdIns3P and
554 PtdIns(3,5)P2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Hum Mol Genet*.
555 2006;15(21):3098-106.
- 556 44. Ceyhan-Birsoy O, Agrawal PB, Hidalgo C, Schmitz-Abe K, DeChene ET, Swanson LC, et al.
557 Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy. *Neurology*.
558 2013;81(14):1205-14.
- 559 45. Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, Pellissier JF, et al. The lipid
560 phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in
561 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):15060-5.

- 562 46. Pierson CR, Dulin-Smith AN, Durban AN, Marshall ML, Marshall JT, Snyder AD, et al. Modeling
563 the human MTM1 p.R69C mutation in murine Mtm1 results in exon 4 skipping and a less severe
564 myotubular myopathy phenotype. *Hum Mol Genet.* 2012;21(4):811-25.
- 565 47. Sabha N, Volpatti JR, Gonorazky H, Reifler A, Davidson AE, Li X, et al. PIK3C2B inhibition
566 improves function and prolongs survival in myotubular myopathy animal models. *J Clin Invest.*
567 2016;126(9):3613-25.
- 568 48. Beggs AH, Bohm J, Snead E, Kozlowski M, Maurer M, Minor K, et al. MTM1 mutation
569 associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
570 2010;107(33):14697-702.
- 571 49. Shelton GD, Rider BE, Child G, Tzannes S, Guo LT, Moghadaszadeh B, et al. X-linked
572 myotubular myopathy in Rottweiler dogs is caused by a missense mutation in Exon 11 of the MTM1
573 gene. *Skelet Muscle.* 2015;5(1):1.
- 574 50. Durieux AC, Vignaud A, Prudhon B, Viou MT, Beuvin M, Vassilopoulos S, et al. A centronuclear
575 myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum Mol*
576 *Genet.* 2010;19(24):4820-36.
- 577 51. Durieux AC, Vassilopoulos S, Laine J, Fraysse B, Brinas L, Prudhon B, et al. A centronuclear
578 myopathy--dynamin 2 mutation impairs autophagy in mice. *Traffic.* 2012;13(6):869-79.
- 579 52. Fraysse B, Guicheney P, Bitoun M. Calcium homeostasis alterations in a mouse model of the
580 Dynamin 2-related centronuclear myopathy. *Biol Open.* 2016;5(11):1691-6.
- 581 53. Cowling BS, Toussaint A, Amoasii L, Koebel P, Ferry A, Davignon L, et al. Increased expression
582 of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads
583 to structural defects and muscle weakness. *Am J Pathol.* 2011;178(5):2224-35.
- 584 54. Kenniston JA, Lemmon MA. Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations
585 found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J.* 2010;29(18):3054-67.
- 586 55. Gibbs EM, Clarke NF, Rose K, Oates EC, Webster R, Feldman EL, et al. Neuromuscular junction
587 abnormalities in DNM2-related centronuclear myopathy. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(6):727-37.
- 588 56. Gibbs EM, Davidson AE, Telfer WR, Feldman EL, Dowling JJ. The myopathy-causing mutation
589 DNM2-S619L leads to defective tubulation in vitro and in developing zebrafish. *Dis Model Mech.*
590 2014;7(1):157-61.
- 591 57. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, Benninghoff U, Cassani B, Callegaro L, et al. Gene therapy
592 for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med.* 2009;360(5):447-58.
- 593 58. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, et al.
594 Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med.*
595 2011;365(25):2357-65.
- 596 59. Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, et al. Effect of gene
597 therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 2008;358(21):2231-9.
- 598 60. Marks WJ, Jr., Ostrem JL, Verhagen L, Starr PA, Larson PS, Bakay RA, et al. Safety and
599 tolerability of intraputamin delivery of CERRE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to
600 patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. *Lancet Neurol.*
601 2008;7(5):400-8.
- 602 61. Worgall S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, Neyzi N, et al. Treatment of late
603 infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus
604 expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther.* 2008;19(5):463-74.
- 605 62. Carpentier AC, Frisch F, Labbe SM, Gagnon R, de Wal J, Greentree S, et al. Effect of alipogene
606 tiparvovec (AAV1-LPL(S447X)) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient
607 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(5):1635-44.
- 608 63. Gaudet D, Methot J, Dery S, Brisson D, Essiembre C, Tremblay G, et al. Efficacy and long-term
609 safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an
610 open-label trial. *Gene Ther.* 2013;20(4):361-9.
- 611 64. Childers MK, Joubert R, Poulard K, Moal C, Grange RW, Doering JA, et al. Gene therapy
612 prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy. *Sci*
613 *Transl Med.* 2014;6(220):220ra10.

- 614 65. Mack DL, Poulard K, Goddard MA, Latournerie V, Snyder JM, Grange RW, et al. Systemic
615 AAV8-Mediated Gene Therapy Drives Whole-Body Correction of Myotubular Myopathy in Dogs. *Mol*
616 *Ther.* 2017;25(4):839-54.
- 617 66. Buj-Bello A, Fougerousse F, Schwab Y, Messaddeq N, Spehner D, Pierson CR, et al. AAV-
618 mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in
619 targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Hum Mol Genet.*
620 2008;17(14):2132-43.
- 621 67. Lawlor MW, Armstrong D, Viola MG, Widrick JJ, Meng H, Grange RW, et al. Enzyme
622 replacement therapy rescues weakness and improves muscle pathology in mice with X-linked
623 myotubular myopathy. *Hum Mol Genet.* 2013;22(8):1525-38.
- 624 68. Crawford CR, Patel DH, Naeve C, Belt JA. Cloning of the human equilibrative,
625 nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional
626 expression in a transport-deficient cell line. *J Biol Chem.* 1998;273(9):5288-93.
- 627 69. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, Germain DP, Lee P, Waldek S, et al. Safety and efficacy of
628 recombinant human alpha-galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med.*
629 2001;345(1):9-16.
- 630 70. Brady RO, Pentchev PG, Gal AE, Hibbert SR, Dekaban AS. Replacement therapy for inherited
631 enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *N Engl J Med.*
632 1974;291(19):989-93.
- 633 71. Van den Hout H, Reuser AJ, Vulto AG, Loonen MC, Cromme-Dijkhuis A, Van der Ploeg AT.
634 Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet.*
635 2000;356(9227):397-8.
- 636 72. Van den Hout JM, Kamphoven JH, Winkel LP, Arts WF, De Klerk JB, Loonen MC, et al. Long-
637 term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk.
638 *Pediatrics.* 2004;113(5):e448-57.
- 639 73. Amoasii L, Hnia K, Chicanne G, Brech A, Cowling BS, Muller MM, et al. Myotubularin and
640 PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 8):1806-19.
- 641 74. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics.
642 *Nature.* 2006;443(7112):651-7.
- 643 75. Krauss M, Haucke V. Phosphoinositide-metabolizing enzymes at the interface between
644 membrane traffic and cell signalling. *EMBO Rep.* 2007;8(3):241-6.
- 645 76. Velichkova M, Juan J, Kadandale P, Jean S, Ribeiro I, Raman V, et al. Drosophila Mtm and class
646 II PI3K coregulate a PI(3)P pool with cortical and endolysosomal functions. *J Cell Biol.*
647 2010;190(3):407-25.
- 648 77. Kutchukian C, Lo Scudato M, Tourneur Y, Poulard K, Vignaud A, Berthier C, et al.
649 Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca²⁺ release defects and prolongs survival in
650 myotubularin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(50):14432-7.
- 651 78. Qian Z, Fernald AA, Godley LA, Larson RA, Le Beau MM. Expression profiling of CD34+
652 hematopoietic stem/ progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid
653 leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(23):14925-30.
- 654 79. Chiaretti S, Li X, Gentleman R, Vitale A, Wang KS, Mandelli F, et al. Gene expression profiles
655 of B-lineage adult acute lymphocytic leukemia reveal genetic patterns that identify lineage derivation
656 and distinct mechanisms of transformation. *Clin Cancer Res.* 2005;11(20):7209-19.
- 657 80. Boller D, Doepfner KT, De Laurentiis A, Guerreiro AS, Marinov M, Shalaby T, et al. Targeting
658 PI3KC2beta impairs proliferation and survival in acute leukemia, brain tumours and neuroendocrine
659 tumours. *Anticancer Res.* 2012;32(8):3015-27.
- 660 81. Knobbe CB, Reifemberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to
661 the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in
662 glioblastomas. *Brain Pathol.* 2003;13(4):507-18.
- 663 82. Alliouachene S, Bilanges B, Chicanne G, Anderson KE, Pearce W, Ali K, et al. Inactivation of
664 the Class II PI3K-C2beta Potentiates Insulin Signaling and Sensitivity. *Cell Rep.* 2015;13(9):1881-94.

- 665 83. Alliouachene S, Bilanges B, Chaussade C, Pearce W, Foukas LC, Scudamore CL, et al.
666 Inactivation of class II PI3K-C2alpha induces leptin resistance, age-dependent insulin resistance and
667 obesity in male mice. *Diabetologia*. 2016;59(7):1503-12.
- 668 84. Braccini L, Ciraolo E, Campa CC, Perino A, Longo DL, Tibolla G, et al. PI3K-C2gamma is a Rab5
669 effector selectively controlling endosomal Akt2 activation downstream of insulin signalling. *Nat*
670 *Commun*. 2015;6:7400.
- 671 85. Maffucci T, Falasca M. New insight into the intracellular roles of class II phosphoinositide 3-
672 kinases. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(5):1378-82.
- 673 86. Raess MA, Friant S, Cowling BS, Laporte J. WANTED - Dead or alive: Myotubularins, a large
674 disease-associated protein family. *Adv Biol Regul*. 2017;63:49-58.
- 675 87. Laporte J, Liaubet L, Blondeau F, Tronchere H, Mandel JL, Payrastre B. Functional redundancy
676 in the myotubularin family. *Biochem Bioph Res Co*. 2002;291(2):305-12.
- 677 88. Bolino A, Marigo V, Ferrera F, Loader J, Romio L, Leoni A, et al. Molecular characterization
678 and expression analysis of Mtmr2, mouse homologue of MTMR2, the Myotubularin-related 2 gene,
679 mutated in CMT4B. *Gene*. 2002;283(1-2):17-26.
- 680 89. Shpetner HS, Vallee RB. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that
681 mediates interactions between microtubules. *Cell*. 1989;59(3):421-32.
- 682 90. Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, Vallee RB. Molecular cloning of the
683 microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of
684 GTP-binding proteins. *Nature*. 1990;347(6290):256-61.
- 685 91. Chen MS, Obar RA, Schroeder CC, Austin TW, Poodry CA, Wadsworth SC, et al. Multiple forms
686 of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis. *Nature*.
687 1991;351(6327):583-6.
- 688 92. Cook TA, Urrutia R, McNiven MA. Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously
689 expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2):644-8.
- 690 93. Zuchner S, Nouredine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K, De Jonghe P, et al.
691 Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-
692 Marie-Tooth disease. *Nat Genet*. 2005;37(3):289-94.
- 693 94. Durieux AC, Prudhon B, Guicheney P, Bitoun M. Dynamin 2 and human diseases. *J Mol Med*
694 (Berl). 2010;88(4):339-50.
- 695 95. Eppinga RD, Krueger EW, Weller SG, Zhang L, Cao H, McNiven MA. Increased expression of
696 the large GTPase dynamin 2 potentiates metastatic migration and invasion of pancreatic ductal
697 carcinoma. *Oncogene*. 2012;31(10):1228-41.
- 698 96. Ge Z, Gu Y, Han Q, Zhao G, Li M, Li J, et al. Targeting High Dynamin-2 (DNM2) Expression by
699 Restoring Ikaros Function in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci Rep*. 2016;6:38004.
- 700 97. Feng H, Liu KW, Guo P, Zhang P, Cheng T, McNiven MA, et al. Dynamin 2 mediates
701 PDGFRalpha-SHP-2-promoted glioblastoma growth and invasion. *Oncogene*. 2012;31(21):2691-702.
- 702 98. Alexander MS, Kawahara G, Motohashi N, Casar JC, Eisenberg I, Myers JA, et al. MicroRNA-
703 199a is induced in dystrophic muscle and affects WNT signaling, cell proliferation, and myogenic
704 differentiation. *Cell Death Differ*. 2013;20(9):1194-208.
- 705 99. Cowling BS, Chevremont T, Prokic I, Kretz C, Ferry A, Coirault C, et al. Reducing dynamin 2
706 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1350-63.
- 707 100. Tasfaout H, Buono S, Guo S, Kretz C, Messaddeq N, Booten S, et al. Antisense
708 oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat*
709 *Commun*. 2017;8:15661.
- 710 101. Stein CA, Castanotto D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther*.
711 2017;25(5):1069-75.
- 712 102. Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, et al.
713 Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant
714 hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(2):687-700.

- 715 103. Burdick AD, Sciabola S, Mantena SR, Hollingshead BD, Stanton R, Warneke JA, et al. Sequence
716 motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid--modified antisense oligonucleotides.
717 *Nucleic Acids Res.* 2014;42(8):4882-91.
- 718 104. van Poelgeest EP, Swart RM, Betjes MG, Moerland M, Weening JJ, Tessier Y, et al. Acute
719 kidney injury during therapy with an antisense oligonucleotide directed against PCSK9. *Am J Kidney*
720 *Dis.* 2013;62(4):796-800.
- 721 105. Herrington WG, Talbot DC, Lahn MM, Brandt JT, Callies S, Nagle R, et al. Association of long-
722 term administration of the survivin mRNA-targeted antisense oligonucleotide LY2181308 with
723 reversible kidney injury in a patient with metastatic melanoma. *Am J Kidney Dis.* 2011;57(2):300-3.
- 724 106. Pierson CR, Agrawal PB, Blasko J, Beggs AH. Myofiber size correlates with MTM1 mutation
725 type and outcome in X-linked myotubular myopathy. *Neuromuscul Disord.* 2007;17(7):562-8.
- 726 107. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. Mechanisms regulating skeletal muscle
727 growth and atrophy. *FEBS J.* 2013;280(17):4294-314.
- 728 108. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-
729 beta superfamily member. *Nature.* 1997;387(6628):83-90.
- 730 109. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, et al. A mutation creating a potential
731 illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet.*
732 2006;38(7):813-8.
- 733 110. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene.
734 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(23):12457-61.
- 735 111. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, et al. A mutation
736 in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote
737 dogs. *PLoS Genet.* 2007;3(5):e79.
- 738 112. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, et al. Myostatin mutation
739 associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.* 2004;350(26):2682-8.
- 740 113. Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umaphathi P, Eagle A, Shilling C, et al. Long-term enhancement of
741 skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl*
742 *Acad Sci U S A.* 2008;105(11):4318-22.
- 743 114. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, et al. Functional
744 improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature.* 2002;420(6914):418-21.
- 745 115. Holzbaur EL, Howland DS, Weber N, Wallace K, She Y, Kwak S, et al. Myostatin inhibition
746 slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.*
747 2006;23(3):697-707.
- 748 116. Siriatt V, Salerno MS, Berry C, Nicholas G, Bower R, Kambadur R, et al. Antagonism of
749 myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Mol Ther.* 2007;15(8):1463-70.
- 750 117. Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA. Acute inhibition of
751 myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem*
752 *Biophys Res Commun.* 2010;391(3):1548-54.
- 753 118. Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle
754 wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell.* 2010;142(4):531-43.
- 755 119. Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA, et al. GDF-8 propeptide
756 binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth*
757 *Factors.* 2001;18(4):251-9.
- 758 120. Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM, et al. The myostatin
759 propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal
760 serum. *J Biol Chem.* 2002;277(43):40735-41.
- 761 121. Cadena SM, Tomkinson KN, Monnell TE, Spaits MS, Kumar R, Underwood KW, et al.
762 Administration of a soluble activin type IIB receptor promotes skeletal muscle growth independent of
763 fiber type. *J Appl Physiol (1985).* 2010;109(3):635-42.
- 764 122. Morrison BM, Lachey JL, Warsing LC, Ting BL, Pullen AE, Underwood KW, et al. A soluble
765 activin type IIB receptor improves function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp*
766 *Neurol.* 2009;217(2):258-68.

- 767 123. Lawlor MW, Read BP, Edelstein R, Yang N, Pierson CR, Stein MJ, et al. Inhibition of activin
768 receptor type IIB increases strength and lifespan in myotubularin-deficient mice. *Am J Pathol.*
769 2011;178(2):784-93.
- 770 124. Rodgers BD, Interlichia JP, Garikipati DK, Mamidi R, Chandra M, Nelson OL, et al. Myostatin
771 represses physiological hypertrophy of the heart and excitation-contraction coupling. *J Physiol.*
772 2009;587(Pt 20):4873-86.
- 773 125. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, et al. A phase
774 I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2008;63(5):561-71.
- 775 126. Liliienbaum A. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int J Biochem*
776 *Mol Biol.* 2013;4(1):1-26.
- 777 127. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell*
778 *Stem Cell.* 2015;17(1):11-22.
- 779 128. Passweg JR, Halter J, Bucher C, Gerull S, Heim D, Rovo A, et al. Hematopoietic stem cell
780 transplantation: a review and recommendations for follow-up care for the general practitioner. *Swiss*
781 *Med Wkly.* 2012;142:w13696.
- 782 129. Patel NC, Gallagher JL, Torgerson TR, Gilman AL. Successful haploidentical donor
783 hematopoietic stem cell transplant and restoration of STAT3 function in an adolescent with
784 autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *J Clin Immunol.* 2015;35(5):479-85.
- 785 130. Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med.* 2006;354(17):1813-26.
- 786 131. Weber C, Kasberg H, Copelan E. Successful hematopoietic stem cell transplantation following
787 a cyclophosphamide-containing preparative regimen with concomitant phenobarbital administration.
788 *Case Rep Transplant.* 2012;2012:721857.
- 789 132. Skuk D. Cell Transplantation and "Stem Cell Therapy" in the Treatment of Myopathies: Many
790 Promises in Mice, Few Realities in Humans. *ISRN Transplantation.* 2013;Volume 2013 (2013):25
791 pages.
- 792 133. Cerletti M, Jurga S, Witczak CA, Hirshman MF, Shadrach JL, Goodyear LJ, et al. Highly
793 efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell.*
794 2008;134(1):37-47.
- 795 134. Gussoni E, Blau HM, Kunkel LM. The fate of individual myoblasts after transplantation into
796 muscles of DMD patients. *Nat Med.* 1997;3(9):970-7.
- 797 135. Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, et al. Myoblast transfer in the
798 treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 1995;333(13):832-8.
- 799 136. Tremblay JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Bouchard JP, Satoh A, et al. Results of a triple blind
800 clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with
801 Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant.* 1993;2(2):99-112.
- 802 137. Lim HJ, Joo S, Oh SH, Jackson JD, Eckman DM, Bledsoe TM, et al. Syngeneic Myoblast
803 Transplantation Improves Muscle Function in a Murine Model of X-Linked Myotubular Myopathy.
804 *Cell Transplant.* 2015;24(9):1887-900.
- 805 138. Alessandri G, Pagano S, Bez A, Benetti A, Pozzi S, Iannolo G, et al. Isolation and culture of
806 human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages.
807 *Lancet.* 2004;364(9448):1872-83.
- 808 139. Conboy IM, Rando TA. The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and
809 cell fate determination in postnatal myogenesis. *Dev Cell.* 2002;3(3):397-409.
- 810 140. Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative
811 potential to aged muscle. *Science.* 2003;302(5650):1575-7.
- 812 141. Sherwood RI, Christensen JL, Conboy IM, Conboy MJ, Rando TA, Weissman IL, et al. Isolation
813 of adult mouse myogenic progenitors: functional heterogeneity of cells within and engrafting skeletal
814 muscle. *Cell.* 2004;119(4):543-54.
- 815 142. Fakhfakh R, Lee SJ, Tremblay JP. Administration of a soluble activin type IIB receptor
816 promotes the transplantation of human myoblasts in dystrophic mice. *Cell Transplant.*
817 2012;21(7):1419-30.

- 818 143. Ambler MW, Neave C, Singer DB. X-linked recessive myotubular myopathy: II. Muscle
819 morphology and human myogenesis. Hum Pathol. 1984;15(12):1107-20.
820 144. Fidzianska A, Goebel HH. Aberrant arrested in maturation neuromuscular junctions in
821 centronuclear myopathy. J Neurol Sci. 1994;124(1):83-8.

822

4. La voie de signalisation MAD (Mytotubularine1, Amphiphysine2 et Dynamine2) : Du fait de leur rôle dans le remodelage des membranes cellulaires et leur implication dans la genèse des myopathies centronucléaires, le laboratoire d'accueil a émis une hypothèse plaçant les trois protéines MTM1, AMPH2 (BIN1) et DNM2 dans une voie de signalisation commune appelée « voie MAD (MAD pathway) ». Cette hypothèse est appuyée par de nombreux travaux qui mettent ces trois protéines en relation directe ou indirecte.

4.1. Une interaction moléculaire directe :

Le laboratoire d'accueil a démontré que MTM1 interagit directement avec AMPH2 (BIN1) et stimule sa fonction de tubulation, alors que les mutations de BIN1 responsables de la forme récessive de myopathie centronucléaire altèrent cette interaction (Royer, Hnia et al. 2013). Les résultats suggèrent que lorsque MTM1 est présente au niveau de la membrane cytoplasmique, des changements des propriétés physico-chimiques de la membrane cytoplasmique s'opèrent, ce qui entraînerait le recrutement de BIN1 et déclencherait la tubulation. D'autre part, et comme je l'ai décrit dans les paragraphes précédents, BIN1 interagit avec DNM2 par les domaines SH3 et PRD et serait responsable de la modulation de l'activité GTPase de DNM2 et donc du devenir des tubules formés par DNM2. Ceci orienterait une tubulation soit vers une fission et une endocytose, soit vers une élongation et un maintien des tubules formés (Takei, Slepnev et al. 1999, Marks, Stowell et al. 2001, Yoshida, Kinuta et al. 2004).

Du point de vue physiopathologique, l'analyse de l'ultrastructure des muscles squelettiques des trois formes classiques de myopathie centronucléaire révèle des anomalies de formation et/ou de maintien des tubules-T. Cette observation souligne l'importance des protéines MAD dans la formation et la stabilisation de ces structures membranaires et montre que toute perturbation fonctionnelle de ces protéines MAD affecte la biogenèse des tubules-T (Dowling, Lawlor et al. 2014).

4.2. Une régulation indirecte via les phospholipides :

Comme décrit auparavant, la présence de PtdIns(4,5) P_2 au niveau de la membrane plasmique permet à BIN1 et DNM2 de s'accrocher à la bicouche lipidique via leurs domaines PI et PH, respectivement (Lee, Marcucci et al. 2002, Yasar, Surka et al. 2008). De plus, le domaine PI de BIN1 a une forte affinité pour le PtdIns(3) P et le PtdIns(5) P et une affinité faible pour le PtdIns(3,5) P_2 (Lee, Marcucci et al. 2002, Fugier, Klein et al. 2011). Or, PtdIns(3) P et PtdIns(3,5) P_2 sont les deux substrats de MTM1 alors que PtdIns(5) P est le produit. Ceci laisse supposer que l'activité phosphatase de MTM1 régule la composition de la membrane plasmique

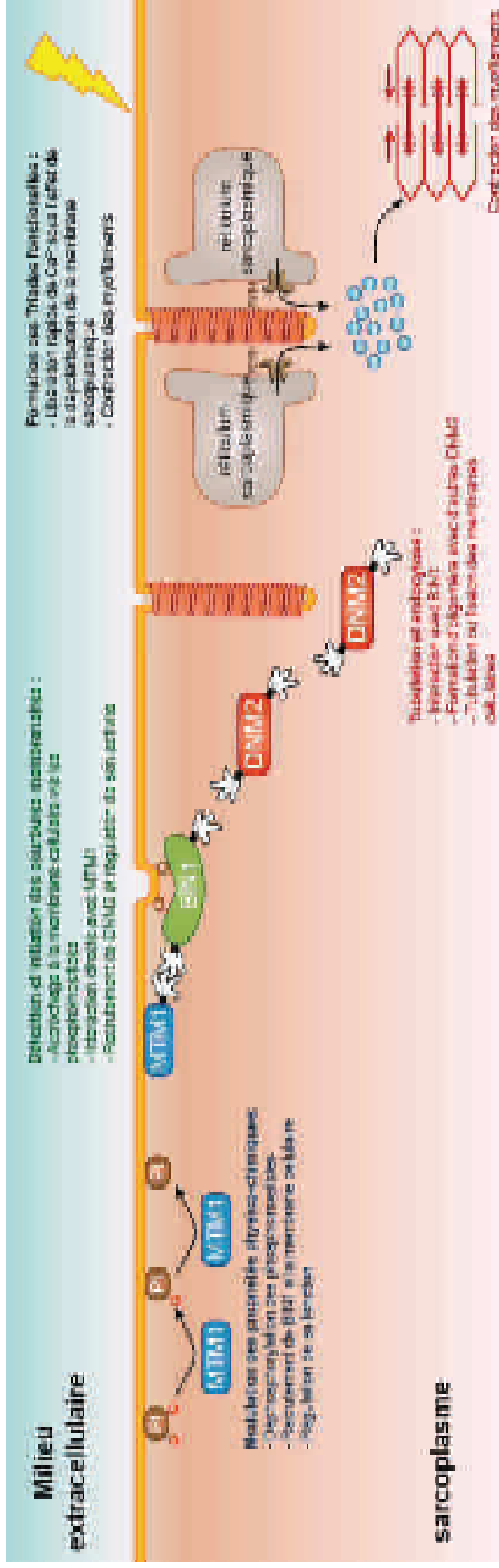


Figure 12 : Hypothèse d'une voie de signalisation commune (MAD pathway).

L'existence d'un lien commun entre MTM1, BIN1 et DNM2 est de plus en plus privilégiée. Dans cette voie de signalisation, nous pensons que, par le biais de son implication dans la modulation des propriétés physico-chimiques, MTM1 recrute BIN1 à la surface interne de la membrane cellulaire. Une fois accroché, BIN1 initie la tubulation et recrute à son tour DNM2 qui s'oligomère en formant une hélice autour de la membrane. La régulation de l'activité GTPase de DNM2 par BIN1 maintiendrait ces tubules qui formeraient par la suite des triades fonctionnelles en s'associant à deux réticulum sarcoplasmiques. Ces éléments sont indispensables à la libération rapide des ions calciques nécessaires à la contraction musculaire.

et permet de recruter BIN1 ce qui initie une tubulation. La participation d'autres phosphatases ou kinases à phosphoinositide dans cette interconversion des phospholipides membranaires n'est pas exclue.

Toutes ces données suggèrent que MTM1, BIN1 et DNM2 sont impliqués dans une cascade commune selon le scénario suivant (Figure 12) :

- MTM1 déphosphorylerait les phosphoinositides membranaires qui recruteraient BIN1
- Une fois fixé, BIN1 courberait la membrane et recruterait à son tour DNM2 qui s'oligomériserait en formant une hélice autour de l'invagination membranaire initiée par BIN1.
- Une faible activité GTPase de DNM2 conduit à un allongement des tubules, tandis qu'une hydrolyse rapide du GTP provoque une forte torsion de l'hélice entraînant ainsi une fission de la membrane. Ce contrôle de l'activité GTPase serait assuré par BIN1.

4.3. Une voie de signalisation affectée par les mutations génétiques :

Dans le cas des myopathies centronucléaires, les mutations de *MTM1* et de *BIN1* induisent une perte de fonction des protéines respectives (absence totale de MTM1 ou hypomorphie de BIN1), alors que les mutations de *DNM2* responsables de la forme dominante des myopathies centronucléaires sont suspectées d'entraîner un gain de fonction. En effet, des travaux menés par Kenniston et ses collègues montrent que les protéines DNM2 portant une mutation au niveau du domaine PH présentent une activité GTPase plus élevée à cause de changement de conformation de la protéine (Kenniston and Lemmon 2010). Wang et ses collègues ont confirmé ces observations et ils ont en plus montré que les formes mutées de DNM2 forment des oligomères très stables et plus résistants que les formes non mutées (Wang, Barylko et al. 2010). D'autre part, cette élévation de l'activité GTPase de DNM2 (induite par les mutations retrouvées chez les patients avec myopathie centronucléaire) a été associée à une fragmentation des tubules-T dans les myotubes en culture ainsi que chez la drosophile (Chin, Lee et al. 2015). Tous ces résultats mènent à la même conclusion, celle où les mutations de *DNM2* de myopathie centronucléaire induisent un gain de fonction de la protéine.

De plus, la surexpression de DNM2 dans le muscle de souris par transgénèse ou transduction virale de virus adéno-associés conduit à un phénotype musculaire ressemblant à celui observé dans les myopathies centronucléaires dont une atrophie musculaire et des anomalies

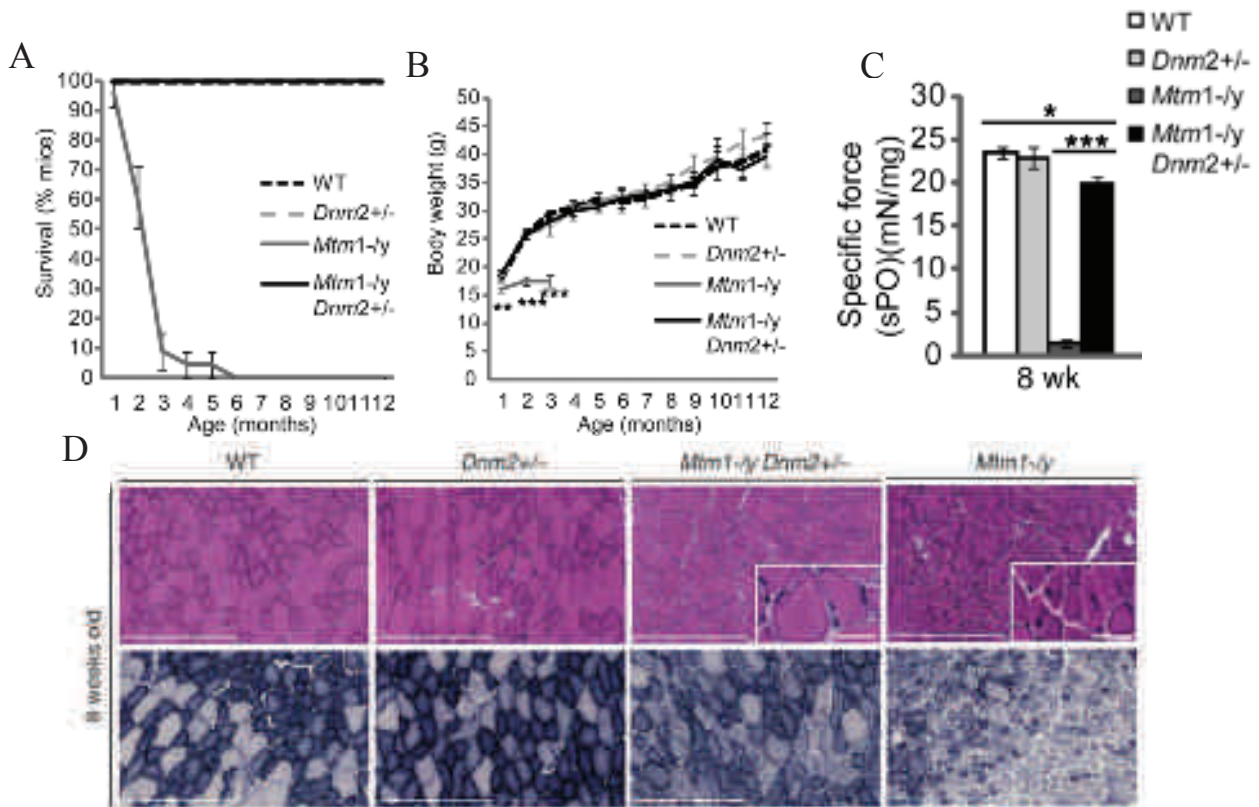


Figure 13 : Effets positifs de la réduction génétique de DNM2 dans la myopathie myotubulaire.

Alors que les souris déficientes en MTM1 présentent une espérance de vie très courte (A), une réduction du poids corporel (B) et une faiblesse musculaire mesurée *in situ* (C), leurs congénères *Mtm1*^{-/-}*DNM2*^{+/-} (déficientes en MTM1 et exprimant 50% du taux normal de DNM2) survivent plus longtemps avec un poids corporel similaire aux souris sauvages (A, B). De même, une augmentation de la force musculaire et une normalisation de l'histologie musculaire ont été notées chez ces souris (C, D) (d'après Cowling, Chevremont et al. 2014).

histologiques telles que des noyaux centraux, une désorganisation de l'activité oxydative et des triades (Cowling, Toussaint et al. 2011, Liu, Bezprozvannaya et al. 2011), alors que la réduction de son expression chez la souris (souris hétérozygote *DNM2*) ne cause aucun phénotype ce qui écarte le mécanisme d'haploinsuffisance et renforce l'hypothèse d'un gain de fonction de *DNM2* (Cowling, Chevremont et al. 2014).

L'implication de *DNM2* ne se limite pas qu'à la forme autosomique dominante. Une surexpression de *DNM2* a été observée dans les biopsies musculaires de nouveau-nés atteints de la forme liée au chromosome X et dans des échantillons musculaires de souris déficientes en *MTM1* (Cowling, Chevremont et al. 2014). Ces résultats confirment l'épistasie génétique entre *MTM1* et *DNM2*, et bien que *MTM1* soit le gène muté, l'élévation du niveau et/ou de l'activité de *DNM2* semble être la cause du phénotype musculaire observé chez les patients atteints de la forme liée au chromosome X des myopathies centronucléaires. Ainsi, la réduction du niveau de *DNM2* pourrait améliorer le phénotype musculaire de la myopathie myotubulaire.

5. *DNM2*, une cible thérapeutique :

Le laboratoire d'accueil a en effet évalué le potentiel de la réduction de *DNM2* dans la myopathie myotubulaire et ceci par croisement génétique (Cowling, Chevremont et al. 2014). Comme décrit dans la revue ci-dessus, une souris déficiente en *MTM1* (*Mtm1*KO pour *Mtm1* knock-out) fut créée par le laboratoire d'accueil par recombinaison homologe et reste à ce jour le modèle animal le plus utilisé pour étudier la myopathie myotubulaire (Buj-Bello, Laugel et al. 2002). Cette souris présente une absence totale de *MTM1* et développe une faiblesse musculaire progressive à partir de 2 à 3 semaines après la naissance (Figure 13). A 7-8 semaines de vie, ces souris présentent une atrophie musculaire très sévère et une force musculaire quasi nulle. De plus, l'histologie musculaire est similaire à celle observée chez les patients avec un taux très élevé de fibres hypotrophiques et une position anormale des organites. En revanche, les souris congénères *Mtm1* KO/ *Dnm2* hétérozygote (HTZ) (obtenues par croisement génétique d'une femelle *Mtm1* HTZ avec un male *Dnm2* HTZ) présentent une amélioration phénotypique très frappante (Cowling, Chevremont et al. 2014). Contrairement aux souris *Mtm1*KO qui étaient immobiles et décédaient à 7-8 semaines, les souris *Mtm1*KO/ *Dnm2* HTZ survivent jusqu'à plus de 2 ans et présentent une normalisation du poids et de la fonction motrice. De plus, le poids des muscles ainsi que la force musculaire atteignent des valeurs similaires à celles mesurées chez les souris sauvages. L'examen histologique des échantillons musculaires montrent une correction de la structure et de la taille des myofibrilles avec une normalisation de la position des noyaux et des mitochondries. Ces résultats confirment d'une part l'implication

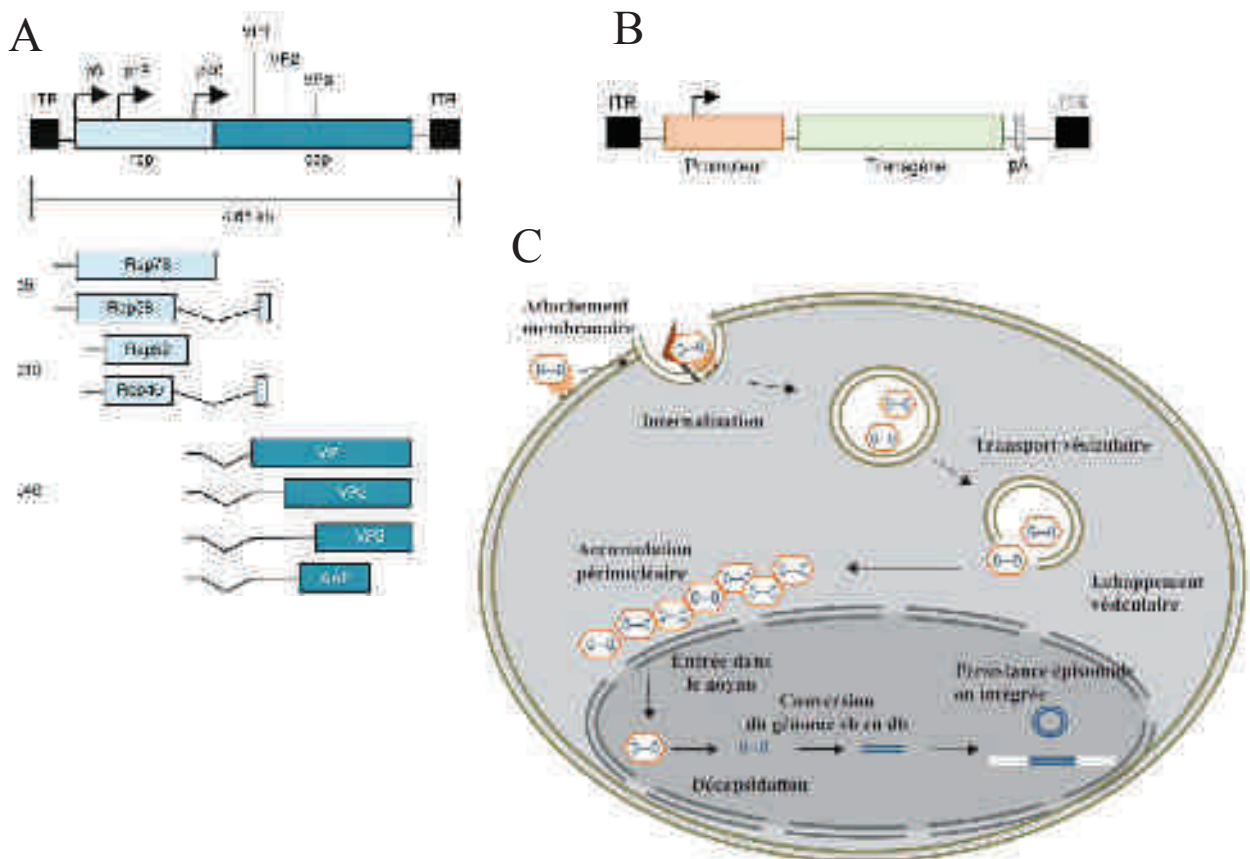


Figure 14 : Organisation du génome AAV et trafic intracellulaire.

(A) Le génome de l'AAV sauvage est composé d'un ADN simple brin. Il contient deux gènes *rep* et *cap* flanqués par deux séquences ITR identiques. Trois promoteurs (p5, p19 et p40) sont à l'origine de l'expression de 8 protéines. Rep40, Rep52, Rep68 et Rep78 sont nécessaires à la réplication du virus. VP1, VP2, VP3 et AAP constituent la base de la forme icosaédrique de la capsid virale. (B) Le génome d'AAV recombinant est constitué d'une cassette transgénique contenant *a minima* un promoteur, le gène d'intérêt sous forme d'ADNc et une séquence polyA. (C) Les différentes étapes de l'internalisation cellulaire des particules AAV et leur trafic intracellulaire (adapté de Gaj, Epstein et al. 2016 et de Millet, Rossi et al. 2013)

de DNM2 dans le mécanisme pathologique de la myopathie myotubulaire, et d'autre part montrent l'intérêt thérapeutique de la réduction de DNM2. Une application thérapeutique chez l'homme ne sera possible que si un composé injectable, qui cible et réduit de manière spécifique DNM2, est développé, testé et validé sur des modèles animaux dans une étude préclinique.

Pour atteindre cet objectif, nous avons opté pour deux stratégies thérapeutiques, l'une basée sur l'utilisation de virus adéno-associés exprimant des « petits ARNs en épingle à cheveux » (ou shRNA), l'autre sur les oligonucléotides antisens.

6. Le virus adéno-associé (AAV) :

Le vecteur AAV fut découvert la première fois en 1965 comme contaminant des préparations virales d'adénovirus humains (Atchison, Casto et al. 1965). Ce virus, dépourvu d'enveloppe, de petite taille et de faible complexité, appartient à la famille des *Parvoviridae* et de la sous-famille des *Parvovirinae* du genre des *Dependovirus* (Goncalves 2005). Le nom de *Dependovirus* a été attribué à ce genre compte tenu de leur incapacité à se répliquer seul au sein d'une cellule hôte et de leur dépendance à la machinerie cellulaire et d'autres facteurs apportés par des virus auxiliaires tels que les adénovirus (Richardson and Westphal 1981), papillomavirus (Ogston, Raj et al. 2000) ou le virus de l'Herpes simplex (Mishra and Rose 1990). Ceci peut être expliqué par l'absence de gène codant pour une polymérase virale due à la taille très limitée de leur génome, seulement 4.7kb. En effet, le génome simple brin de l'AAV ne possède que deux gènes, *rep* et *cap*, entourés par deux séquences identiques appelées ITR (pour Inverted Terminal Repeat). Le gène *rep* code pour quatre protéines Rep40, Rep52, Rep68 et Rep78 nécessaires à l'initiation de la réplication virale, alors que *cap* code pour les protéines VP1, VP2, VP3 et AAP (pour Assembly-Activating Protein) qui constituent la base de structure icosaédrique de la capsid virale (Rose, Maizel et al. 1971, McPherson and Rose 1983, Mendelson, Trempe et al. 1986, Sonntag, Schmidt et al. 2010). Enfin, les séquences ITR sont présentes au niveau des extrémités 5' et 3' du génome de l'AAV (Figure 14). Elles sont riches en CG et forment une structure palindromique en forme de T. Elles sont indispensables pour l'encapsidation, l'intégration et la réplication des nouvelles particules.

6.1. Mécanisme d'action :

La transduction de la cellule cible par les particules virales se fait grâce à une interaction de la capsid avec différents récepteurs et corécepteurs présents sur la membranaire de la cellule eucaryote (Figure 14). Une fois fixés, ces virus sont internalisés par endocytose et transportés vers le noyau par des mécanismes encore assez mal connus (Nonnenmacher and Weber 2012).

Sérotypage	Récepteurs primaires	Co-récepteurs	Tropisme tissulaire
AAV1	Acide sialique N-lié	Inconnu	MS, SNC, rétine, pancréas
AAV2	HSPG	FGFR1, HGFR, LamR, CD9 tétrasparine	MS, SNC, foie, reins
AAV3	HSPG	FGFR1, HGFR, LamR	Hépatocarcinome, MS
AAV4	Acide sialique Q-lié	Inconnu	SNC, reins
AAV5	Acide sialique N-lié	FGFR	MS, SNC, prostate, rétine
AAV6	Acide sialique N-lié, HSPG	EGFR	MS, MS (i.v.), cœur, poumons
AAV7	Inconnu	Inconnu	MS, rétine, SNC
AAV8	Inconnu	LamR	foie, MS, SNC, reins, pancréas, cœur
AAV9	Glycocalyx N-lié	LamR	foie, cœur (i.v.), cerveau (i.v.), MS (i.v.), poumons, pancréas, reins (i.v.)

EGFR : epidermal growth factor receptor ; FGFR : fibroblast growth factor receptor ; HGFR : hepatocyte growth factor receptor ; HSPG : heparan sulfate proteoglycan ; i.v. : injection intraveineuse ; MS : muscle squelettique ; PDGFR : platelet-derived growth factor receptor ; SNC : système nerveux central.

Tableau 2 : Tableau recensant les différents sérotypes des virus AAV ainsi que leur récepteur, corécepteurs et tropisme tissulaire (d'après Millet, Rossi et al, 2013). Aux 9 sérotypes listés dans ce tableau s'ajoutent l'AAV10, l'AAV11 et l'AAV12 pour lesquels aucun récepteur n' a été identifié.

Deux scénarios sont possibles après sa translocation nucléaire, soit le virus entre dans une phase de latence où le génome simple brin est converti en génome double brin et demeure sous forme d'épisome ou intégrés (Daya and Berns 2008), soit, en présence de virus auxiliaires, le virus est actif et se multiplie grâce aux différentes polymérase. D'autre part, les différentes protéines d'encapsulation sont elles aussi synthétisées pour former la capsid et de nouvelles particules. La libération des nouveaux virions dans le compartiment extracellulaire se fait par une cytolysé déclenchée par les virus auxiliaires. Cependant, ce phénomène reste encore très mal caractérisé.

6.2. Sérotypes et tropisme cellulaire :

A ce jour, plus de 110 variants d'AAV ont été identifiés grâce au séquençage du génome viral, ce qui a permis de les classer en 12 sérotypes (classés de AAV1 à AAV12) en fonction de leur caractéristique antigénique portée par les protéines de la capsid (Wu, Asokan et al. 2006). Certains sont d'origine humaine tels que le sérotype 2, 3 et 5 alors que l'AAV1 et 4 proviennent de primates non humains. L'AAV6 est considéré comme un hybride entre le sérotype 1 et 2 (Wu, Asokan et al. 2006). L'AAV2 reste le sérotype le plus étudié et le mieux caractérisé et sert de référence pour les autres. Il est capable d'infecter différents types cellulaires grâce à son interaction avec le protéoglycane héparan sulfate (HSPG) (Summerford and Samulski 1998), un récepteur exprimé par de nombreux tissus comme le muscle squelettique, le système nerveux central, le foie et le rein (Daya and Berns 2008). D'autre molécules telles que les récepteurs au facteur de croissance de type 1 des fibroblastes (FGFR-1) (Qing, Mah et al. 1999), au facteur de croissance des hépatocytes (HGFR) (Kashiwakura, Tamayose et al. 2005), de la laminine (LamR) et la molécule CD9 (Akache, Grimm et al. 2006) ou encore les intégrines $\alpha\beta5$ et $\alpha5\beta1$ ont été décrites comme des corécepteurs de l'AAV2 (Tableau 2) (Asokan, Hamra et al. 2006). Cette diversité des récepteurs permet à ce sérotype d'infecter de nombreux types cellulaires mais limite leur efficacité à cibler spécifiquement un tissu en particulier. De son côté, le sérotype 1 reconnaît l'acide sialique N-lié présent dans le muscle squelettique, le système nerveux central, la rétine et le pancréas. Comme l'AAV6 est le résultat de la recombinaison du sérotype 1 et 2, cet hybride interagit à la fois avec le HGFR et l'acide sialique N-lié. Peu d'informations sont disponibles au sujet des autres sérotypes, l'AAV4 et 5 interagissent avec l'acide sialique O-lié et N-lié respectivement (Daya and Berns 2008). Enfin, l'AAV9, l'un des sérotypes les plus prometteurs pour le transfert de gène *in vivo* reconnaît le galactose N-lié. Aucun récepteur n'a été identifié pour l'AAV7 et 8 jusqu'à présent.

Cette diversité en termes de tropisme cellulaire a permis aux vecteurs AAV de devenir, en moins de deux décennies, un outil puissant pour la thérapie génique. Leur efficacité à infecter

des cellules eucaryotes, leur caractère inoffensif ainsi que la simplicité de leur génome ont attiré l'attention de nombreux chercheurs.

6.3. Les virus AAV recombinants :

Les études initiales conduites pour évaluer la capacité des AAV à transporter et coder un gène d'intérêt ont été réalisées essentiellement dans les modèles murins. En effet, les deux gènes *rep* et *cap* peuvent être remplacés par une cassette transgénique composée généralement d'un promoteur permettant l'expression du gène d'intérêt (sous forme d'ADNc) situé quelque nucléotides en aval (Lu 2004). En revanche, les séquences palindromiques ITR restent irremplaçables car elles sont nécessaires à la phase de l'encapsidation du génome.

Les premiers protocoles développés pour la production d'AAV recombinant (exprimant donc une cassette transgénique à la place du génome sauvage) consistaient à transfecter simultanément des cellules par des vecteurs exprimant la cassette transgénique et des protéines exogènes Rep et Cap (Ayuso, Mingozzi et al. 2010). Cette transfection était suivie par une infection d'adénovirus sauvage pour permettre la réplication, l'assemblage et la libération des virions. Cependant, avec cette méthode la présence de virus auxiliaires à des titres élevés était inévitable ce qui présente un risque sanitaire majeur empêchant toute application thérapeutique (Salveti, Oreve et al. 1998). Des solutions ont été proposées pour inactiver les virus auxiliaires comme l'inactivation thermique mais cela ne permettait pas d'éviter les contaminations protéiques.

Afin d'éviter ces problèmes, un deuxième protocole de production et de purification a été mis en place (Ayuso, Mingozzi et al. 2010). Le remplacement des virus auxiliaires par des plasmides qui codent pour les protéines Rep et Cap mais aussi les facteurs nécessaires aux activités auxiliaires d'adénovirus a permis d'obtenir des solutions avec des titres très élevés de particule AAV, sans générer de particule de virus auxiliaire. Par la suite, une multitude de techniques de purification comme la chromatographie ont vu le jour et ont apporté des améliorations considérables permettant ainsi de produire des solutions qui répondent aux exigences de pureté requise pour une application thérapeutique.

Les vecteurs AAV font l'objet de nombreux essais cliniques sur les maladies monogéniques. En 2012, l'agence européenne du médicament (EMA) a approuvé la commercialisation du premier médicament de thérapie génique. Il s'agit de Glybera, traitement indiqué en cas de déficit familial en lipoprotéine lipase (Salmon, Grosios et al. 2014). Ce succès thérapeutique montre le potentiel des AAV à remplacer un gène défectueux. Toutefois, de plus en plus

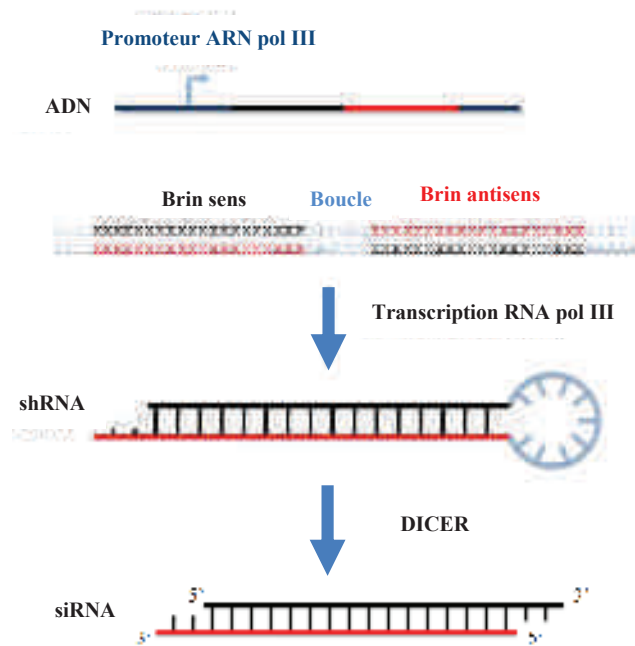


Figure 15 : Différentes étapes de maturation des shRNA.

Après sa transcription à partir d'un ADN, l'ARN en forme d'épingle à cheveux subit un clivage de la boucle (loop) par l'enzyme DICER permettant ainsi de générer des petits fragments de siRNA. Ces petites molécules seront ensuite prises en charge par un complexe protéique appelé RISC « RNA-induced silencing complex » qui va éliminer le brin sens (noir) et garder le brin antisens (rouge) pour s'apparier avec l'ARNm cible.

(<https://www.labome.com/method/siRNAs-and-shRNAs-Tools-for-Protein-Knockdown-by-Gene-Silencing.html>)

d'essais précliniques et cliniques montrent l'efficacité des AAV à réprimer l'expression d'un gène lorsque ce dernier est toxique ou cause un gain de fonction (Sun, Tang et al. 2010, Koornneef, Maczuga et al. 2011, Yang, Tang et al. 2012, Borel, Kay et al. 2014, Saal, Koch et al. 2015). Ceci est possible grâce au phénomène d'interférence d'ARN assuré par des « petits ARN en épingle de cheveux » ou shRNA (pour short hairpin RNA).

6.4. Les shRNA :

Historiquement, le phénomène d'interférence d'ARN a été découvert chez les plantes par des chercheurs étudiant les mécanismes de coloration de *Petunias*. Dans le but de renforcer la coloration des fleurs, les auteurs ont introduit dans le génome de la plante une deuxième copie de gène responsable de la pigmentation. Contre toute attente, ils ont obtenu une extinction de la coloration (Napoli, Lemieux et al. 1990). Ces expériences ont mis en évidence un mécanisme très répandu chez les végétaux appelé : extinction post-transcriptionnelle des gènes (ou PTGS pour *Post Transcriptional Gene Silencing*) (Vaucheret and Fagard 2001). Ce mécanisme permet aux plantes de protéger leur génome contre les éléments transposables mobiles et les virus à ARN. Par la suite, d'autres études ont montré l'existence d'un phénomène similaire chez les vers *C. elegans* (Fire, Xu et al. 1998), les insectes (Kennerdell and Carthew 1998), les amphibiens (Oelgeschlager, Larrain et al. 2000) et la souris (Svoboda, Stein et al. 2000), et il a été appelé interférence d'ARN. Plusieurs éléments régulateurs de ce phénomène ont été identifiés tels que les miRNA (ou microRNA codés par le génome des organismes multicellulaires), les tncRNA (pour tiny non-coding RNA découverts chez les *C. elegans*), smRNA (small modulatory RNA découvert chez la souris) et enfin les siRNA et shRNA (respectivement small interfering RNA et short hairpin RNA). Les shRNA sont des ARN simple brin de petite taille qui adoptent une structure en forme d'épingle à cheveux (figure 15). Ce repliement est le résultat d'un appariement spontané d'une séquence sens avec sa séquence complémentaire antisens, séparées par une boucle de quelques nucléotides. Une fois transcrit dans le noyau de la cellule eucaryote, les shRNA sont exportés vers le cytoplasme par des récepteurs nucléaires appelés Exportine 5. Ils seront par la suite clivés en siRNA par section de la boucle via l'enzyme DICER (une RNase de type III). Le brin antisens est ensuite incorporé dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) et va s'apparier par complémentarité des bases à l'ARN messenger cible qui sera détruit par l'action des nucléases cytoplasmiques (Figure 16).

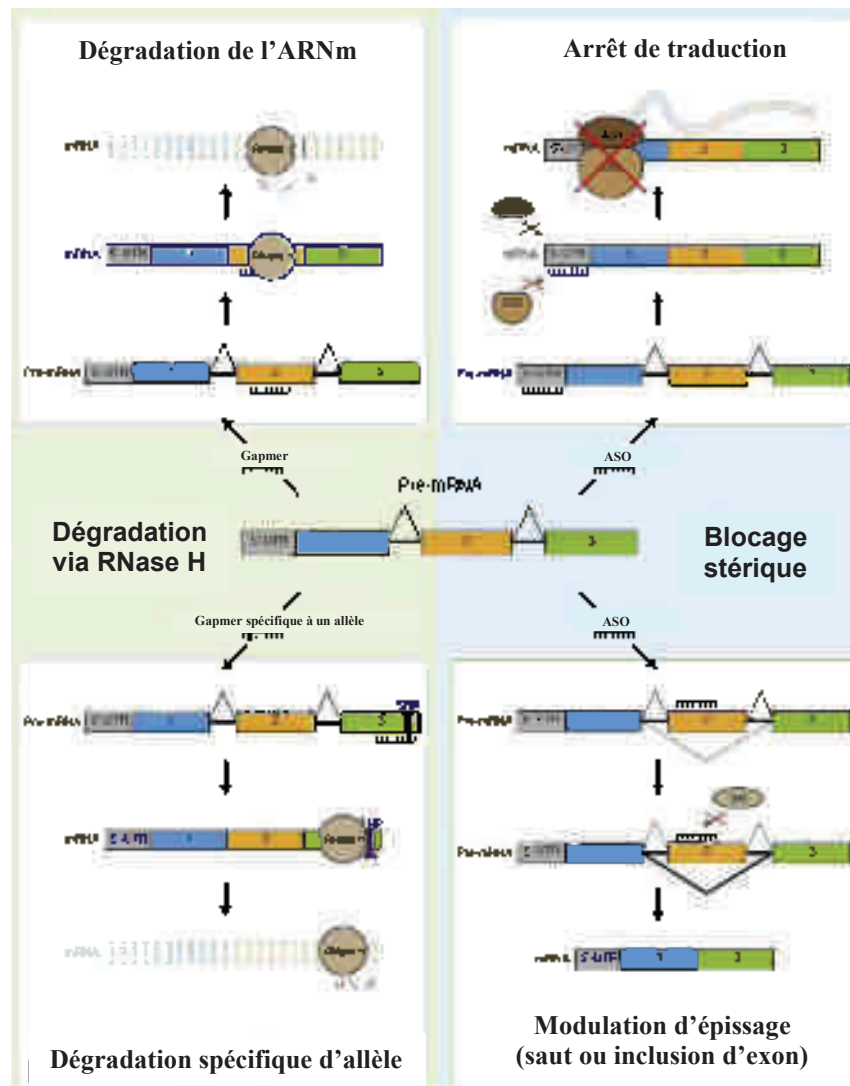


Figure 16 : Différents mode d'action des ASO.

En fonction du site ciblé et de la chimie, les ASO peuvent soit déclencher une dégradation de l'ARNm par la RNase H, bloquer l'initiation de la traduction ou bien induire une modulation d'épissage de l'ARN pré-messager (adapté de Evers, Toonen et al. 2015).

7. Les oligonucléotides antisens (ASO) :

Outre les éléments décrits ci-dessus, les travaux menés par Zamecnik et ses collègues sur le virus du sarcome de Rous (RVS) ont dévoilé le potentiel des oligonucléotides dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes (Zamecnik and Stephenson 1978). En effet, ces chercheurs ont montré que l'inhibition de la réplication du RVS est possible grâce à l'hybridation spécifique d'un oligonucléotide simple brin et chimiquement modifié de 13 bases à l'ARN 35S du virus. Ces travaux ont ouvert la voie au développement de plusieurs composés chimiques regroupés sous l'appellation d'oligonucléotide antisens (ASO). Ces petits fragments d'ARN ou d'ADN peuvent intégrer une cellule et s'apparier à une séquence cible avec un haut degré d'affinité. Bien qu'ils aient une taille de 15-22 nucléotide, ils ont la capacité remarquable de discriminer, à la base près, les ARN ciblés ce qui permet de minimiser tout risque d'effet secondaire lié à une interaction aspécifique (Lima, Rose et al. 2007, Straarup, Fisker et al. 2010). En fonction de la structure chimique et la séquence cible, les ASO permettent de moduler l'expression d'un gène soit en occupant une région spécifique du transcrite nécessaire à l'épissage (Kole and Sazani 2001), l'initiation de la traduction ou autre modification post-transcriptionnelle (Boiziau, Kurfurst et al. 1991), soit en induisant la dégradation de l'ARNm grâce à l'action d'une ribonucléase : RNase H1 (Figure 16, 17) (Agrawal, Mayrand et al. 1990). Ces effets ne sont possibles que si la structure chimique des ASO est modifiée car, dès ses premières secondes dans une cellule, un fragment d'ADN ou ARN non modifié sera dégradé par les différents mécanismes de défense avant même d'atteindre sa cible (Yang 2011). De plus, ces modifications chimiques confèrent aux ASO une meilleure affinité et biodisponibilité tout en réduisant une éventuelle toxicité (Mansoor and Melendez 2008). Les ASO peuvent être divisés en fonction de leur modification chimique en trois générations (Figure 18) :

7.1. Première génération :

La première modification chimique à avoir fait ses preuves est : la phosphorothioate (PS). Elle consiste à substituer un atome d'oxygène par un atome de soufre au niveau du groupement phosphate reliant les nucléotides (Stein, Subasinghe et al. 1988). Les ASO conservent leur charge négative et présentent une meilleure résistance aux nucléases. De plus, cette modification améliore la liaison des ASO aux protéines plasmatiques ce qui diminue leur clairance rénale et augmente leur biodisponibilité (Srinivasan, Tewary et al. 1995). Cependant, une légère diminution de l'affinité a été constatée avec les ASO porteurs de cette modification, avec une réduction de la température de fusion (T_m) estimée à $0,5^\circ\text{C}$ par nucléotide modifié (Crooke 2000). Néanmoins, les propriétés intrinsèques de cette chimie ont permis le

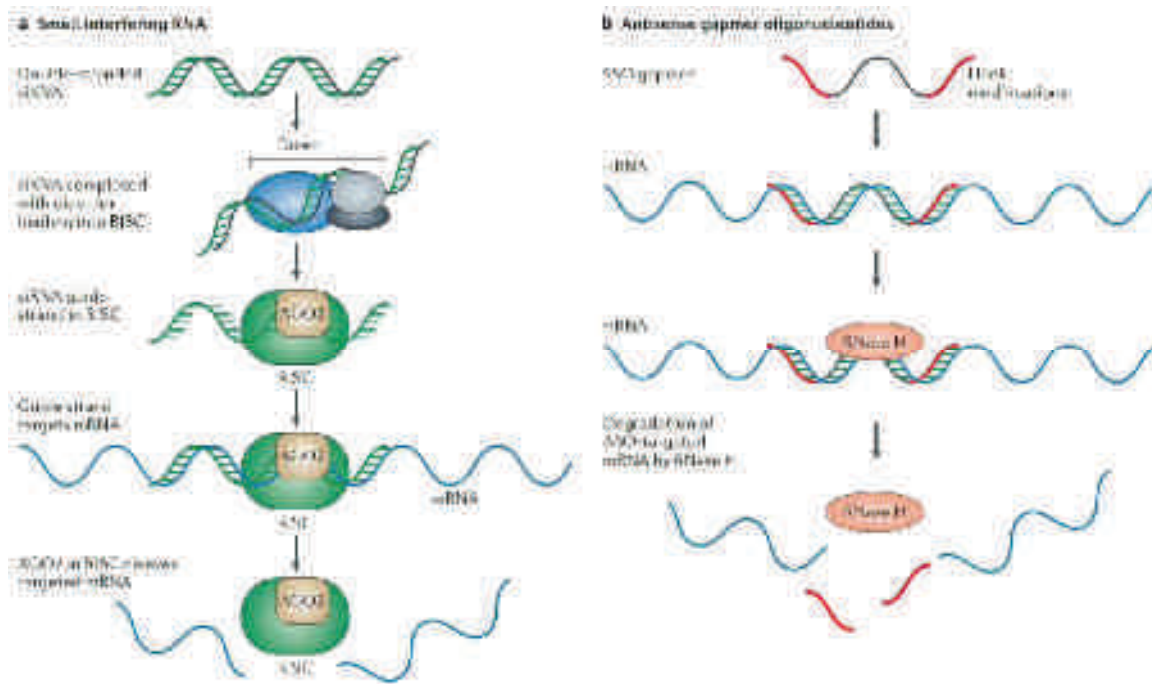


Figure 17 : Différence des modes de dégradations déclenchés par shRNA ou ASO.

(a) Une fois présents dans le cytoplasme (par injection directe ou maturation des shRNA ou miRNA), les siRNA sont rapidement pris en charge par le complexe RISC. Ils seront guidés par complémentarité des bases et forment un hétéroduplex avec l'ARN messenger cible. Ce dernier sera clivé par action de l'enzyme AGO2, membre du complexe RISC. (b) la reconnaissance de l'hybride ARNm/ASO par RNaseH1 induit l'hydrolyse des liaisons phosphodiester de l'ARNm. Seul les désoxyribonucléotides naturels, et leurs analogues synthétiques de type phosphorothioate ou phosphorodithioate, sont capables de recruter la RNaseH1 (d'après de Kole, Krainer et al. 2012).

développement de plusieurs candidats thérapeutiques. En 1998, Fomivirsen fut le premier médicament ASO commercialisé pour le traitement local des rétinites à cytomégalo virus chez les patients immunodéprimés (Crooke 1998). D'autres modifications chimiques visant à remplacer le groupement phosphodiester par un méthylphosphonate, phosphoramidite ont été testés mais aucune amélioration n'a été apportée par rapport au PS (Bennett and Swayze 2010).

7.2. Deuxième génération :

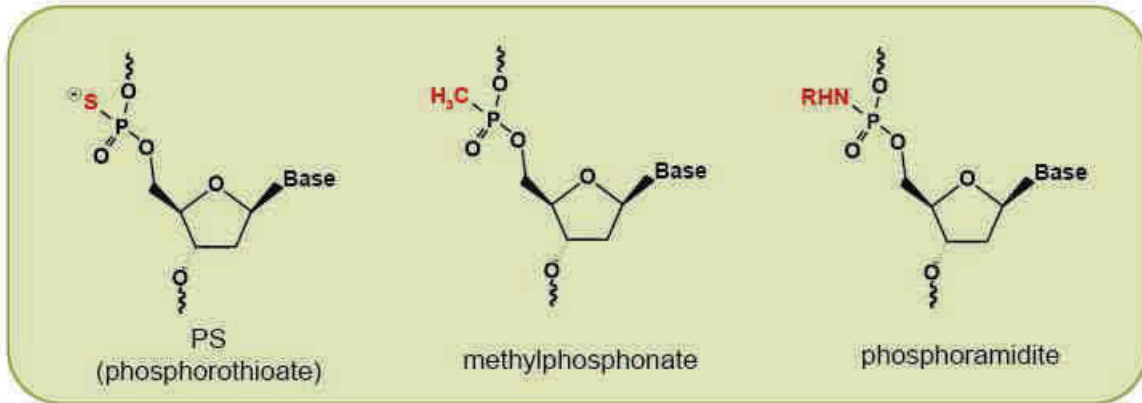
Les recherches se sont donc orientées vers les modifications structurales du sucre ribose des acides nucléiques. Des molécules d'O-Méthyl ou O-Méthoxyethyl ont été greffées au niveau du carbone en position 2' (Figure 18). Les ASO modifiés acquièrent ainsi une nouvelle conformation tridimensionnelle qui permet d'augmenter la température de fusion du duplex ARN-ASO améliorant par conséquent son affinité et sa stabilité (Freier and Altmann 1997). De plus, ces changements de conformation sont responsables d'un encombrement stérique par rapprochement du groupe alkyle situé en 2' avec le groupement phosphate adjacent situé en 3', ce qui augmente la résistance aux différentes nucléases (Kawasaki, Casper et al. 1993, Freier and Altmann 1997, Manoharan 1999). Toutefois cet encombrement stérique empêche le recrutement de la RNase H1. Cet obstacle est souvent surmonté par l'utilisation de configuration dite de gapmer, où la modification chimique est réservée au nucléotide de l'extrémité 5' et 3' alors que la région centrale de l'ASO reste non modifiée (Figure 19) (Crooke, Lemonidis et al. 1995). Cette stratégie permet à cette génération d'ASO de posséder à la fois une affinité élevée au ARN cible et une capacité à recruter la RNase H1.

Ces 5 dernières années, plusieurs médicaments ASO de deuxième génération ont été approuvés par l'agence américaine FDA. Mipomersen en était le premier, il cible l'ARNm de l'apolipoprotéine B et réduit son expression dans l'hypercholestérolémie homozygote familiale. Fin 2016, Nusinersen et Volanesorsen ont reçu l'accord pour être commercialisés pour le traitement de l'atrophie musculaire spinale type 1 et l'hypertriglycéridémie, respectivement.

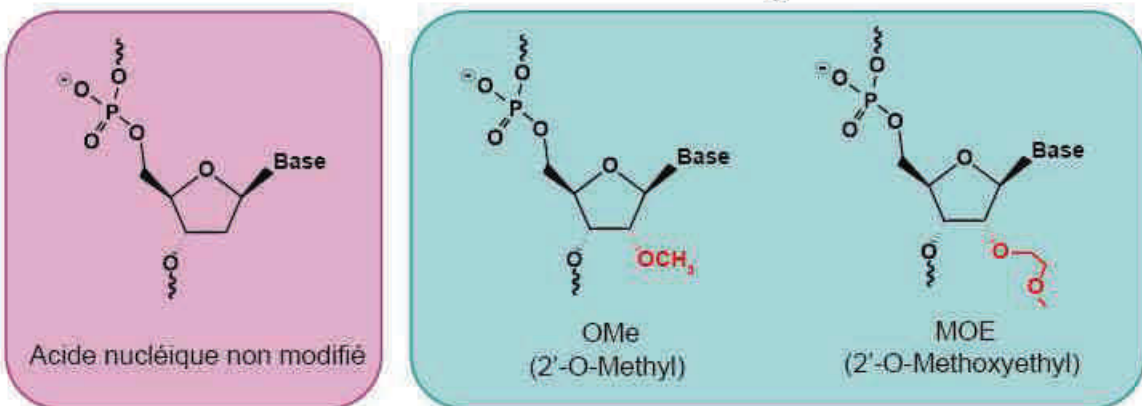
7.3. Troisième génération :

Bien que certains les considèrent comme ASO de 2ème génération, les ASO type morpholinos (ou PMO pour phosphorodiamidate morpholino oligo) se distinguent des autres oligonucléotides par leur structure non conventionnelle comparés aux acides nucléiques classiques. Les cycles furanoses sont remplacés par des anneaux morpholinos qui sont reliés entre eux par des groupements phosphorodiamidates (Figure 18). Cette configuration permet d'augmenter leur résistance aux nucléases mais les condamne à avoir une charge neutre ce qui restreint leur absorption cellulaire (Amantana and Iversen 2005). Ils sont très utilisés dans des

Première génération



Deuxième génération



Troisième génération

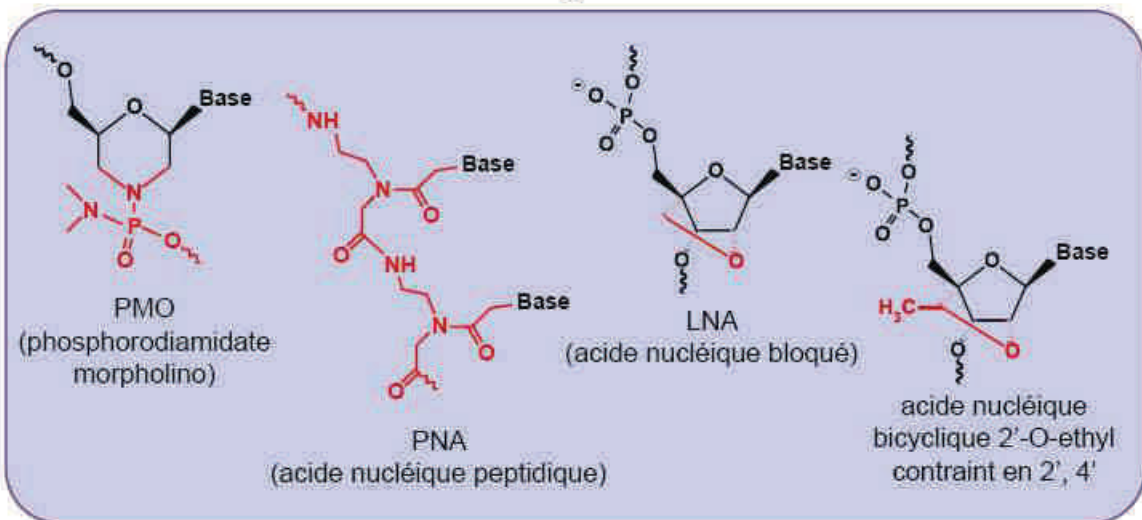


Figure 18 : Modifications chimiques des oligonucléotides antisens.

La première génération se caractérise par la substitution du groupement phosphodiester par un groupement phosphorothioate, méthylphosphonate, phosphoramidate. La seconde génération résulte de l'ajout d'un groupe 2'-alkyle au sucre furanose, alors que la troisième génération consiste en la modification partielle ou totale de l'anneau furanose.

études d'inactivation des gènes dans le poisson zèbre par micro-injection des œufs fécondés (Brent and Drapeau 2002). Par ailleurs, quelques études cliniques ont profité de la porosité des fibres musculaires des patients atteints de dystrophie de Duchenne pour évaluer la capacité des morpholinos à restaurer le cadre de lecture de la dystrophine (Cirak, Arechavala-Gomez et al. 2011, Mendell, Rodino-Klapac et al. 2013, Mendell, Goemans et al. 2016).

Tout comme les PMO, les acides nucléiques peptidiques (PNA) présentent un changement radical de l'anneau furanose et une charge neutre. Ces ASO sont composés d'une succession d'unités N-(2-aminoethyl)-glycine reliées par une liaison peptidique (Figure 18). Malgré l'absence d'acide nucléique, cette chimie conserve l'appariement de base de Watson-Crick. Les PMO et PNA sont tous les deux incapables de recruter les RNase H1 et sont généralement utilisés pour un blocage stérique de l'initiation de traduction (Figure 16) (Pandey, Upadhyay et al. 2009).

Enfin, une autre conformation chimique d'ASO a fait son apparition offrant une meilleure puissance et une grande résistance à la dégradation. Il s'agit des acides nucléiques bloqués (ou LNA : locked nucleic acid). Ils sont appelés ainsi car leur sucre ribose est verrouillé par un pont méthylène reliant l'hydroxyle du carbone 2' au carbone 4' (Figure 18) (Obika, Nanbu et al. 1997, Kumar, Singh et al. 1998). Cette conformation leur confère une grande affinité et une meilleure biodisponibilité mais une toxicité hépatique a été observée avec cette chimie (Swayze, Siwkowski et al. 2007). De ce fait, une autre modification chimique a été développée pour contrer cet effet secondaire. L'ajout d'un groupe méthyl sur le second cycle a permis de diminuer cette toxicité. Cette chimie est connue sous le nom de : acide nucléique bicyclique 2'-O-ethyl contraint en 2', 4' (Pallan, Allerson et al. 2012). C'est cette chimie que j'ai utilisée pour mon projet de thèse.

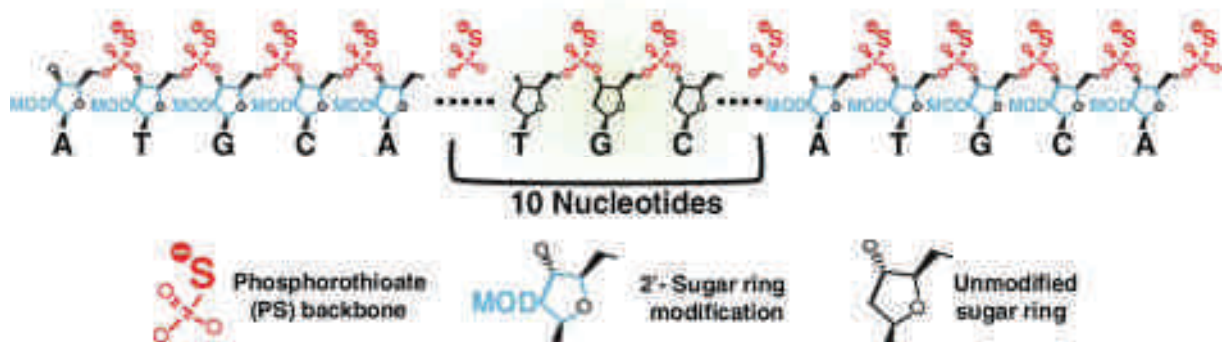


Figure 19 : Exemple de configuration gapmer.

Les modifications chimiques du sucre furanose de l'extrémité 3' et 5' protègent l'ASO contre la dégradation des endonucléases. La région centrale reste quant à elle non modifiée afin de permettre le recrutement de la RNase H1 (adapté de DeVos and Miller 2013).

8. Le projet de thèse :

L'équipe « physiopathologie des maladies neuromusculaires » dirigée par Jocelyn LAPORTE s'intéresse aux maladies musculaires congénitales et plus particulièrement les myopathies centronucléaires. Ce laboratoire a identifié les principaux gènes responsables de cette maladie invalidante, ce qui a permis à la fois de proposer des tests de diagnostic aux patients et de générer différents modèles animaux. Le phénotypage de ces derniers a grandement contribué à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette maladie et de valider quelques pistes thérapeutiques.

A mon arrivé dans le laboratoire, j'ai participé à la caractérisation de la souris invalidée pour BIN1 (*Bin1*KO) ainsi que ses congénères *Bin1*KO/*Dnm2*HTZ. Ce travail de master s'inscrit dans un projet plus vaste que nous avons nommé : DynaCure, par lequel le laboratoire d'accueil tente de comprendre le lien entre les différentes protéines impliquées dans la genèse des myopathies centronucléaires tout en validant l'hypothèse de réduction de DNM2 comme cible thérapeutique. Mes résultats de master ont montré que la réduction génétique de DNM2 permettait de surmonter la léthalité périnatale des souris *Bin1*KO (Publication 3, voir Annexe). Cette réduction de DNM2 serait donc bénéfique aux deux formes de myopathie centronucléaire : la forme liée au chromosome X ainsi que la forme autosomique récessive.

Par la suite, j'ai défendu ce projet devant le jury de l'école doctorale des sciences de la vie et de la santé en vue d'obtenir une allocation doctorale MRT. Leur approbation m'a permis de continuer à explorer le potentiel thérapeutique de la réduction de DNM2 dans le cadre d'une thèse doctorale.

Pendant ces quatre années, j'ai eu l'opportunité de développer, tester et valider deux approches thérapeutiques ciblant DNM2. Dans la première, j'ai cloné différentes séquences shRNA dans des vecteurs, puis je les ai criblés sur des cultures cellulaires. Les meilleurs candidats ont été sélectionnés pour des tests *in vivo*. En collaboration avec les différentes plateformes de l'IGBMC, j'ai pu tester l'efficacité des AAV-shRNA à réduire DNM2 et évaluer les effets positifs de cette stratégie sur des muscles de souris *Mtm1*KO. Les résultats de cette étude sont en cours de révision et sont présentés sous-forme de publication (publication 1).

En parallèle, nous avons collaboré avec IONIS pharmaceuticals, leader mondial de la technologie antisens. Nous avons pu bénéficier de leur expertise et de leur puissante chimie de troisième génération : acide nucléique bicyclique 2'-O-ethyl contraint en 2', 4'. Sur des cultures cellulaires, nos collaborateurs à IONIS ont criblé pour nous plus de 500 ASO et en ont

Introduction

sélectionné les trois meilleurs. Ces ASO ont été testés et validés sur le modèle *MtmIKO* et ces travaux sont présentés dans un article scientifique (publication 2).

En conclusion, mes travaux de thèse avaient pour but de valider la réduction de DNM2 comme piste thérapeutique dans une étude préclinique. Les résultats extrêmement encourageants serviront de références pour des essais cliniques chez les patients atteints de myopathie centronucléaire.

RESULTATS



Publication 1

Single intramuscular injection of AAV-shRNA reduces DNM2 and prevents myotubular myopathy in mice

Hichem TASFAOUT, Christine KRETZ, Pascale KOEBEL, Nadia MESSADDEQ, Deborah BITZ, Jocelyn LAPORTE, Belinda S. COWLING.

1. Diminution de DNM2 par approche virale basée sur l'utilisation de virus AAV-shRNA :

Publication 1 : “ Single intramuscular injection of AAV-shRNA reduces DNM2 and prevents myotubular myopathy in mice”

a) Contexte de l'étude :

DNM2 est une mécano-enzyme qui joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires comme l'endocytose, l'organisation du cytosquelette ou encore la tubulation des membranes (Durieux, Prudhon et al. 2010). Sa fonction GTPase ainsi que son niveau d'expression sont essentiels au bon fonctionnement cellulaire. Différentes études ont montré que les mutations du gène DNM2 responsables de la forme autosomique dominante de la myopathie centronucléaire sont à l'origine d'une élévation de l'activité GTPase et une stabilité des oligomères (Kenniston and Lemmon 2010, Wang, Barylko et al. 2010). Ce gain de fonction serait responsable d'une fragmentation des tubules-T observée dans les myotubes en culture et chez la drosophile (Chin, Lee et al. 2015). De plus, une surexpression de DNM2 dans le muscle de souris, par injection d'AAV ou par transgénèse, engendre un phénotype musculaire très proche de celui observé dans les myopathies centronucléaires (Cowling, Toussaint et al. 2011, Liu, Bezprozvannaya et al. 2011). Ces résultats indiquent que le niveau et/ou l'activité enzymatique de DNM2 doivent être maintenus à des niveaux physiologiques et que toute élévation causerait l'apparition de défauts musculaires.

D'autre part, le laboratoire d'accueil a montré qu'en absence de MTM1, les échantillons de muscle de nouveau-nés atteints de myopathie myotubulaire ainsi que le modèle murin *Mtm1KO* présentent une surexpression de DNM2 (Cowling, Chevremont et al. 2014). Cette découverte a mis en évidence une épistasie génétique entre MTM1 et DNM2 tout en proposant la réduction de la DNM2 comme une piste thérapeutique.

Afin de tester cette hypothèse, le laboratoire d'accueil a en effet évalué le potentiel de la réduction de DNM2 dans les souris déficientes en MTM1 par croisement génétique. Les souris *Mtm1KO/ Dnm2HTZ* ont montré une amélioration phénotypique et survivait plus longtemps que leurs congénères *Mtm1KO* (Cowling, Chevremont et al. 2014). Cette preuve de concept a permis d'identifier DNM2 comme une cible thérapeutique dans la myopathie myotubulaire. Son application chez l'homme est suspendue au développement d'un produit injectable.

b) Résultats :

Le but de l'étude suivante était d'évaluer le potentiel thérapeutique des virus AAV exprimant des shRNA anti-*DNM2*. Un premier criblage *in vitro* d'une douzaine de shRNA transfectés dans des cellules en culture m'a permis d'identifier cinq candidats. Ces derniers étaient capables de cibler efficacement les transcrits *DNM2* humain et murin et de réduire leurs niveaux dans les cellules traitées. Par la suite, la production des AAV codant pour les shRNA sélectionnés par la plateforme de production d'AAV de l'IGBMC m'a permis de tester leur efficacité à réprimer le niveau de *DNM2* *in vivo* par injection intramusculaire. Une seule injection locale était nécessaire pour maintenir, pendant plusieurs semaines, le taux de *DNM2* à 50% ce qui entraîne une amélioration phénotypique des muscles *Mtm*IKO injectés.

c) Contribution :

Dans cette étude, j'ai cloné et testé *in vitro* et *in vivo* les différents shRNA. Les particules AAV ont été produites par Pascale KOEBEL (plateforme de production d'AAV de l'IGBMC). Nadia MESSADDEQ a préparé et analysé l'ultrastructure des muscles par la microscopie électronique. Christine KRETZ a préparé les croisements génétiques des souris et a génotypé les nouveau-nés.

d) Conclusion :

Les résultats de cette étude confirment le potentiel thérapeutique de la réduction de *DNM2* dans le modèle murin de la myopathie myotubulaire. Ces données sont en accord avec ceux rapportées par croisement génétique. De plus, l'amélioration phénotypique obtenue par injection d'AAV-sh*Dnm2* atteste la faisabilité de cette approche thérapeutique et montre leur efficacité à maintenir des effets positifs plusieurs semaines après une seule injection intramusculaire.

1 **Single intramuscular injection of AAV-shRNA reduces DNM2 and prevents myotubular** 2 **myopathy in mice**

3 Hichem Tasfaout^{1,2,3,4}, Christine Kretz^{1,2,3,4}, Pascale Koebel^{2,3,4}, Nadia Messaddeq^{2,3,4,5},
4 Deborah Bitz^{2,3,4}, Jocelyn Laporte^{1,2,3,4,*}, Belinda S. Cowling^{1,2,3,4,*}.

5 ¹Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, 67400 France

6 ²INSERM U964, Illkirch, 67400 France

7 ³CNRS UMR7104, Illkirch, 67400 France

8 ⁴Strasbourg University, Illkirch, 67400 France

9 CELPHEDIA, PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS), Illkirch, 67400 France

10 ⁵Imaging center, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC),
11 Illkirch, 67400 France.

12 *These authors contributed equally to this work. Correspondence to belinda@igbmc.fr and
13 jocelyn@igbmc.fr

15 **Abstract**

16 Myotubular myopathy, or X-linked centronuclear myopathy, is a severe muscle disorder
17 representing a significant burden for patients and their families. It is clinically characterized by
18 neonatal and severe muscle weakness and atrophy. Mutations in Myotubularin (*MTM1*) gene
19 cause myotubular myopathy and no specific curative treatment is available. We previously
20 found that Dynamin 2 (DNM2) is upregulated in both *Mtm1* knockout and patient muscle
21 samples, while its reduction through antisense oligonucleotides rescues the clinical and
22 histopathological features of this myopathy in mice. Here, we propose a novel approach
23 targeting *Dnm2* mRNA. We screened and validated *in vitro* and *in vivo* several shRNA
24 sequences that efficiently target *Dnm2* mRNA. A single intramuscular injection of AAV-
25 sh*Dnm2* resulted in long-term reduction of DNM2 protein level and restored muscle force,
26 mass, histology and myofiber ultrastructure, and prevented molecular defects linked to the
27 disease. Our results demonstrate a robust DNM2 knockdown and provide an alternative strategy
28 based on reduction of DNM2 to treat myotubular myopathy.

29 Keywords: AAV/ DNM2/ ShRNA/ myotubular myopathy/ MTM1

30 **Introduction**

31 Centronuclear myopathies (CNM) are a group of rare congenital disorders characterized
32 clinically by severe muscle atrophy and generalized muscle weakness (Jungbluth, Wallgren-
33 Pettersson et al., 2008, Romero, 2010). Muscle biopsies from affected patients present
34 numerous myofibers with nuclei abnormally located at the center, without excessive
35 regeneration. Different forms of CNM have been characterized to date. The most common and
36 severe form is the X-linked CNM (XLCNM), also called myotubular myopathy (Spiro, Shy et
37 al., 1966). XLCNM patients present with severe hypotonia and respiratory distress at birth,
38 strongly impacting on life expectancy. More than 200 mutations in *MTM1* have been identified

Table 1: Selected shRNA and target sequences

ShRNAID	Target sequence (mouse)	Remarks
shRNA ctrl	GGGCTATCCCAACGCTATTAGT	No target
shDnm2 A	AACCGCGGGATGGAAGAGCT	Identical to human sequence
shDnm2 B	AACTTGACCCTCATCGACCTC	Identical to human sequence
shDnm2 C	AAGGACATGATCCTGCAGTTCAT	Identical to human sequence
shDnm2 D	TCGGTGTTCATCACCAAGCT	Identical to human sequence
shDnm2 E	TGCCAACTGTTTCTATACT	1 nucleotide different to human (underlined)
shDnm2 F	AACTGTTTCTATACTGAGGAG	2 nucleotides different to human (underlined)
shDnm2 G	TTTCTATACTGAGGAGCTGGT	2 nucleotides different to human (underlined)
shDnm2 H	GCACGCAGCTGAACAAGAA	Identical to human sequence
shDnm2 I	AAGAAGTACATGCTGCCACTGGA	1 nucleotide different to human (underlined)
shDnm2 J	AACACCTTCTCCATGGACCC	Identical to human sequence
shDnm2 K	CCATTATCCGCCAGCCGAGC	Identical to human sequence

Figure 1

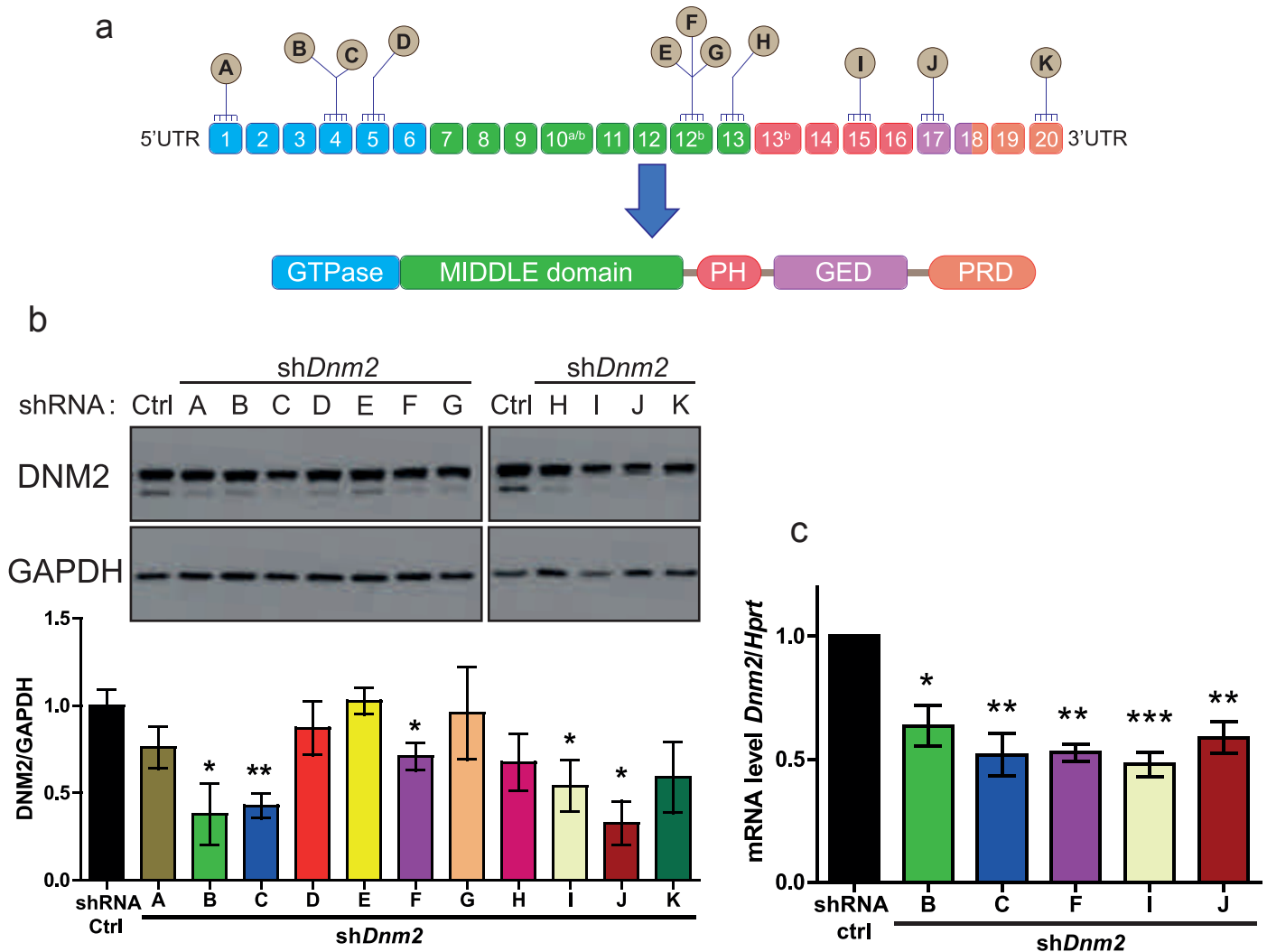


Figure 1: *In vitro* validation of shRNA targeting DNM2.

(a) Location of shRNA-targeting sequences in *Dnm2* mRNA. Exons are depicted as boxes and exons 10a, 10b, 12b and 13b are alternative exons. Below the protein domains encompass a GTPase domain, a middle and GTP effector (GED) domains forming the stalk, a pleckstrin homology (PH) and a proline-rich (PRD) domain (b) Representative western blot from HEK293T cells co-transfected with two plasmids, one encoding human DNM2 and the second expressing the different shRNA. DNM2 protein levels was determined by densitometry and standardized to GAPDH. (c) Endogenous *Dnm2* mRNA levels in shRNA-treated C2C12 mouse myoblast cells were determined by qRT-PCR and standardized to Hprt. Cells were electroporated with shRNA ctrl, or shDnm2 (B, C, F, I or J). n=3 per each group. Data represent an average of three independent experiments \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01 for shDnm2 treated vs shRNA ctrl-treated cells (ANOVA test).

39 to cause XLCNM, most of them leading to a strong decrease or absence of the MTM1 protein
40 (Buj-Bello, Biancalana et al., 1999, Laporte, Biancalana et al., 2000, Laporte, Hu et al., 1996,
41 Laporte, Kress et al., 2001, Tosch, Vasli et al., 2010, Tsai, Horinouchi et al., 2005). MTM1 is
42 a phosphoinositide phosphatase involved in key cellular processes, including endosomal
43 trafficking (Tsujita, Itoh et al., 2004), excitation contraction coupling (Al-Qusairi, Weiss et al.,
44 2009, Dowling, Vreede et al., 2009), intermediate filament organization (Hnia, Tronchere et al.,
45 2011), neuromuscular junction (NMJ) structure (Dowling, Joubert et al., 2012, Robb, Sewry et
46 al., 2011), satellite cell proliferation (Lawlor, Alexander et al., 2012), apoptosis (Lawlor et al.,
47 2012, Lawlor, Viola et al., 2014) and autophagy (Al-Qusairi, Prokic et al., 2013, Fetalvero, Yu
48 et al., 2013). Furthermore, mutations in *DNM2* have been associated with a less severe
49 autosomal dominant form (Bitoun, Maugendre et al., 2005, Bohm, Biancalana et al., 2012).
50 *DNM2* encodes for Dynamin 2, a mechanoenzyme implicated in endocytosis (Warnock, Baba
51 et al., 1997), exocytosis (Arneson, Segovis et al., 2008, Di, Nelson et al., 2003), as well as
52 cytoskeleton organization (McNiven, Kim et al., 2000, Mooren, Kotova et al., 2009, Yamada,
53 Takeda et al., 2016). Different *in vitro* studies have proposed CNM-causing *DNM2* mutations
54 increase Dynamin 2 GTPase activity and oligomer stability, suggesting a gain-of-function of
55 the mutated forms (Kenniston & Lemmon, 2010, Wang, Barylko et al., 2010). This hypothesis
56 is sustained by the fact that over-expression of wildtype *DNM2* in mice recapitulates a CNM-
57 like phenotype (Cowling, Toussaint et al., 2011, Liu, Bezprozvannaya et al., 2011). To date, no
58 effective and specific therapy is available for patients with CNM.

59 The *Mtm1* knock-out (*Mtm1KO*) mice present a severe muscular phenotype and have been
60 extensively used to understand the physiopathology of XLCNM and to test therapeutic
61 approaches (Buj-Bello, Fougousse et al., 2008, Buj-Bello, Laugel et al., 2002, Childers,
62 Joubert et al., 2014, Cowling, Chevremont et al., 2014, Sabha, Volpatti et al., 2016, Tasfaout,
63 Buono et al., 2017). They develop a severe progressive myopathy starting from week 3 which
64 is clinically reflected by a severe muscle atrophy and weakness (Buj-Bello et al., 2002). They
65 present a short lifespan and die between 1-3 months of age. Transversal muscle sections of
66 *Mtm1KO* exhibit a typical XLCNM histology with predominance of hypotrophic and rounded
67 fibers with centralized nuclei, abnormal mitochondrial distribution and aggregated proteins
68 including Caveolin 3 (Cav3) and Desmin (Cowling et al., 2014, Hnia et al., 2011). In addition,
69 and similarly to muscle biopsies from XLCNM patients, *DNM2* was found to be upregulated
70 at the symptomatic phase, pointing to *DNM2* reduction as a therapeutic strategy (Cowling et
71 al., 2014).

72 We have previously reported that reduction of *DNM2* expression by genetic crossing rescues
73 the early XLCNM lethality and ameliorates most CNM features, notably increased muscle force
74 and correction of myofiber histology, indicating an epistasis between *MTM1* and *DNM2*
75 (Cowling et al., 2014). These data have been recently confirmed using antisense
76 oligonucleotides (ASO) that target the nuclear pre-mRNA of *Dnm2*. Repeated injections of
77 ASO targeting *Dnm2* into *Mtm1KO* mice efficiently reduced the *DNM2* protein level and
78 reverts the CNM features (Tasfaout et al., 2017). However, such ASO strategy would require
79 repeated injections in patients, potentially on a long-term basis, and an efficient biodistribution
80 in patients to reach all muscles of the body.

Figure 2

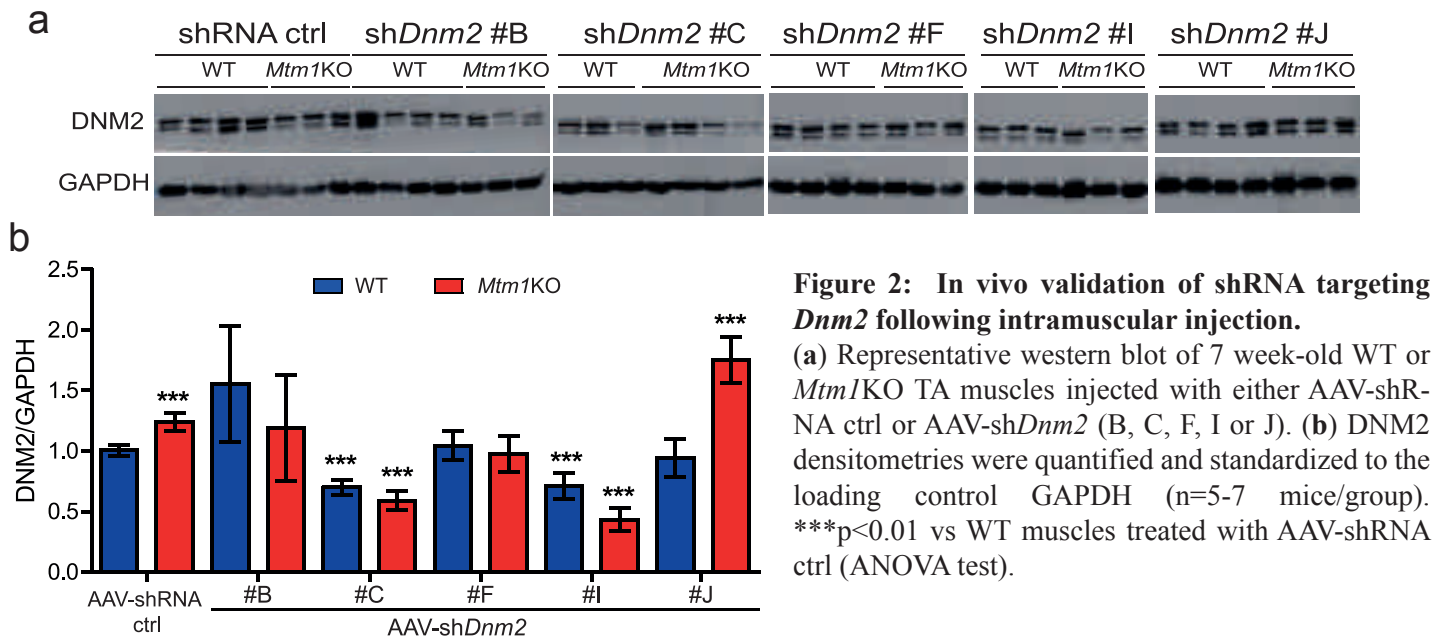
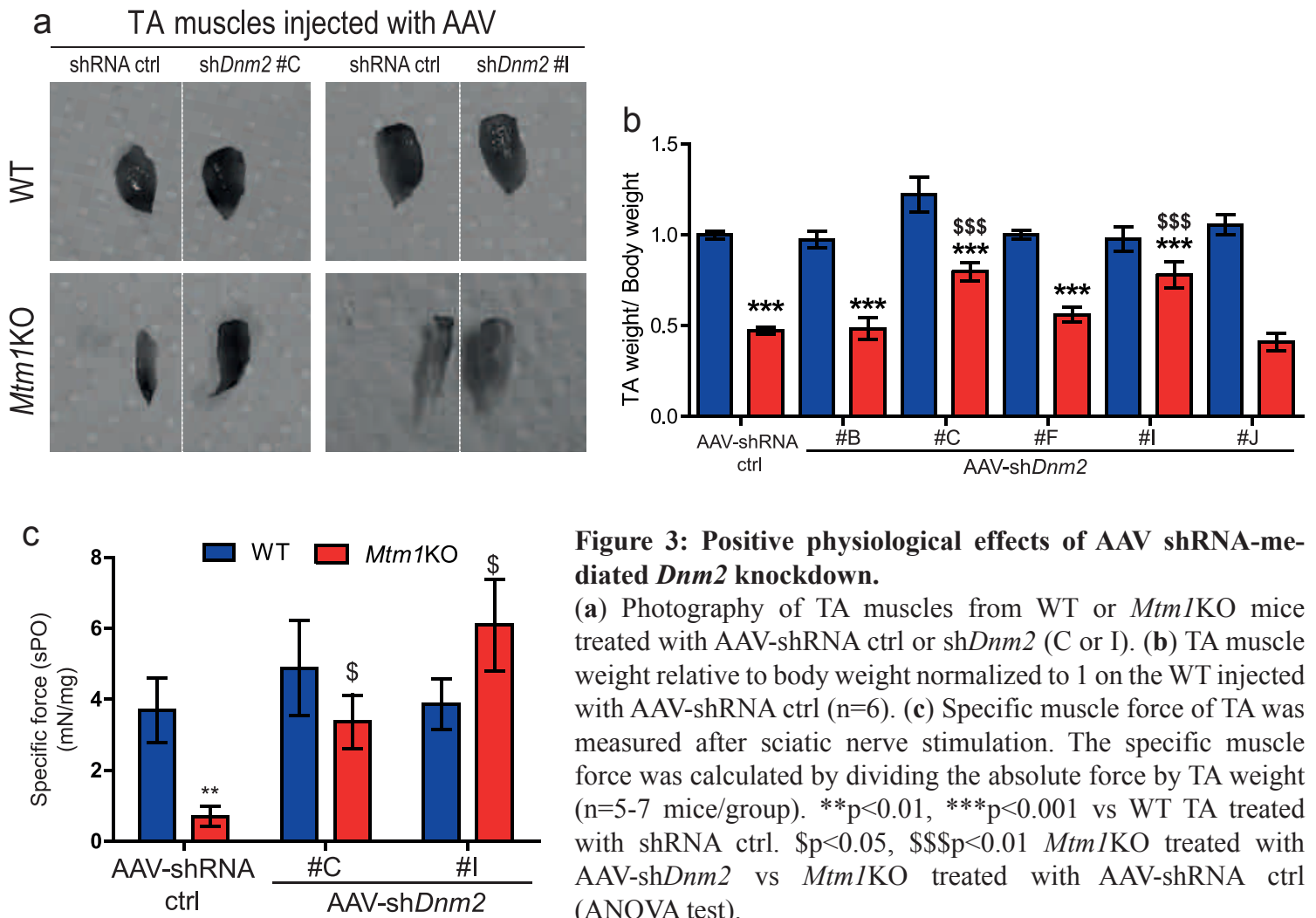


Figure 3



81 Here we tested another approach of reducing DNM2 expression based on AAV-shRNA.
82 Adeno-associated virus (AAV) vectors have been intensively used to re-express the defective
83 gene in many monogenic disorders (Samulski & Muzyczka, 2014). In addition, an increasing
84 number of studies showed their efficacy to repress gene expression when they encode for
85 shRNA complementary to the target mRNA (Grimm, Pandey et al., 2005, Koornneef, Maczuga
86 et al., 2011, Saal, Koch et al., 2015, Yang, Tang et al., 2012). In the present study, we evaluated
87 the potential of AAV-shRNA to knockdown DNM2 in mice. A single intramuscular injection
88 of AAV-sh*Dnm2* resulted in long-term reduction of DNM2 protein level and restore different
89 CNM features. Our data validate the epistasis between *Mtm1* and *Dnm2* and propose an
90 alternative approach to target DNM2 for therapeutic approaches.

91 Results

92 Design and *in vitro* validation of shRNA targeting *DNM2* conserved regions:

93 To target *DNM2* mRNA for degradation, eleven highly conserved regions between the human
94 and mouse *DNM2* mRNA were selected to design the different shRNA sequences (**Figure 1a**,
95 **Table 1**). All shRNA sequences had an identical nine-nucleotide hairpin or loop sequence.

96 To evaluate the efficacy of shRNA to knockdown DNM2 protein level *in vitro*, human
97 embryonic kidney 293T (HEK293T) cells were co-transfected with a plasmid expressing
98 human DNM2 and plasmids expressing the sh*Dnm2* under the control of the mouse U6
99 promoter. DNM2 protein level was measured 72 hours post-transfection. A statistically
100 significant decrease of DNM2 protein level was observed with five sh*Dnm2* constructs (B, C,
101 F, H and J) out of the 11 sh*Dnm2* tested (**Figure 1b**). In addition, selected sh*Dnm2* elicited a
102 strong decrease of the endogenous murine *Dnm2* mRNA when electroporated into mouse
103 C2C12 myoblasts (**Figure 1c**). However, protein level was unchanged 48 hours after
104 electroporation, most likely due to longer stability of endogenous DNM2. These results indicate
105 that five shRNA (B, C, F, H and J) target efficiently both human and murine *DNM2* mRNA.

106 Efficient *in vivo* DNM2 knockdown following a single intramuscular injection of 107 AAV shRNA:

108 To test the *in vivo* efficacy of the five best sh*Dnm2*, AAV serotype 2/9 vectors encoding the
109 selected sh*Dnm2* or a scrambled control sequence (shRNA ctrl) were produced. AAV2/9
110 serotype efficiently transduces skeletal muscle (Koo, Malerba et al., 2011). The AAV-sh*Dnm2*
111 (B, C, F, H or I) were administrated locally into right tibialis anterior muscles (TA) of 3-week
112 old wild-type (WT) or *Mtm1*KO mice at a dose of $5\text{-}7 \times 10^{11}$ viral genome (vg/ml) while the
113 same dose of AAV-shRNA ctrl was injected into the contralateral TA. Four weeks later,
114 injected TA muscles were weighed and *in situ* muscular force as well as DNM2 protein level
115 were measured. DNM2 protein levels in TA injected with AAV-sh*Dnm2* B, F and J were not
116 reduced below TA injected with AAV-shRNA ctrl (**Figure 2**). Accordingly, these muscles
117 remain atrophic (**Figure 3a-b**). Conversely, muscles of WT or *Mtm1*KO injected with sh*Dnm2*
118 C or I presented a strong decrease of DNM2 protein level (**Figure 2**). In addition, improvement
119 of muscle mass and force were noted for *Mtm1*KO injected with sh*Dnm2* C or I. *Mtm1*KO
120 muscles injected with AAV-sh*Dnm2* C or I were remarkably bigger and exhibit an increase of
121 specific muscle force compared to the contralateral TA injected with shRNA ctrl (**Figure 3a-**

Figure 4

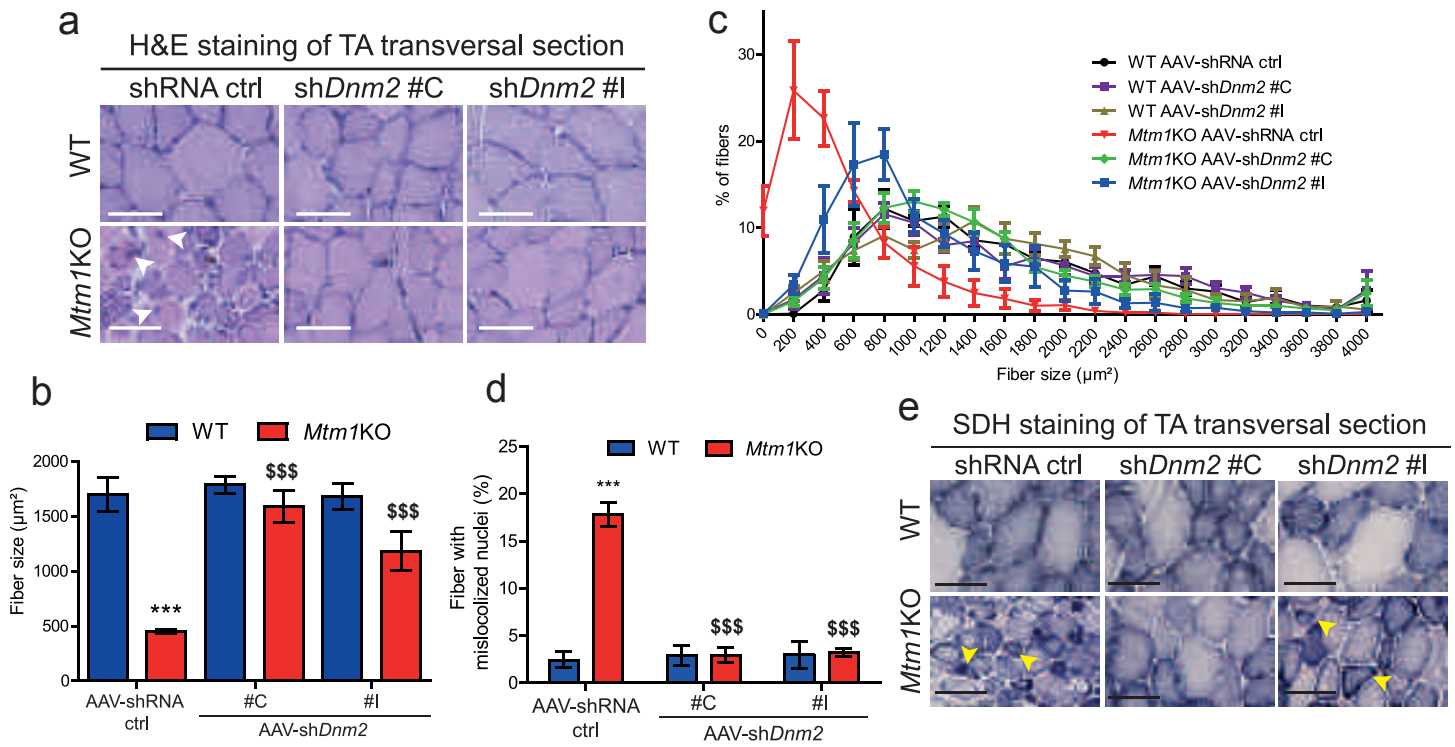


Figure 4: Histology amelioration of TA treated with AAV shDnm2.

(a) TA muscle sections of WT or *Mtm1KO* mice treated with AAV-shRNA ctrl or shDnm2 (C or I) were stained with H&E to visualize fiber size and shape and nuclei positioning. Arrows show mislocalized nuclei (scale bars: 50 μm). (b) TA myofiber area was calculated on 300-400 fibers per sample (n=5 mice/group). (c) Fiber size distribution of WT or *Mtm1KO* TA muscles according to size groups. Affected *Mtm1KO* TA muscles have more small fibers and less medium-size or large fibers. (d) Percentage of fibers with mislocalized nuclei was determined in 1000 fibers (n=5-6 mice/group). (e) Mitochondrial oxidative activity distribution was analysed on transversal sections stained for SDH. Arrows show aggregated staining (scale bars: 50 μm). ***p<0.001 vs WT TA treated with shRNA ctrl. \$\$\$p<0.01 *Mtm1KO* treated with AAV-shDnm2 vs *Mtm1KO* treated with AAV-shRNA ctrl (ANOVA test).

Figure 5

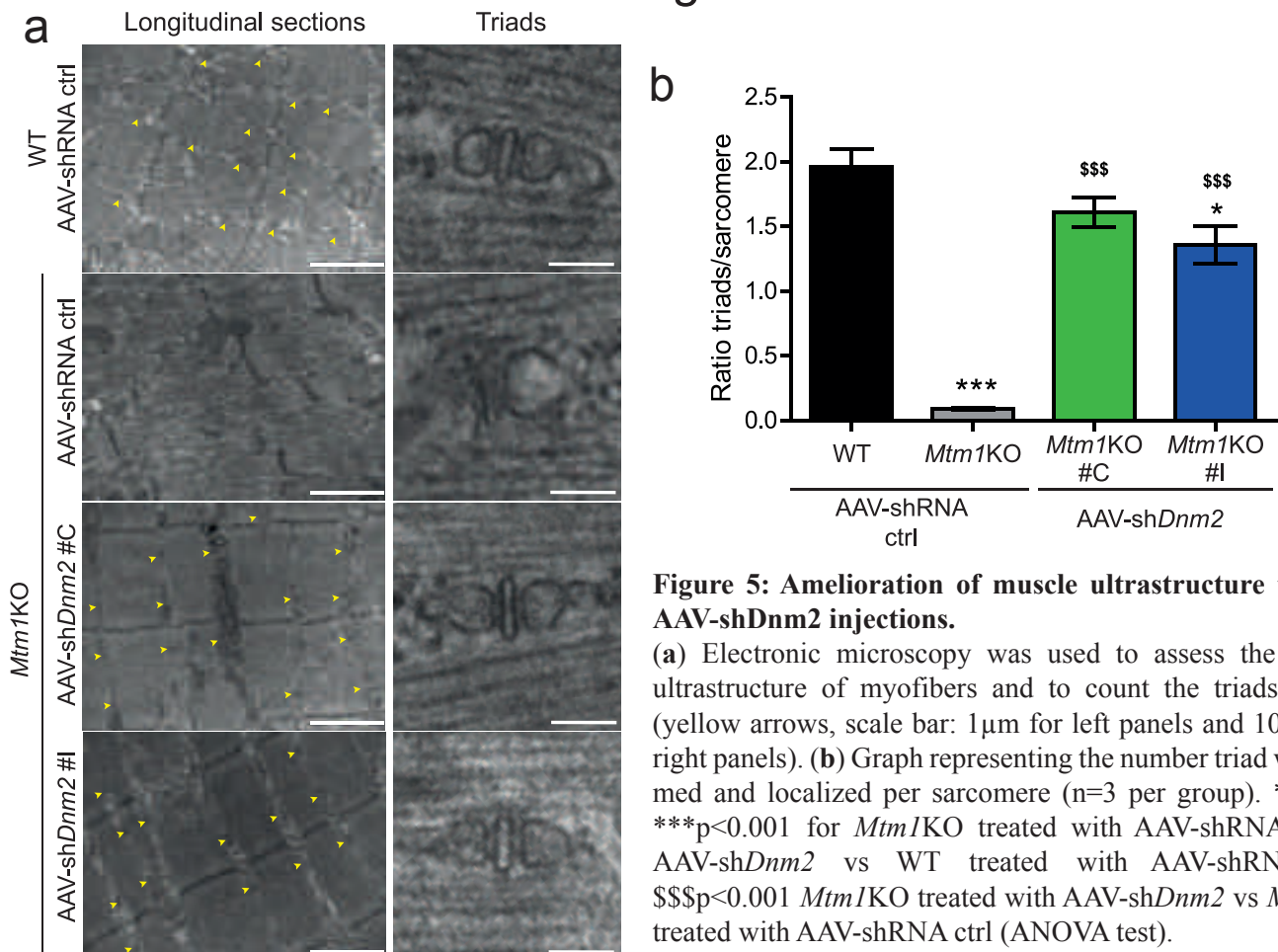


Figure 5: Amelioration of muscle ultrastructure through AAV-shDnm2 injections.

(a) Electronic microscopy was used to assess the general ultrastructure of myofibers and to count the triads formed (yellow arrows, scale bar: 1 μm for left panels and 100nm for right panels). (b) Graph representing the number triad well-formed and localized per sarcomere (n=3 per group). *p<0.05, ***p<0.001 for *Mtm1KO* treated with AAV-shRNA ctrl or AAV-shDnm2 vs WT treated with AAV-shRNA ctrl. \$\$\$p<0.001 *Mtm1KO* treated with AAV-shDnm2 vs *Mtm1KO* treated with AAV-shRNA ctrl (ANOVA test).

122 c). These results validate *in vivo* the efficiency of several shRNA sequences targeting *Dnm2*
123 mRNA and show that reducing DN2 after a single injection of AAV-sh*Dnm2* efficiently
124 ameliorates muscle mass and force of the *Mtm1KO* XLCNM model.

125 AAV shRNA-mediated knockdown of DN2 rescues *Mtm1KO* muscle histology:

126 To assess if the functional amelioration of *Mtm1KO* muscles is linked to an improved muscle
127 histology, transversal sections of TA 4 weeks post-injection were stained with hematoxylin and
128 eosin (H&E). *Mtm1KO* muscles treated with AAV-shRNA ctrl exhibited small and rounded
129 fibers with a 3-fold reduction in fiber size compared to WT muscles (**Figure 4a-c**). In addition,
130 approximately 20% of the myofibers presented with abnormal internal localization of nuclei
131 (**Figure 4d**). Succinate dehydrogenase (SDH) staining showed abnormal mitochondrial
132 distribution with aggregated staining in the centre or forming a halo at the periphery of the
133 myofiber (**Figure 4e**). These abnormal histological features recapitulate the typical histology
134 seen in XLCNM patients and were corrected in *Mtm1KO* TA when treated with two different
135 AAV-sh*Dnm2*. Muscles injected with AAV-sh*Dnm2* C or I showed a normalization of the
136 myofiber size with nuclei positioned at the periphery (**Figure 4a-d**). In addition, TA muscles
137 injected with AAV-sh*Dnm2* C exhibit a normal muscle histology similar to WT with normal
138 mitochondrial distribution (**Figure 4e**). Injection of sh*Dnm2* I correlated with an increase of
139 myofiber size and a strong improvement of mitochondria distribution, however few myofibers
140 still presented an intermediate size with mitochondrial oxidative staining in the centre or
141 forming a halo at the periphery (**Figure 4a-c, 4e**). These results suggest only a slight difference
142 in efficacy between sh*Dnm2* C and I based on SDH staining, and show overall a strong rescue
143 of muscle histology following a single injection of two different AAV-sh*Dnm2*.

144 DN2 reduction through AAV-shRNA rescues myofiber organization in *Mtm1KO* 145 muscles:

146 MTM1 deficiency was documented to induce disorganization of muscle fiber in several species
147 (Beggs, Bohm et al., 2010, Buj-Bello et al., 2002, Dowling et al., 2009). MTM1 deficient fibers
148 present with misalignment of Z-line, mislocalization of organelles including nuclei and
149 mitochondria, and a strong defect in triad structure (formed by one T-tubule and two
150 sarcoplasmic reticulum cisternae) implicated in excitation-contraction coupling. In agreement
151 with the literature, misalignment of the Z-line was observed in the *Mtm1KO* TA muscles by
152 transmission electronic microscopy (TEM) in this study (**Figure 5a**), and confirmed by
153 immunolabeling of alpha-Actinin (Z-line marker) (**Figure 6**). Well organized triads are seldom
154 observed in this model (**Figure 5a-b**), and this finding parallels the perturbed localization of
155 the junctional sarcoplasmic reticulum calcium channel RYR1 and caveolin 3 implicated in T-
156 tubule biogenesis (**Figure 6**).

157 AAV-sh*Dnm2* injection into *Mtm1KO* mice restored the disorganized ultrastructure observed
158 in untreated mice. Using TEM, myofiber ultrastructure revealed a well-organized structure with
159 increased ratio of normal and well positioned triads in treated *Mtm1KO* mice (**Figure 5a, b**),
160 equivalent to the rescue observed targeting DN2 systemically by ASO at higher doses
161 (Tasfaout et al., 2017). RYR1 and caveolin 3 were also correctly localized as in WT muscle
162 (**Figure 6**). Furthermore Z-line alignment and alpha actinin labelling were also normal. DN2
163 localized normally in both untreated and treated *Mtm1KO* muscles, in a transverse localization.

Figure 6

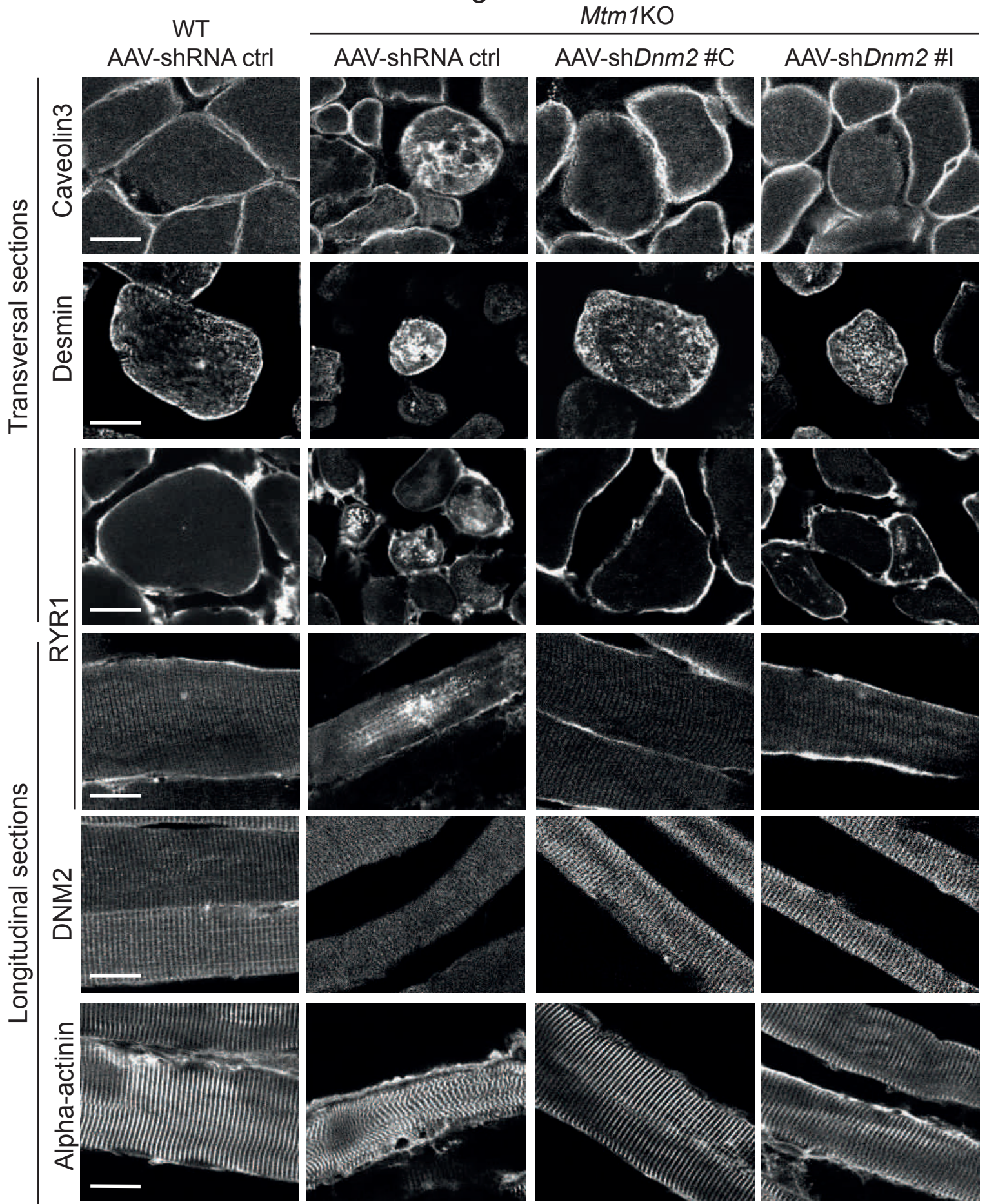


Figure 6: Improvement of molecular defects in *Mtm1KO* mice treated with AAV shDnm2.

Immunolabeling of CAV3, desmin, RYR1, DNM2 and alpha-actinin was performed on 8µm transversal or longitudinal sections. The staining was visualized using confocal microscopy (scale bar: 20µm).

164 In addition, the desmin aggregation observed in the *Mtm*IKO mice treated with AAV-shRNA
165 ctrl was also rescued upon injection with AAV-sh*Dnm2* (Figure 6).

166 Altogether, these findings underline a complete amelioration of the XLCNM like phenotypes
167 in the *Mtm*IKO model at the structural and molecular levels upon DNM2 reduction through
168 AAV-shRNA treatment, and fully correlate with the rescue in muscle mass and force.

169

170 Discussion

171 Myotubular myopathy is the most severe form of CNM with highest incidence, and no available
172 effective treatment exists. Among the different therapeutic approaches that were tested in
173 preclinical trials on animal models, few showed a significant histological and functional
174 improvements. Here we provide evidence showing that a single injection of AAV-sh*Dnm2*
175 rescues the CNM phenotype of *Mtm*IKO mice at the functional, histological, and ultrastructural
176 level, when analyzed four weeks after injection. Molecular defects were greatly ameliorated
177 with a strong improvement of the localization of desmin, caveolin 3 and RYR1. The structural
178 alterations of the myofibers were rescued, including normalization of mitochondria and nuclei
179 positioning and triad shape and distribution. Furthermore, the different histological hallmarks
180 of CNM were absent upon AAV-sh*Dnm2* injection, with an increase in myofiber size and
181 decrease in frequency of fibers with mislocalized nuclei. These effects correlated with a
182 normalization of muscle mass and force.

183 Our results demonstrate that reduction of DNM2 level, through local injection of AAV-
184 sh*Dnm2*, prevent the disease progression. These data confirmed the therapeutic potential of
185 DNM2 knockdown and are concordant with those obtained with ASO targeting *Dnm2* or
186 genetic reduction of *Dnm2* (Cowling et al., 2014, Tasfaout et al., 2017). Furthermore, it is
187 noteworthy that using this approach we almost fully rescued the CNM phenotype targeting
188 DNM2 in one muscle alone, despite the severe phenotype still observed in other muscles of the
189 mouse. DNM2 protein levels are increased in muscles from both XLCNM patients and
190 *Mtm*IKO mice, at symptomatic ages. The fact that reducing DNM2 level promotes disease
191 prevention strongly supports the observed increase in DNM2 as a significant cause of the
192 disease initiation and/or progression. This finding is sustained by the fact that overexpression
193 of DNM2 in WT mice by transgenesis or AAV injections creates a CNM phenotype (Cowling
194 et al., 2011, Liu et al., 2011). Moreover, *in vitro* experiments showed that DNM2 mutations
195 leading to a dominant CNM form increase its GTPase activity and oligomerization stability
196 (Kenniston & Lemmon, 2010, Wang et al., 2010). We thus hypothesize that either increase in
197 DNM2 protein level upon impairment of MTM1 or increase in DNM2 activity following
198 mutations trigger the CNM phenotypes in XLCNM or ADCNM, respectively.

199 The present results confirm the epistasis between *Mtm1* and *Dnm2* and place DNM2
200 downstream of MTM1 in the pathological pathway causing CNM. To date the functional link
201 between MTM1 and DNM2, and the molecular mechanism underlying this rescue remain
202 unclear. However, MTM1 deficiency was reported to cause an alteration of autophagy and
203 protein accumulation (Al-Qusairi et al., 2013, Fetalvero et al., 2013). One could hypothesize

204 that autophagy defects lead to imbalance between transcription and clearance of DNM2 causing
205 its accumulation and increased overall activity. Alternatively, MTM1 might somehow regulate
206 *DNM2* transcription or translation. However, this is less likely as DNM2 mRNA is not elevated
207 in *Mtm1*KO mice (Cowling et al., 2014). In addition, one cannot exclude that MTM1 directly
208 regulates DNM2 activity or transport in addition to its expression.

209 Here we validated several shRNA sequences targeting *Dnm2* mRNA *in vitro* and *in vivo* for
210 efficient DNM2 knockdown. In particular, we identified shRNA sequences partially (#I) or
211 fully (#C) improving the molecular, cellular and physiological phenotypes. These data provide
212 the proof-of-concept that targeting *Dnm2* mRNA for degradation using AAV as a delivery
213 method is efficient to ameliorate XLCNM, thus validating a novel approach to tackle this
214 disease. Compared to the recently reported ASO targeting nuclear *Dnm2* pre-mRNA, shRNA
215 targets the cytoplasmic mRNA and both approaches efficiently decrease DNM2 level.
216 Moreover, AAV have two main advantages: they can have a good muscle tropism and they can
217 sustain long-term expression following a single injection. Indeed, tissue specificity can be
218 further achieved by modulating the AAV serotype and the promoter controlling the expression
219 of the transgene. Numerous AAV serotypes have been identified and several showed a strong
220 skeletal muscle tropism (Zincarelli, Soltys et al., 2008). In addition, several promoter and
221 regulatory cassettes have been reported to have a high activity in skeletal muscle (Salva,
222 Himeda et al., 2007). Together, the combination of these two elements would largely restrict
223 the delivery of shRNA to skeletal muscles which may improve the efficacy while decreasing
224 the required dose and minimizing potential side effects related to reduction of DNM2 in other
225 organs. Of note, reduction of DNM2 by 50% through transgenesis or ASO injection did not
226 induce a detectable toxicity (Cowling et al., 2014, Tasfaout et al., 2017).

227 Many studies showed the potential of AAV to maintain a long-term and robust transgene
228 expression (Husain, Passini et al., 2009, Nathwani, Tuddenham et al., 2011, Penaud-Budloo,
229 Le Guiner et al., 2008, Rivera, Gao et al., 2005), which imply avoiding multiple injection that
230 may trigger immune reaction against these vectors. Moreover, several reports claim the safety
231 of recombinant AAV vector. Unlike other viral vectors, they do not integrate the genome of the
232 host cell and they elicit a mild and manageable immune response (Nathwani et al., 2011,
233 Nowrouzi, Penaud-Budloo et al., 2012, Penaud-Budloo et al., 2008). However, they represent
234 some limitations. Following their transduction into host cells, AAV are mostly present as non-
235 integrated episomes. Loss of the transgene expression could be expected due to normal muscle
236 turnover. In addition, it has been reported that AAV do not transduce satellite cells which are
237 multipotent cells able to differentiate and give rise to myofibers (Arnett, Konieczny et al.,
238 2014). Thus, re-administration of these vectors after the initial infusion might be needed.
239 Furthermore, human administration of AAV requires a large amount and high titer production
240 which represent a manufacturing challenges and costly process. Finally, the level of DNM2 will
241 have to be tightly regulated for clinical use.

242 In conclusion, we provide the first proof-of-principle that using AAV encoding for sh*Dnm2* in
243 XLCNM mouse model shows a strong and robust reduction of DNM2 protein level following
244 a single injection. These shRNA targeting *Dnm2* exhibit a strong affinity to human *DNM2*

245 transcript as shown *in vitro* (**Figure 1**), which might be relevant for human application in future
246 clinical trials.

247 **Materials and methods**

248 **Cell transfection:**

249 HEK293T were co-transfected by plasmid encoding human DNMT2 and another plasmid
250 expressing either shRNA ctrl or different sh*Dnm2* using lipofectamine 2000 and following the
251 manufacturer's instructions. Cells were seeded in 6-well plates. At 80% of confluency, a
252 mixture of lipofectamine reagent and opti-MEM medium containing 2µg of plasmid expressing
253 human *DNMT2* and 2 µg of plasmid encoding the different shRNA was incubated for 4 hours.
254 Then the mixture was removed and replaced by DMEM medium containing 20% FCS. The
255 transfected cells were incubated at 37°C for 72 hours.

256 C2C12 mouse myoblast were electroporated with different concentrations of ASO using Amaxa
257 nucleofector2B Kit V and following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were
258 trypsinized and 1x10⁶ cells per sample were gently centrifuged at 90 g for 10 minutes at room
259 temperature. Cell pellet was resuspended in 100 µl of the solution provided in the kit. Then,
260 2µg of plasmid expressing shRNA ctrl or different sh*Dnm2* were added to the cell suspension
261 and transferred immediately to an electroporation cuvette. Electroporation was performed using
262 the B-032 program of Nucleofector® I Device. The electroporated cells were incubated for 48
263 hours in DMEM medium containing 20% FCS at 37°C, before harvesting the electroporated
264 cells for RNA analysis.

265 **Animals:**

266 Animal experiment were conducted on male *Mtm*IKO or WT 129SvPAS mice according to the
267 French and European legislation on animal care and experimentation. Protocols N°: Com'Eth
268 IGBMC-ICS 2012-132, 2013-034 and 2016-5453 were approved by the institutional Ethics
269 Committee. Mice were housed in a temperature controlled room and ventilated cages with 12
270 hours day light/darkness cycle and given free access to food.

271 **Intramuscular injection of AAV:**

272 3 week-old male *Mtm*IKO or WT were weighed then an anaesthetic solution of ketamine 20
273 mg/ml and xylazine 0,4% at 5 µl/gram of body weight was administrated by intraperitoneal
274 injection. Right Tibialis anterior (TA) muscles were injected with 5-7x10¹¹vg/ml in 20µl of
275 AAV2/9 expressing sh*Dnm2* (either B, C, F, I or J) and the same dose of AAV2/9 expressing
276 shRNA ctrl was injected in the contralateral TA. At 7 weeks of age, mice were humanly killed
277 by CO₂ suffocation followed by cervical dislocation. The TA muscles were dissected and
278 weighed. They were snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at -80°C for
279 H&E and SDH histology analysis as well as protein extraction and quantification. For
280 immunostaining, TA muscles were stored in PFA 4% for 24 hours, then they were transferred
281 to sucrose 30% overnight and stored at 4°C.

282 **Immunostaining of muscle sections:**

283 8 μ m transversal or longitudinal cryosections of TA were stained with antibodies against CAV3
284 (Santa Cruz N-18 sc-7665; 1:500), RYR1 (34C abcam2668; 1:500), desmin (Santa Cruz sc-
285 7559; 1:500), DNM2 (homemade antibody R2680; 1:500), alpha-actinin (anti- α -actinin
286 Sarcomeric clone EA-53; 1:500). Images were taken with a Leica SP8-UV confocal
287 microscope.

288 **Muscle histology:**

289 8 μ m transversal cryosections were prepared and stained by Haematoxylin and Eosin (H&E) or
290 succinate dehydrogenase (SDH). Sections were imaged with the Hamamatsu NanoZoomer 2HT
291 slide-scanner. The percentage of TA muscle fibers with mislocalized (centralized or
292 internalized) nuclei was counted using the cell counter plugin in Fiji image analysis software.
293 The fiber area was measured using the Fiji software.

294 **TA muscle contractile properties:**

295 TA muscle contraction properties were evaluated *in situ* after sciatic nerve stimulation using an
296 Aurora scientific force transducer. Briefly, mice were anesthetized with IP injection of
297 pentobarbital (60 mg/kg). The distal tendon of TA muscle was detached and tied to the isometric
298 transducer. Sciatic nerves were stimulated by pulses of 50 to 150 Hz and the absolute maximal
299 force was measured. The specific maximal force was determined by dividing the absolute
300 muscle force on the TA muscle weight.

301 **Protein extraction and western blot:**

302 TA muscle cryosections or transfected HEK 293T cells were lysed in RIPA buffer
303 supplemented with PMSF 1 mM and complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail
304 (Roche Diagnostic). Protein concentrations were determined with the BIO-RAD Protein Assay
305 Kit. Samples were denatured at 95°C for 5 minutes. Then 20 μ g of protein were loaded in
306 buffer containing 50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, separated in 10% SDS-PAGE
307 electrophoretic gel and transferred on nitrocellulose membrane for 1.5 hour at 200 mA.
308 Membranes were blocked for 2 hours in TBS containing 5% non-fat dry milk and 0.1%
309 Tween20 before an incubation for 2 hours with primary rabbit polyclonal antibodies against
310 DNM2 (homemade antibody R2865; 1:500) or mouse antibody against GAPDH (1: 100,000)
311 diluted in blocking buffer containing 5% milk. Secondary antibodies coupled to horseradish
312 peroxidase were goat anti-rabbit (for DNM2) (1:10000) or goat anti-mouse (for GAPDH)
313 (1:10000) and were incubated overnight. Nitrocellulose membranes were visualized in
314 Amersham Imager 600.

315 **Production and purification of Adeno-Associated Virus (rAAV):**

316 rAAV2/9 vectors were generated by a triple transfection of AAV-293 cell line with pAAV2-
317 insert containing either shRNA control (scrambled sequence) or sh*Dnm2* (B, C, F, H and J)
318 under the control of the mouse U6 promoter, a GFP gene under the control of CMV promoter
319 as a reporter and flanked by serotype-2 inverted terminal repeats, pXR1 containing rep and cap
320 genes of AAV serotype-9, and pHelper encoding the adenovirus helper functions. Cell lysates
321 were subjected to 3 rounds of freeze/thaw, then treated with 50U/mL Benzonase (Sigma) for
322 30 minutes at 37°C and clarified by centrifugation. Viral vectors were purified by Iodixanol

323 gradient ultracentrifugation followed by dialysis and concentration against DPBS using
324 centrifugal filters (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 30K). Physical particles were
325 quantified by real time PCR and titers are expressed as viral genomes per ml (vg/ml).

326 RNA extraction and qRT-PCR:

327 Total RNA was isolated from transfected HEK293T or C2C12 cells using TRIzol reagent
328 according to the manufacturer's instruction (Invitrogen, UK). RT-PCR was carried out on 1-
329 1.5 µg aliquot using SuperscriptII Reverse Transcriptase (Thermofischer Scientific). qRT-PCR
330 was performed in Lightcycler 480 (Roche) using: *Dnm2* (F): CCAACAAAGGCATCTCCCCT,
331 *Dnm2* (R): TGGTGAGTAGACCCGAAGGT, *Hprt*(F): GTAATGATCAGTCAACGGGGG-
332 AC, *Hprt* (R): CCAGCAAGCTTGCAACCTTAACCA mixed in SybrGreen (Qiagen).

333 Statistical analysis:

334 Curves and graphs were made using GraphPad Prism software. Difference between groups was
335 analyzed by two-way ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni.

336 Acknowledgments:

337 We thank Pascal Kessler, William Magnant and Olivia Wendling for excellent technical
338 assistance, and Julie JOHNSTON (Penn Vector Core at University of Pennsylvania) for
339 providing pAAV2/9 plasmid. This study was supported by ANR-10-LABX-0030-INRT, a
340 French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program
341 Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02, Myotubular Trust and Sparks the
342 Children's Medical Research Charity, Association Française contre les Myopathies (AFM
343 20323), and the SATT Alsace Conectus. H.T. was supported by a MRT fellowship.

344 Author contribution:

345 B.S.C and J.L conceived the project. H.T performed most experiments. C.K genotyped the
346 mice. P.K produced and purified the AAV. N.M performed electron microscopy. D.B prepared
347 and stained muscle samples for histology analysis. H.T wrote the manuscript draft with editions
348 by B.S.C and J.L.

349 Conflict of interest:

350 H.T., J.L. and B.S.C. are inventors of a patent on targeting *DNM2* for the treatment of
351 centronuclear myopathies. J.L. and B.S.C. are scientific advisors for Dynacure.

352 References

- 353 Al-Qusairi L, Prokic I, Amoasii L, Kretz C, Messaddeq N, Mandel JL, Laporte J (2013) Lack
354 of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy
355 and ubiquitin-proteasome pathways. *FASEB J* 27: 3384-94
- 356 Al-Qusairi L, Weiss N, Toussaint A, Berbey C, Messaddeq N, Kretz C, Sanoudou D, Beggs
357 AH, Allard B, Mandel JL, Laporte J, Jacquemond V, Buj-Bello A (2009) T-tubule disorganization and
358 defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc*
359 *Natl Acad Sci U S A* 106: 18763-8

360 Arneson LN, Segovis CM, Gomez TS, Schoon RA, Dick CJ, Lou Z, Billadeau DD, Leibson PJ
361 (2008) Dynamin 2 regulates granule exocytosis during NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 181:
362 6995-7001

363 Arnett AL, Konieczny P, Ramos JN, Hall J, Odom G, Yablonka-Reuveni Z, Chamberlain JR,
364 Chamberlain JS (2014) Adeno-associated viral (AAV) vectors do not efficiently target muscle satellite
365 cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 1

366 Beggs AH, Bohm J, Snead E, Kozlowski M, Maurer M, Minor K, Childers MK, Taylor SM,
367 Hitte C, Mickelson JR, Guo LT, Mizisin AP, Buj-Bello A, Tired L, Laporte J, Shelton GD (2010) MTM1
368 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers. *Proc Natl Acad Sci U*
369 *S A* 107: 14697-702

370 Bitoun M, Maugendre S, Jeannet PY, Lacene E, Ferrer X, Laforet P, Martin JJ, Laporte J,
371 Lochmuller H, Beggs AH, Fardeau M, Eymard B, Romero NB, Guicheney P (2005) Mutations in
372 dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* 37: 1207-9

373 Bohm J, Biancalana V, Dechene ET, Bitoun M, Pierson CR, Schaefer E, Karasoy H, Dempsey
374 MA, Klein F, Dondaine N, Kretz C, Haumesser N, Poirson C, Toussaint A, Greenleaf RS, Barger MA,
375 Mahoney LJ, Kang PB, Zanoteli E, Vissing J et al. (2012) Mutation spectrum in the large GTPase
376 dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum*
377 *Mutat* 33: 949-59

378 Buj-Bello A, Biancalana V, Moutou C, Laporte J, Mandel JL (1999) Identification of novel
379 mutations in the MTM1 gene causing severe and mild forms of X-linked myotubular myopathy. *Hum*
380 *Mutat* 14: 320-5

381 Buj-Bello A, Fougereousse F, Schwab Y, Messaddeq N, Spehner D, Pierson CR, Durand M,
382 Kretz C, Danos O, Douar AM, Beggs AH, Schultz P, Montus M, Deneffe P, Mandel JL (2008) AAV-
383 mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in
384 targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Hum Mol Genet* 17:
385 2132-43

386 Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, Pellissier JF, Mandel JL (2002)
387 The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis
388 in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15060-5

389 Childers MK, Joubert R, Poulard K, Moal C, Grange RW, Doering JA, Lawlor MW, Rider BE,
390 Jamet T, Daniele N, Martin S, Riviere C, Soker T, Hammer C, Van Wittenberghe L, Lockard M, Guan
391 X, Goddard M, Mitchell E, Barber J et al. (2014) Gene therapy prolongs survival and restores function
392 in murine and canine models of myotubular myopathy. *Sci Transl Med* 6: 220ra10

393 Cowling BS, Chevremont T, Prokic I, Kretz C, Ferry A, Coirault C, Koutsopoulos O, Laugel V,
394 Romero NB, Laporte J (2014) Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear
395 myopathy. *J Clin Invest* 124: 1350-63

396 Cowling BS, Toussaint A, Amoasii L, Koebel P, Ferry A, Davignon L, Nishino I, Mandel JL,
397 Laporte J (2011) Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2
398 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am J Pathol* 178: 2224-
399 35

400 Di A, Nelson DJ, Bindokas V, Brown ME, Libunao F, Palfrey HC (2003) Dynamin regulates
401 focal exocytosis in phagocytosing macrophages. *Mol Biol Cell* 14: 2016-28

402 Dowling JJ, Joubert R, Low SE, Durban AN, Messaddeq N, Li X, Dulin-Smith AN, Snyder AD,
403 Marshall ML, Marshall JT, Beggs AH, Buj-Bello A, Pierson CR (2012) Myotubular myopathy and the
404 neuromuscular junction: a novel therapeutic approach from mouse models. *Dis Model Mech* 5: 852-9

405 Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, Gibbs EM, Kuwada JY, Bonnemann CG, Feldman EL (2009)
406 Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular
407 myopathy. *PLoS Genet* 5: e1000372

408 Fetalvero KM, Yu Y, Goetschkes M, Liang G, Valdez RA, Gould T, Triantafellow E, Bergling
409 S, Loureiro J, Eash J, Lin V, Porter JA, Finan PM, Walsh K, Yang Y, Mao X, Murphy LO (2013)
410 Defective autophagy and mTORC1 signaling in myotubularin null mice. *Mol Cell Biol* 33: 98-110

411 Grimm D, Pandey K, Kay MA (2005) Adeno-associated virus vectors for short hairpin RNA
412 expression. *Methods Enzymol* 392: 381-405

413 Hnia K, Tronchere H, Tomczak KK, Amoasii L, Schultz P, Beggs AH, Payraastre B, Mandel JL,
414 Laporte J (2011) Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial
415 dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J Clin Invest* 121: 70-85

416 Husain T, Passini MA, Parente MK, Fraser NW, Wolfe JH (2009) Long-term AAV vector gene
417 and protein expression in mouse brain from a small pan-cellular promoter is similar to neural cell
418 promoters. *Gene Ther* 16: 927-32

419 Jungbluth H, Wallgren-Pettersson C, Laporte J (2008) Centronuclear (myotubular) myopathy.
420 *Orphanet J Rare Dis* 3: 26

421 Kenniston JA, Lemmon MA (2010) Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain
422 mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J* 29: 3054-67

423 Koo T, Malerba A, Athanasopoulos T, Trollet C, Boldrin L, Ferry A, Popplewell L, Foster H,
424 Foster K, Dickson G (2011) Delivery of AAV2/9-Microdystrophin Genes Incorporating Helix 1 of the
425 Coiled-Coil Motif in the C-Terminal Domain of Dystrophin Improves Muscle Pathology and Restores
426 the Level of alpha 1-Syntrophin and alpha-Dystrobrevin in Skeletal Muscles of mdx Mice. *Human Gene
427 Therapy* 22: 1379-1388

428 Koornneef A, Maczuga P, van Logtenstein R, Borel F, Blits B, Ritsema T, van Deventer S, Petry
429 H, Konstantinova P (2011) Apolipoprotein B knockdown by AAV-delivered shRNA lowers plasma
430 cholesterol in mice. *Mol Ther* 19: 731-40

431 Laporte J, Biancalana V, Tanner SM, Kress W, Schneider V, Wallgren-Pettersson C, Herger F,
432 Buj-Bello A, Blondeau F, Liechti-Gallati S, Mandel JL (2000) MTM1 mutations in X-linked myotubular
433 myopathy. *Hum Mutat* 15: 393-409

434 Laporte J, Hu LJ, Kretz C, Mandel JL, Kioschis P, Coy JF, Klauck SM, Poustka A, Dahl N
435 (1996) A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase
436 family conserved in yeast. *Nat Genet* 13: 175-82

437 Laporte J, Kress W, Mandel JL (2001) Diagnosis of X-linked myotubular myopathy by
438 detection of myotubularin. *Ann Neurol* 50: 42-6

439 Lawlor MW, Alexander MS, Viola MG, Meng H, Joubert R, Gupta V, Motohashi N, Manfreedy
440 RA, Hsu CP, Huang P, Buj-Bello A, Kunkel LM, Beggs AH, Gussoni E (2012) Myotubularin-deficient
441 myoblasts display increased apoptosis, delayed proliferation, and poor cell engraftment. *Am J Pathol*
442 181: 961-8

443 Lawlor MW, Viola MG, Meng H, Edelstein RV, Liu F, Yan K, Luna EJ, Lerch-Gaggl A,
444 Hoffmann RG, Pierson CR, Buj-Bello A, Lachey JL, Pearsall S, Yang L, Hillard CJ, Beggs AH (2014)
445 Differential muscle hypertrophy is associated with satellite cell numbers and Akt pathway activation
446 following activin type IIB receptor inhibition in Mtm1 p.R69C mice. *Am J Pathol* 184: 1831-42

447 Liu N, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Frisard MI, Hulver MW, McMillan RP, Wu Y, Voelker
448 KA, Grange RW, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2011) Mice lacking microRNA 133a
449 develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy. *J Clin Invest* 121: 3258-68

450 McNiven MA, Kim L, Krueger EW, Orth JD, Cao H, Wong TW (2000) Regulated interactions
451 between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* 151: 187-98

452 Mooren OL, Kotova TI, Moore AJ, Schafer DA (2009) Dynamin2 GTPase and cortactin
453 remodel actin filaments. *J Biol Chem* 284: 23995-4005

454 Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P,
455 Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA,
456 Zhou J, Spence Y, Morton CL et al. (2011) Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer
457 in hemophilia B. *N Engl J Med* 365: 2357-65

458 Nowrouzi A, Penaud-Budloo M, Kaepfel C, Appelt U, Le Guiner C, Moullier P, Kalle CV,
459 Snyder RO, Schmidt M (2012) Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV
460 Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver. *Mol Ther* 20: 1177-1186

461 Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Cherel Y, Chenuaud P, Schmidt
462 M, von Kalle C, Rolling F, Moullier P, Snyder RO (2008) Adeno-associated virus vector genomes
463 persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* 82: 7875-85

464 Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW, Clackson T, Wilson
465 JM (2005) Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following
466 AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105: 1424-30

467 Robb SA, Sewry CA, Dowling JJ, Feng L, Cullup T, Lillis S, Abbs S, Lees MM, Laporte J,
468 Manzur AY, Knight RK, Mills KR, Pike MG, Kress W, Beeson D, Jungbluth H, Pitt MC, Muntoni F
469 (2011) Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in
470 centronuclear myopathies. *Neuromuscul Disord* 21: 379-86
471 Romero NB (2010) Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul Disord* 20:
472 223-8
473 Saal KA, Koch JC, Tatenhorst L, Szego EM, Ribas VT, Michel U, Bahr M, Tonges L, Lingor
474 P (2015) AAV.shRNA-mediated downregulation of ROCK2 attenuates degeneration of dopaminergic
475 neurons in toxin-induced models of Parkinson's disease in vitro and in vivo. *Neurobiol Dis* 73: 150-62
476 Sabha N, Volpatti JR, Gonorazky H, Reifler A, Davidson AE, Li X, Eltayeb NM, Dall'Armi C,
477 Di Paolo G, Brooks SV, Buj-Bello A, Feldman EL, Dowling JJ (2016) PIK3C2B inhibition improves
478 function and prolongs survival in myotubular myopathy animal models. *J Clin Invest* 126: 3613-25
479 Salva MZ, Himeda CL, Tai PW, Nishiuchi E, Gregorevic P, Allen JM, Finn EE, Nguyen QG,
480 Blankinship MJ, Meuse L, Chamberlain JS, Hauschka SD (2007) Design of tissue-specific regulatory
481 cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol Ther* 15: 320-9
482 Samulski RJ, Muzyczka N (2014) AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic
483 Purposes. *Annu Rev Virol* 1: 427-51
484 Spiro AJ, Shy GM, Gonatas NK (1966) Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in
485 an adolescent boy. *Arch Neurol* 14: 1-14
486 Tasfaout H, Buono S, Guo S, Kretz C, Messaddeq N, Booten S, Greenlee S, Monia BP, Cowling
487 BS, Laporte J (2017) Antisense oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts
488 myotubular myopathy in mice. *Nat Commun* 8: 15661
489 Tosch V, Vasli N, Kretz C, Nicot AS, Gasnier C, Dondaine N, Oriot D, Barth M, Puissant H,
490 Romero NB, Bonnemann CG, Heller B, Duval G, Biancalana V, Laporte J (2010) Novel molecular
491 diagnostic approaches for X-linked centronuclear (myotubular) myopathy reveal intronic mutations.
492 *Neuromuscul Disord* 20: 375-81
493 Tsai TC, Horinouchi H, Noguchi S, Minami N, Murayama K, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino
494 I (2005) Characterization of MTM1 mutations in 31 Japanese families with myotubular myopathy,
495 including a patient carrying 240 kb deletion in Xq28 without male hypogenitalism. *Neuromuscul Disord*
496 15: 245-52
497 Tsujita K, Itoh T, Ijuin T, Yamamoto A, Shisheva A, Laporte J, Takenawa T (2004)
498 Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol
499 3,5-bisphosphate interaction. *J Biol Chem* 279: 13817-24
500 Wang L, Barylko B, Byers C, Ross JA, Jameson DM, Albanesi JP (2010) Dynamin 2 mutants
501 linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J Biol Chem* 285: 22753-7
502 Warnock DE, Baba T, Schmid SL (1997) Ubiquitously expressed dynamin-II has a higher
503 intrinsic GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal dynamin-I. *Mol Biol*
504 *Cell* 8: 2553-62
505 Yamada H, Takeda T, Michiue H, Abe T, Takei K (2016) Actin bundling by dynamin 2 and
506 cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma
507 cells. *Int J Oncol* 49: 877-86
508 Yang Q, Tang Y, Imbrogno K, Lu A, Proto JD, Chen A, Guo F, Fu FH, Huard J, Wang B (2012)
509 AAV-based shRNA silencing of NF-kappaB ameliorates muscle pathologies in mdx mice. *Gene Ther*
510 19: 1196-204
511 Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE (2008) Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated
512 gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16: 1073-80

513



Publication 2

Antisense oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice

Hichem TASFAOUT, Suzie BUONO, Shuling GUO, Christine KRETZ,
Nadia MESSADDEQ, Sheri BOOTEN, Sarah GREENLEE, Brett P
MONIA, Belinda S. COWLING, Jocelyn LAPORTE.

2. Diminution de DNM2 par approche non-virale basée sur l'utilisation d'oligonucléotide antisens :

Publication 2 : “Antisense oligonucleotides-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice ”

a) Contexte de l'étude :

La réduction de DNM2 semble être une piste très prometteuse pour traiter la myopathie myotubulaire. Les résultats obtenus par croisement génétique ainsi que par l'injection d'AAV-sh*Dnm2* reflètent les effets positifs de cette approche. L'utilisation des vecteurs AAV présente plusieurs avantages tels que l'expression à long terme du transgène et le tropisme tissulaire. Cependant, ces vecteurs présentent des limites. Une perte du transgène est envisageable après la division cellulaire car, une fois dans une cellule hôte, le matériel génétique des AAV recombinants reste sous forme d'épisome et n'intègre pas le génome de la cellule eucaryote (Penaud-Budloo, Le Guiner et al. 2008). D'autre part, ces virus montrent une incapacité à transduire les cellules satellites des muscles qui représentent un pool de cellules pluripotentes capables, en cas de lésion musculaire, de proliférer puis de se différencier en myofibre (Arnett, Konieczny et al. 2014). Cette perte du transgène nécessiterait d'autres injections afin de maintenir son expression. Ces vecteurs viraux sont suspectés d'induire des réactions immunitaires après leur injection (Lowenstein, Mandel et al. 2007). De plus, environ 70% de la population présente déjà des anticorps anti-AAV suite à une exposition à l'AAV sauvage pendant l'enfance ou l'adolescence. Une ré-administration du virus recombinant pourrait déclencher une forte réaction immunitaire et compromettre leur efficacité à délivrer le transgène (Boutin, Monteilhet et al. 2010). Il serait donc préférable de développer et tester, en parallèle, une autre stratégie thérapeutique visant à réduire le niveau de DNM2.

Les ASO présentent une alternative idéale pour réprimer l'expression de DNM2. Ils ont fait leurs preuves dans de nombreuses maladies neurodégénératives notamment la dystrophie de Duchenne (DMD) (Cirak, Arechavala-Gomez et al. 2011, Goemans, Tulinius et al. 2016). Les muscles des patients atteints de DMD sont caractérisés par la fragilité des membranes sarcoplasmiques ce qui présente un « avantage » pour le passage des molécules thérapeutiques. En revanche, dans le cas de myopathie myotubulaire, les membranes cellulaires ne présentent pas de porosité. Au début de ce projet, il était donc incertain que les ASO pourraient passer ces membranes pour atteindre le noyau et induire la dégradation de l'ARNm de *Dnm2*.

b) Résultats :

En collaboration avec IONIS Pharmaceuticals, plusieurs centaines d'ASO ont été criblés *in vitro*, et trois candidats ont été sélectionnés pour leur efficacité à réduire la DNM2 et leur rapport dose-réponse. Par la suite, j'ai évalué l'efficacité de leur chimie (acide nucléique bicyclique 2'-O-ethyl contraint en 2', 4') à cibler l'ARNm DNM2 et à diminuer son expression *in vivo*. L'injection intramusculaire de ces ASO a permis de réduire efficacement le niveau de DNM2 et de restaurer les défauts musculaires chez les souris *MtmIKO*. Ces résultats très prometteurs obtenus par des injections locales m'ont poussé à évaluer l'efficacité des injections systémiques des ASO. Dans un premier temps, j'ai testé un protocole visant à prévenir l'apparition des symptômes de la myopathie myotubulaire (injection à 3 semaines). Différentes doses ont été administrées par voie intrapéritonéale. Un effet dose-réponse a été observé et les meilleurs résultats ont été obtenus avec les doses les plus élevées. Nous avons pu détecter la présence de ces ASO dans les muscles squelettiques ce qui reflète la puissance de cette chimie et sa capacité à traverser les différentes barrières biologiques pour atteindre sa cible dans les noyaux des myofibrilles. De plus, la première analyse sérologique et histologique montre que cette approche est bien tolérée.

Dans un autre protocole d'injection, j'ai ensuite évalué le potentiel thérapeutique de ces molécules à restaurer la fonction musculaire dans des souris myopathes sévèrement affectées (traitement curatif). La première injection de l'ASO-*Dnm2* a rapidement stabilisé l'évolution des symptômes alors que la deuxième injection était suivie d'une amélioration de tous les signes cliniques. Les souris *MtmIKO* injectées avec l'ASO-*Dnm2* étaient capables de marcher de nouveau et présentaient une force quasi normale. De plus, cette réversion est corrélée avec une normalisation du niveau de la DNM2 dans les muscles de souris traitées.

c) Contribution :

Dans cette étude, j'ai criblé les différents ASO dans les myoblastes murins. J'ai aussi injecté les souris et analysé les effets moléculaires, histologiques et physiologiques. Suzie BUONO a phénotypé les effets cliniques des souris injectées à 3 semaines et a effectué les tests suivants : Hanging, Grip, String et Rotarod. Nadia MESSADDEQ a préparé et analysé l'ultrastructure des muscles par la microscopie électronique. Christine KRETZ a préparé les croisements génétiques des souris et a génotypé les nouveau-nés. IONIS pharmaceuticals ont produit et criblé les ASO dans des cellules non-musculaires (cellules endothéliales du cerveau). L'équipe de pharmacocinétique d'IONIS a mesuré la quantité d'ASO dans les différents organes.

d) Conclusion :

Les résultats obtenus dans cette étude confirment le lien entre MTM1 et DNM2 et valident DNM2 comme cible thérapeutique dans la myopathie myotubulaire. L'étude dose-réponse réalisée avec les ASO m'a permis de corrélérer les effets positifs observés avec le niveau de DNM2 et de déterminer une fenêtre thérapeutique. Aussi, la réduction de DNM2 observée dans les muscles non dystrophiques des souris *Mtm*IKO reflète la puissance de la chimie développée par IONIS et sa capacité à traverser les nombreuses barrières biologiques. La possibilité d'interrompre le traitement, d'ajuster les doses ainsi que l'innocuité des ASO présentent à mon avis de sérieux avantages qui pourront accélérer le transfert de cette approche vers des essais cliniques pour traiter la myopathie myotubulaire.

ARTICLE

Received 27 Jul 2016 | Accepted 18 Apr 2017 | Published 7 Jun 2017

DOI: 10.1038/ncomms15661

OPEN

Antisense oligonucleotide-mediated *Dnm2* knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice

Hichem Tasfaout^{1,2,3,4}, Suzie Buono^{1,2,3,4}, Shuling Guo⁵, Christine Kretz^{1,2,3,4}, Nadia Messaddeq^{2,3,6}, Sheri Booten⁵, Sarah Greenlee⁵, Brett P. Monia⁵, Belinda S. Cowling^{1,2,3,4,*} & Jocelyn Laporte^{1,2,3,4,*}

Centronuclear myopathies (CNM) are non-dystrophic muscle diseases for which no effective therapy is currently available. The most severe form, X-linked CNM, is caused by myotubularin 1 (*MTM1*) loss-of-function mutations, while the main autosomal dominant form is due to dynamin2 (*DNM2*) mutations. We previously showed that genetic reduction of *DNM2* expression in *Mtm1* knockout (*Mtm1*KO) mice prevents development of muscle pathology. Here we show that systemic delivery of *Dnm2* antisense oligonucleotides (ASOs) into *Mtm1*KO mice efficiently reduces *DNM2* protein level in muscle and prevents the myopathy from developing. Moreover, systemic ASO injection into severely affected mice leads to reversal of muscle pathology within 2 weeks. Thus, ASO-mediated *DNM2* knockdown can efficiently correct muscle defects due to loss of *MTM1*, providing an attractive therapeutic strategy for this disease.

¹Department of Translational Medicine and Neurogenetics, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch 67404, France. ²INSERM U964, Illkirch 67404, France. ³CNRS UMR7104, Illkirch 67404, France. ⁴FMTS, Strasbourg University, Illkirch 67404, France. ⁵Ionis Pharmaceuticals Inc., Carlsbad, California 92010, USA. ⁶Service de Microscopie Electronique, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch 67404, France. * These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.S.C. (email: belinda@igbmc.fr) or to J.L. (email: jocelyn@igbmc.fr).

Antisense oligonucleotide (ASO) technology represents a promising therapeutic approach for neuromuscular diseases caused by gain-of-function mutations by reducing expression of the mutant gene, or to induce production of a functional or partially functional protein through a number of mechanisms including splicing modulation for loss-of-function genetic diseases^{1–4}. To date, this approach has been mainly applied to dystrophic muscles where uptake may be facilitated by muscle fibre leakiness, or to diseases with nuclear accumulation of pathogenic RNA that favours RNase H1-dependent degradation of the targeted transcript³. X-linked centronuclear myopathy (XLCNM), or myotubular myopathy, is a non-dystrophic muscle disease characterized by muscle weakness and hypotrophic fibres with centralized nuclei^{5–7}. It is due to loss-of-function mutations in the phosphoinositides phosphatase myotubularin (*MTM1*)⁸. Both patient muscle biopsies and the *Mtm1* knockout (Mtm1KO) mouse model present an overexpression of dynamin 2 (DNM2) as a consequence of *MTM1* mutations⁹. Of note, overexpression of DNM2 in wild-type (WT) mice by transgenesis or adeno-associated virus creates a centronuclear myopathy (CNM) phenotype^{10,11}, while genetic reduction of DNM2 in the myopathic Mtm1KO mice, by crossing with *Dnm2* +/– heterozygous mice, prevented the development of myotubular myopathy in Mtm1KO mice⁹, altogether pointing to DNM2 as a target for therapeutic development. In addition, autosomal dominant CNM forms are due to heterozygous mutations in *DNM2* that are thought to increase the GTPase activity and oligomerization of DNM2 (refs 12–14).

To develop a therapeutic approach for XLCNM, we tested ASOs against *Dnm2* that act through a RNase H-dependent RNA degradation mechanism utilizing the recently developed constrained ethyl ASO chemistry (cEt)¹⁵. This ASO chemistry exhibits enhanced *in vitro* and *in vivo* potency through higher binding affinity and better protection against nuclease degradation when compared to other chemistries, while maintaining a favourable safety profile^{16–18}.

Here, we demonstrate that intramuscular injection and systemic delivery of *Dnm2* ASOs efficiently reduced DNM2 protein levels and rescue different CNM features in the Mtm1KO murine model of myotubular myopathy. These data confirm the epistasis between *Mtm1* and *Dnm2* and validate DNM2 knock-down as a therapeutic approach for XLCNM.

Results

In vitro and *in vivo* ASO screening for DNM2 downregulation.

Following a screen of ~500 ASOs, we identified three ASO candidates based on relative potency for reducing DNM2 levels (Fig. 1a, Supplementary Table 1), each of which displayed a strong dose-dependent knockdown of the *Dnm2* mRNA transcript (Fig. 1b) and protein (Fig. 1c) when electroporated into C2C12 mouse myoblasts. ASO#1 targets exon17, while ASO#2 and #3 target repeated sequences in intron 16 of the *Dnm2* pre-mRNA.

To assess the *Dnm2* knockdown efficacy of selected ASOs *in vivo* and to potentially rescue the myotubular myopathy phenotype, 20 µg of ASO#1, #2 or #3 were injected weekly into the right tibialis anterior (TA) of 3-week-old WT or Mtm1KO mice and the same dose of control ASO was injected into contralateral limbs. The Mtm1KO mouse develops a progressive muscle weakness starting from week 2 to 3 (ref. 19). They display most features observed in patients such as a decrease in muscle weight and force, ptosis, kyphosis and subsequent breathing difficulties that cause death by 8–9 weeks. Their muscles display typical CNM histology with predominance of small rounded fibres with mislocalized nuclei, abnormal mitochondria distribution and

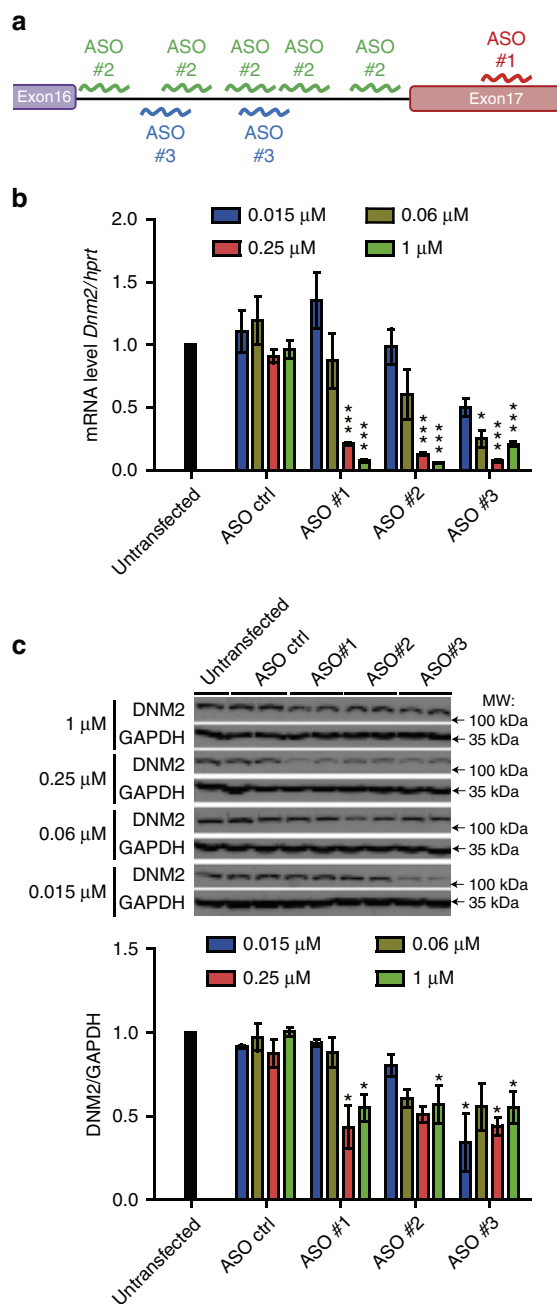


Figure 1 | *In vitro* validation of ASOs targeting *Dnm2*. (a) Location of ASO-targeting sequences in *Dnm2* mouse pre-mRNA. (b) *Dnm2* mRNA level in ASO-treated C2C12 myoblast cells was determined by qRT-PCR and standardized to *Hprt*. Cells were electroporated with ASO control (ctrl), #1, #2 or #3 at 0.015, 0.06, 0.25 or 1 µM and collected 24 h later.

(c) Representative western blot from the same C2C12 cells for DNM2 and the GAPDH loading control. Below, DNM2 protein levels was determined by densitometry and standardized to GAPDH. $n = 3$ per each group. Data represent an average of three independent experiments \pm s.e.m. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ for ASO *Dnm2*-treated versus ASO ctrl-treated cells (ANOVA test). kDa, kilodalton; MW, molecular weight.

alteration in triad shape and orientation^{19–22}. In addition, their muscles display mislocalization of dihydropyridine receptor (DHPR) and Ryanodine receptor 1 (RYR1), two calcium channels that play an important role in excitation–contraction coupling, as well as Caveolin3 (CAV3) which is implicated in T-tubule biogenesis^{22,23}. We showed previously that Mtm1KO

mice display a higher DNM2 level in the symptomatic phase⁹. At 7 weeks of age, Mtm1KO mice TA injected with control ASO presented a higher expression of DNM2 compared to WT confirming an overexpression of DNM2 in the absence of MTM1 and suggesting that the increase in DNM2 is a cause of the disease (Fig. 2a). Treatment with the three ASO candidates reduced DNM2 levels in both WT and Mtm1KO TA. While Mtm1KO TA injected with control ASO were atrophic and displayed a very weak *in situ* muscular force, Mtm1KO TA with *Dnm2* knockdown were remarkably bigger (Fig. 2b,c) and displayed a significant increase in muscle force, which achieved normal levels for ASO #1 (Fig. 2d). Mtm1KO TA injected with control ASO exhibited the typical CNM histology with a predominance of small rounded fibres with mislocalized nuclei and abnormal mitochondrial distribution (Fig. 2e). These abnormal histological features were prevented in Mtm1KO TA injected with the different *Dnm2* ASOs, as reflected by a decrease in the number of fibres with mislocalized nuclei and a restoration of mitochondrial distribution and fibre size (Fig. 2e–g, Supplementary Fig. 1a–c). Altogether, these results suggest that intramuscular injections of ASOs reduce DNM2 levels and prevent myotubular myopathy in Mtm1KO mice.

ASO systemic injections knockdown DNM2 and prevent CNM.

To assess if systemic ASO delivery can prevent disease progression in this non-dystrophic myopathy and to correlate DNM2 levels with therapeutic effects, a systemic dose response study was performed. ASO#1 was selected due to the strong rescue effects observed when administrated locally into muscle: namely it had the best dose response (Fig. 1b,c) and increased muscle force to normal levels (Fig. 2d). Four escalating doses (3.125, 6.25, 12.5 or 25 mg kg⁻¹) of ASO#1 were administrated to WT or Mtm1KO mice by intraperitoneal (i.p.) injections once a week starting with mice at 3 weeks of age, and compared to littermates treated with 25 mg kg⁻¹ control ASO. Mtm1KO mice injected with control ASO presented a short lifespan due to the disease progression and died by about 8 weeks of age, while administration of ASO#1 prolonged the lifespan significantly and in a dose-dependent manner (Fig. 3a). All Mtm1KO mice injected with 12.5 or 25 mg kg⁻¹ survived until the end of the study at 12 weeks. Notably, administration of 6.25 and even 3.125 mg kg⁻¹ extended the lifespan of Mtm1KO with a survival rate of 83% and 37%, respectively. In addition, body weight of Mtm1KO mice with control ASO plateaued at 15 g while weekly systemic injections of 3.125 or 6.25 mg kg⁻¹ of *Dnm2* ASO improved body weight gain up to 18 g, and 25 mg kg⁻¹ ASO treatment was associated with a normal body weight at 12 weeks (Fig. 3b,c).

Two time points were further evaluated following systemic ASO treatment, at week 7 when some Mtm1KO mice injected with control ASO were still alive, albeit severely affected, and at week 12 to further assess the phenotypes of Mtm1KO with a prolonged lifespan. At week 7, Mtm1KO mice treated with control ASO were severely affected (Supplementary Movie 1) and presented hypotrophic TA and gastrocnemius (gast.) muscles (Fig. 4a). Injections with 12.5 or 25 mg kg⁻¹ doses of *Dnm2* ASO greatly improved TA and gast. muscle weight. *In situ* TA muscle force was not rescued with 3.125 and 6.25 mg kg⁻¹ doses but was improved with higher doses, reaching normal levels with 25 mg kg⁻¹ ASO (Fig. 4b). In addition, while 3.125 mg kg⁻¹ ASO treatment did not improve fibre hypotrophy, nuclei positioning, or muscle histology relative to Mtm1KO injected with control ASO, 25 mg kg⁻¹ ASO treatment resulted in a decrease number in fibres with mislocalized nuclei and a strong increase in fibre size and triad ratio (Fig. 4c–e, Supplementary Fig. 2a,b). Mtm1KO injected with control ASO or lower ASO#1 doses exhibited abnormal distribution of

mitochondria oxidative activity; however 25 mg kg⁻¹ ASO treated Mtm1KO mice presented an amelioration but not a normalization in SDH staining distribution, suggesting that the rescue was not complete at this early stage for this phenotype.

By 12 weeks, all Mtm1KO injected with control ASO died and a dose response correlation in the phenotype rescue was observed with ASO#1 (Fig. 3a–c). Mtm1KO mice injected with 3.125 mg kg⁻¹ were significantly affected at 11 weeks of age and could not perform the clinical tests such as hanging, grip, string and rotarod tests (Supplementary Fig. 3). Altogether, this low dose did not produce significant clinical and histological improvements; however the partially extended lifespan supports a partial rescuing effect. A significant improvement in performance was observed with 6.25 and 12.5 mg kg⁻¹ doses. Noteworthy, the highest dose tested greatly improved the ability of Mtm1KO mice to perform comparable to WT in hanging, grip, string and rotarod tests (Supplementary Movie 2, Supplementary Fig. 3), indicating that a dose of 25 mg kg⁻¹ rescues the whole-body strength. At 12 weeks, this highest dose correlated with a normal specific muscle force and close to normal TA and gast. weight (Fig. 5a,b), muscle histology (with only 4% of fibres with mislocalized nuclei), mitochondria distribution and muscle ultrastructure including rescued triad shape and ratio (Fig. 5c–e, Supplementary Fig. 2c,d). These findings were confirmed by immunolabeling of transversal or longitudinal sections of TA with antibodies against CAV3, DHPR and RYR1. Indeed, myofibers from Mtm1KO mice treated with ASO control presented aggregated or perturbed localization of CAV3, RYR1 and DHPR, while Mtm1KO treated with 25 mg kg⁻¹ ASO#1 exhibited a normal localization of RYR1 and DHPR with partial decrease of CAV3 aggregates at both 7 and 12 weeks (Supplementary Fig. 4a). ASO#1 injection and DNM2 decrease did not significantly impact on the level of RYR1 nor DHPR (Supplementary Fig. 4b–d). Overall, these results demonstrate that weekly 25 mg kg⁻¹ ASO systemic delivery to Mtm1KO mice at early disease phase efficiently prevents myopathy progression by rescuing both lifespan and body weight, and correcting muscular mass, force and histology.

In addition to the rescue of locomotor muscles, 25 mg kg⁻¹ ASO#1 treatment ameliorated greatly the diaphragm muscle histology. At 7 weeks, Mtm1KO mice treated with ASO control presented a very thin diaphragm with mislocalized RYR1 and DHPR proteins as well as disorganized sarcomere ultrastructure (Fig. 6). These features were restored in Mtm1KO treated with ASO#1 at 25 mg kg⁻¹ at both 7 and 12 weeks. Transversal diaphragm sections presented an increase in muscle thickness due to increase of fibre area and layers composing this muscle, equivalent to WT control mice (Fig. 6a,b). This morphological improvement was accompanied with a normal localization of RYR1 and DHPR within the myofiber as well as sarcomere organization and triad formation that were comparable to WT diaphragms (Fig. 6a). These findings support the clinical improvements of respiratory function and lifespan extension that were observed in Mtm1KO mice treated with 25 mg kg⁻¹ of ASO#1.

A dose response correlation was noted for the different muscle phenotypes analysed at both ages. This phenotypic amelioration correlated with DNM2 protein levels, while the lower 3.125 mg kg⁻¹ dose did not lead to a significant DNM2 decrease (Fig. 7a,b). Furthermore, a decrease in DNM2 levels by ~50% (obtained with 25 mg kg⁻¹) is sufficient to achieve disease prevention in Mtm1KO mice, with no impact on lifespan and body weight, muscle force, mass and histology of WT mice (Figs 3–6, and 7a,b, Supplementary Figs 2–4). Interestingly, DNM2 reduction can be achieved after 1 week and maintained at least 2 weeks after a single injection of 25 mg kg⁻¹ of ASO#1 in WT mice

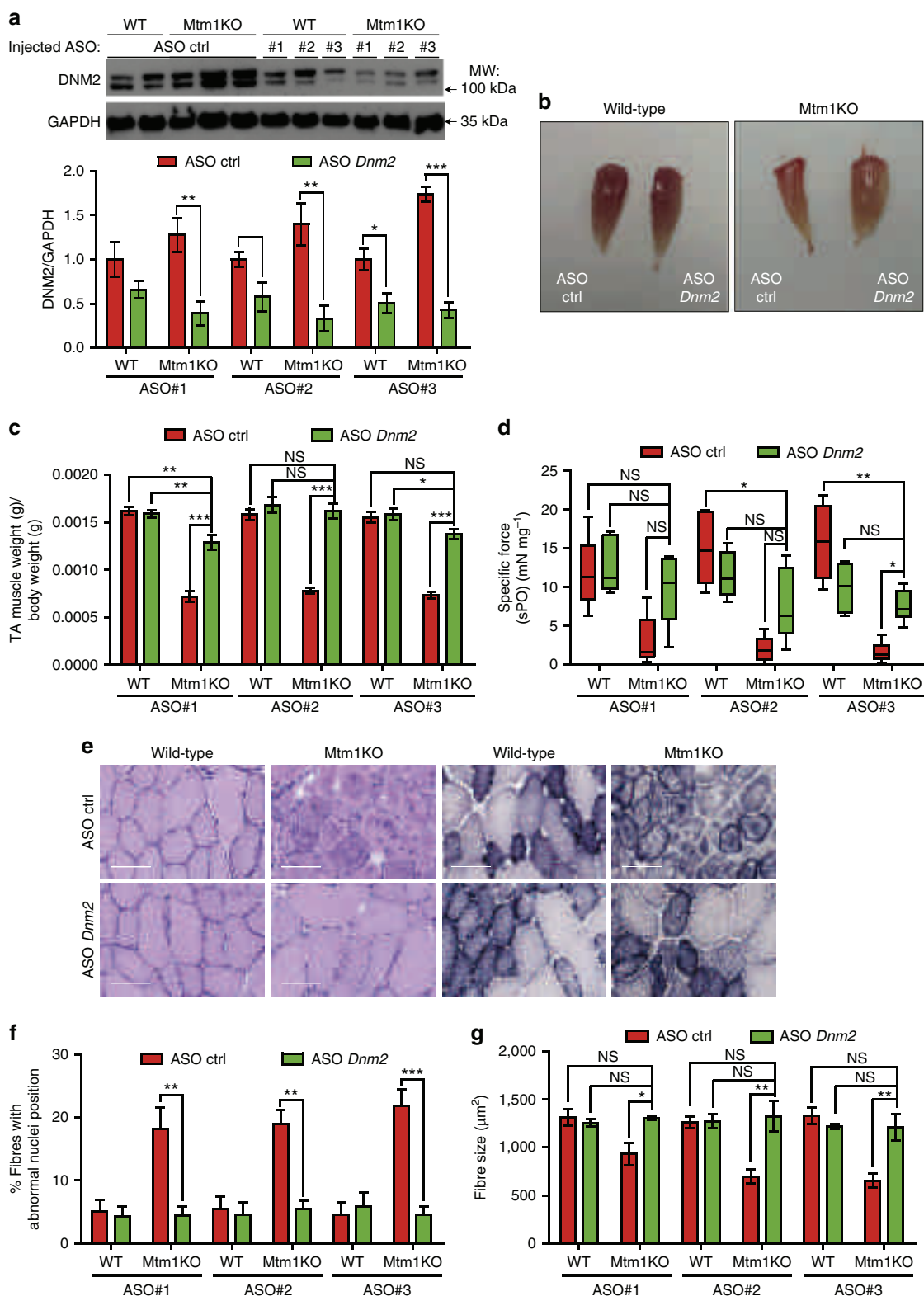


Figure 2 | In vivo validation of ASOs targeting *Dnm2* following intramuscular injection. (a) Representative western blot of 7-week-old WT or Mtm1KO TA muscles injected with 20 μ g of ASO control (ctrl), #1, #2 or #3. DNM2 is present as two bands in muscle tissue. DNM2 densitometries were quantified below and standardized to the loading control GAPDH ($n=5-7$ mice per group). (b) Photography of TA muscles from WT or Mtm1KO mice treated with ASO ctrl or ASO *Dnm2* #1. (c) TA muscle weight relative to body weight ($n=8$). (d) Specific muscle force of the TA ($n=5-6$ mice per group). (e) TA muscle sections were stained with H&E (left) to visualize nuclei positioning or with SDH (right) for mitochondria oxidative activity distribution. Scale bars, 50 μ m. (f) Percentage of fibres with mislocalized nuclei ($n=4-6$ mice per group). (g) Fibre area was determined in 600-1,000 fibres per sample ($n=5$ mice per group). Data represent means \pm s.e.m. NS, not statistically significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for TA treated with ASO *Dnm2* versus TA treated with ASO ctrl (ANOVA test). kDa, kilodalton; MW, molecular weight.

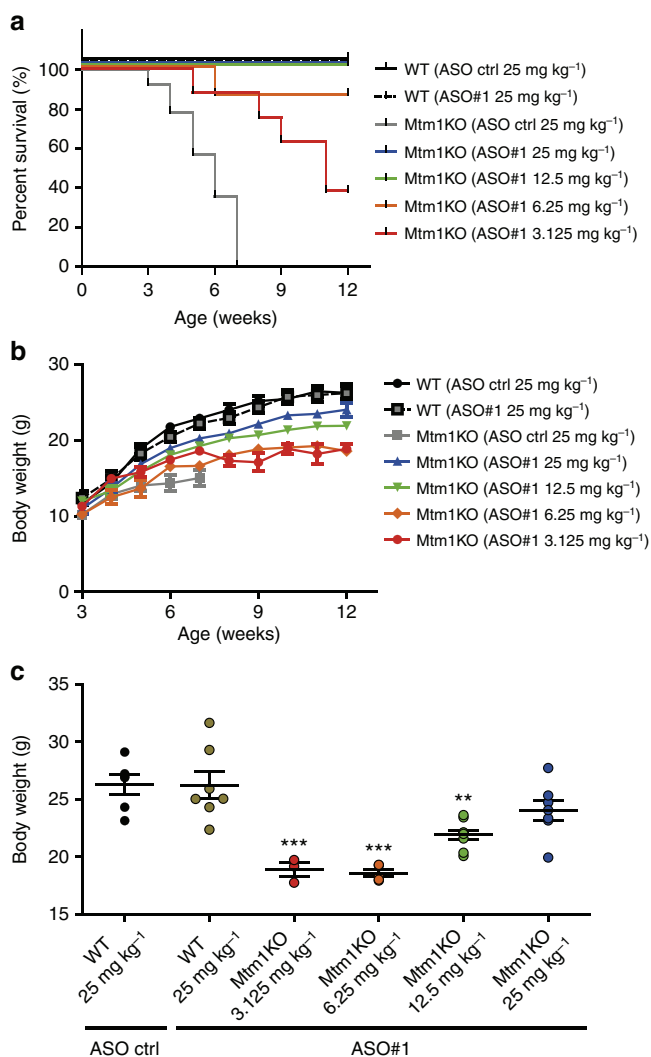


Figure 3 | Dose-response effect of ASO-Dnm2 systemic injections. Representation of survival percentage (a) and whole-body weight evolution (b) of WT injected with 25 mg kg⁻¹ ASO control (ctrl) or ASO#1, or Mtm1KO injected with 25 mg kg⁻¹ ASO ctrl or different doses of ASO#1. (n = 7 mice per group at week 3). (c) Dots represent individual body weight of ASO-treated WT or Mtm1KO mice at week 12 (sacrifice day). n = 5–7 mice per group except for Mtm1KO treated with 3.125 mg kg⁻¹ where n = 3. **P < 0.01, ***P < 0.001 for mice treated with ASO#1 versus WT treated with ASO control (ANOVA test followed by *post hoc* Bonferroni).

(Supplementary Fig. 5), suggesting that the applied injection protocol could be ameliorated by decreasing the frequency of the ASO administration and consequently decrease any potential toxicity relative to chronic exposure to ASO. Long-term ASO treatment of certain bicyclic nucleic acids, such as LNAs, have been reported to have an increased risk of liver or kidney toxicity^{24–27}. Analysis of histology of Mtm1KO mice weekly injected with 25 mg kg⁻¹ ASO for 10 weeks revealed no effects in kidney and liver. Few hepatocytes with condensed nuclei of unknown significance were seen in liver of WT mice only, treated with ASO#1 25 mg kg⁻¹. No effect was seen in both Mtm1KO and WT mice on serum biochemical markers of liver and kidney (including aspartate aminotransferase (ASAT), alanine aminotransferase (ALAT), creatinine, urea) (Supplementary Fig. 6). Characterization of ASO distribution in muscles of systemically treated mice demonstrated dose-dependent accumulation of ASO in muscles, supporting the conclusion that ASO

efficiently distributes to non-dystrophic muscles (Fig. 7c,d). Unexpectedly, we observed significantly higher distribution of both control ASO and ASO#1 in muscles from the Mtm1KO mice compared to WT, suggesting a selective advantage for ASO-based therapy in this non-dystrophic myopathy. Potentially this observation suggests that lack of MTM1 may increase ASO uptake or decrease ASO degradation in muscle, and that this phenomenon is not reversed upon DNM2 downregulation.

Previous studies revealed abnormalities of neuromuscular junction (NMJ) in a zebrafish model²⁸ of XLCNM and Mtm1KO mice²⁹ with enlarged NMJ area. Using a fluorescently labelled bungarotoxin, Acetylcholine nicotinic receptors were labelled to visualize the NMJ of ASO-treated mice. Analysis of the NMJ area revealed that Mtm1KO treated with 25 mg kg⁻¹ of either ASO control or ASO#1 similarly exhibited larger NMJ's compared to age-matched WT at both 7 and 12 weeks (Supplementary Fig. 7a,b). Sciatic nerve transversal sections myelination of Mtm1KO appeared normal (Supplementary Fig. 7c). These findings indicate that systemic reduction of DNM2 rescues the CNM phenotype with normal muscle structure and function despite NMJ phenotype persistence, suggesting this NMJ histological phenotype does not have a strong impact on the disease.

Dnm2 ASO reverts CNM phenotypes in affected Mtm1KO mice.

We next investigated whether ASO systemic delivery can revert CNM features after disease onset. To determine the features that could be reverted, we established a disease severity scoring system (DSS) encompassing six features: body weight difference between Mtm1KO and WT littermates, ability to perform the hanging test, positioning of hindlimbs when walking, ptosis, kyphosis severity, and breathing alteration based on clinical observations (Fig. 8a, Supplementary Table 2). A higher DSS score indicates a more severe phenotype. A large cohort of Mtm1KO mice was followed over time with phenotype progression reaching a mean DSS of 3 at week 5. We therefore selected this age to see if Dnm2 ASO could revert the disease phenotype. We began to inject 25 mg kg⁻¹ ASO#1 once a week. One week later, half of the injected Mtm1KO mice had died, while the other half survived until the end of the study at 12 weeks (Fig. 8b). Retrospectively, the average DSS at week 5 was above 4 for non-rescued mice and 2.5 for the group of rescued mice, suggesting mice that could not be rescued after a single injection were in general more severely affected with more pronounced kyphosis, ptosis and paralysis; however no specific phenotype was predictive of the survival (Fig. 8c,d). After only one injection, surviving Mtm1KO mice presented a stabilization of their phenotype, and were rescued two weeks after commencement of treatment (Fig. 8c,e,f). The DSS dropped from 2.5 at week 5 to 1 at week 7 (Fig. 8c), indicating a rescue of all clinical features of disease, except for a difference in body weight which persisted until 12 weeks of age (maximum age investigated in this study) (Fig. 8c–e, Supplementary Movie 3). These surviving mice were able to perform hanging, rotarod, string and grip tests at WT levels (Fig. 8f–i). By 12 weeks, they presented a lower muscle mass and force compared to WT (Fig. 9a,b), however, TA muscle fibres had a low number of mislocalized nuclei (≈6%, compared to 27% in 7-week old untreated mice), almost normal fibre size, improvement in mitochondrial distribution and localization and structure of triads (Fig. 9c–g). Delivery of 25 mg kg⁻¹ of ASO#1 from 5 weeks of age reduced DNM2 to normal levels (Fig. 9h). Taken together, these results show that post-symptomatic ASO treatment quickly reverts almost all CNM phenotypes within 2 weeks, with disease amelioration after a single injection.

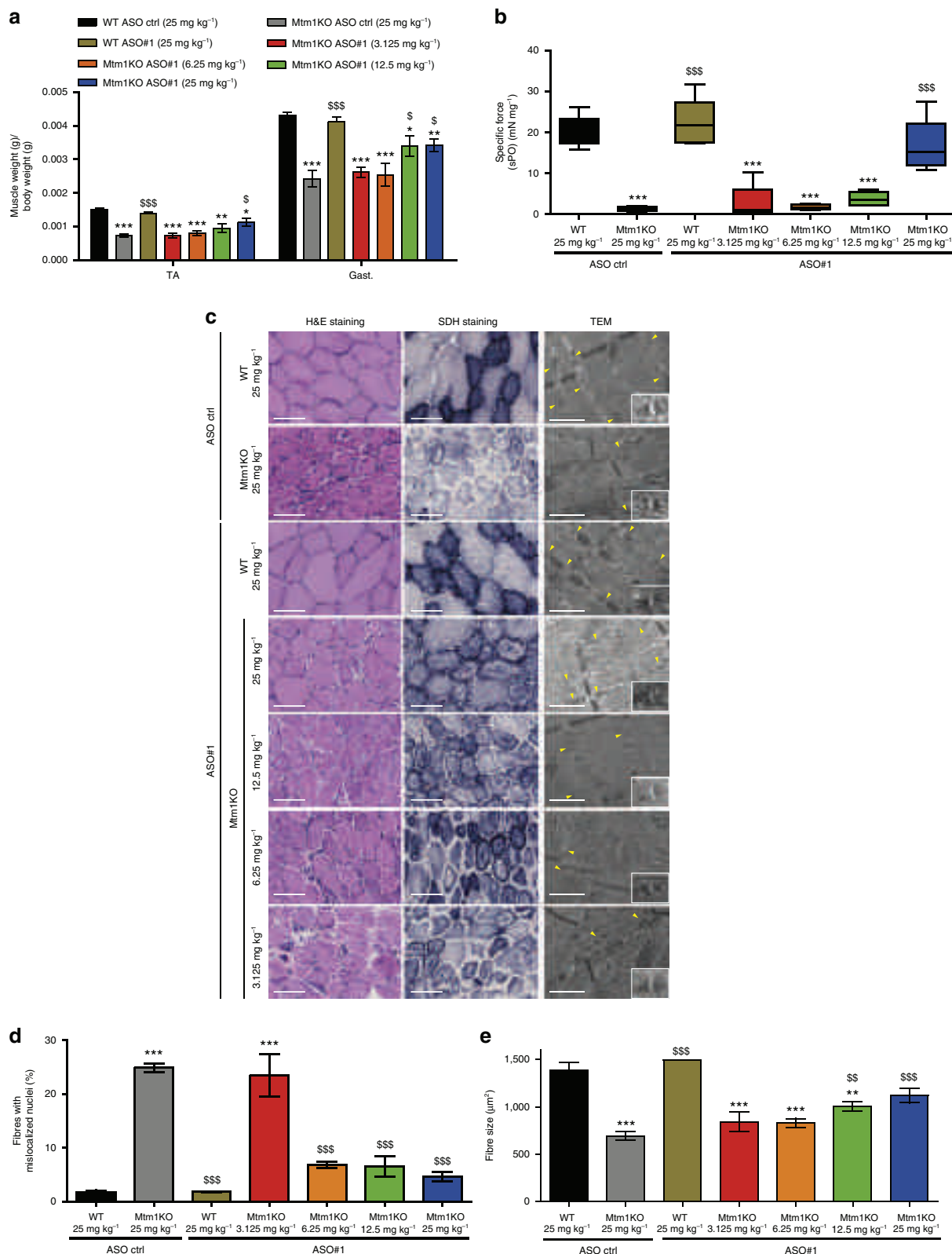


Figure 4 | Physiological effects of ASO-Dnm2 systemic injections at 7 weeks of age. (a) Following 5-weekly injections of ASO, mice were killed and TA and gast. muscles were weighed ($n = 5-7$ mice per group). (b) TA specific muscle force was measured after sciatic nerve stimulation. The specific muscle force was calculated by dividing the absolute force by the TA weight ($n = 5-7$ mice per group). (c) TA muscle sections were stained for H&E or SDH. Sarcomere and triads (yellow arrows) ultrastructure was assessed by TEM. Scale bars: 50 μm (H&E and SDH) or 500 nm (TEM) images. (d) Percentage of fibres with mislocalized nuclei was determined in 1,000 fibres ($n = 5-6$ mice per group). (e) TA muscle fibre area was calculated on 300-600 fibres per sample ($n = 5$ mice per group). Data represent mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for mice treated with ASO *Dnm2* versus WT treated with ASO ctrl. $\$P < 0.05$, $\$\$P < 0.01$, $\$\$\$P < 0.001$ for mice treated with ASO *Dnm2* versus Mtm1KO treated with ASO ctrl (two-way ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni).

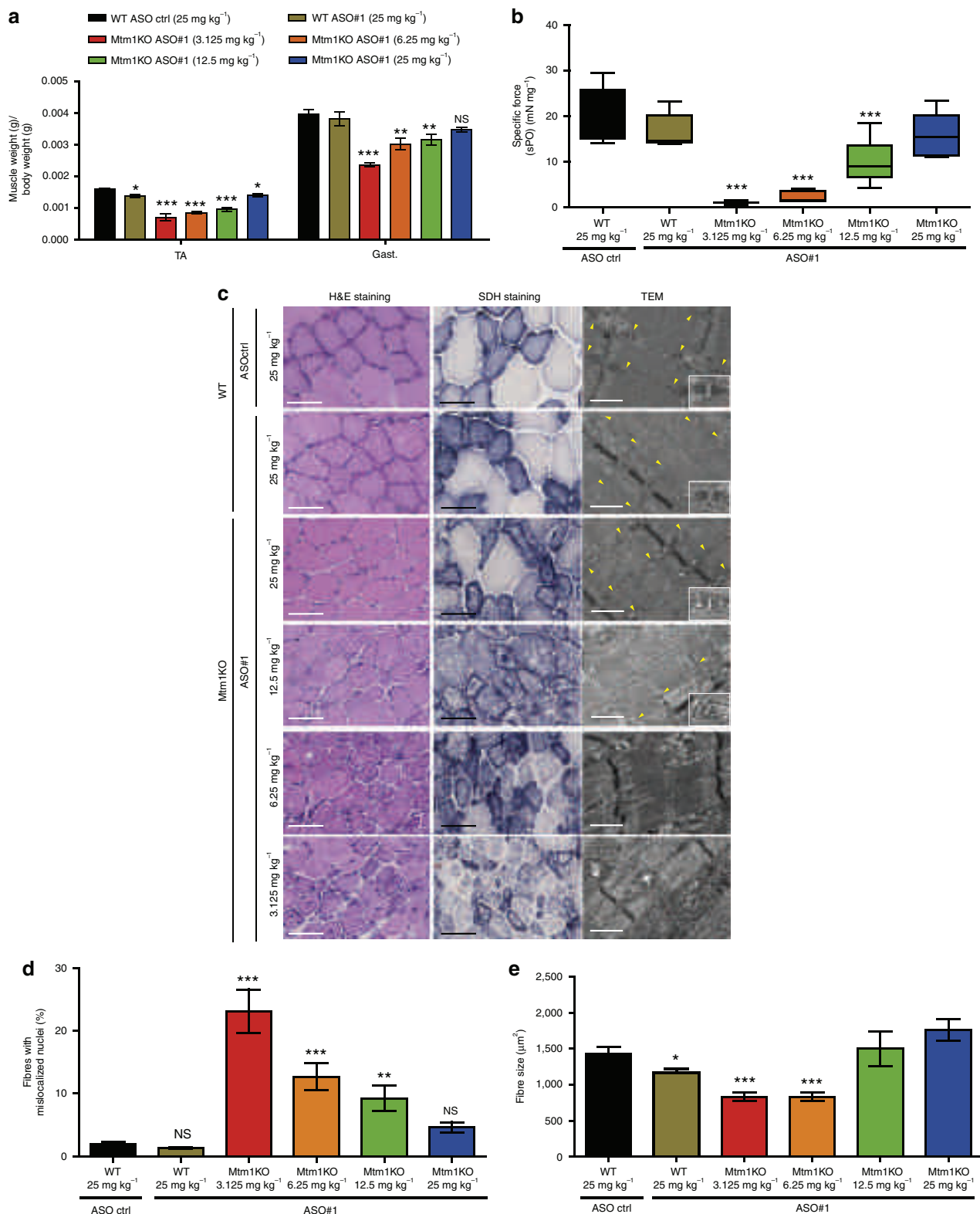


Figure 5 | Physiological effects of ASO-Dnm2 systemic injections at 12 weeks of age. (a) TA and gast. muscle weights from these mice were measured and the ratio relative to the body weight was represented. (b) The TA *in situ* muscle force was measured after sciatic nerve stimulation. The specific muscle force was calculated by dividing the absolute force by the TA weight. (c) TA muscle transversal sections stained with H&E (left panel) and SDH (middle panel) at 12 weeks (10 weeks of treatment). Sarcomere and triads (yellow arrows) ultrastructure assessed by TEM (right panel). Scale bars for H&E and SDH is 50 µm and 500 nm for TEM pictures. (d) The percentage of fibres with mislocalized nuclei was counted on 1,000 fibres per group. (e) TA muscle fibre area was calculated on 300–600 fibres per sample. For all tests cited above, $n = 5-7$ mice per group except for Mtm1KO treated with 3.125 mg kg⁻¹ where $n = 3$. Data represent means ± s.e.m. NS, no statistical significance, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ for mice treated with ASO#1 versus WT treated with ASO control (ctrl) (ANOVA test followed by *post hoc* Bonferroni).

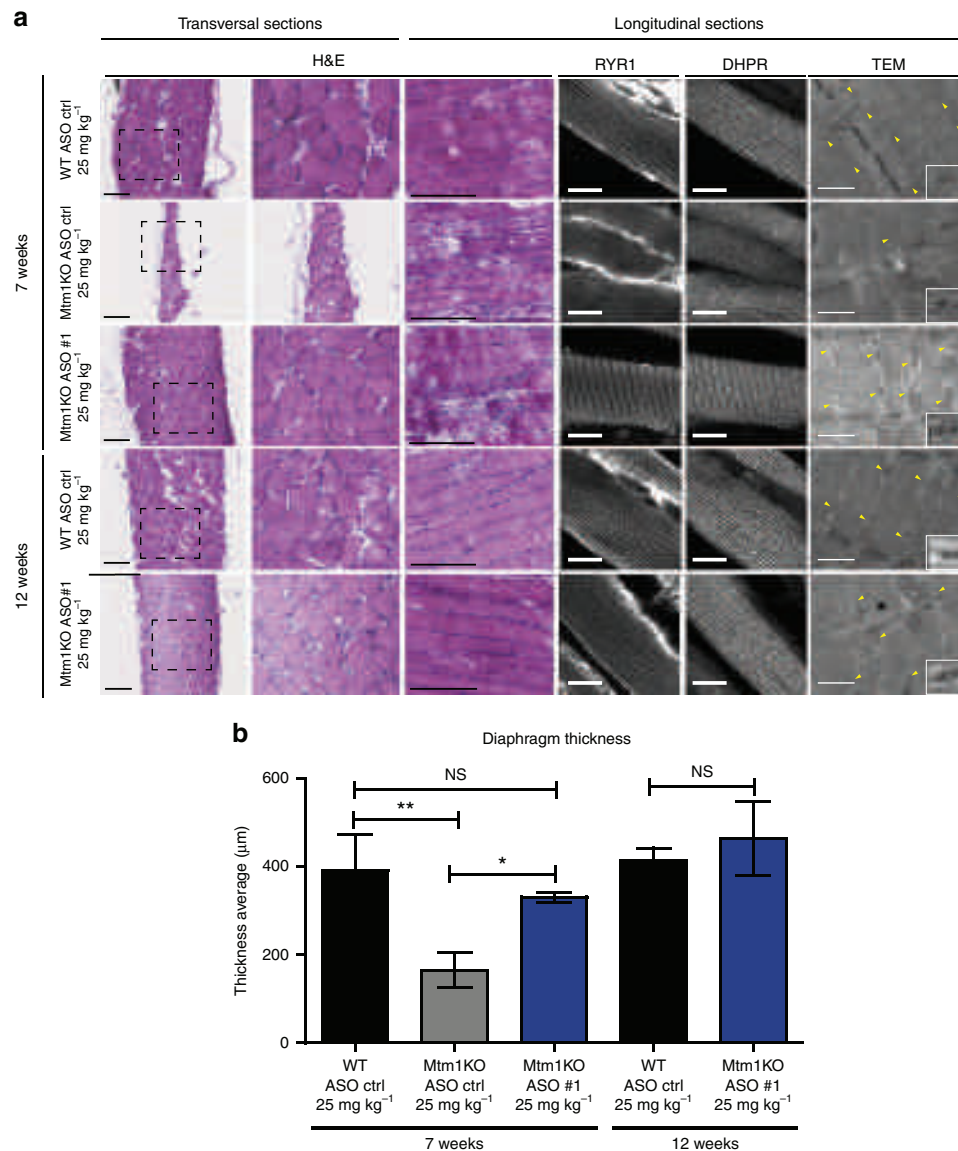


Figure 6 | Diaphragm histology and ultrastructure organization. (a) Hematoxylin and eosin (H&E) staining of cross or longitudinal diaphragm sections of WT or Mtm1KO mice treated with ASO control (ctrl) or ASO#1 at different ages (7 or 12 weeks). Scale bars, 100 μm . These longitudinal sections have been immunostained with antibodies against RYR1 and DHPR. Scale bars, 10 μm . The ultrastructure of diaphragm was analysed using electronic microscopy to assess the sarcomere organization and triad formation and shape (yellow arrows). Scale bars, 500 nm. (b) Graph depicting mean \pm s.e.m. of quantification of diaphragm transversal sections thickness. $n = 4\text{--}5$ samples. NS, not statistically significant, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (ANOVA test followed by *post hoc* Bonferroni).

Discussion

In this study we demonstrated that DNM2 knockdown, through ASO delivery, prevents myotubular myopathy in Mtm1KO mouse model by extending the lifespan and restoring muscle force, mass and histology in a dose-dependent manner. Weekly administration of 25 mg kg^{-1} at early disease stage rescues most myopathy features by 12 weeks. However, long-term effects of this approach are unknown. In addition, DNM2 is ubiquitously expressed and plays an important role in many cellular processes such as endocytosis, intracellular membrane trafficking and cytoskeleton organization³⁰. It is important to note that *Dnm2* heterozygous mice do not present any particular phenotype⁹. However, determination of side effects related to DNM2 reduction through ASO is needed to confirm the safety of this approach.

Furthermore, a single ASO administration into affected Mtm1KO mice stabilizes the CNM phenotype progression and quickly reverts it following the second injection. However, some

mice that exhibited a very severe phenotype with a higher DSS at the start of the injections were not able to be rescued. This observation suggests that disease reversion can be better obtained when ASO treatment is initiated at earlier disease stages. On the other hand, ASO activity to decrease DNM2 and reverse the phenotype appears to have a short delay as the disease can be stabilized one week after the first injection and significantly reversed after 2 weeks of treatment. Moreover, while DNM2 protein level is increased in the disease state, disease prevention with 12.5 mg kg^{-1} (Fig. 7b) and disease reversion with 25 mg kg^{-1} (Fig. 9h) both correlated with DNM2 level normalization, suggesting it is not necessary to decrease DNM2 below normal level to reach a benefit while minimizing the potential risk of DNM2 target reduction.

This study confirms the epistasis between *Mtm1* and *Dnm2* and the ‘cross-therapy’ rationale that targeting another myopathy gene (*DNM2*) than the one mutated in the disease (*MTM1*) can

efficiently re-balance muscle function. To date no direct link has been established between MTM1 and DNM2. MTM1 is involved in the regulation of the phosphoinositides phosphorylation and thus potentially in regulation of the physicochemical properties of intracellular membranes, while DNM2 plays an important role in

membrane remodelling. We hypothesize that in absence of MTM1, DNM2 level and activity should be normalized to maintain the cellular homeostasis.

This first pharmacological validation of DNM2 as a therapeutic target through ASO-mediated knockdown provides an attractive therapeutic strategy that may be applied to patients with this severe congenital myopathy. Nonetheless, these data were generated using ASOs against the murine DNM2 in the mouse model of XLCNM. Moving towards clinical trials will require the development of a potent human ASO compound with an acceptable safety profile. Identification and characterization of the human candidate including off-target analysis should be completed in human cells.

In conclusion, while various ASO chemistries may differ in their ability to achieve significant target reduction and disease rescue in skeletal muscle, our data reveal that the advanced cEt ASO chemistry used here appears promising for non-dystrophic muscle diseases.

Methods

Animals. Mtm1KO or WT 129SvPAS mice were generated by crossing *Mtm1* heterozygous females obtained by homologous recombination¹⁷ with WT males. Mice were handled according to the French and European legislation on animal care and experimentation. Protocols were approved by the institutional Ethics Committee. Protocols No.:Com`Eth IGBMC-ICS 2012-132, 2013-034 and 2016-5453 were granted to perform animal experiment. Mice were kept on 12 h day light and 12 h cycle and given free access to standard food. Lifespan and body weight were followed during this study. All mice analysed in this study were male.

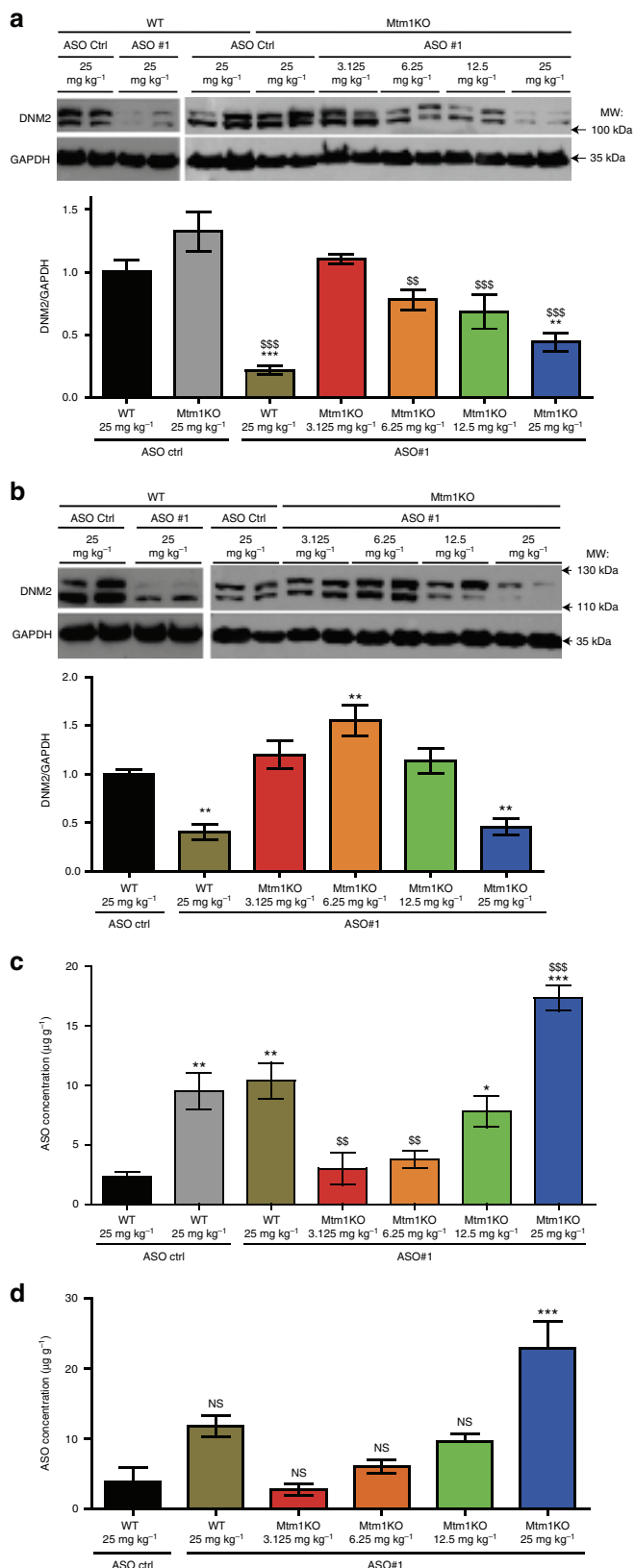
Antisense oligonucleotides. All ASO used in these studies were synthesized in IONIS Pharmaceuticals. They were 16 nucleotides in length and chemically modified with phosphorothioate in the backbone and cEt modifications on the wings with a deoxy gap (3-10-3 design). Oligonucleotides were synthesized using an Applied Biosystems 380B automated DNA synthesizer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences-Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts) and purified¹⁵. A total of 500 ASOs were prescreened in b.END cells. The three best ASO candidates that reduce *Dnm2* level have been selected. In addition, a random control ASO sequence was used as control. The sequence of each ASO is listed in Supplementary Table 1. The chemical structures in Supplementary Table 1 were drawn using ChemDraw software.

ASO quantification in muscle, liver and kidney. Samples and calibration standards were aliquoted into 96-well plates and internal standards were added. Aliquots in 96-well plates were extracted via a liquid-liquid extraction using ammonium hydroxide and phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1). The aqueous layer was further processed via solid phase extraction (Phenomenex Inc., Strata X SPE), dried under nitrogen and reconstituted in 120 µl of water containing 100 µM EDTA. Samples were injected into an Agilent 6460 Triple Quad LC/MS system for analysis. The calibration range for control ASO was 0.005–30 µM (0.027–163 µg g⁻¹) in 50 mg mouse liver homogenate; the calibration range for ASO#1 was 0.005–30 µM (0.028–165 µg g⁻¹) in 50 mg mouse liver homogenate.

Cell transfection. C2C12 mouse myoblasts were purchased from ECACC. They were electroporated with different concentrations of ASO using Amax-nucleofector2B Kit V and following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were trypsinized and 1 × 10⁶ cells per sample were gently centrifuged at 90 g for 10 min at room temperature. Cell pellet was resuspended in 100 µl of the solution provided in the kit. Then, 0.015, 0.06, 0.25 or 1 µM of ASO control, #1, #2 or #3

Figure 7 | DNM2 knockdown and ASO concentration in skeletal muscles.

(a,b) DNM2 and GAPDH (loading control) expression in TA muscles of ASO-treated WT or Mtm1KO mice at 7 weeks (a) (n = 6–7 mice per group) or at 12 weeks of age (b) (n = 5–7 mice per group except for Mtm1KO treated with 3.125 mg per kg where n = 3). (c,d) ASO concentration was determined in gast. muscle of 7- (c) or 12- (d) week-old mice using mass spectrometry and normalized to muscle weight (n = 4 mice per group). Data represent mean ± s.e.m. NS, not statistically significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 for mice treated with ASO *Dnm2* versus WT treated with ASO ctrl. \$\$\$P < 0.01, \$\$\$\$P < 0.001 for mice treated with ASO *Dnm2* versus Mtm1KO mice treated with ASO ctrl (two-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni). kDa, kilodalton; MW, molecular weight.



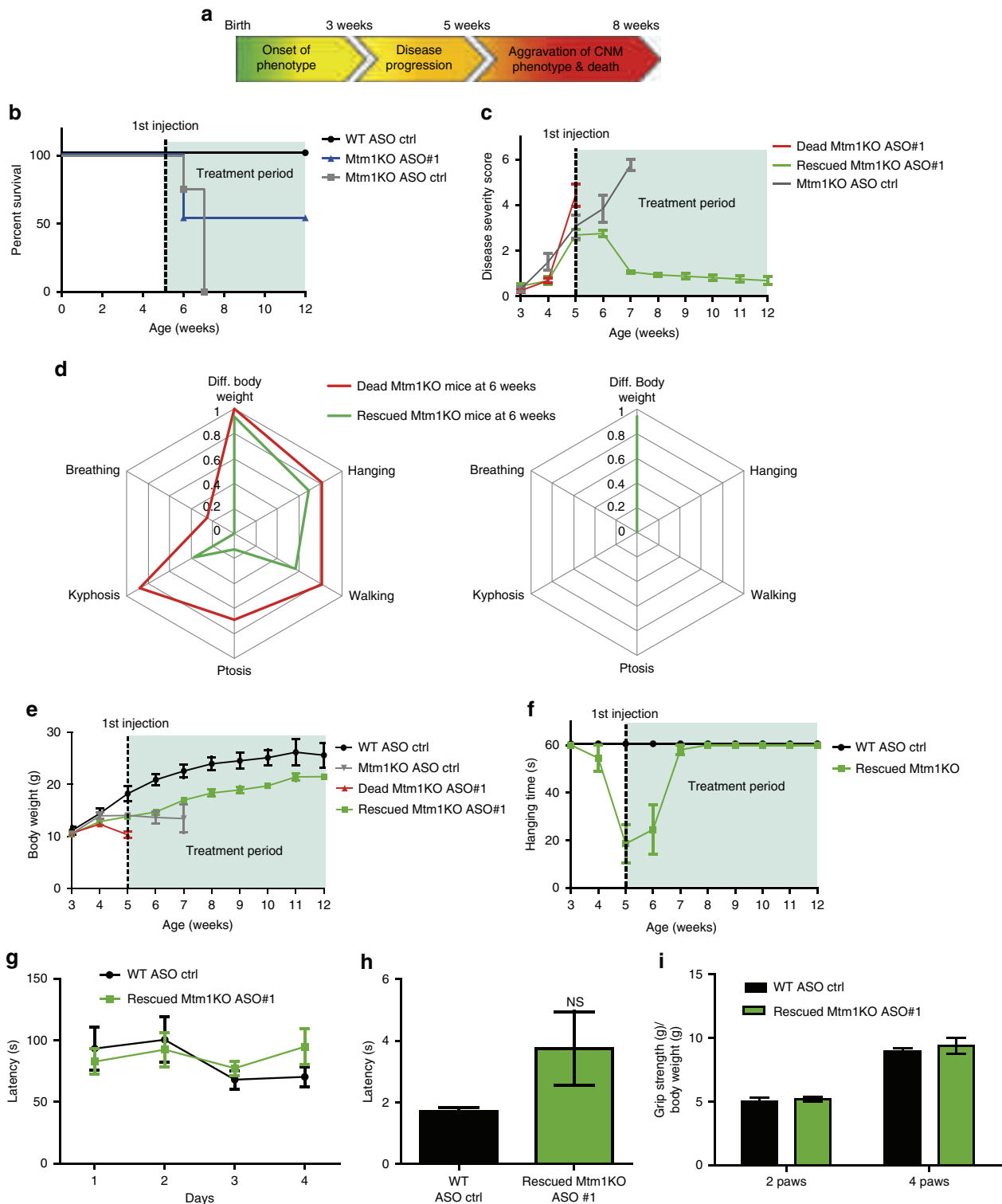


Figure 8 | ASO-*Dnm2* systemic injections revert installed muscle defects in Mtm1KO mice. (a) Chronology of CNM phenotype onset and evolution in Mtm1KO mice. (b) Survival of WT ($n = 5$) or Mtm1KO ($n = 16$) mice upon ASO treatment started at 5 weeks. (c) Disease severity score (DSS) evolution of Mtm1KO mice that died during the first week of treatment or have been rescued after ASO treatment started at week 5. (d) Radar chart representing average values of the six main CNM features in Mtm1KO mice at 5 weeks old (before ASO treatment, left panel) and their evolution at week 12 (after 8 injections, right panel). (e) Body weight evolution of WT treated with ASO control ($n = 5$), Mtm1KO mice treated with ASO control ($n = 8$) or ASO#1 ($n = 8$ for dead or rescued Mtm1KO groups). (f) Hanging test performance of WT ($n = 5$) or Mtm1KO ($n = 8$) rescued by ASO treatment. (g–i) Clinical tests done at 11 weeks of age, WT or Mtm1KO mice underwent different clinical tests to assess whole body strength, fine motor coordination, balance and resistance to fatigue using rotarod (g), string test (h) and grip test (i). NS, not statistically significant (t -test).

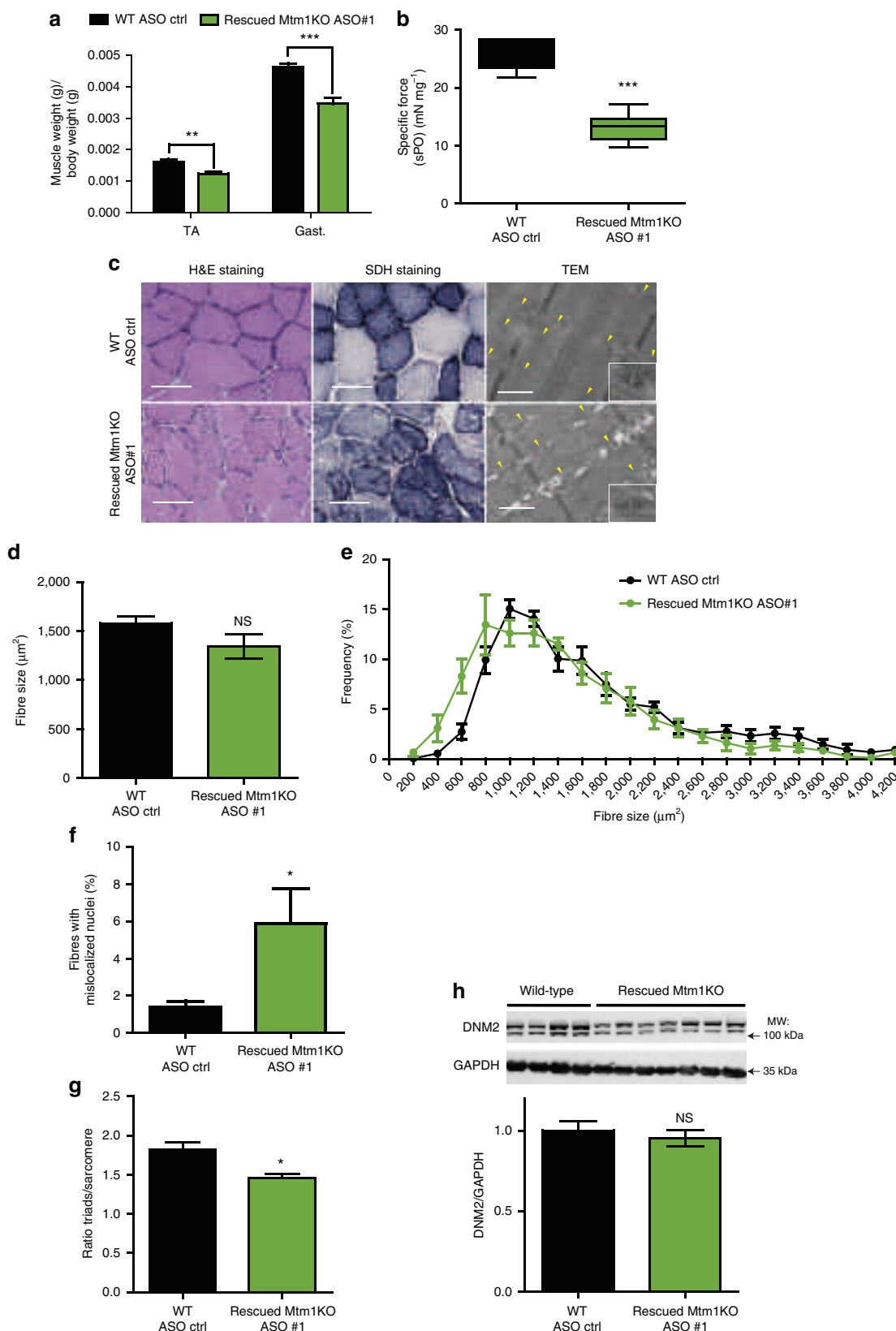


Figure 9 | Physiological improvements of CNM phenotype in severely affected Mtm1KO mice. (a) TA and gast. muscles weight and (b) *in situ* specific muscle force at week 12 and following 8 weeks of ASO treatment. (c) TA muscle sections were stained with H&E or SDH. Scale bar, 50 µm for histology and 500 nm for TEM. Yellow arrows point to organized triads. (d) Fibre size average was quantified in 400–600 fibres (n = 5). (e) TA muscle fibre area distribution of Mtm1KO mice injected with ASO#1 versus WT injected with ASO control (n = 5). (f) Fibres with abnormal position of nuclei (n = 5). (g) Ratio of triads per sarcomere. (h) DNM2 and GAPDH (loading control) protein levels were measured in TA muscles by western blot. Data represent means ± s.e.m. NS, not statistically significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (t-test). kDa, kilodalton; MW, molecular weight.

was added to the cell suspension and transferred immediately to an electroporation cuvette. Electroporation was performed using the B-032 programme of Nucleofector I Device. The electroporated cells were incubated overnight in DMEM medium containing 20% FCS at 37 °C, before collecting of the cells for RNA and protein analysis.

ASO intramuscular injections. Right TA muscles of Mtm1KO or WT mice were injected with 20 µg ASO *Dnm2*, while contralateral TA were injected with 20 µg of ASO control. Mice were injected from week 3 to week 7 of age under isoflurane anaesthesia and were killed 2 days after the last injection.

Intraperitoneal injection. All ASO were dissolved in filtered and autoclaved sterile PBS. Doses of 3.125, 6.25, 12.5 or 25 mg kg⁻¹ were injected by i.p. once a week into WT or Mtm1KO. Mice were killed 2 days after the last injection for analysis.

Clinical tests. Grip test. Mice were placed on the wire grid of the grip-strength apparatus which was connected to an isometric force transducer (dynamometer). They were lifted by the tail so that their all paws grasp the grid and they were gently pulled backward by the tail until they release the grid. The maximal force exerted by the mouse before losing grip was recorded. The mean of three measurements for each animal was calculated. Results are represented relative to whole body weight.

String test. Mice were placed on a wire held under high tension between two vertical supports and elevated 40 cm from the flat surface. The latency of a mouse to lift and grab the string with hind limbs was measured for each mouse over three trials with inter-trial intervals of 5 min between each trial.

Whole body hanging test. Mice were placed on a grid (cage lid) then turned upside down; the suspending animal should hold on to the grid to avoid falling. The latency to fall was measured three times for each mouse. The three trials were taken at ten minute intervals to allow a recovery period. The latency time measurements began from the point when the mouse was hanging free on the wire and ended with the animal falling to the cage underneath the wire or grid. The maximum time measured was 60 s. For all physiological tests described above, two trials were done to familiarize the mouse with the testing conditions. The data were expressed as an average of three trials.

Rotarod test. Motor coordination, balance and resistance to fatigue were assessed with a rotarod apparatus. At day 0, mice were trained to walk against the motion of a rotating drum. First, a training session of 5 min was done at a constant speed (4 r.p.m.; rotation per minute) followed by three trials at an accelerating speed. The following days, mice were tested three times at an accelerating speed (from 0 to 40 r.p.m. over 5 min). The mean latency to fall off the rotarod was recorded. The test was repeated three times for four consecutive days (day 1–4).

TA muscle contractile properties. TA muscle contraction properties were evaluated *in situ* after sciatic nerve stimulation using Aurora scientific force transducer. Briefly, mice were anaesthetised with i.p. injection of pentobarbital (60 mg kg⁻¹). The distal tendon of TA muscle was detached and tied to the isometric transducer. The absolute maximal force was measured after stimulation of the sciatic nerve by pulses of 50–150 Hz. The specific maximal force was determined by dividing the absolute muscle force on the TA muscle weight.

Tissue collection. Mice were killed by cervical dislocation after carbon dioxide (CO₂) suffocation. The TA and gast. muscles were dissected and weighed. They were snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at –80 °C for H&E and SDH histology analysis. For immunostaining, TA and diaphragm muscles were stored in PFA 4% for 24 h, then they were transferred to sucrose 30% overnight and stored at 4 °C. Liver and kidney were collected and stored in 4% PFA for 24 h then in 70% ethanol for histological analysis. Diaphragms were embedded in optimal cutting temperature compound. For transmission electron microscopy (TEM) analysis and toluidine blue staining, TA and non stimulated sciatic nerves were dissected and fixed in 4% PFA and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M.

Disease severity scoring system. A scoring system was set up to evaluate the clinical evolution of six CNM features. Difference of body weight versus WT littermate, ability to perform the hanging test, walking manner, presence or absence of ptosis and kyphosis and breathing difficulties (frequency and amplitude evaluation based on clinical observations) have been followed every week (before and after ASO treatment) and a score of 0, 0.5 or 1 was given to each clinical readout. The sum represents the DSS. The higher the DSS, the more severe the phenotype, minimum 0 (healthy mouse), maximum 6 (severely affected mouse).

Transmission electron microscopy. TEM was carried out on TA muscles stored in 2.5% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde and 50 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). Sections (70 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined by TEM (Morgagni 268D, FEI). The ratio of triads to sarcomere was calculated by dividing the number of triads identified by the number of sarcomeres present in the field.

Histological staining. Transversal or longitudinal cryosections (8 µm) of TA and diaphragm or 5 µm from paraffin-embedded liver or kidney were prepared, fixed and stained by Haematoxylin and Eosin (H&E) or succinate dehydrogenase (SDH). Sections were imaged with the Hamamatsu NanoZoomer 2HT slide-scanner. The percentage of TA muscle fibres with centralized or internalized nuclei was counted using the cell counter plugin in Fiji image analysis software. The fibre area was measured using the Fiji software.

TA and diaphragm immunostaining. Transversal or longitudinal cryosections (8 µm) of TA and diaphragm were stained with antibodies against CAV3 (Santa Cruz N-18 sc-7665; 1:500), RYR1 (34C abcam2668; 1:500), DHPR 1 A (abcam2862; 1:500) or BiotiumCF488A α-bungarotoxin (1:1,000). Images were taken in the same Leica SP8-UV confocal microscope. NMJ area was measured using Fiji software.

RNA extraction and qRT-PCR. Total RNA was isolated from electroporated cells or muscle tissue using TRIzol reagent according to the manufacturer's instruction (Invitrogen, UK). RT-PCR was carried out on 1–1.5 µg aliquot using SuperscriptII Reverse Transcriptase (ThermoFischer Scientific). qRT-PCR was performed in Lightcycler 480 (Roche) using: *Dnm2* (F): CCAACAAAGGCATCTCCCCCT, *Dnm2*(R):TGGTGAGTAGACCCGAAGGT, *Hprt*(F): GTAATGATCAGT-CAACGGGGGAC and *Hprt* (R): CCAGCAAGCTGCAACCTTAACCA mixed in SybrGreen (Qiagen).

Protein extraction and western blot. TA muscle cryosections, C2C12 cells, liver or kidney samples were lysed in RIPA buffer supplemented with PMSF 1 mM and complete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostic). Protein concentrations were determined with the BIO-RAD Protein Assay Kit. Samples were denatured at 95 °C for 5 min. Then 20 µg of protein was loaded in buffer containing 50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, separated in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis electrophoretic gel and transferred on nitrocellulose membrane for 1.5 h at 200 mA. Membranes were blocked for 2 h in TBS containing 5% non-fat dry milk and 0.1% Tween20 before an incubation for 2 h with primary rabbit polyclonal antibodies against DNM2 2865 (1:500), mouse antibody against RYR1 (34C abcam2668; 1:500), mouse antibody against DHPR 1A (abcam2862; 1:500), homemade mouse antibody against BETA TUBULIN (1:1,000) and mouse antibody against GAPDH (1:100,000) diluted in blocking buffer containing 5% milk. Secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were goat anti-rabbit (for DNM2) (1:10,000) or goat anti-mouse (for RYR1, DHPR, BETA TUBULIN and GAPDH) (1:10,000) and were incubated overnight. Nitrocellulose membranes were visualized in Amersham Imager 600. Full blots of all western blots are presented in Supplementary Fig. 8.

Blood sample collection and biochemistry analysis. Blood samples were collected by cardiac puncture from anaesthetised mice. ASAT, ALAT, urea and creatinine levels were determined using an Olympus analyzer with kits and controls supplied by Olympus or other suppliers.

Statistical analysis. All data are expressed as mean ± s.e.m. Graphs and curves were made using GraphPad Prism software. Difference between two groups was analysed by *t*-test. For comparison between three groups, two-way ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni was used.

Data availability. All relevant data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

References

- Arechavala-Gomez, V. *et al.* Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges. *Curr. Gene Ther.* **12**, 152–160 (2012).
- Benchaoui, R. *et al.* Gene and splicing therapies for neuromuscular diseases. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **20**, 1190–1233 (2015).
- Wheeler, T. M. *et al.* Targeting nuclear RNA for *in vivo* correction of myotonic dystrophy. *Nature* **488**, 111–115 (2012).
- Finkel, R. S. *et al.* Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* **388**, 3017–3026 (2016).
- Ravenscroft, G. *et al.* Pathophysiological concepts in the congenital myopathies: blurring the boundaries, sharpening the focus. *Brain* **138**, 246–268 (2015).
- Jungbluth, H. *et al.* Centronuclear (myotubular) myopathy. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 26 (2008).
- Spiro, A. J. *et al.* Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy. *Arch. Neurol.* **14**, 1–14 (1966).
- Laporte, J. *et al.* A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast. *Nat. Genet.* **13**, 175–182 (1996).

9. Cowling, B. S. *et al.* Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* **124**, 1350–1363 (2014).
10. Cowling, B. S. *et al.* Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am. J. Pathol.* **178**, 2224–2235 (2011).
11. Liu, N. *et al.* Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* **121**, 3258–3268 (2011).
12. Bitoun, M. *et al.* Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* **37**, 1207–1209 (2005).
13. Wang, L. *et al.* Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers. *J. Biol. Chem.* **285**, 22753–22757 (2010).
14. Kenniston, J. A. *et al.* Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J.* **29**, 3054–3067 (2010).
15. Seth, P. P. *et al.* Design, synthesis and evaluation of constrained methoxyethyl (cMOE) and constrained ethyl (cEt) nucleoside analogs. *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf.)* **52**, 553–554 (2008).
16. Pallan, P. S. *et al.* Structure and nuclease resistance of 2',4'-constrained 2'-O-methoxyethyl (cMOE) and 2'-O-ethyl (cEt) modified DNAs. *Chem. Commun.* **48**, 8195–8197 (2012).
17. Kurreck, J. *et al.* Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1911–1918 (2002).
18. Seth, P. P. *et al.* Short antisense oligonucleotides with novel 2'–4' conformationally restricted nucleoside analogues show improved potency without increased toxicity in animals. *J. Med. Chem.* **52**, 10–13 (2009).
19. Buj-Bello, A. *et al.* The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 15060–15065 (2002).
20. Amoasii, L. *et al.* Phosphatase-dead myotubularin ameliorates X-linked centronuclear myopathy phenotypes in mice. *PLoS Genet.* **8**, e1002965 (2012).
21. Romero, N. B. *et al.* Centronuclear myopathies: a widening concept. *Neuromuscul. Disord.* **20**, 223–228 (2010).
22. Al-Qusairi, L. *et al.* T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 18763–18768 (2009).
23. Toussaint, A. *et al.* Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol.* **121**, 253–266 (2011).
24. Swayze, E. E. *et al.* Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res.* **35**, 687–700 (2007).
25. Burdick, A. D. *et al.* Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid-modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **42**, 4882–4891 (2014).
26. Van Poelgeest, E. P. *et al.* Acute kidney injury during therapy with an antisense oligonucleotide directed against PCSK9. *Am. J. Kidney Dis.* **62**, 796–800 (2013).
27. Herrington, W. G. *et al.* Association of long-term administration of the survivin mRNA-targeted antisense oligonucleotide LY2181308 with reversible kidney injury in a patient with metastatic melanoma. *Am. J. Kidney Dis.* **57**, 300–303 (2011).
28. Robb, S. A. *et al.* Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies. *Neuromuscul. Disord.* **21**, 379–386 (2011).
29. Dowling, J. J. *et al.* Myotubular myopathy and the neuromuscular junction: a novel therapeutic approach from mouse models. *Dis. Model. Mech.* **5**, 852–859 (2012).
30. Durieux, A. C. *et al.* Dynamin 2 and human diseases. *J. Mol. Med.* **88**, 339–350 (2010).

Acknowledgements

We thank Pascal Kessler, Olivia Wendling, Huges Jacobs, William Magnant and IONIS PK team for the excellent technical assistance. This work was supported by SATT Conectus Alsace, the Agence Nationale de la Recherche grant ANR-10-LABX-0030-INRT. H.T. was supported by a MRT fellowship.

Author contributions

B.S.C. and J.L. conceived the project. H.T., B.S.C. and J.L. designed the experiments, analysed the data. H.T. wrote the manuscript with input from all coauthors. B.S.C. and J.L. edited and corrected the manuscript. S.Gu., S.B., S.Gr. and B.P.M. performed the *in vitro* and *in vivo* ASO screen and PK analysis. H.T. carried out most experiments. N.M. performed electron microscopy. S.B. and C.K. performed mice phenotyping.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing interests: H.T., B.S.C. and J.L. are co-inventors of the patent on therapies targeting dynamin2 to rescue centronuclear myopathies. The other authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

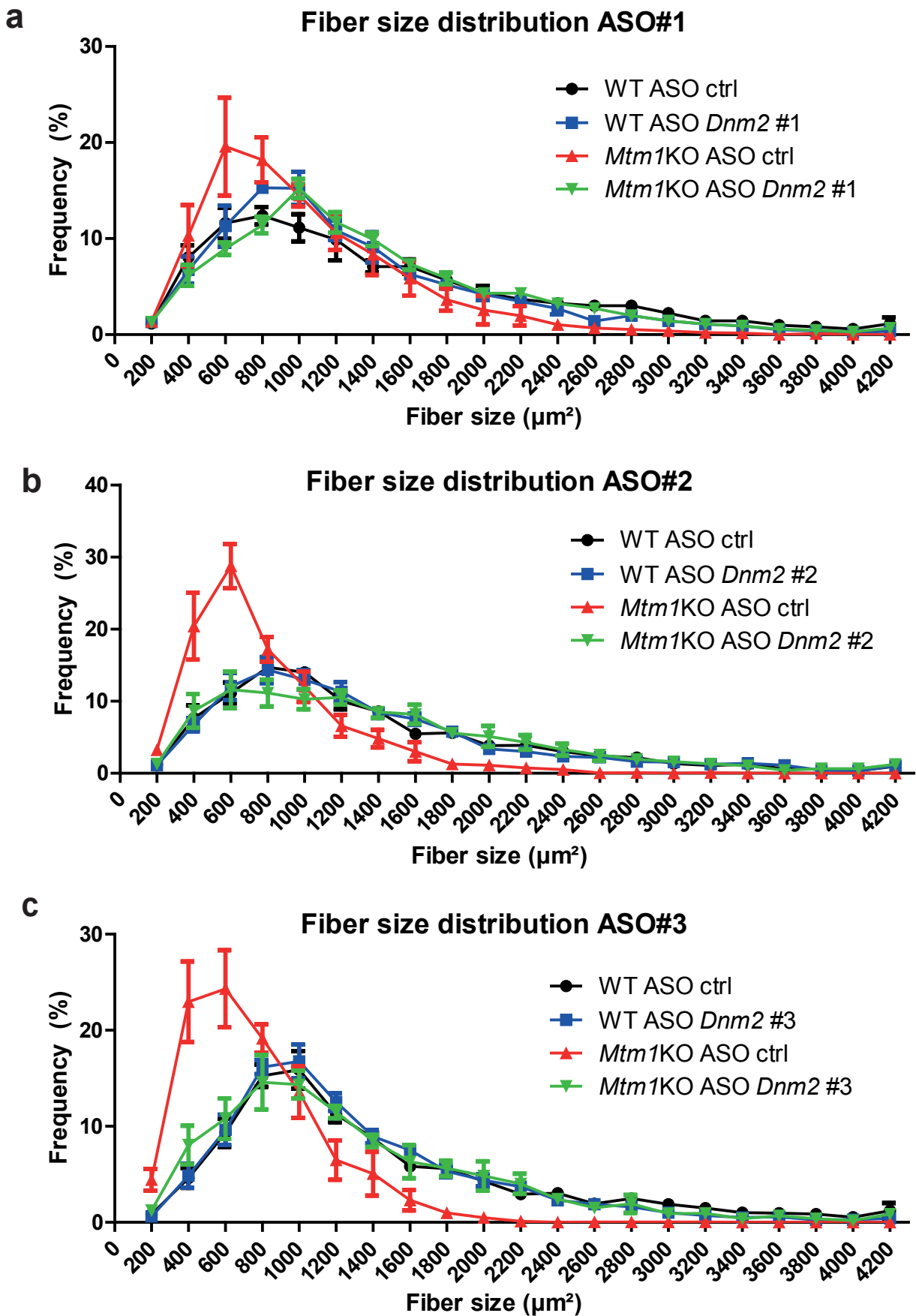
How to cite this article: Tasfaout, H. *et al.* Antisense oligonucleotide-mediated *Dnm2* knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat. Commun.* **8**, 15661 doi: 10.1038/ncomms15661 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

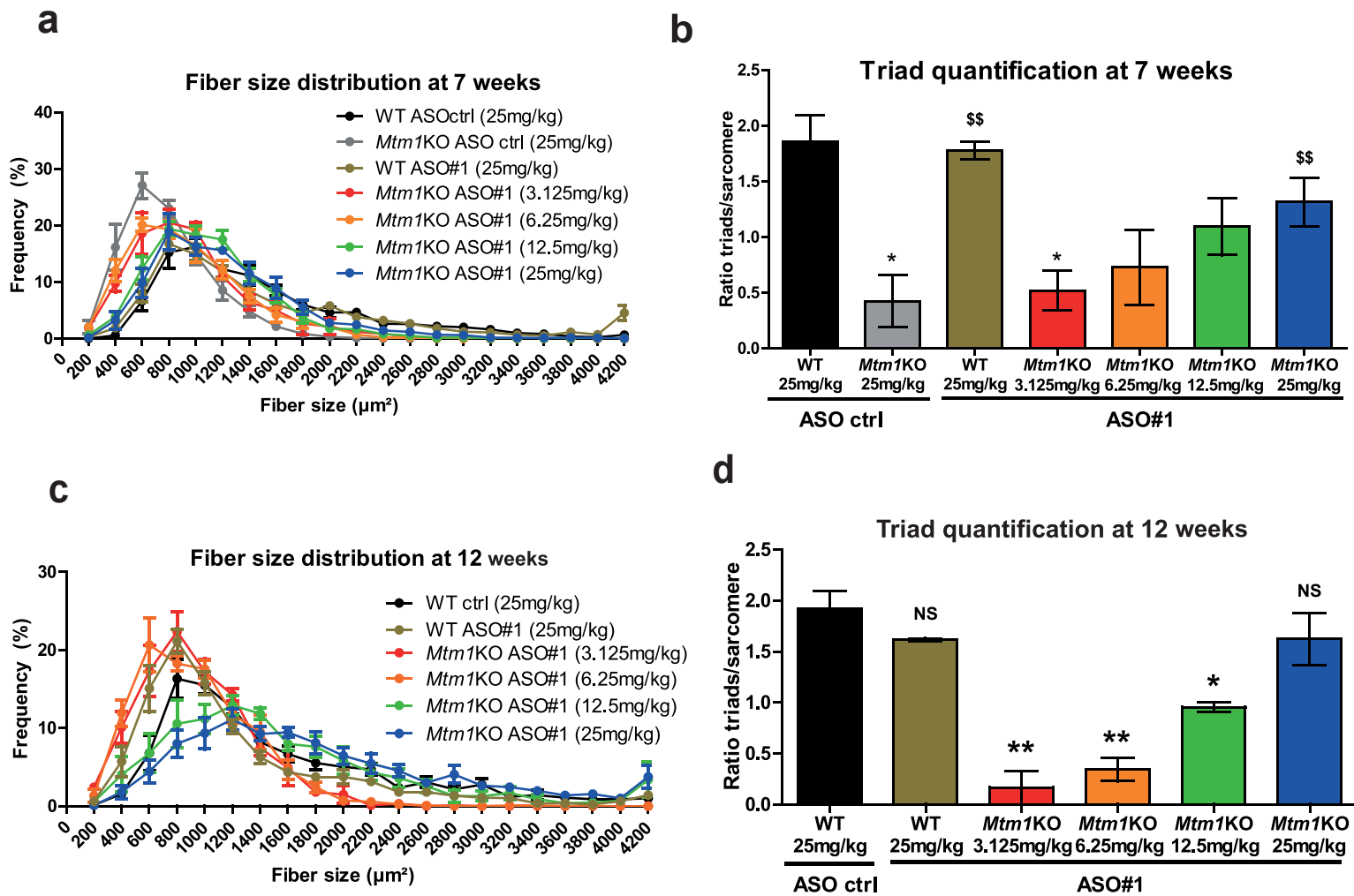


Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

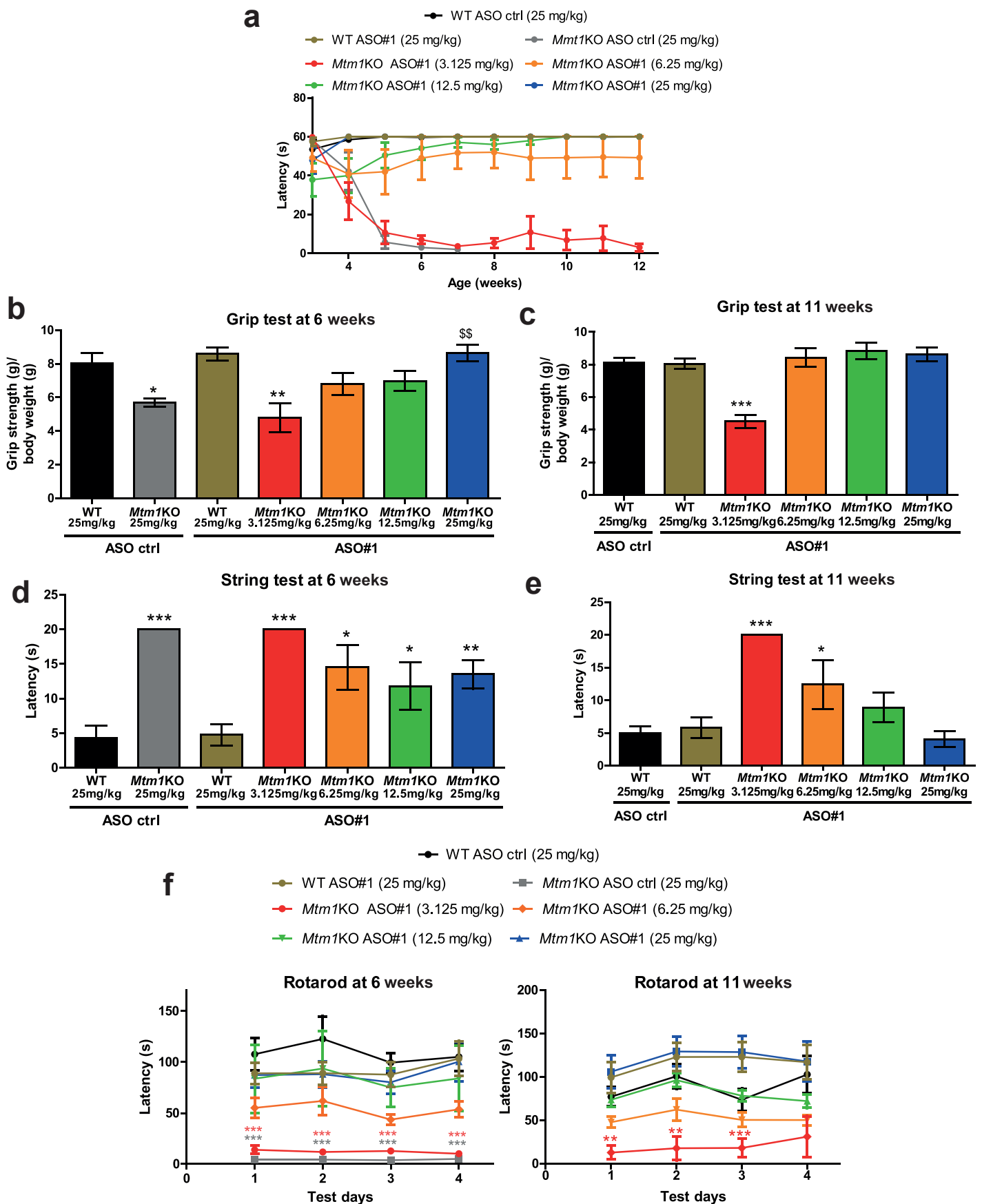


Supplementary Figure 1: Fiber size distribution of WT or *Mtm1*KO TA muscles injected with ASOs according to their size. Myofiber area was measured on 8 μm sections of TA muscles that were injected with ASO#1 (a), #2 (b), #3 (c) or contralateral TA injected with ASO control. They have been subdivided into 21 subgroups ranging from the smallest to the largest. The curve represents the percentage of fibers that belongs to each subgroup. >300 fibers were quantified per sample, $n=5$ per group.

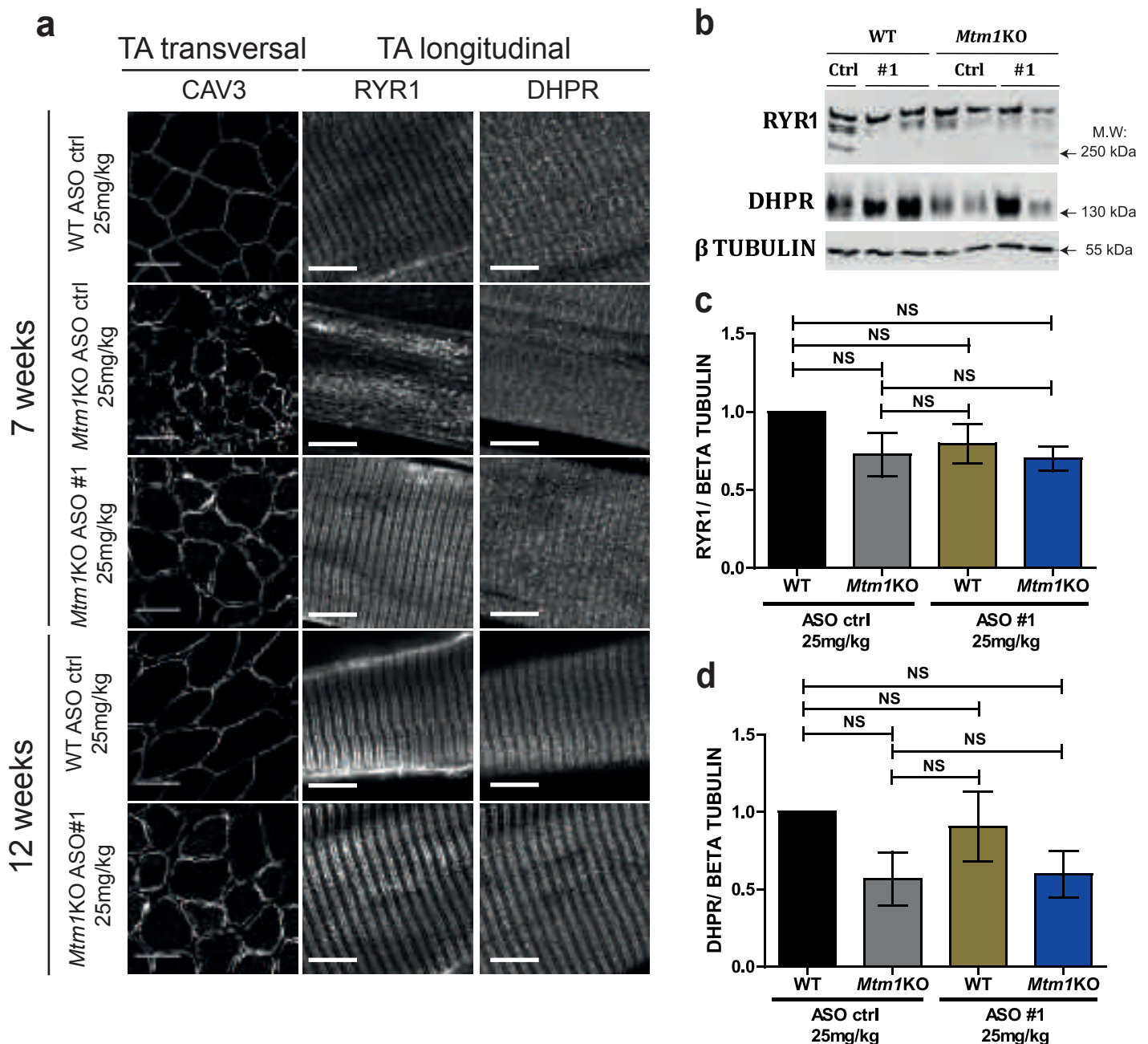


Supplementary Figure 2: Muscle organisation and histology evaluation after systemic ASO#1 treatment for 5 or 11 weeks. (a) and (c) myofiber area was measured on 8 μm TA muscle sections. The curve represents the percentage of fibers that belong to each subgroups. >300 fibers were quantified per group, $n=5$. (b) and (d) triads/sarcomere ratio was determined by dividing the number of triads observed by the number of sarcomeres present in the field, $n=3$. Data represent means \pm SEM. NS: no statistical significance, $*p<0.05$, $**p<0.01$ vs WT treated with ASO ctrl. $$$$p<0.01$ vs *Mtm1KO* treated with ASO ctrl (ANOVA test followed by post-hoc Bonferroni).

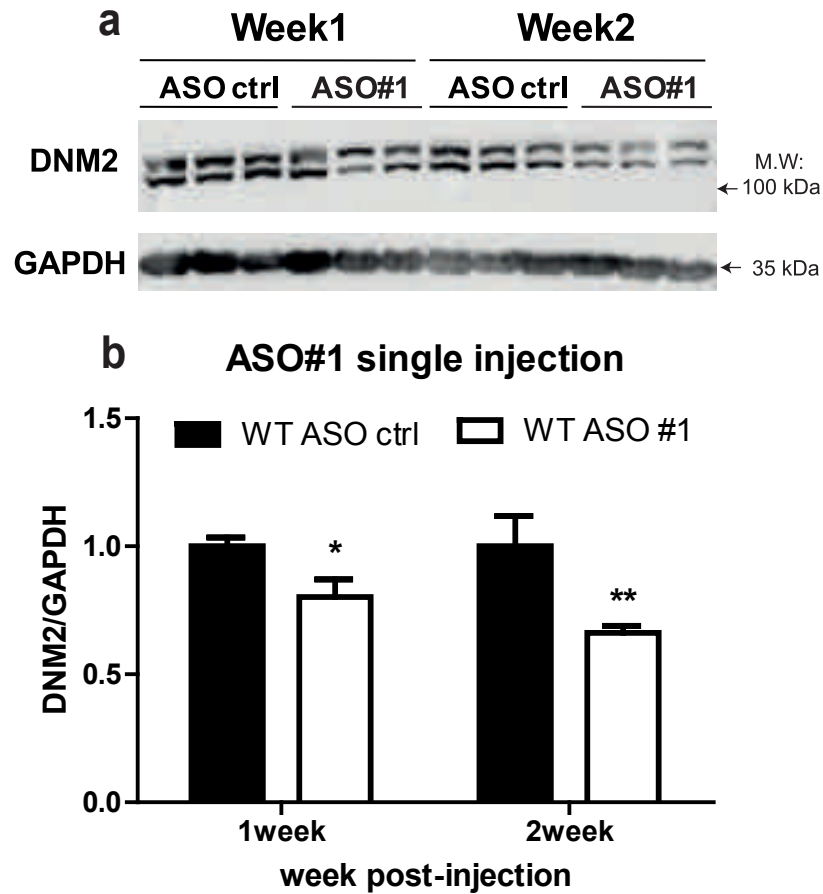
Hanging test



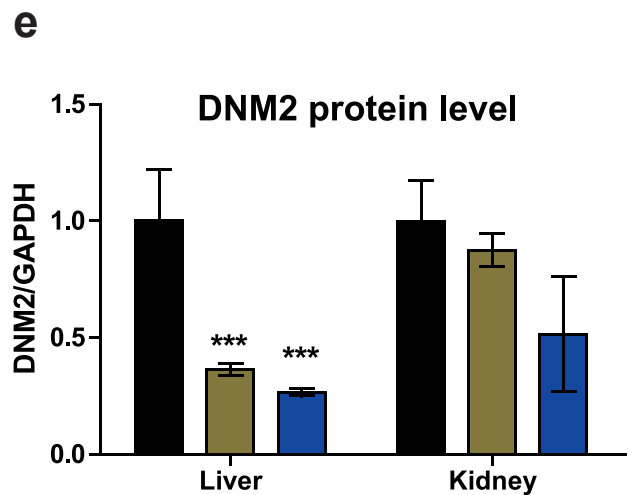
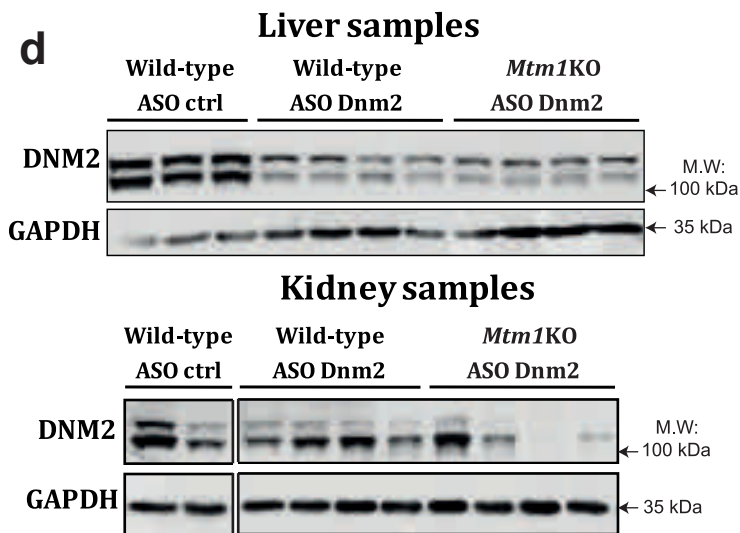
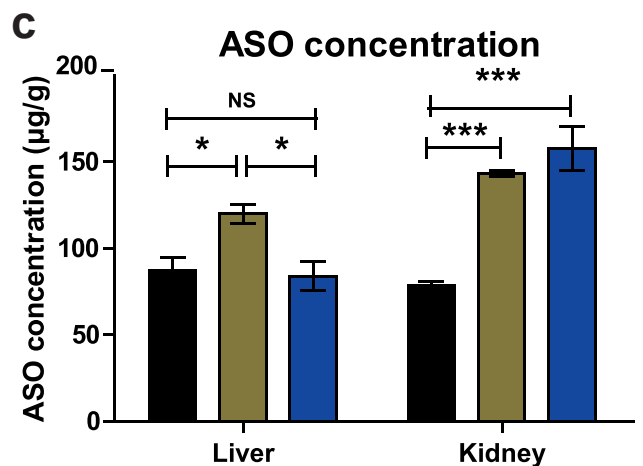
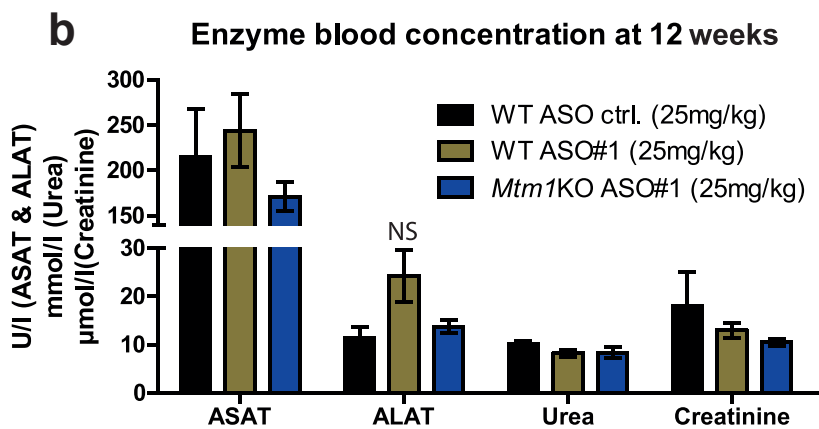
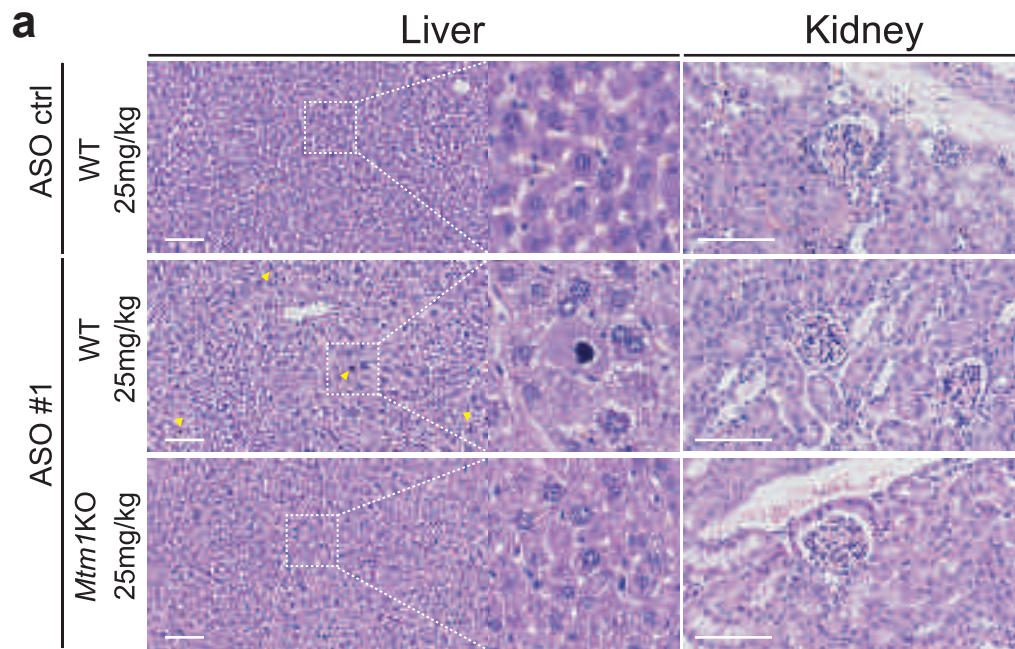
Supplementary Figure 3: Clinical improvement of the CNM phenotype after 5 or 10 weeks of systemic ASO treatment. (a) The ability of WT or *Mtm1KO* mice to perform the hanging test was measured every week. Quantification of mice muscle strength, fine motor coordination, balance and resistance to fatigue were assessed with grip (b, c), string (d, e) and rotarod (f), at week 6 (b, d, f) and week 11 (c, e, f). $n=6-7$ except for *Mtm1KO* treated with ASO#1 at 3.125 mg/kg at 11 weeks where $n=3$. Data represent means \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ for mice treated with ASO#1 vs WT treated with ASO ctrl. \$\$ $p<0.01$ for *Mtm1KO* treated with ASO#1 vs *Mtm1KO* treated with ASO ctrl (ANOVA test followed by post-hoc Bonferroni).



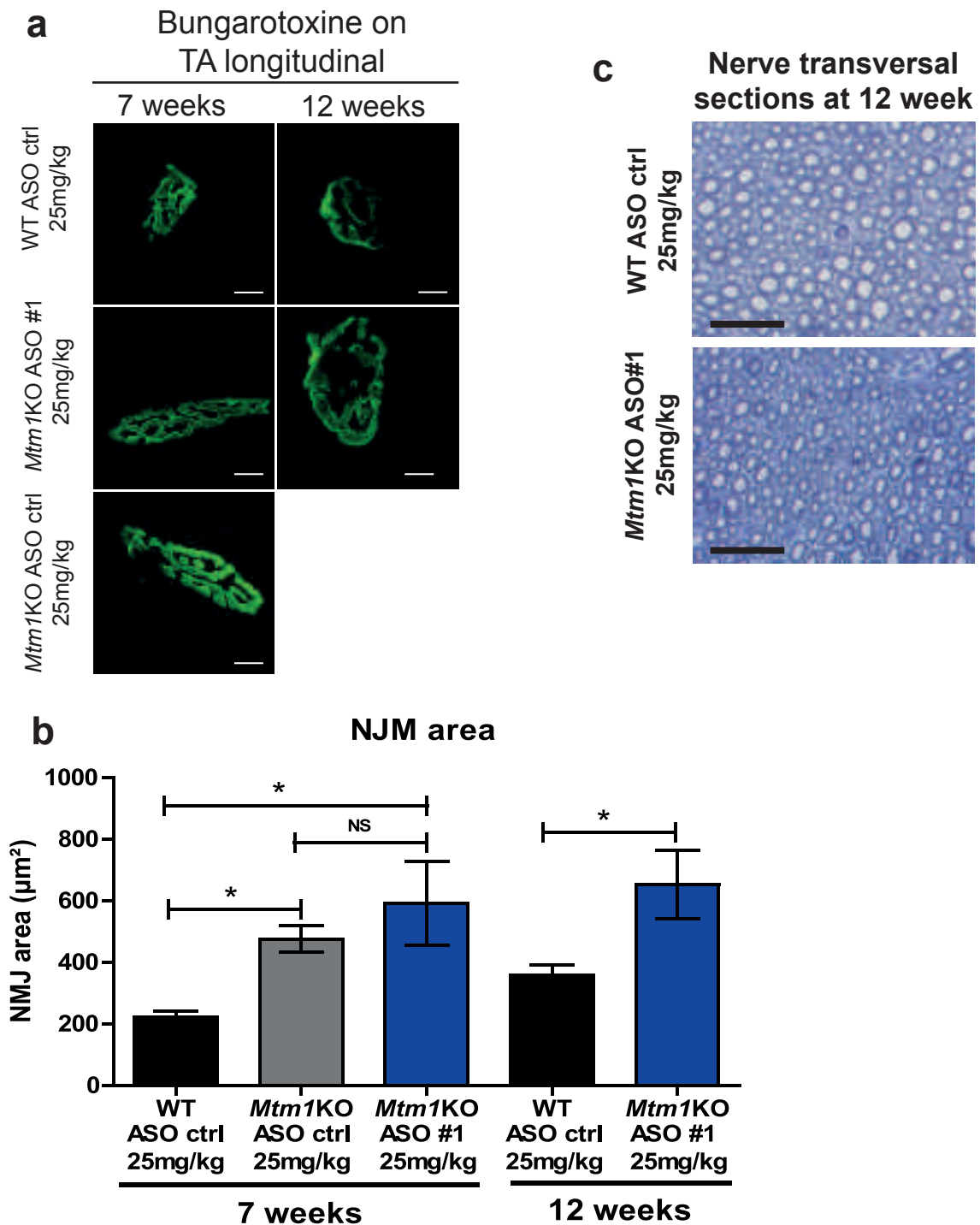
Supplementary figure 4: RYR1 and DHPR localization expression in TA muscle of WT or *Mtm1KO* mice treated with systemic ASO ctrl or ASO#1 injection. (a) Immunostaining of CAV3, RYR1 or DHPR in tibialis anterior muscle sections of WT or *Mtm1KO* mice treated with ASO ctrl or ASO#1 at 7 weeks or 12 weeks. CAV3 localisation was assessed on transversal sections (scale bars: 50 μ m) while RYR1 and DHPR were localized on longitudinal sections (scale bars: 10 μ m). (b) Western blot of RYR1, DHPR and Beta TUBULIN (loading control) of TA muscle lysates at 7 weeks. Relative level of RYR1 (c) and DHPR (d) levels were determined by densitometry of RYR1 or DHPR standardized to Beta TUBULIN. $n=4$. Data are means \pm SEM. NS: no statistical significance. (ANOVA test followed by post-hoc Bonferroni). M.W: molecular weight. kDa: kilodalton.



Supplementary Figure 5: DNM2 downregulation persistence after a single injection at week 3. (a) Blots represent DNM2 protein level in WT TA muscle lysates 1 or 2 weeks after a single intraperitoneal injection of 25 mg/kg of ASO#1. (b) Graph depicts the densitometry quantification of DNM2 level relative to GAPDH (loading control). $n=3$. Data are means \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (t -test). M.W: molecular weight. kDa: kilodalton.



Supplementary figure 6: Systemic ASO treatment effects on livers and kidneys of WT mice treated with ASO ctrl or ASO#1 or *Mtm1KO* mice treated with ASO#1 at 25 mg/kg for 10 weeks. (a) H&E staining of liver and kidney sections. Yellow arrows show some hepatocyte with cytoplasm enlargement and condensed nuclear material found in WT treated with ASO#1. The zoom magnified examples of hepatocytes observed in the analyzed samples. Scale Bars: 100μm. (b) Liver and kidney serum biomarkers were analyzed at age of 12 weeks. Graphs represent ASAT, ALAT, urea and creatinine blood levels. (c) ASO concentration in liver or kidney homogenates. ASO concentration was determined using mass spectrometry. (d) Blots show DNM2 and GAPDH (loading control) expression in liver and kidney samples. (e) Graphs representing the quantification of DNM2/GAPDH ratio. $n = 3-4$ per group. Data are means \pm SEM. NS: no statistical significance. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ (ANOVA test followed by post-hoc Bonferroni). M.W: molecular weight. kDa: kilodalton.



Supplementary Figure 7: Neuromuscular and peripheral nerve assessment. (a) Neuromuscular junctions were analysed on longitudinal sections using CFTM488A α -bungarotoxin. Scale bars: 10 μ m. (b) Graphs representing a quantification mean \pm SEM of the NMJ overall area. $n=5-6$ per group. NS: not statistically significant, $*p<0.05$ vs age-matched WT ASO ctrl (ANOVA test followed by post-hoc Bonferroni). (c) Toluidine blue staining of sciatic nerve transversal sections. Scale bars: 25 μ m.

Figure 1c

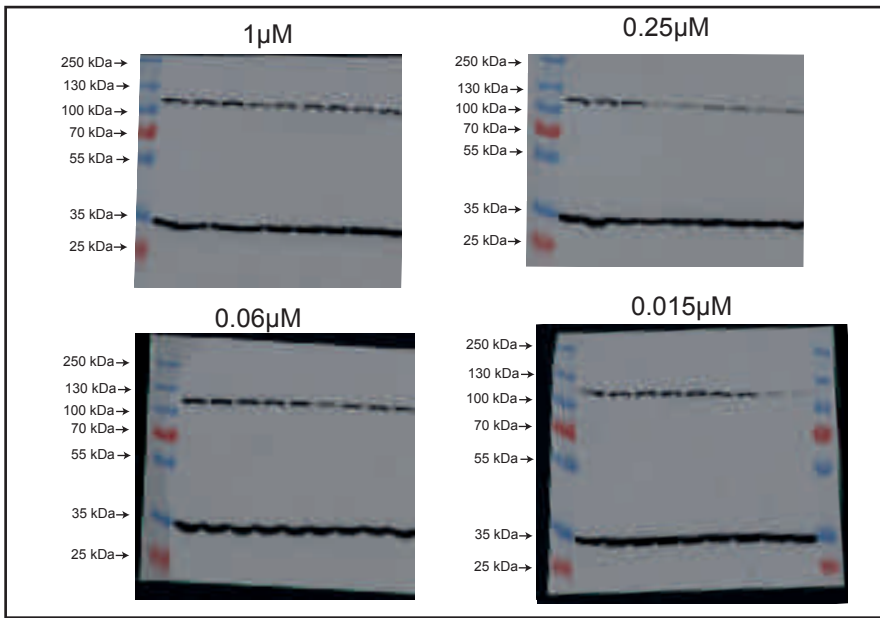


Figure 2a



Figure 7a

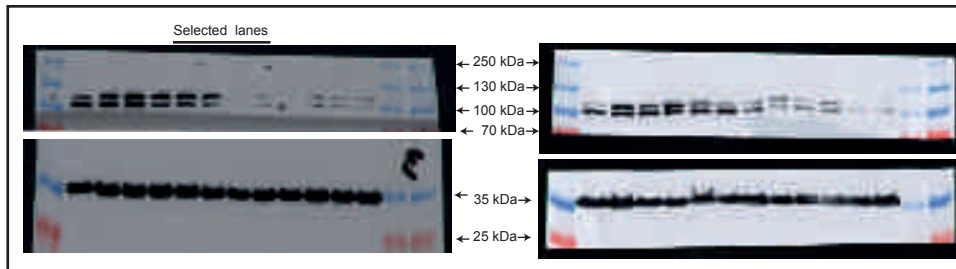


Figure 7b

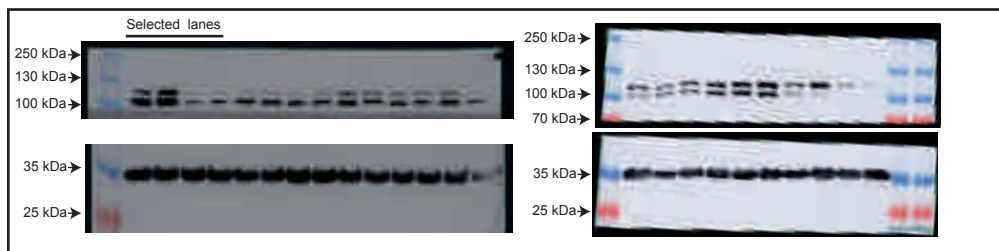
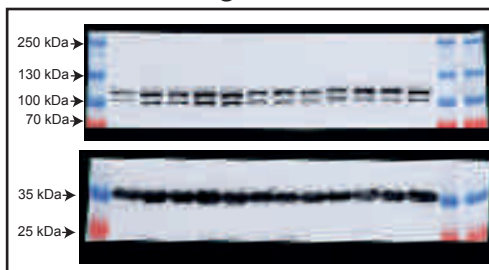
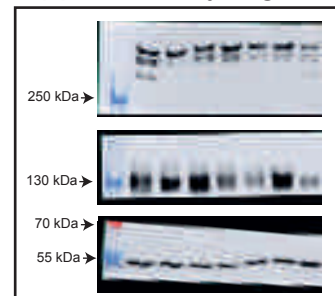


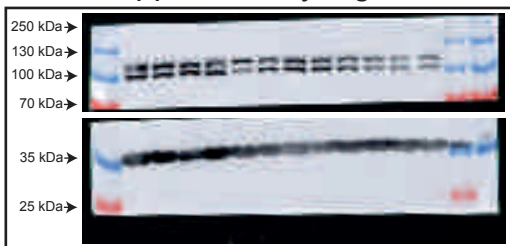
Figure 9h



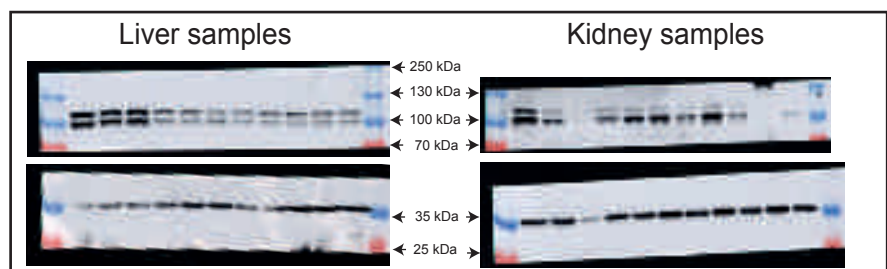
Supplementary Figure 4b



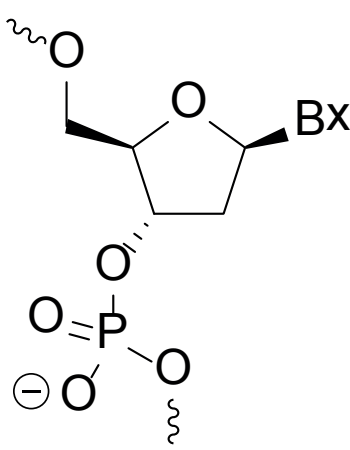
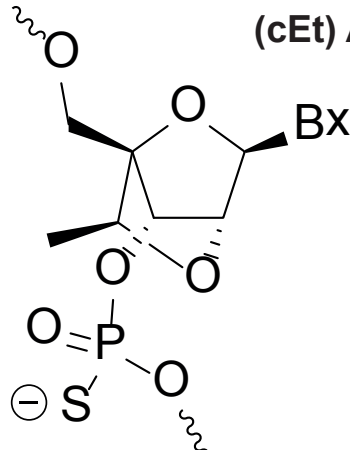
Supplementary Figure 5a



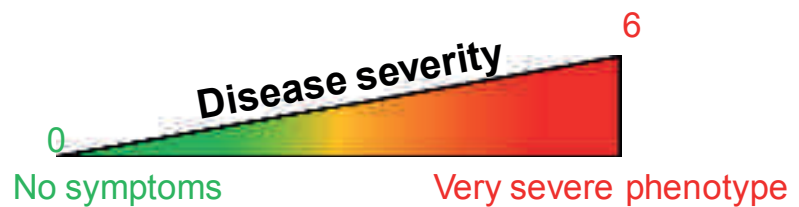
Supplementary Figure 6d



Supplementary Figure 8: Uncropped western blots used in figures 1c, 2a, 7a, 7b, 9h and supplementary figures 4b, 5a, 6d
Full western blot with marker size indicated by the arrows. kDa: kilodalton

ASO No (IONIS ID)	Length	Sequence (5'-3')
ASO ctrl. (549144)	16	GGCCAATACGCCGTCA
ASO #1 (694966)	16	GGCATAAGGTCACGGA
ASO #2 (695233)	16	CGCAGGAACCCCCTCA
ASO#3 (695244)	16	GGTAGACCCCAGCACG
<p style="text-align: center;">Unmodified DNA</p> 		<p style="text-align: center;">phosphorothioate constrained ethyl (cEt) ASO</p> 

Supplementary Table 1: sequence (top) and representation of the chemical structure (bellow) of antisense oligonucleotides (ASOs). All ASO have phosphorothioate backbone and constrained ethyl (cEt) modifications on the wings (**bold**) with a deoxy gap (underlined).



Score =	0	0,5	1	
Diff. of body weight (compared to WT littermates)	0g	1-2g	> 2g	0-1
Hanging test ability	60s	5-60s	<5s	0-1
Walking (hindlimbs)	Normal	Splayed	Loss of use	0-1
Ptosis	No	X	Yes	0-1
Kyphosis	No	Mild	Severe	0-1
Breathing alteration	No	x	Yes	0-1
Total: Disease Severity Score (DSS)				= 0-6

Supplementary Table 2: The six CNM features used to score the disease severity (DSS) in *Mtm1*KO mice. *Mtm1*KO mice were followed every week for the six CNM features (before and after ASO treatment). A score of 0 to 1 was given for each feature and the sum represents the DSS. The higher is the DSS, more severe is the phenotype.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Les résultats obtenus pendant ces quatre années de thèse nous ont permis de valider l'existence d'un lien commun reliant les trois protéines impliquées dans la genèse des myopathies centronucléaires. Cette voie de signalisation MAD (MTM1/ AMPH2/ DNM2) serait très importante dans l'homéostasie des muscles squelettiques car des défauts des trois protéines, dus à des mutations génétiques, causent un dysfonctionnement musculaire et l'apparition d'une myopathie très sévère. Plus important, mes travaux de thèse ont permis de valider la réduction de DNM2 comme piste thérapeutique pour le traitement de la myopathie myotubulaire. Le développement de produits injectables capables de cibler spécifiquement DNM2 suscite de grands espoirs pour une application clinique chez l'Homme. De plus, cette approche thérapeutique semble être transposable à d'autres formes de myopathie centronucléaire voire d'autres pathologies musculaires ou non musculaires.

1. Réduction de DNM2, une nouvelle cible thérapeutique :

En moins de trois décennies, DNM2 est passée du statut de protéine responsable de paralysie de mouche drosophile à une cible thérapeutique très prometteuse pour des maladies musculaires handicapantes chez l'Homme. Grâce au rationnel de la « thérapie croisée », notre équipe a montré que cibler une protéine (DNM2) autre que la protéine mutée (MTM1 ou BIN1) permet de restaurer la fonction musculaire dans les myopathies centronucléaires. Cette preuve de concept, faite initialement par croisement génétique dans des modèles murins, a permis de mettre en évidence un lien fonctionnel entre les différentes protéines et a surtout identifié DNM2 comme une éventuelle cible commune au traitement d'au moins deux formes de myopathie centronucléaire (la forme liée au chromosome X et la forme autosomique récessive).

1.1. Réduction de DNM2 dans la myopathie myotubulaire :

1.1.1. Surexpression de DNM2, une cause ou une conséquence ?

La myopathie myotubulaire, liée au chromosome X est la plus sévère des myopathies centronucléaires. Tout comme pour les patients atteints de cette forme, le modèle murin inactivé pour le gène *Mtm1* présente une atrophie et une hypotonie musculaire ainsi qu'une désorganisation structurelle des myofibres telles qu'une centralisation des noyaux, une distribution anarchique des mitochondries en plus d'une absence quasi-totale des triades. Ces éléments sont indispensables au bon fonctionnement d'une fibre musculaire. Ils jouent un rôle clé dans l'homéostasie calcique (Al-Qusairi, Weiss et al. 2009). L'absence de ces structures dans les muscles déficients en MTM1 peut être due soit à un problème d'initiation de tubulation, soit à un défaut de maintien des invaginations membranaires. Très récemment, des fragmentations de tubule-T ont été observées dans des myotubes en culture et dans des muscles

de drosophile causées par un gain de fonction de DNM2 (Chin, Lee et al. 2015). Or, une élévation du taux de DNM2 a été mesurée dans les muscles déficients en MTMT1 suggérant un gain de la fonction GTPase de DNM2. Cette activité enzymatique est sensiblement régulée. Alors qu'une hydrolyse lente des molécules GTP induit une élongation des invaginations membranaires et le maintien des tubules, l'hydrolyse rapide indirectement liée à une auto-activation des oligomères DNM2 conduit à une forte torsion de l'hélice entraînant la rupture de la membrane. Un tel scénario serait envisageable dans la myopathie myotubulaire. En effet, en absence de MTM1 (par des mutations génétiques), DNM2 est surexprimée et s'oligomérisse pour former des oligomères très actifs. Ses derniers auraient une forte activité GTPase et une vitesse d'hydrolyse de GTP très rapide ce qui entraînerait une fission prématurée des tubules-T néoformés au lieu de les maintenir en forme allongée. Par conséquent, les réticulums sarcoplasmiques ne seraient plus en mesure de former des triades.

D'autres hypothèses où MTM1 inhibe directement DNM2 ou bien participe à son transport cellulaire ne sont pas exclues. Mais à ce jour aucune étude n'a montré un lien moléculaire direct entre MTM1 et DNM2.

1.1.2. Origine de la surexpression de DNM2 :

L'homéostasie cellulaire repose en partie sur un équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation des protéines. A l'issue de leur traduction par les ribosomes, les protéines accomplissent leurs rôles cellulaires, et en fonction de leur demi-vie, elles seront dégradées par les différents mécanismes de protéolyse comme le système ubiquitine-protéasome ou l'autophagie. Ces mécanismes ont pour but de recycler les acides aminés et surtout d'éviter l'accumulation de protéines défectueuses. La défaillance de ces voies de dégradation a été rapportée dans les muscles déficients en MTM1 entraînant ainsi l'accumulation des mitochondries et la formation d'agrégats de différentes protéines dans les myofibres. (Al-Qusairi, Prokic et al. 2013, Fetalvero, Yu et al. 2013). Ce défaut de clearance des protéines pourrait expliquer l'origine du taux élevé de DNM2. De plus, contrairement aux protéines, la quantification des ARNm de *Dnm2* par qRT-PCR dans les muscles des souris *Mtm1*KO ne montre aucune augmentation des transcrits (Cowling, Chevremont et al. 2014). Ces observations suggèrent l'existence d'un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines DNM2 et ceci par un blocage de la voie ubiquitine-protéasome et d'autophagie, un blocage causé par l'absence de MTM1.

1.1.3. Effets positifs de la réduction de DNM2 :

Nous avons démontré par croisement génétique ainsi que par l'administration de composés injectables (AAV-shRNA et ASO) que la réduction de DNM2 pouvait prévenir le développement du phénotype musculaire dans le modèle murin de myopathie myotubulaire. La survie ainsi que le poids des souris *Mtm*IKO exprimant moins de DNM2 étaient similaires aux souris sauvages. De plus, tous les marqueurs histologiques et cliniques de la myopathie myotubulaire étaient corrigés avec cette approche. Plus important, la diminution de DNM2 permet même d'améliorer la myopathie une fois les signes cliniques déclarés ce qui montre le potentiel de cette stratégie à restaurer la fonction musculaire des muscles sévèrement affectés mais aussi des défauts non musculaires tels que la scoliose. Les résultats obtenus avec les ASO indiquent qu'il suffirait de normaliser le niveau de DNM2 pour avoir une correction du phénotype. Cette observation suggère qu'il n'est pas nécessaire de réduire le taux de DNM2 en dessous de la normale pour atteindre des effets positifs ce qui minimiserait d'éventuels effets secondaires relatifs à la réduction de la DNM2.

1.1.4. Potentiels effets secondaires :

Comme toute intervention thérapeutique, la réduction excessive de DNM2 pourrait donner naissance à des effets secondaires. En effet, DNM2 est une protéine ubiquitaire et elle est impliquée dans divers processus cellulaires. La létalité embryonnaire des souris systématiquement inactivées pour le gène *Dnm2* montre que cette protéine est indispensable pour le bon fonctionnement cellulaire et le développement embryonnaire en général (Ferguson, Raimondi et al. 2009). De même, les souris avec une inactivation du gène *Dnm2* restreinte aux muscles squelettiques décèdent à quatre semaines après leur naissance, ce qui indique le rôle clé de DNM2 dans la fonction musculaire. En revanche les souris hétérozygotes ont été dûment phénotypées par le programme européen EUMODIC et ne présentent aucun signe particulier. Ces résultats montrent bien qu'il est possible de réduire DNM2 de moitié sans déclencher des effets secondaires alors que son abolition totale aurait des répercussions négatives.

D'autre part, pour des raisons techniques, mon évaluation du potentiel thérapeutique des AAV-shRNA s'est limitée à des injections locales. Il a donc été difficile d'estimer les effets secondaires de cette approche pour le corps entier. En revanche, grâce aux injections systémiques des ASO j'ai pu évaluer les effets de la réduction de DNM2 dans les autres organes. L'analyse des biomarqueurs de la fonction hépatique et rénale indique que cette approche est bien tolérée par les souris sauvages et les souris *Mtm*IKO traitées. Il en est de même pour le foie et les reins pour lesquels l'examen microscopique n'a montré aucune anomalie à

l'exception des quelques hépatocytes à larges cytoplasmes et à noyaux condensés dans les foies de souris sauvages traitées avec l'ASO-DNM2. D'après Hugues Jacob, anatomopathologiste à l'IGBMC, ces cellules montrent un blocage de l'appareil mitotique. Une observation similaire a été faite par Thompson et ses collègues sur des hépatocytes traités avec des siRNA ciblant la DN2 (Thompson, Cao et al. 2004). La réduction de 80% du niveau de DN2 entraîne des défauts de cohésion du centrosome causant des anomalies de dynamique de l'appareil mitotique lors de la division cellulaire. De plus, DN2 a été localisée au niveau de la plaque équatoriale lors de la métaphase et au cortex pendant l'anaphase. Cette régulation serait médiée par une interaction avec les microtubules et l'actine (Thompson, Skop et al. 2002, Wang, Liu et al. 2014). Tous ces résultats montrent le rôle clé de DN2 dans la cytokinèse et la cellularisation et pourraient expliquer les défauts observés dans quelques hépatocytes de souris sauvages traitées avec l'ASO-*Dnm2* ainsi que la mortalité embryonnaire des souris inactivées pour le gène *Dnm2*.

Par ailleurs, une réduction de DN2 a été observée dans les cardiomyocytes de patients atteints d'arythmie cardiaque ischémique (Shi, Xie et al. 2014). De même, l'induction d'un stress ischémique dans des cœurs de rat provoque une arythmie sévère et le niveau de DN2 dans les zones ischémiques est fortement diminué. Cette arythmie serait la conséquence d'une modulation du niveau des canaux ioniques (Nav1.5 et Kir2.1) à la surface des cardiomyocytes ischémiques entraînant un dysfonctionnement du transport des ions sodiums et potassiums. Cet échange défaillant des ions provoque une augmentation de l'amplitude du potentiel d'action et un prolongement de la durée de la repolarisation. Au vu de son rôle dans le remodelage et le trafic des récepteurs membranaires, les auteurs ont attribué ces changements des niveaux de canaux ioniques à la surface des cardiomyocytes à la baisse du taux de DN2 dans les zones ischémiques. Toutefois, la participation d'autres protéines du trafic membranaire n'est pas exclue. Ces résultats sont en totale contradiction avec les données obtenues par Gao et ses collègues qui montrent que la réduction de DN2 protège les cardiomyocytes de l'apoptose, et ceci par diminution de la production des radicaux libres (ROS) et la fragmentation des mitochondries (Gao, Yang et al. 2016). Le rôle de DN2 dans le déclenchement d'arythmie cardiaque ischémique reste discutable.

Enfin, le gène DN2 a été décrit comme un gène de susceptibilité de la forme tardive d'Alzheimer (Aidaraliev, Kamino et al. 2008). Une étude génétique sur 429 personnes âgées avec une démence révèle des polymorphismes nucléotidiques du gène *DN2*. De plus, l'analyse en *post mortem* des cortex cérébraux des sujets ayant la forme tardive d'Alzheimer

montre une diminution de DNM2 (Aidaralieva, Kamino et al. 2008, Kamagata, Kudo et al. 2009). Cette réduction serait la cause d'un défaut de recyclage des APP (Amyloid Precursor Protein) par les endosomes et de leur accumulation au niveau de la membrane cellulaire conduisant à la formation de plaques amyloïdes.

Toutes les études citées ci-dessus montrent que la réduction de DNM2 peut avoir des effets secondaires dans différents organes. Il serait donc très important d'évaluer les effets à long terme des AAV-sh*Dnm2* ou ASO-*Dnm2* sur les fonctions cardiaque et cognitive. L'injection de ces composés dans les primates non-humains ainsi que des études toxicologiques plus approfondies pourraient apporter plus de réponses aux observations mentionnées dans les paragraphes précédents.

1.1.5. Comment éviter ces effets secondaires ?

1.1.5.1. Normaliser le niveau de DNM2 :

Les données obtenues avec les ASO indiquent qu'il suffit de normaliser le niveau de DNM2 dans les muscles *Mtm*IKO pour obtenir une correction du phénotype musculaire. Cette normalisation serait très difficile à obtenir chez l'Homme avec les injections de virus AAV. En revanche, les injections répétées des ASO laisseraient plus de souplesse pour contrôler le niveau de DNM2 dans le muscle squelettique à condition d'identifier des marqueurs biologiques qui guideraient cet ajustement. Des biopsies musculaires répétées serait très compliquées à mettre en place pour « gauger » le niveau de DNM2 dans le muscle et devraient être réservées au suivi de l'évolution de l'histologie musculaire. En revanche, comme DNM2 est ubiquitaire, mesurer son taux dans les fluides biologiques serait plus convenable. Une simple prise de sang permettrait de récupérer un volume correct d'échantillon biologique et d'analyser le niveau de DNM2 soit dans le plasma soit dans les éléments figurés du sang (plaquette, érythrocytes, leucocytes). Il serait nécessaire d'établir une corrélation entre le niveau de DNM2 dans le sang et celui dans les myofibres.

1.1.5.2. Limiter la réduction de DNM2 au muscle squelettique :

Limiter la diffusion des AAV-shRNA et ASO aux muscles squelettiques serait possible afin de restreindre la réduction de DNM2 aux fibres musculaires. Bien qu'il ne soit pas exclusif à un seul organe, le tropisme tissulaire des AAV permet de délivrer le transgène à un tissu cible. Plusieurs sérotypes d'AAV ont montré une bonne transduction des muscles squelettiques tels que l'AAV1, 6 et 9 (Zincarelli, Soltys et al. 2008). De plus, l'utilisation de promoteur muscle spécifique (par exemple le promoteur HSA : human α -skeletal actin) ou des éléments

régulateurs (par exemple la cassette MHCK7 : α -myosin heavy-chain Creatine kinase 7) peut limiter d'avantage l'expression du transgène aux fibres musculaires (Salva, Himeda et al. 2007, McCarthy, Srikuea et al. 2012).

D'autre part, conjugués à des peptides de petite taille, les ASO peuvent être délivrés spécifiquement aux muscles squelettiques (Yin, Moulton et al. 2009, Gao, Zhao et al. 2014). Ces peptides montrent une très forte affinité à des récepteurs présents à la surface des myofibres, et leur interaction faciliterait l'absorption des ASO conjugués par les fibres musculaires tout en la limitant dans d'autre organe comme le foie. Cette conjugaison permettrait d'améliorer la biodisponibilité musculaire des ASO, d'éviter l'apparition d'éventuels effets secondaires dans d'autres organes et surtout de réduire les doses injectées requises pour atteindre l'efficacité thérapeutique souhaitée.

Enfin, nous avons identifié une isoforme muscle-spécifique de DNM2 chez la souris. Cette isoforme résulte d'un épissage alternatif et contient un exon de 30 acides nucléiques supplémentaires, l'exon 12b. L'inclusion de cet exon varie pendant le développement musculaire et atteint 71% dans le muscle adulte. Cibler cette isoforme pourrait théoriquement conduire à une réduction de DNM2 limitée aux fibres musculaires. Cependant, parmi les trois séquences shRNA ciblant l'exon 12b testées sur culture cellulaire (sh*Dnm2* E, F, G), seule la séquence F affiche une réduction de 30% du niveau totale des DNM2. Par contre, l'injection de cette séquence dans le muscle squelettique de souris sauvages ou *Mtm*IKO n'a montré aucune réduction. Toutefois, je n'ai testé que trois séquences. Cibler d'autres séquences avec d'autres shRNA ou même des ASO pourrait réduire efficacement le niveau de DNM2 dans le muscle.

Il est très important de noter que chez les patients atteints de myopathie myotubulaire, outre le muscle squelettique, d'autres organes semblent être touchés. La population avec une plus longue survie présente des troubles hépatiques, endocriniens ou orthopédiques. De plus, Une amélioration phénotypique moins importante était observée dans les souris pourtant une délétion partielle de *Dnm2* restreinte au muscle squelettique. Tout comme les souris avec une diminution constitutive de DNM2, ces souris présentent une extension de la survie et une amélioration du phénotype musculaire. En revanche, à l'âge 18 mois, ces souris montrent des défauts de démarche et de transmission nerveuse (données préliminaires). Ces observations suggèrent que la réduction de DNM2 devrait être appliquée à tous les organes pour une amélioration phénotypique complète.

1.1.6. Transfert de l'approche vers l'Homme :

L'application de cette approche aux patients atteints de la myopathie myotubulaire nécessite le développement des composés qui reconnaissent l'ARNm *DNM2* humain. Dans ces travaux de thèse, les shRNA développés et testés chez la souris ciblent des régions conservées entre l'Homme et la souris tandis que les ASO testés et validés sont spécifiques au transcrit murin. Il est donc primordial de développer plusieurs candidats ASO humains et tester leur efficacité à réduire la *DNM2* soit sur des cultures cellulaires de patients soit sur des souris transgéniques portant le gène *DNM2* humain.

1.1.6.1. Modèle cellulaire de myopathie myotubulaire :

Le développement d'un modèle cellulaire de myopathie myotubulaire à partir de myoblastes de patients serait un outil très précieux pour la sélection du candidat ASO humain. Plusieurs études *in vitro* ont tenté d'identifier des défauts dans les myoblastes de patients atteints de myopathie myotubulaire mais aucune n'a décrit un phénotype anormal (Vanderven, Jap et al. 1995, Dorchie, Laporte et al. 2001). Ces cellules déficientes en *MTM1* sont cultivables et ne récapitulent pas les anomalies cellulaires observées dans les biopsies musculaires. Par contre, dans un test préliminaire, j'ai constaté que les myoblastes de souris exprimant une forte réduction de *MTM1* se différencient moins vite, et les myotubes formés sont plus courts et présentent un taux de fusion moins important que les contrôles (données non publiées). D'autre part, Lawlor et ses collègues ont montré que les myoblastes issus de souris *Mtm1KO* sont apoptotiques et moins prolifératives (Lawlor, Alexander et al. 2012). Ces résultats n'ont jamais été vérifiés dans les myoblastes humains et il serait intéressant de voir si la réduction de *DNM2* permet de restaurer ces phénotypes.

1.1.6.2. Souris humanisée :

La création d'une souris humanisée (souris qui exprime le gène *DNM2* humain à la place du gène *Dnm2* murin) aiderait à sélectionner le meilleur candidat ASO et à comparer *in vivo* l'efficacité de plusieurs candidats. L'utilisation de ce genre de modèle de souris transgénique est très répandue pour étudier la pathogénicité des agents infectieux et ils sont de plus en plus utilisés afin d'évaluer les effets des médicaments dans des études précliniques. L'injection des ASO humains permettrait d'établir leur profil pharmacodynamique dans un contexte *in vivo*, mais contrairement à des cellules humaines, il serait impossible de déterminer les effets hors-cible du candidat ASO car seul le gène *DNM2* est d'origine humaine.

Pour finir, des mutations spontanées du gène *MTM1* ont été identifiées chez des chiens Labrador retriever. Les chiots porteurs de la mutation présentent un myopathie généralisée et progressive avec une histologie musculaire similaire à celle observée chez les patients avec myopathie myotubulaire. Ce modèle a récemment été utilisé pour le développement d'une thérapie génique basée sur le remplacement du gène *MTM1* (Mack, Poulard et al. 2017). Leur corpulence moyenne (similaire à un nouveau-né) ainsi que le phénotype développé les rendent particulièrement intéressants pour tester des nouvelles thérapies. De plus, *DNM2* est très conservé entre l'Homme et le chien. La génération d'un ASO qui cible ces régions communes permettrait de tester et valider cette approche sur ces chiens myopathes avant le passage chez l'Homme.

1.2. Réduction de *DNM2* dans la forme autosomique récessive de myopathie centronucléaire : Les résultats positifs de la réduction du niveau de *DNM2* ne se limitent pas à la myopathie myotubulaire. Cette stratégie serait applicable à la forme autosomique récessive due à des mutations de *BINI*.

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été développés pour comprendre le rôle physiologique de *BIN1* et étudier l'impact des différentes mutations. La première souris fut développée en 2003 par recombinaison homologue. Les exons 3, 4 et 5 du gène *Bin1* ont été remplacés par une cassette de résistance à la néomycine. Ces souris déficientes en *BIN1* présentent une cardiomyopathie causant une léthalité périnatale (Muller, Baker et al. 2003). Selon les auteurs, l'analyse du muscle squelettique ne montre aucun défaut structurel.

Après avoir identifié des mutations de *BINI* chez des patients atteints de la forme autosomique récessive et dominante de myopathie centronucléaire, le laboratoire d'accueil a développé plusieurs modèles murins de *BIN1*. Le premier porte une délétion de l'exon 11 de *Bin1*, exon spécifique des muscles squelettiques. Cet exon code pour le domaine PI qui interagit avec les phosphoinositides et permet à *BIN1* de s'accrocher aux membranes cytoplasmiques. Alors que l'exclusion de cet exon spécifique au muscle squelettique induit un phénotype musculaire sévère chez l'Homme (myopathie centronucléaire et dystrophie myotonique) et le chien (Myopathie héréditaire du Dogue Allemand) (Fugier, Klein et al. 2011, Bohm, Vasli et al. 2013), aucun phénotype majeur n'a été observé chez ces souris *Bin1* délétées de l'exon 11 (Prockic et al. en préparation).

Une deuxième souris a été générée afin d'étudier l'impact des mutations situées au niveau du dernier exon de *Bin1*. En effet, les exons 19 et 20 de *BINI* codent pour le domaine SH3 qui

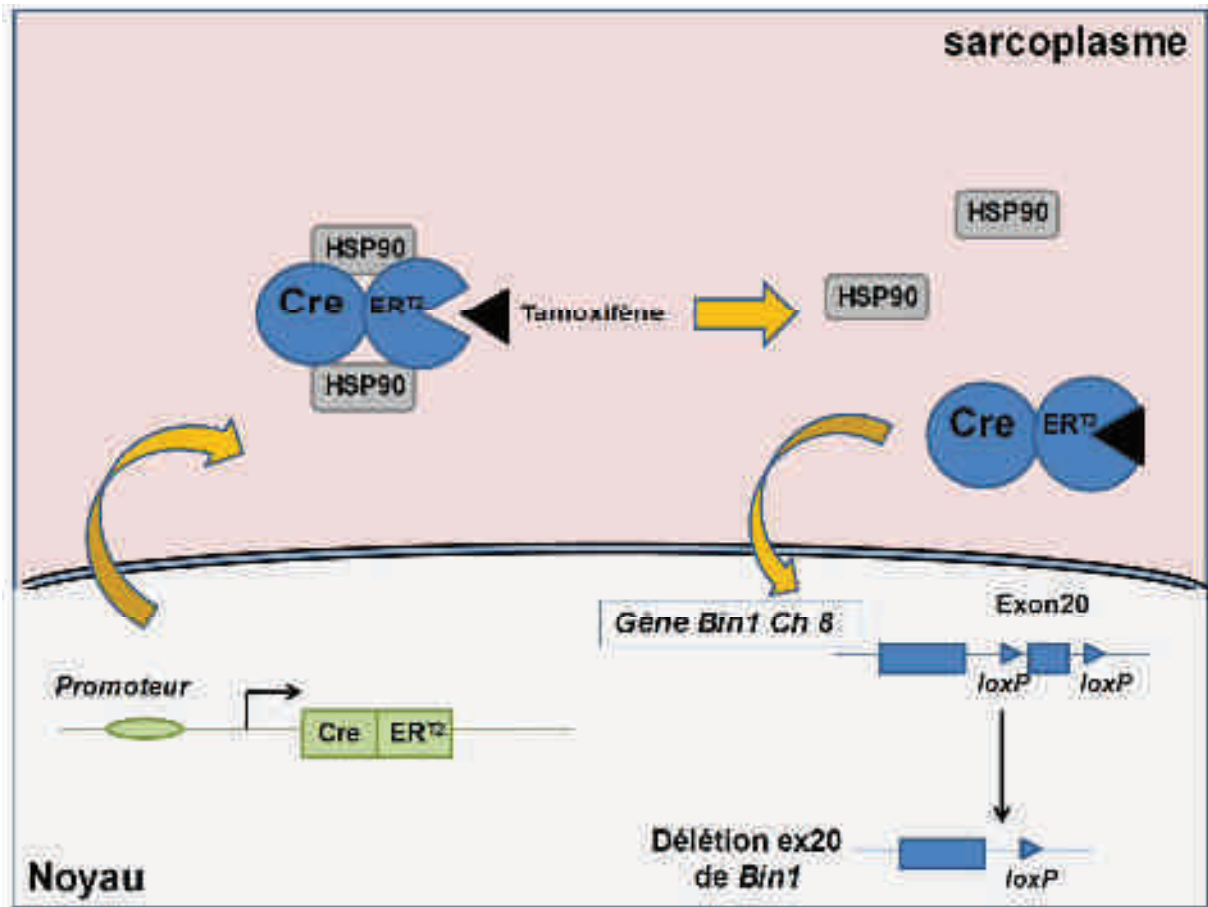


Figure 20 : Mécanisme d'action du système inducible Cre-ER^{T2}/Tamoxifène.

L'interaction du Tamoxifène avec le récepteur des œstrogènes libère le complexe Cre-ER^{T2} des HSP90 (heat shock protein 90). La Cre-recombinase peut ensuite se transloquer vers le noyau et exciser les régions situées entre les sites LoxP.

assure l'interaction de BIN1 avec de nombreux effecteurs notamment DNM2. Plusieurs mutations altérant le codon stop ont été séquencées chez des patients atteints de la forme autosomique récessive et dominante de myopathie centronucléaire. Par conséquent, le domaine SH3 n'est plus fonctionnel et l'interaction de BIN1 avec les protéines partenaires est perturbée. A cet effet, notre équipe a généré une souris transgénique portant une délétion de l'exon 20 de *Bin1* (*Bin1* ex20 KO). Ces souris expriment un taux très faible de BIN1 et meurent quelques heures après leur naissance probablement par une hypoglycémie secondaire au manque de lait maternel dans l'estomac. Cette observation suggère un problème de déglutition dû à un défaut des muscles requis pour ce réflexe. Contre toute attente, la réduction de DNM2 chez ces souris *Bin1* ex20 KO (*Bin1* ex20 KO/ *Dnm2* hétérozygote) améliore leur survie. Ces souris étaient capables d'effectuer tous les tests cliniques avec la même endurance que leurs congénères sauvages et présentaient les mêmes force et masse musculaire. Ces résultats très prometteurs montrent, qu'en plus de la forme due à MTM1, la stratégie de réduction de DNM2 est aussi applicable à la forme causée par BIN1 ce qui la rend particulièrement attractive.

1.2.1. Confirmation de l'amélioration phénotypique par des composés injectables :

Ces résultats obtenus par croisement génétique n'ont pas pu être validés par des composés injectables pour plusieurs raisons. L'une d'elle est la mortalité périnatale des souris *Bin1* ex20 ce qui ne laisse que quelques heures pour agir efficacement, et réduit les chances d'un produit injectable à atteindre sa cible thérapeutique.

1.2.1.1. Développement d'un modèle inductible *Bin1* :

En absence de modèle approprié au développement thérapeutique, j'ai tenté de créer un modèle de souris viable mais suffisamment affecté par inactivation inductible de *Bin1*.

Nous disposons d'une souris double transgénique qui exprime une protéine chimérique Cre-ER^{T2} et porte un exon 20 de *Bin1* flanqué entre deux régions *LoxP* (locus of X-over P1). Issue de bactériophage, cette séquence de 34 nucléotides est la cible d'une topoisomérase de type 1 appelée Cre-recombinase. Dans le cas du système Cre-ER^{T2}, cette enzyme reste inactive car elle est constamment couplée à un récepteur modifié des estrogènes. L'injection du Tamoxifène libère la Cre-recombinase qui transloque ensuite vers le noyau induisant l'excision de l'exon 20 de *Bin1* (Figure 20). Ce système offre la possibilité d'inactiver des gènes de façon temporelle et contrôlée.

Afin de développer un modèle viable mais suffisamment affecté pour tester l'efficacité thérapeutique de la réduction de DNM2, j'ai injecté le Tamoxifène dans des souris *Bin1*

ex20^{lox/lox} Cre-ER^{T2} (+) à différentes périodes pré et postnatales. L'administration de cet analogue d'estrogène aux mères gestantes de dix jours cause une hémorragie vaginale et une interruption précoce de la gestation. Cet effet serait probablement lié à l'action antagoniste anti-oestrogénique du tamoxifène. Dans une deuxième tentative, j'ai injecté le tamoxifène aux femelles le jour de la mise-bas pour espérer un passage dans le lait maternel vers les nouveau-nés *Bin1* ex20^{lox/lox} Cre-ER^{T2} (+). Deux semaines après, aucune excision de l'exon 20 n'a été détectée et par conséquent aucune réduction du niveau de BIN1 n'a été mesurée par western blot. Ceci peut être expliqué par la propriété anti-galactogène du Tamoxifène (Shaaban 1975, Masala, Delitala et al. 1978). En effet, le Tamoxifène pourrait réduire la production du lait maternel et réduirait par conséquent son passage vers les souris nouveau-nés. Enfin, même si l'administration du tamoxifène à des souris *Bin1* ex20^{lox/lox} Cre-ER^{T2} (+) adultes induit une réduction de 80% de BIN1, aucun phénotype musculaire n'a été observé chez les souris injectées.

1.2.1.2. Réduction de DNM2 pendant la période embryonnaire :

Face à cet échec à développer un modèle inductible *Bin1*KO, j'ai changé de stratégie et j'ai évalué la capacité des ASO à traverser la barrière placentaire dans le but de réduire DNM2 dans les fœtus *Bin1*KO pendant la période embryonnaire. Les injections répétées des ASO à des femelles gestantes par voie intraveineuse entraînent la réduction de DNM2 dans les organes maternelle (foie et muscles) mais aucune diminution n'a été observée dans les organes fœtaux. Ces données montrent que le placenta est complètement hermétique au passage des ASO. Il serait envisageable d'administrer ces molécules directement aux fœtus par injection intra-utérine guidée par une échographie mais le risque d'endommager les tissus embryonnaires est très élevé.

La confirmation des résultats positifs de la réduction de DNM2 dans le modèle murin *Bin1*KO n'a donc, à ce jour, pas été faite par des produits injectables. Dans l'impossibilité de le faire chez la souris, le modèle canin identifié avec une mutation de *BIN1* et décrit par Bohm et ses collègues présente une alternative pour la validation de cette approche dans la forme causée par *BIN1*.

1.2.2. Rôle de DNM2 dans les formes autosomiques causées par l'absence de *BIN1* :

Contrairement à la forme liée au chromosome X, la surexpression de DNM2 n'a pas été vérifiée dans la forme autosomique récessive. Toutefois, l'implication de DNM2 dans cette pathogénèse pourrait être due à une augmentation de l'activité GTPase sans que le niveau protéique soit

élevé. En effet, il a été démontré que BIN1 recrute, interagit et régule l'activité de DNM2 *in vitro*. Dans le muscle squelettique adulte, DNM2 est localisé au niveau des lignes Z tandis que BIN1 se trouve dans les tubules-T. En revanche, dans les myotubes embryonnaires, nous avons observé une colocalisation des deux protéines le long des tubules longitudinaux (publication 3, voir Annexe) indiquant un rôle dans la biogénèse des tubules-T pendant le développement embryonnaire. Ce changement de localisation pourrait être expliqué par la restructuration moléculaire associée à l'épissage de différents exons. En collaboration avec l'équipe du docteur Aurélien Roux, nous avons montré que la présence de BIN1 diminue fortement le niveau d'hydrolyse de GTP par l'isoforme majoritaire de DNM2 (exon 12b exclu) dans les muscles embryonnaires. Dans le muscle adulte, l'isoforme majoritaire de DNM2 (exon 12b inclus) ne semble pas être sensible à l'ajout de BIN1 ce qui suggère une régulation transitoire de l'activité GTPase de DNM2 par BIN1. Cette observation montre que l'activité GTPase est influencée par la présence de BIN1 et par l'épissage de l'exon 12b de *Dnm2*. Cette modulation serait un élément très important dans le choix entre une tubulation ou une fission des membranes. Nous pensons que, pendant la phase embryonnaire, BIN1 régule l'activité de DNM2 et assure la formation des tubules-T. En absence de BIN1, l'activité de DNM2 est élevée ce qui favorise la fission des membranes et l'absence des tubules-T. En réduisant le niveau de DNM2, l'activité GTPase de DNM2 serait théoriquement plus faible ce qui permettrait de rebalancer le résultat final vers une tubulation.

1.3. Réduction de DNM2 dans la forme autosomique dominante de myopathie centronucléaire : Comme je l'ai déjà abordé dans les paragraphes précédents, les mutations de DNM2 impliquées dans l'apparition de la forme autosomique dominante de myopathie centronucléaire provoquent une élévation de l'activité GTPase et une fragmentation des tubules formés. De plus, la surexpression de DNM2 dans le muscle squelettique de souris adulte déclenche l'apparition d'un phénotype musculaire similaire à celui observé chez les patients myopathes. Ces observations montrent une nouvelle fois l'importance de l'activité GTPase de DNM2 dans la tubulation et pointe vers sa normalisation pour restaurer la fonction musculaire, une normalisation qui peut être réalisée par la réduction du niveau total de DNM2.

Une souris transgénique knock-in (KI) a été développée par le docteur Marc BITOUN pour étudier l'impact de la mutation la plus fréquente séquencée chez les patients, la mutation R465W. Tandis que les souris homozygote *Dnm2*^{R465W/R465W} sont léthales et meurent pendant les premiers 24 heures de vie, les souris hétérozygotes *Dnm2*^{R465W/WT} sont viables et présentent un léger phénotype musculaire. Afin d'évaluer les effets de la réduction du niveau total de

DNM2, nous avons injecté directement les ASO-*Dnm2* et les AAV-sh*Dnm2* dans les souris hétérozygotes *Dnm2*^{R465W/WT}. L'analyse des résultats est en cours et les résultats préliminaires montrent une amélioration phénotypique suite à la réduction de DNM2 par les ASO ou AAV-shRNA. Les souris *Dnm2*^{R465W/WT} injectées montrent une augmentation de la masse et de la force musculaire ainsi qu'une correction des défauts histologiques.

Nos résultats indiquent donc l'applicabilité de cette stratégie thérapeutique aux trois formes de la myopathie centronucléaire à savoir la myopathie myotubulaire et les formes autosomiques dominantes et récessive.

1.4. Autres maladies musculaires :

La réduction du niveau de DNM2 comme stratégie thérapeutique peut s'étendre à d'autres pathologies musculaires. Différentes équipes ont montré l'implication partielle ou indirecte de DNM2 dans la pathogénèse des dystrophies myotoniques et la dystrophie musculaire de Duchenne.

1.4.1. Les dystrophies myotoniques :

Les dystrophies myotoniques représentent un groupe de maladies multi-systémiques affectant principalement le muscle squelettique. Les défauts musculaires observés chez les patients sont : une myotonie (relâchement musculaire lent et difficile après une contraction volontaire), une hypotonie et une atrophie progressive en plus d'une centralisation des noyaux. A cela s'ajoutent des troubles cardiaques, endocriniens et même une cataracte en fonction des formes. Comme indiqué brièvement dans la boîte 1 de l'introduction, cette maladie est due à une expansion d'un trinuéotide CTG au niveau de l'extrémité 3' du gène *DMPK* (Dystrophia myotonica protein kinase). Chez un sujet sain, cette répétition du triplet CTG ne dépasse pas les 37 fois. Or, plus cette expansion augmente et plus le phénotype sera sévère. L'ARNm porteur de ces anomalies séquestre des facteurs très importants pour la transcription des gènes ou l'épissage des ARNm tels que MBNL (muscleblind-like protein). Par conséquent, MBNL ne sera plus disponible pour l'épissage et la maturation des ARNm cibles comme le récepteur de l'insuline et le canal sodique *SCN5A* causant respectivement une insulino-résistance et des troubles de la conduction cardiaque.

En collaboration avec l'équipe du docteur Nicolas Charlet-Berguerand, notre équipe a démontré que dans les muscles de patients avec la dystrophie myotonique un épissage alternatif aberrant de l'exon 11 de *BINI* est responsable de l'hypotonie et la position centrale des noyaux dans les myofibres ainsi que des anomalies de formation des tubules-T (Fugier, Klein et al. 2011).

L'exclusion de cet exon spécifique au muscle squelettique se traduit par l'expression d'une isoforme qui ne contient pas le domaine PI. Cette isoforme est incapable de se fixer aux phosphoinositides membranaires et n'initie pas la formation des tubules. Tout comme dans certains cas affectés par la forme autosomique récessive de la myopathie centronucléaire, un défaut d'épissage de *Bin1* semble être une cause commune aux défauts de biogénèse des tubules-T et du phénotype musculaire des patients atteints des dystrophies myotoniques (la forme congénitale CDM1 et les formes adultes type 1 et 2). Nous pensons que même si les causes génétiques sont différentes, le mécanisme responsable des défauts musculaires est le même pour les deux pathologies. Il serait donc envisageable d'évaluer le potentiel thérapeutique de la réduction DNM2 dans un modèle animal des dystrophies myotoniques. Cependant, à ma connaissance aucune étude n'a décrit un défaut d'épissage de *Bin1* dans les modèles animaux de dystrophie myotonique disponibles. Comme je l'ai déjà abordé dans ce chapitre, notre équipe a généré une souris inactivée pour l'exon 11 de *Bin1*. Aucun phénotype musculaire n'a été observé. Par ailleurs, l'exclusion forcée de cet exon induite par l'injection intramusculaire d'AAV exprimant une cassette U7-siRNA (small nuclear RNA) dans les muscles de souris montre une légère réduction de la force musculaire et des défauts structurels des tubules-T (Fugier, Klein et al. 2011). La masse musculaire, quant à elle, reste inchangée. Il semble que l'exclusion de cet exon n'affecte pas la fonction musculaire chez la souris. En revanche, le domaine PI codé par cet exon serait très important chez le chien car son absence cause un phénotype musculaire très sévère. L'identification d'une colonie de chien avec une expansion similaire de CTG au niveau du gène *DMPK* permettrait d'évaluer les effets de la réduction de DNM2 dans le traitement du phénotype musculaire des dystrophies myotoniques.

1.4.2. La dystrophie musculaire de Duchenne :

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie musculaire qui touche environ 1 garçon sur 3500. Cette pathologie est caractérisée par l'absence de la dystrophine dans les fibres musculaires due à des mutations génétiques du gène *DMD*. Ainsi, la membrane sarcoplasmique est fragilisée entraînant une dégénérescence progressive des fibres musculaires. Une étude a révélé une surexpression du transcrit *DNM2* dans les biopsies musculaires de patients atteints de DMD (Alexander, Kawahara et al. 2013). Toutefois, aucune explication n'a été donnée à cette élévation. Par croisement génétique, notre équipe a voulu déterminer si la réduction du taux de DNM2 peut corriger le phénotype musculaire des souris *mdx*. Les souris *mdx/Dnm2^{HTZ}* présentent une légère amélioration de la résistance aux dommages causés par les contractions musculaires répétées. L'investigation des autres effets positifs de cette stratégie

thérapeutique est en cours, et les résultats préliminaires obtenus suggèrent que la réduction de DNM2 peut avoir des effets bénéfiques dans le modèle murin de DMD en stabilisant l'évolution de cette pathologie.

1.5. Autres maladies non-musculaires :

En plus des maladies musculaires, d'autres études ont décrit une surexpression de DNM2 dans d'autres conditions pathologiques.

1.5.1. Cancer

Comme je l'ai déjà abordé dans l'introduction, DNM2 joue un rôle très important dans le remodelage des membranes cellulaires et le dynamisme du cytosquelette. Ce rôle assure à la cellule différentes propriétés comme la formation des pseudopodes lors de la phagocytose, la motilité et migration cellulaire. L'équipe de McNiven a montré dans une étude que DNM2 est impliquée dans la migration métastatique et l'invasion des cellules tumorales vers d'autres foyers. Les auteurs ont montré que DNM2 était quatre fois surexprimé chez 81% des patients avec un adénocarcinome ductal pancréatique (Eppinga, Krueger et al. 2012). Par des tests *in vitro* et *in vivo*, ils ont montré que la surexpression de DNM2 dans des cellules d'adénocarcinome humain accentue leur caractère tumoral. Les cellules transfectées présentaient deux fois plus de lamellipodes (extensions membranaires) et migraient plus vite et plus loin que les cellules contrôles. Par contre, les cellules traitées avec des siRNA anti-*Dnm2* ou bien des inhibiteurs non spécifiques des dynamines (MiTMAB ou Dynasore) présentaient une faible migration cellulaire.

D'autres études ont obtenu des résultats similaires sur des cellules tumorales du glioblastome ou de cancer du col de l'utérus. L'inhibition de DNM2 ou la réduction de son niveau par shRNA réduit fortement le développement, la migration et l'invasion des cellules tumorales (Feng, Liu et al. 2012, Lee, Jeon et al. 2016). Dans les cellules tumorales du glioblastome, les auteurs ont identifié une cascade de signalisation où DNM2 a un rôle de médiateur entre le récepteur α du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR α) et des protéines impliquées dans la survie, la division, la croissance et la prolifération cellulaires comme AKT et ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases).

Enfin, plusieurs mutations du gène *DNM2* ont été identifiées dans des échantillons de leucémie lymphoblastique aiguë (Zhang, Ding et al. 2012, Neumann, Heesch et al. 2013, Van Vlierberghe, Ambesi-Impombato et al. 2013). Une étude a même montré l'existence d'une corrélation entre le niveau d'expression de DNM2 dans les lymphocyte B et la survie des

patients atteints d'une leucémie lymphoblastique aiguë de type B (Ge, Gu et al. 2016). Un taux de survie très faible était observé chez les patients avec des lymphocytes B surexprimant DNMT2. Par contre, l'inhibition de DNMT2 dans une culture cellulaire de lignée lymphoblastique réduit la prolifération cellulaire des cellules tumorales.

Toutes ces études indiquent que la surexpression de DNMT2 pourrait avoir un rôle oncogène et suggèrent la réduction de son expression comme traitement complémentaire aux chimio- et radiothérapies existantes afin de limiter l'invasion tumorale et augmenter l'efficacité des thérapies anticancéreuses.

1.5.2. Maladies infectieuses :

Différentes études montrent la participation de DNMT2 dans l'endocytose des agents pathogènes. En effet, les virus de l'hépatite C et E, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou encore le virus de la fièvre éphémère bovine sont tous internalisés dans la cellule hôte par l'endocytose dépendante de la clathrine et médiée par DNMT2 (Cheng, Shih et al. 2012, Blaising, Levy et al. 2013, Sloan, Kuhl et al. 2013, Holla, Ahmad et al. 2015). Le traitement préalable des macrophages par un inhibiteur de DNMT2 altère l'expression des récepteurs du VIH sur la membrane cellulaire ce qui limite fortement l'entrée des particules VIH (Carter, Bernstone et al. 2011). De plus, DNMT2 interagit avec la protéine Nef et potentialise son action. Cette dernière joue un rôle déterminant dans la pathogénicité et la réplication du VIH (Pizzato, Helander et al. 2007). La diminution de DNMT2 par des siRNA réduit significativement l'infectiosité des particules virales. Récemment, d'autres travaux ont souligné le rôle crucial de DNMT2 dans la fusion du VIH aux lymphocytes T ainsi que la stabilisation des pores de fusion, alors que son inhibition par Dynasore interfère avec ce processus (Jones, Alvarez et al. 2017).

Ces données montrent l'implication de DNMT2 dans les premières étapes de l'infection virale. Ainsi, la réduction de son taux intracellulaire serait une nouvelle cible thérapeutique pour plusieurs maladies infectieuses telles que l'hépatite ou encore le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

2. AAV-shRNA versus ASO, que choisir ?

Les deux approches développées dans ce travail ont montré leur efficacité, leur potentiel et parfois leur limite.

2.1. Avantages et inconvénients des AAV-shRNA :

Initialement isolés comme virus défectueux et contaminants les préparations biologiques, les AAV sont devenus en quelques années des outils extrêmement efficaces pour le transfert des

gènes. En effet, ces petits vecteurs présentent de nombreux avantages qui ont grandement facilité leur développement et optimisation par les différents laboratoires de recherche comme leur caractère inoffensif et la simplicité de leur génome. De plus, ils présentent une capacité extraordinaire à infecter une grande variété de type cellulaire tout en offrant la possibilité de restreindre l'expression de la cassette transgénique à une population cellulaire donnée. Ceci serait possible par la modulation du sérotype viral et le choix d'un promoteur tissu-spécifique contrôlant l'expression de la cassette. Ils sont capables d'assurer une expression à long terme de la cassette transgénique ce qui permettrait de réduire les interventions. Cependant, l'utilisation des AAV montre certains inconvénients qui peuvent limiter leur efficacité. Suite à la transduction virale, son matériel génétique reste sous forme d'épisome et n'intègre pas le génome de la cellule hôte. Une perte du transgène est envisageable pendant les différents cycles de division cellulaire. Dans le muscle squelettique, cette perte serait importante car ce virus est incapable d'infecter les cellules satellites. La repopulation du tissu musculaire par ces cellules pluripotentes non infectées réduirait l'efficacité thérapeutique du transgène. Cette perte du transgène nécessiterait donc d'autres injections afin de maintenir son expression ce qui pourrait déclencher une réponse immunitaire portée par les anticorps anti-AAV produits lors de la première administration. Aussi, il est très important de noter qu'une grande partie de la population humaine est déjà séropositive suite à un contact précoce avec le virus sauvage. Une primo-injection du virus recombinant pourrait induire une réaction immunitaire très sévère. Il serait donc impossible avec cette approche d'affiner les doses ou d'arrêter le traitement ce qui présente une limitation majeure pour un usage thérapeutique. Enfin, les doses requises pour une expression efficace et systémique du transgène chez l'Homme sont extrêmement élevées et nécessitent la production d'une quantité très importante de particule AAV. Au coût de production très élevé (pour Glybera, le coût d'un traitement pour une personne est de 1 million de dollars), s'ajoute le défi technologique de production et de stockage de solutions très concentrées en particule qui reste un obstacle majeur pour l'utilisation de cette stratégie en clinique.

2.2. Avantages et inconvénients des ASO :

L'utilisation des ASO présente de nombreux avantages qui ont accéléré leur utilisation dans divers essais cliniques. Contrairement aux AAV-shRNA, l'injection *in vivo* de ces petits fragments d'ARN ne semble pas induire une réponse immunitaire. De plus, ils ont une demi-vie intermédiaire ce qui permet d'interrompre le traitement et d'ajuster les posologies en fonction des individus et des objectifs visés. Le développement de nouvelles chimies a permis

d'augmenter leur résistance à la dégradation des nucléases et la diminution de leur filtration rénale ce qui a amélioré leur biodisponibilité et leur efficacité. Toutefois, les ASO manquent de spécificité tissulaire ce qui peut générer des effets indésirables dans d'autres tissus. Certaines études montrent que les injections répétées des ASO provoquent une toxicité hépatique et rénale par accumulation des ASO dans le foie et le rein (Swayze, Siwkowski et al. 2007, Herrington, Talbot et al. 2011, van Poelgeest, Swart et al. 2013, Burdick, Sciabola et al. 2014).

3. Autres approches pour inhiber DNM2 :

Outre les AAV-shRNA et les ASO, d'autres molécules chimiques peuvent être utilisées pour bloquer l'activité de DNM2. Elles sont régulièrement utilisées par les différents laboratoires de recherche pour étudier le rôle des dynamines dans les phénomènes biologiques.

Les premières molécules décrites furent MiTMAB et OctMAB (respectivement myristyl trimethyl ammonium bromide et octadecyltrimethyl ammonium bromide) (Hill, Odell et al. 2004). Ces longues chaînes de sel d'ammonium interfèrent avec le domaine PH de DNM2 et bloquent son recrutement à la membrane cellulaire (Quan, McGeachie et al. 2007). Dans un criblage de 16.000 petites molécules, une troisième molécule appelée « Dynasore » a été identifiée comme inhibiteur non-compétitif de l'activité GTPase de DNM1, DNM2 et « Dynamine-related protéine » (Macia, Ehrlich et al. 2006). Des analogues de cette molécule au nom de « Dyngos » ont été synthétisés par ajout de groupes dihydroxyl et trihydroxyl afin d'améliorer l'activité inhibitrice et diminuer la toxicité cellulaire observée avec la molécule mère (McCluskey, Daniel et al. 2013). Les « Dynoles » représentent une autre série d'inhibiteurs non-compétitifs qui possèdent une meilleure perméabilité cellulaire (Hill, Gordon et al. 2009). D'autres molécules initialement développées pour inhiber DNM1 présentent une activité inhibitrice pour DNM2 comme les tyrphostines dimériques, les iminodynes et les pthaladynes (Hill, Odell et al. 2005, Hill, Mariana et al. 2010, Odell, Howan et al. 2010).

Toutes ces molécules bloquent de façon non-spécifique les différentes dynamines et, à ce jour, aucun inhibiteur spécifique de DNM2 n'a été identifié. L'utilisation de ces inhibiteurs *in vivo* pourrait générer des effets secondaires par blocage de DNM1, DNM3 et les autres « dynamine related ».

4. Autres approches thérapeutiques très prometteuses :

Dans la revue, j'ai essayé de regrouper toutes les approches thérapeutiques développées par les différents groupes pour la myopathie myotubulaire. Tandis que certaines montrent des effets très limités et locaux, d'autres montrent des effets thérapeutiques très prometteurs.

La thérapie génique développée par le laboratoire d'Ana Buj-Bello est la première stratégie thérapeutique testée sur la myopathie myotubulaire. Cette approche repose sur le remplacement du gène *MTM1* défectueux par un autre délivré par des vecteurs AAV. L'administration systémique des virus AAV-*MTM1* dans les souris et les chiots Labrador déficients en *MTM1* prolonge leur survie et restaure la fonction et l'histologie musculaire (Childers, Joubert et al. 2014, Mack, Poulard et al. 2017). Cependant, une surexpression de 600 fois de la protéine transgénique a été quantifiée dans les cœurs des souris injectées qui était accompagnée de quelques défauts structuraux du myocarde. Cette surexpression peut être due à l'activité du promoteur choisi. Les résultats du docteur Ana Buj-Bello et du docteur Martin Childers ont été générés avec le promoteur Desmine. Bien qu'il soit actif dans le muscle squelettique, il présente une forte activité dans le muscle cardiaque. Pour une application chez l'homme, il serait nécessaire de remplacer le promoteur Desmine par un autre qui permet d'assurer une expression de *MTM1* proche des niveaux physiologiques dans les différents organes infectés. Les conséquences que peut engendrer l'expression de la protéine transgénique dans des cellules déficientes en *MTM1* sont encore inconnues. La présence de *MTM1* exogène pourrait déclencher une réaction inflammatoire ou immunitaire au sein de la cellule en activant les différents mécanismes de défense cellulaire. A cela s'ajoutent les inconvénients que présentent l'utilisation des AAV discutés auparavant.

Une autre stratégie thérapeutique a récemment été développée par l'équipe du docteur James Dowling. Le rééquilibrage du niveau des phosphoinositides par inhibition des kinases à phosphoinositide de classe II a permis de prolonger la survie et d'améliorer la fonction musculaire des souris *Mtm1KO* (Sabha, Volpatti et al. 2016). Ces résultats ont été obtenus par inactivation totale du gène *Pik3c2β* qui code pour la kinase à phosphoinositide PIK3C2B (souris double mutante *Mtm1KO/ Pik3c2βKO*). Alors que l'absence de *MTM1* cause une élévation de ses substrats dont PtdIns(3)P, la délétion totale du gène *Pik3c2β* permet de réduire son niveau cellulaire et de corriger le phénotype musculaire des souris *Mtm1KO*. Par contre, la délétion partielle du gène *Pik3c2β* (souris *Mtm1KO/ Pik3c2βHTZ*) montre une amélioration phénotypique très limitée. Cette observation montre qu'il faut inactiver complètement le gène *Pik3c2β* pour avoir une amélioration complète. L'obtention de cette abolition serait impossible avec les outils technologiques disponibles à l'heure actuelle. Par ailleurs, une aggravation du phénotype des souris *Mtm1KO* a été rapportée lorsque le gène *Pik3c3* (kinase à phosphoinositides de classe III) était inactivé. Ceci montre que seul le blocage spécifique de la kinase à phosphoinositide de classe II permet de corriger les défauts musculaires des souris

Mtm1KO ce qui implique le développement d'inhibiteurs spécifiques de la kinase à phosphoinositide de classe II. Parmi les molécules disponibles, aucune ne montre une activité spécifique à PIK3C2B.

Conclusion générale :

Le but de ma thèse était de développer, tester et valider des approches thérapeutiques visant à réduire et contrôler le niveau de DNM2, une protéine surexprimée dans les muscles de patients atteints de la forme liée à l'X de la myopathie centronucléaire.

L'étude menée avec les AAV-shRNA m'a permis d'identifier deux candidats *shDnm2* (shRNA C et I) qui ciblent et réduisent efficacement DNM2 dans les muscles de souris *Mtm1KO*. Une seule injection intramusculaire de ces vecteurs était suffisante pour rétablir la fonction et l'histologie musculaire. Cependant, à cause de problèmes techniques, mes essais se sont limités aux injections locales des AAV-*shDnm2*. Il serait très intéressant d'évaluer l'efficacité de ces vecteurs par injection systémique et analyser les effets positifs obtenus.

J'ai également pu tester l'efficacité des ASO-*Dnm2* par différents protocoles d'injection. L'administration locale de ces composés a montré une amélioration des différents défauts musculaires ce qui m'a aidé à sélectionner un candidat pour les injections systémiques. Dans deux protocoles à but préventif ou curatif, l'administration systémique des ASO-*Dnm2* pouvait prévenir l'apparition des différents symptômes de cette myopathie et même corriger et restaurer les défauts cliniques et histopathologiques chez des souris très affectées. Ces résultats extrêmement encourageants reflètent la puissance de la chimie ASO utilisée et montrent le potentiel de cette approche thérapeutique.

Ce travail de thèse fait l'objet d'un programme de développement préclinique qui sera validé très prochainement avec des composés spécifiques à la DNM2 humaine pour des essais cliniques chez les patients atteints de myopathie myotubulaire.

Enfin, cette approche thérapeutique très prometteuse montre un intérêt aussi bien pour d'autres formes de myopathie centronucléaire que pour d'autres pathologies musculaires ou non musculaires. Les méthodes testées ainsi que les résultats obtenus dans ce travail serviront de référence pour les études futures qui, je l'espère, aboutiront à la guérison de patients.

ANNEXE



Publication 3

*Antagonistic epistasis between amphiphysin 2 (BIN1)
and dynamin 2 is essential for normal muscle
development, structure and function*

Belinda S. COWLING, Ivana PROKIC, Hichem TASFAOUT, Frédéric
HUMBERT, Anne-Sophie NICOT, Christine KRETZ, Aurélien ROUX,
Jocelyn LAPORTE.

3. Epistasie génétique entre *Bin1* et *Dnm2* dans le muscle squelettique :

Publication 3 : “ Antagonistic epistasis between amphiphysin 2 (BIN1) and dynamin 2 is essential for normal muscle development, structure and function ”

a) Contexte de l'étude :

La réduction de DNM2 semble une approche très prometteuse pour le traitement de la myopathie myotubulaire. Les résultats obtenus par croisement génétique ou bien par administration d'AAV-shRNA ou ASO confirment le lien génétique entre *Mtm1* et *Dnm2*.

A ce jour, aucune étude n'a pu montrer un lien physique direct entre MTM1 et DNM2. En revanche, BIN1 semble être un intermédiaire dans cette régulation. Cette protéine joue un rôle clé dans le remodelage de la membrane cellulaire et ses mutations sont responsables de deux formes autosomiques de myopathie centronucléaire (Nicot, Toussaint et al. 2007, Bohm, Biancalana et al. 2014). Des données générées par le laboratoire d'accueil montrent qu'en effet MTM1 interagit avec BIN1 et régule son activité de tubulation tandis que les formes mutées de BIN1 présentent des changements de conformation qui altèrent cette régulation (Royer, Hnia et al. 2013). D'autre part, ces mutations diminuent fortement l'interaction moléculaire de BIN1 avec DNM2, comme le montre des expériences « GST-pull down » ou par colocalisation dans des cellules en culture. Cette interaction semble être essentielle pour la biogénèse des tubules-T observée *in vitro*. Aucune étude n'a pu confirmer ce lien *in vivo*. Il est donc capital de vérifier s'il existe une épistasie génétique entre *Bin1* et *Dnm2* dans le muscle squelettique.

b) Résultats :

Afin de répondre à cette question, nous avons étudié l'interaction de BIN1 avec DNM2 dans la physiologie des muscles squelettiques et ceci par modulation de leur expression. En effet, pendant mon stage de master, j'ai participé au phénotypage des souris *Bin1KO/Dnm2HTZ* obtenues par croisement génétique. Les souris déficientes en BIN1 présentent une létalité périnatale probablement due à hypoglycémie. L'absence de lait maternel dans l'estomac des nouveau-nés suggère une hypotonie des muscles requis pour la déglutition. En revanche, j'ai constaté que les souris *Bin1KO* et hétérozygotes pour le gène *Dnm2* vivaient plus longtemps. Plus surprenant, ces doubles mutants présentaient une force musculaire normale. En analysant la courbe de croissance, j'ai trouvé que leurs poids étaient normalisés. De plus, j'ai noté que ces souris étaient capables d'effectuer différents tests cliniques avec la même force et endurance que les souris sauvages. Aussi, j'ai trouvé que ces souris présentent une normalisation de la

taille des myofibres et de la distribution mitochondriale. Mais contre toute attente, j'ai pu constater une élévation du nombre de fibre avec noyaux centralisés. Cette découverte montre que, contrairement à la position des noyaux, la taille des fibres est très importante pour le bon fonctionnement du muscle.

c) Contribution :

Dans cette étude, j'ai caractérisé les souris à 10 semaines. J'ai effectué les tests cliniques afin d'évaluer la résistance et la force musculaire. J'ai analysé l'histologie musculaire et effectué les western blot pour quantifier le niveau des protéines. Les autres âges (6 et 12 mois) ont été phénotypés par Belinda COWLING et Ivana PROKIC. L'activité GTPase a été mesurée *in vitro* par le laboratoire du docteur Aurélien ROUX.

d) Conclusion :

Les résultats de cette étude mettent en évidence un lien entre BIN1 et DNM2 dans le muscle squelettique et renforcent l'hypothèse d'une voie de signalisation commune entre MTM1, BIN1 et DNM2. Plus important, les effets positifs et remarquables observés chez les souris *Bin1KO/Dnm2HTZ* suggèrent la réduction de DNM2 comme piste thérapeutique. DNM2 serait donc une cible thérapeutique pour le traitement de plusieurs formes de myopathie centronucléaire.

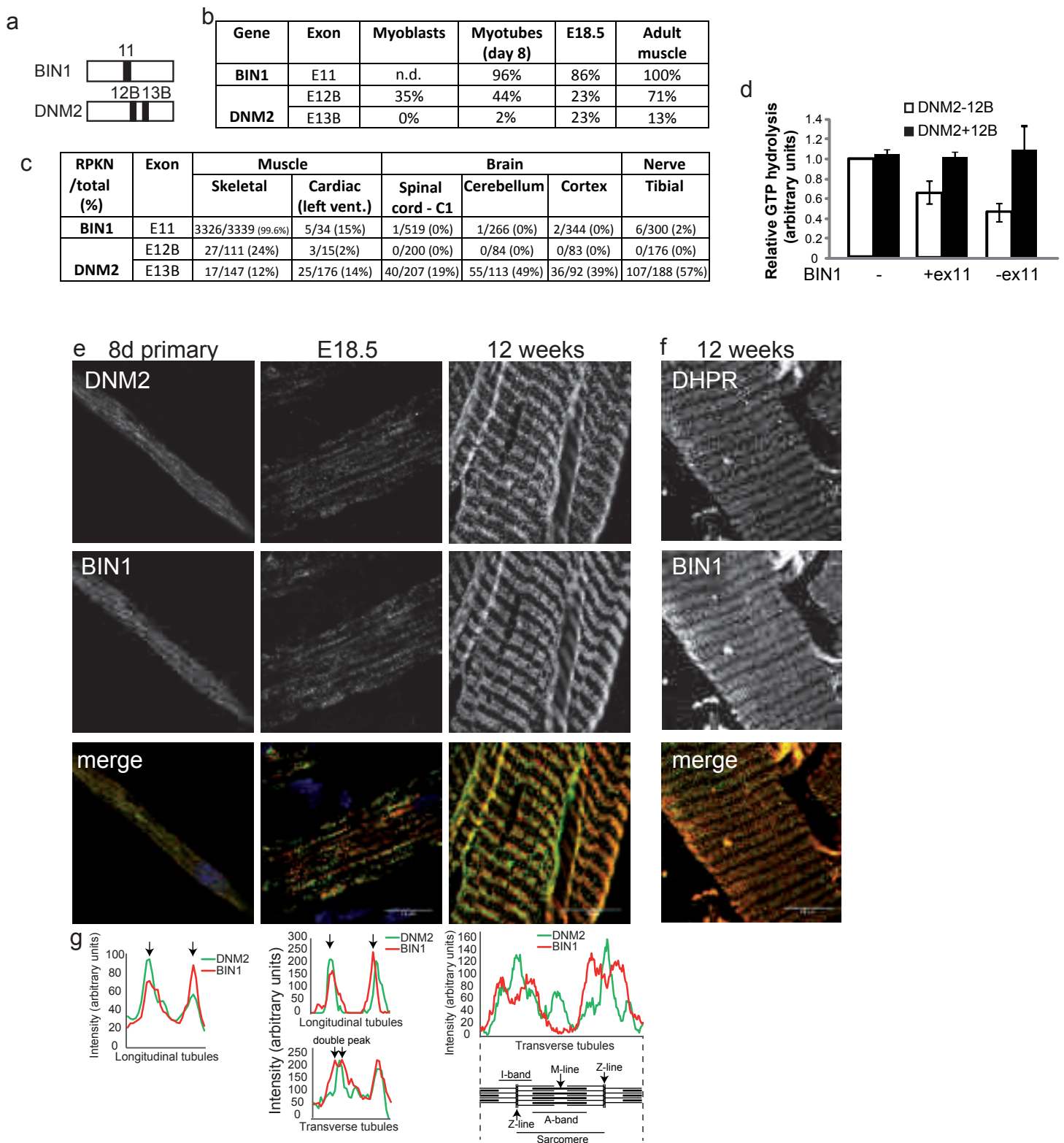


Figure 1. BIN1 and DNM2 in skeletal muscle development.

(a) Position of alternative exons (not to scale). (b) Expression of BIN1 and DNM2 isoforms detected at various stages of muscle differentiation. Isoforms were identified by RT-PCR followed by cDNA cloning and sequencing. The percentage of clones for each isoform is indicated ($n = >30$ clones per muscle sample). (c) Number of bridging reads over total reads identified in GTEx (reads per kilobase per million mapped reads, RPKM) for BIN1 and DNM2 isoforms represented in (a). (d) Malachite green assay with DNM2 (+ or -12B) and BIN1 (+e11 (Iso8) and -e11 (Iso9)) isoforms. Results are shown in arbitrary units relative to DNM2-12B alone. Results are an average of 2 independent experiments. Graph represents mean + standard deviation. (e) Immunofluorescence staining of longitudinal murine muscle at 8 days (primary myotubes, 8d primary), embryonic day 18.5 (E18.5), and adult mouse muscle (12 weeks) from wildtype mice. DNM2 (upper panel, green in merge) and BIN1 (middle panel, red in merge) immunolabelling is shown. Merge overlay (lower panel) images are shown. Scale bar 10 μ m. (f) Immunofluorescence staining of semi-thin (200nm) sections from wildtype mice, DHPR (upper panel, red in merge) and BIN1 (middle panel, green in merge). Scale bar 10 μ m. (g) Intensity scans spanning one complete sarcomere from the above images.

31 Skeletal muscle requires adequate membrane remodeling to achieve and maintain its normal
32 structure and function¹. It is thus not surprising that several human myopathies are due to mutations
33 in proteins implicated in membrane trafficking and remodeling². Amphiphysins and dynamins are
34 recognized hubs in the membrane trafficking pathway and are known to physically interact in cells.
35 Amphiphysin 2 (BIN1) and dynamin 2 (DNM2) are mutated in rare congenital myopathies called
36 centronuclear myopathies (CNM)³⁻⁵, characterized by severe muscle weakness and hypotonia
37 associated to mislocalization of nuclei and other organelles and the abnormal orientation and shape
38 of T-tubules in skeletal muscle fibers⁶.

39 BIN1 contains a BAR domain that can sense and induce membrane curvature^{7,8} and a C-terminal
40 SH3 domain binding to different effectors containing a proline-rich domain (PRD) as dynamins.
41 Based on its membrane tubulation properties and on the phenotype of the amphiphysin drosophila
42 mutant, BIN1 was proposed to participate to the biogenesis of T-tubules, plasma membrane
43 invaginations forming with the reticulum calcium stores the structural basis of the excitation-
44 contraction coupling machinery in cardiac and skeletal muscle^{9,10}. BIN1 recessive mutations in
45 CNM either impair its membrane tubulation properties, its binding to dynamin 2, or the inclusion
46 of a muscle-specific exon encoding a phosphoinositide (PI) binding domain^{4,5,11}. DNM2 is a large
47 GTPase involved in membrane fission¹². Biochemical studies indicated that several DNM2
48 mutations causing CNM increase dynamin oligomer stability and GTPase activity¹³⁻¹⁵.
49 Overexpression of wildtype DNM2 leads to CNM-like features in mice and perturbation of muscle
50 and T-tubules in drosophila¹⁵⁻¹⁷. Altogether, we hypothesize CNM mutations in DNM2 create a
51 gain-of-function. Here, to study the genetic and functional links between BIN1 and DNM2, we
52 characterized their muscle isoforms and localization through development and in adult, and created
53 a Bin1^{-/-} mouse and modulated DNM2 expression in this model to study the physiological impact
54 of the BIN1/DNM2 balance.

55 BIN1 and DNM2 are ubiquitously expressed. To tackle the molecular basis of their muscle-
56 specificity, their RNA isoforms were identified by RT-PCR, cDNA cloning and sequencing during
57 muscle cell maturation in culture, at late embryogenesis and in adult muscle. It was shown
58 previously that BIN1 has at least 10 different splicing isoforms, with iso8 containing the
59 phosphoinositide (PI) binding domain (exon 11, Fig. 1a) highly expressed in skeletal muscle^{5,18,19}.
60 BIN1-iso8 is highly expressed in myotubes differentiated for 8 days, and mouse embryonic (day
61 18.5) and adult muscles (80-100% of isoforms detected) (Fig. 1b), while it was barely present in

62 undifferentiated myoblasts⁵, identifying BIN1-iso8 is the main isoform expressed throughout
63 muscle development. Moreover, mining GTEx data identified BIN1-iso8 was skeletal muscle-
64 specific where it represents 99.6 % of isoforms found (Fig. 1c)²⁰. Four transcripts of DNM2 have
65 been previously characterized²¹. In addition, we detect the presence of an in-frame exon located
66 between exons 12 and 13, consisting of 30 nucleotides coding for the predicted murine protein
67 sequence ‘CFYTEELVTG’, which we named exon 12B (Fig. 1a). Inclusion of exon 12B
68 (DNM2+12B) increased from 35% in myoblasts to 44% in differentiated myotubes, and
69 throughout muscle development from 23% (E18.5) to 71% in adult muscle (Fig. 1b). DNM2 exon
70 12B is specific for skeletal muscle among 43 human tissues (Fig. 1c)²⁰. As dynamin proteins are
71 GTPase enzymes, we measured GTPase hydrolysis by DNM2, with or without BIN1 isoforms.
72 DNM2-12B activity was reduced by the addition of BIN1 +/- exon 11 (Fig. 1d). DNM2+/-12B
73 had a similar baseline activity in the presence of lipids, however GTPase activity of DNM2+12B
74 in the presence of BIN1 isoforms was unaffected, indicating BIN1 isoforms inhibit GTP hydrolysis
75 by the ubiquitous, but not the skeletal muscle-specific isoform of DNM2. Thus, muscle maturation
76 correlates with the appearance and predominance of muscle-specific BIN1 and DNM2 isoforms,
77 which impacts on the function of DNM2 in different stages of skeletal muscle development.

78 Inclusion of the PI binding domain in BIN1 increases its membrane tubulation properties⁹
79 while BIN1 alteration correlates with T-tubules defects²²⁻²⁴. During muscle development forming
80 T-tubules have first a longitudinal orientation and are then reoriented to their final transverse
81 orientation during the first 3 weeks postnatally in mice²⁵. To correlate the appearance of BIN1 and
82 DNM2 muscle-specific isoforms with muscle maturation, their localization was investigated. In
83 myotubes and E18.5 muscle fibers, BIN1 and DNM2 co-localized extensively on longitudinal
84 tubules (Fig. 1e,g). In adult muscle, BIN1 localized on transversal T-tubules with the voltage-
85 dependent calcium channel DHPR, while DNM2 staining was more intense at the Z-line and I-
86 band and only partially overlaps with BIN1 at the edge of the I-band (Fig. 1e-g). These data
87 indicate BIN1 and DNM2 may function together in muscle maturation and that increased inclusion
88 of exon 12B in DNM2 correlates with its re-localization away from T-tubules.

89 To study the interplay between BIN1 and DNM2 during muscle maturation, *Dnm2*+/- and
90 *Bin1*-/- mice were created. The *Dnm2*+/- mice are viable without obvious phenotypes²⁶. To
91 develop a mouse model for autosomal recessive BIN1-CNM, we floxed exon 20 that is frequently
92 mutated in patients and encodes for the SH3 domain⁵(Supplementary Fig.1). Following either

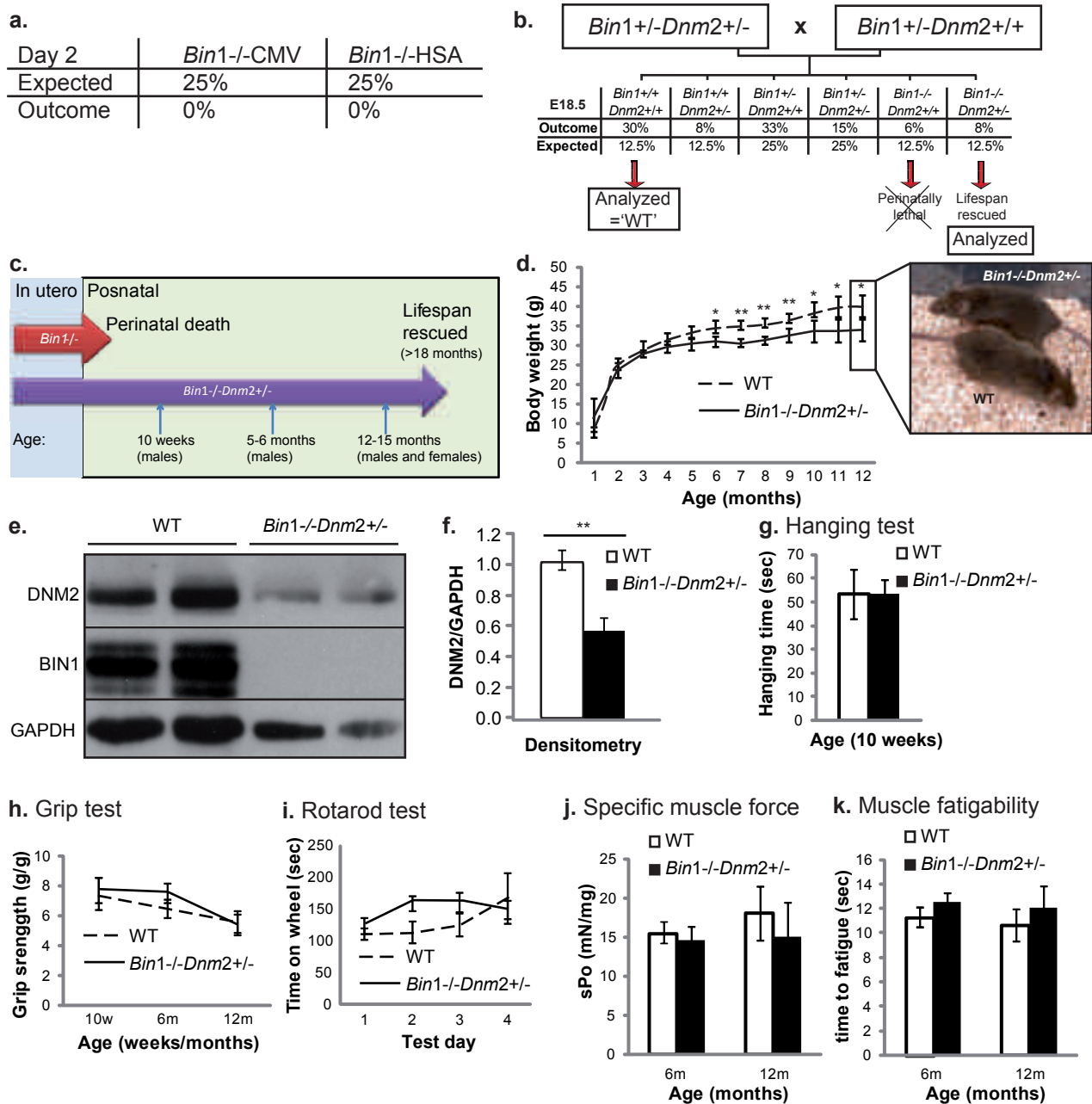


Figure 2. DNM2 downregulation rescues the neonatal lethality of *Bin1*^{-/-} mice.

(a) Expected and obtained percentage of mice identified at day 2 postnatally with *Bin1*^{-/-} genotype after excision with Cre recombinase under the control of the CMV (all tissues) or HSA (skeletal muscle) promoters. (b) Breeding strategy and outcome for *Bin1*^{-/-}-*Dnm2*^{+/-} mice, with expected and obtained percentage of mice at embryogenic day 18.5 (E18.5). (c) Overview of lifespan and time points used to analyze *Bin1*^{-/-}-*Dnm2*^{+/-} mice. (d) Mice whole bodyweight, and representative photo of mice at 12 months of age. Note all genotyped *Bin1*^{-/-}-*Dnm2*^{+/-} mice survived more than 12 months of age. (e) Immunoblot analysis of DNM2 and BIN1 protein expression from muscle lysates. (f) Relative level of DNM2 protein expression was determined by densitometry of DNM2 signal standardized to GAPDH. (g) Hanging test where young 10 week old mice were required to hang from a cage lid for up to 60 seconds. (h) 4-paw grip test. (i) Rotarod test performed under acceleration mode (4-40 rpm in 5 minutes). n=3 trials/mouse/day, 6 month old mice. (j) Specific muscle force of the tibialis anterior (TA) muscle (mN force/mg TA muscle). (k) Fatigue of the TA muscle, measured as the time taken to reach 50% of the maximum muscle force (seconds). All graphs depict mean \pm s.e.m. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) (w=weeks, m=months).

93 constitutive or skeletal muscle deletion with CMV or Human skeletal actin (HSA) promoters
94 driving the Cre recombinase, *Bin1*^{-/-} was neonatally lethal in mice with no pups surviving the first
95 day of postnatal life (Fig. 2a,b). A similar perinatal lethality was previously reported for another
96 constitutive *Bin1*^{-/-} mouse deleted for exon 3 and the phenotype was first attributed to severe
97 ventricular cardiomyopathy²⁷; however mice with exon 3 cardiac-specific deletion survived to
98 adulthood²⁸. At least in our *Bin1*^{-/-} model, the lethality is due to a primary defect of skeletal muscle
99 and this confirms an essential role of BIN1 in perinatal muscle maturation. Similarly, most BIN1-
100 CNM patients display neonatal muscle weakness and several died within the first year⁵.

101 Recessive BIN1-CNM is due to BIN1 loss-of-function and DNM2-CNM probably due to
102 DNM2 gain-of-function^{3,5,15}. We hypothesize these two proteins are in the same pathway for
103 muscle maturation and that reducing DNM2 expression might rescue the neonatal lethality
104 observed in *Bin1*^{-/-} mice. To this end we produced *Bin1*^{-/-} mice with reduced DNM2 expression
105 (*Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-}) (Fig. 2b,c). Unlike *Bin1*^{-/-} mice, *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} mice are viable to at least 18
106 months (oldest age at sacrifice), with only a slight but significant reduction in bodyweight from 6
107 months of age compared to *Bin1*^{+/+}*Dnm2*^{+/+} (thereafter named WT) littermates (Fig. 2d).
108 Furthermore *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} mice appeared healthy (Fig. 1d, Supplementary videos 1-3). No
109 difference was observed between WT and *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} mice in blood metabolites, liver function,
110 organ weight or histology in brain and liver at 12 months (Supplementary Fig. 1). No difference
111 in muscle mass or histology of the heart was noted, as ventricle thickness was similar and no
112 increased fibrosis was observed at 12 months (Supplementary Fig. 2). Western blot confirmed that
113 BIN1 protein expression was barely detectable in *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} mice and that DNM2 expression
114 was reduced to approximately 50% of WT levels (Fig. 2e,f), therefore validating that reducing
115 DNM2 expression can rescue the neonatal lethality caused by BIN1 defect.

116 As *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} and WT mice appeared clinically similar, we focused on muscle-related
117 functions. No difference was observed in hanging test, grip test and rotarod performance at all
118 different ages analyzed (10 weeks, 6 months, and 12 months) and for both sex (Fig. 2g-i,
119 Supplementary Fig. 3 and 4). No difference in muscle weights of gastrocnemius, soleus, extensor
120 digitorum longus (EDL), or tibialis anterior (TA) skeletal muscles was observed in *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-}
121 mice compared to WT (Supplementary Fig. 3). Specific muscle force and fatigability were
122 measured *in situ* in the tibialis anterior muscle at 6 and 12 months of age, and no difference
123 between groups was observed (Fig. 2j,k, Supplementary Fig. 4). Overall these results indicate

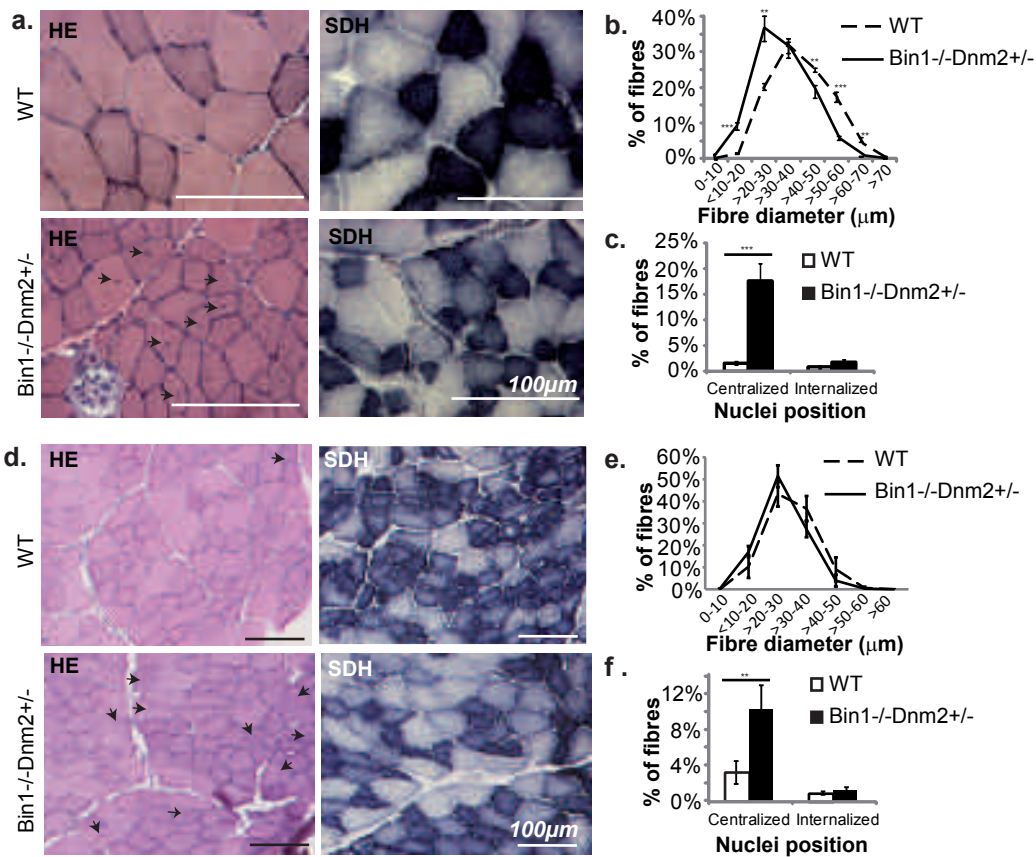


Figure 3. Skeletal muscle histology is mildly affected in surviving *Bin1*^{-/-} mice with reduced DNM2 expression.

Transverse TA sections from 10 week (a) or 12 month old (d) mice were stained with HE or SDH. Scale bar 100µm. HE muscle sections were then analyzed for fiber area for 10w (b) and 12m (e). Fiber diameter is grouped into 10 µm intervals, and represented as the percentage of total fibers. (c, f) The frequency of fibers with central or internal nuclei were scored. Internal nuclei are defined as not subsarcolemmal nor central. All graphs depict mean ± s.e.m. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) (n=minimum 5 mice per group) (w=weeks, m=months).

124 *Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}* have normal whole body strength and coordination, and individual muscle strength.
125 As no *Bin1^{-/-}* mice survive past 24 hours, their strength cannot be compared in these mice.

126 To determine if the skeletal muscle structure was affected in *Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}* mice, TA
127 muscle cryosections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and succinate dehydrogenase
128 (SDH, mitochondrial enzyme) at 10 weeks and 12 months of age. At 10 weeks muscle fibers were
129 slightly but significantly smaller than WT while by 12 months this difference was not significant
130 (Fig. 3a,b,d,e). No difference was observed in SDH staining at either time point. The main
131 sustained difference was a 9-fold increase in centralized nuclei at 10 weeks in up to 20% of fibers
132 and to a lesser extent at 12 months (Fig. 3a,c,d,f). BIN1-CNM histology is characterized by
133 hypotrophic fibers with more than 90% of mislocalized internal nuclei in patient biopsies²⁴,
134 reminiscent of an important role of BIN1 in nuclear positioning²⁹. The slight CNM-like
135 histological features in *Bin1^{-/-}* mice with reduced DNM2 level appear compatible with normal
136 muscle strength and coordination.

137 As BAR proteins can remodel membrane *in vitro* and as *Bin1* downregulation with shRNA
138 in adult muscle led to swollen T-tubules^{23,30}, the sarcomere and triad structure was investigated. In
139 *Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}* mice, DNM2 localization was unperturbed and co-localized at the z-line with α -
140 actinin in 10 weeks and 12 months old mice (Fig. 4a, Supplementary Fig. 5). By electron
141 microscopy, no obvious structural defects were observed, Z-lines appeared well aligned,
142 myofibrils were of a similar size, and no major differences in organelle size or positioning was
143 noted (Fig. 4d). In adult *Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}* mice, localization of DHPR (T-tubule), RYR1 (junctional
144 sarcoplasmic reticulum) and SERCA (longitudinal sarcoplasmic reticulum) was normal on both
145 longitudinal and transversal sections indicating no disruption to the triads (Fig. 4b, Supplementary
146 Fig. 5). Caveolin 3 (CAV3) and dysferlin are localized at the T-tubule during muscle development
147 and regeneration, and at the sarcolemma in non-regenerating mature muscle³¹. CAV3 and dysferlin
148 immunolabelling was positive at the sarcolemma in *Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}* and WT mice, supporting
149 normal development and maintenance of the T-tubules (Fig. 4c, Supplementary Fig. 5). Triads are
150 well formed with normal membrane shape, and the number of detectable T-tubules per sarcomere
151 was equivalent to WT (Fig. 4d,e). Overall, while BIN1 defect lead to neonatal lethality from a
152 primary skeletal muscle default, decreased expression of DNM2 rescues the lifespan of the animals
153 and associates to normal T-tubules maturation and maintenance compatible with normal muscle
154 force and animal behavior.

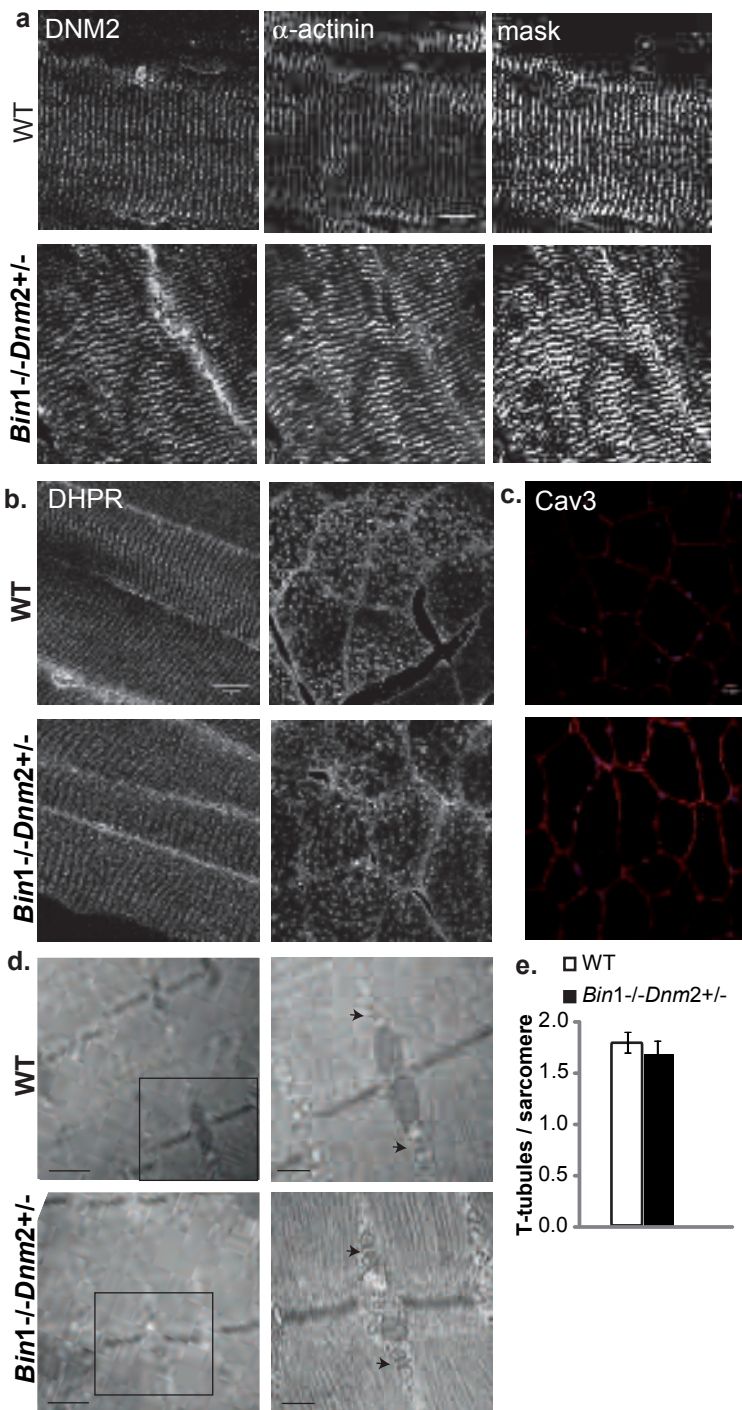


Figure 4. Normal muscle structure and ultrastructure in *Bin1-/-Dnm2+/-* mice

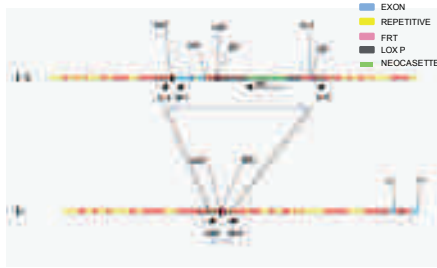
(a) Longitudinal muscle sections were co-stained for DNM2 (left panel) and α -actinin (middle panel) and imaged by confocal microscopy. Mask image shows areas of co-localization (right panel). Scale bar 10 μ m. (b) Longitudinal (left panel) and transverse (right panel) muscle sections were stained with the T-tubule marker DHPR. Scale bar 10 μ m. (c) Transverse muscle sections stained with Cav3 antibody and viewed by confocal microscopy. Scale bar 10 μ m. (d) Longitudinal muscle sections viewed by transmission electron microscopy. Low magnification images in left panel (scale bar 0.5 μ m); high magnification images shown in right panel (scale bar 200nm). Arrows point to the triad. All samples from 12 months old mice. (e) The number of T-tubules per sarcomere was calculated from TEM images in (d).

155 The ubiquitous BIN1 and DNM2 proteins are well known to participate in membrane
156 remodeling during endocytosis and *in vitro* data suggested amphiphysin proteins recruit and
157 activate dynamins³². Here the antagonistic balance between BIN1 and DNM2 supports that BIN1
158 is a negative regulator of DNM2 *in vivo*, at least in skeletal muscle. During muscle development
159 BIN1-DNM2 strongly co-localize (Fig. 1). The appearance and enrichment of muscle-specific
160 BIN1 and DNM2 isoforms correlate with the maturation of T-tubules and the re-localization of
161 DNM2 to actin-rich Z disc partly away from the triad. BIN1 and DNM2 muscle-specific exons
162 encode for amino acids that are located within or close to regions essential for intramolecular
163 regulation, the PI-binding domain binds the SH3 domain in BIN1³³ and for DNM2 the PH-stalk
164 domains interface³². Thus, BIN1 and DNM2 achieve muscle-specific functions during muscle
165 maturation. As *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} mice develop normally to adulthood with well-organized triads
166 without BIN1, it is rather the BIN1-DNM2 balance that is important for muscle maturation and
167 maintenance. Potentially, unregulated DNM2, due either to BIN1 alteration or DNM2 mutations,
168 would compromise muscle maturation/maintenance and lead to centronuclear myopathies.

169 Here we show reducing DNM2 in *Bin1*^{-/-} mice rescues its neonatal lethality. We recently
170 discovered that reduction of DNM2 can rescue the lifespan and several pathological features of a
171 murine model of myotubular myopathy which is the X-linked form of centronuclear myopathy due
172 to mutations in the PI phosphatase MTM1²⁶. Altogether, these results indicate both MTM1 and
173 BIN1 act upstream of DNM2. Indeed BIN1-CNM mutations interfere with its ability to interact
174 with MTM1 and DNM2^{5,34}, indicating the importance of this pathway in muscle and disease.
175 Moreover, DNM2 downregulation becomes a potential strategy to rescue several myopathy forms
176 (linked to either MTM1 or BIN1 mutations). This adds credit to the concept of “cross-therapy”
177 where phenotypes due to loss of a CNM protein (MTM1 or BIN1) is rescued by downregulating
178 another CNM protein (DNM2). As BIN1 was also implicated in several cancers, arrhythmia and
179 late-onset Alzheimer disease³⁵, the epistasis and potential therapeutic approach demonstrated here
180 for myopathies may trigger novel research directions for these common diseases.

181 In conclusion, we show here that reduction of DNM2 can rescue the neonatal lethality due
182 to BIN1 alteration in mice and that the balance between muscle-specific isoforms of BIN1 and
183 DNM2 is necessary for perinatal muscle maturation. These findings highlight that BIN1 is a
184 negative regulator of DNM2 *in vivo*, at least in muscle maturation, and support DNM2
185 downregulation as a therapeutic strategy to rescue several myopathy forms.

A. Targeted disruption of mouse Bin1



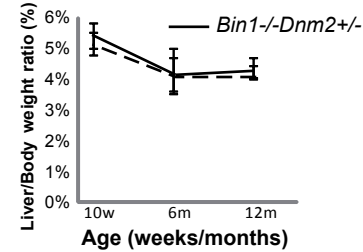
B. General bloodwork

		Total proteins	Glucose	Insulin	Ca	Creatinine	Urea
		g/l	mmol/l	µg/l	mmol/l	µmol/l	mmol/l
WT	Average	50,25	11,39	5,33	2,61	11,27	8,68
	s.e.m	4,06	0,47	3,01	0,16	2,45	0,82
<i>Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}</i>	Average	53,00	10,72	1,63	2,53	10,81	9,65
	s.e.m	2,00	2,18	0,36	0,09	0,33	1,95
	t-test	0,50	0,75	0,25	0,68	0,77	0,42

C. Cholesterol metabolism

		Total Chol.	TG	FFA	True Triglycerides	Glycerol
		mmol/l	mmol/l	mEq/l	mmol/l	µmol/l
WT	Average	3,11	1,31	0,59	1,03	220,93
	s.e.m	0,42	0,25	0,11	0,27	16,11
<i>Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}</i>	Average	3,09	0,96	0,62	0,54	313,30
	s.e.m	0,38	0,33	0,03	0,29	129,30
	t-test	0,62	0,58	0,56	0,33	0,20

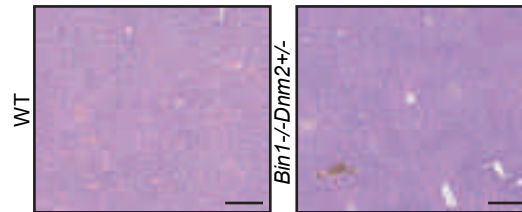
D. Liver



E. Liver function

		ASAT	ALAT
		U/l	U/l
WT	Average	81,60	23,80
	s.e.m	23,38	5,21
<i>Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}</i>	Average	109,33	24,33
	s.e.m	44,36	3,56
	t-test	0,26	0,60

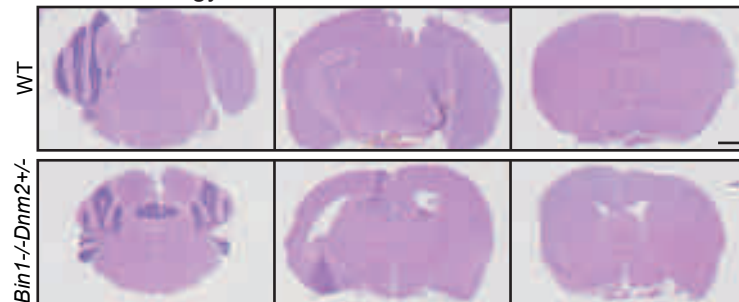
F. Liver histology



G. Muscle function

		CK	IGF-1
		U/l	ng/ml
WT	Average	814.2	324.7
	s.e.m	281.46	140.7
<i>Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}</i>	Average	642.33	250.1
	s.e.m	430.7	13.7
	t-test	0.77	0.64

H. Brain histology



Supplementary figure 1. Analysis of several organs and whole body metabolism in *Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}* mice

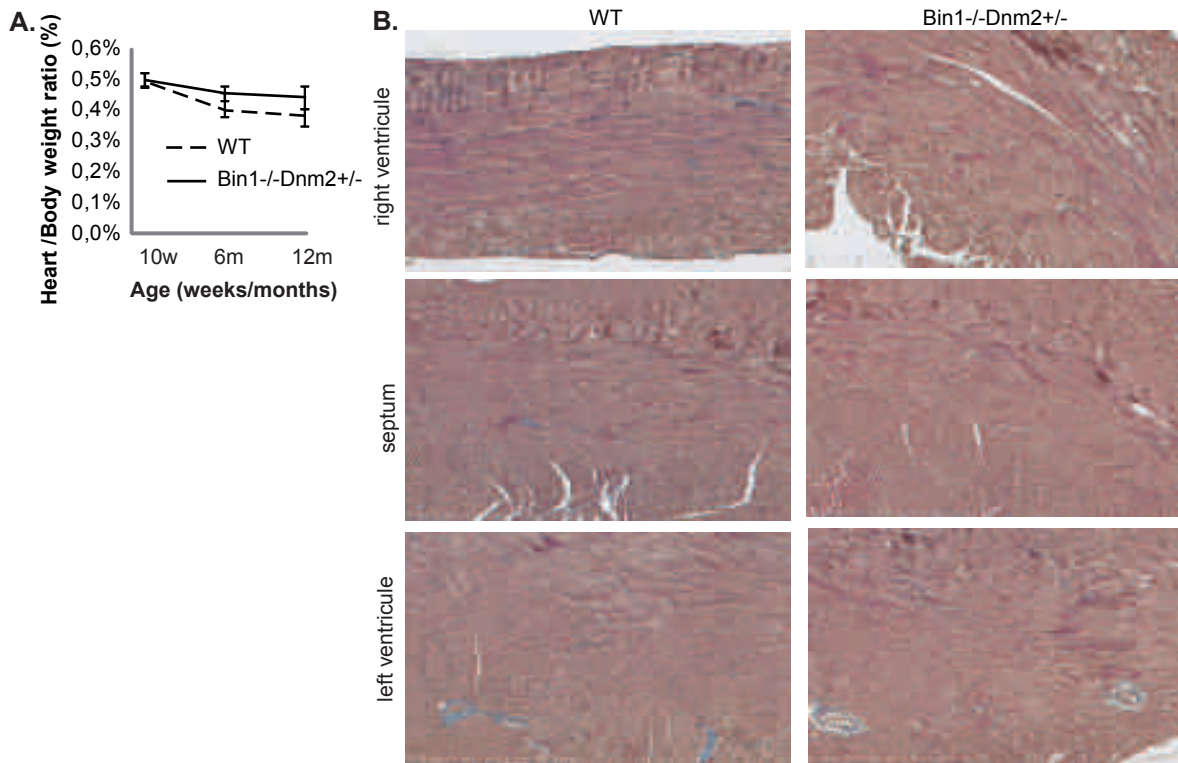
(a) Targeted disruption of mouse Bin1 gene. (b) Plasma levels of total proteins (g/l), glucose (mmol/l), insulin (µg/l), calcium (Ca, mmol/l), creatinine (µmol/l), and urea (mmol/l). (c) Cholesterol metabolism measured from blood plasma. Liver organ/body weight (d), liver enzymes from plasma (e) and 10µm HE histological sections (f); scale bar 250µm. (g) Creatine kinase and IGF-1 total levels measured in blood plasma. (h) HE staining of 10µm brain sections; scale bar 1mm.

186 METHODS

187 **Materials.** Primary antibodies used were: mouse anti-DHPR α_1 (Ca $_v$ 1.1) subunit (MA3-920;
188 Affinity Bioreagents), α -actinin (EA-53, Sigma-Aldrich), caveolin-3 (clone 26, BD Biosciences),
189 BIN1 (C99D, Upstate), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, MAB374;
190 Chemicon). Rabbit anti-DNM2 antibodies (R2680 and R2865)¹, anti-BIN1 (R2405)² and anti-
191 MTM1 (R2827)³ were made onsite at the polyclonal antibody facility of IGBMC. Alexa-
192 conjugated secondary antibodies were purchased from Invitrogen. Secondary antibodies against
193 mouse and rabbit IgG, conjugated with horseradish peroxidase (HRP) were purchased from
194 Jackson ImmunoResearch Laboratories. ECL chemiluminescent reaction kit was purchased from
195 Pierce.

196 **Primary cell culture.** Primary myoblasts from WT newborn mice were prepared using a protocol
197 adapted from⁴. After hind limb muscles isolation, muscles were minced and digested for 1.5 hours
198 in PBS containing 0.5 mg/ml collagenase –Sigma - and 3.5 mg/ml dispase – Gibco. Cell
199 suspension was filtered through a 40 μ m cell strainer and pre-plated in DMED-10%FBS (Gibco),
200 to discard the majority of fibroblasts and contaminating cells, for 3 hours. Non adherent-myogenic
201 cells were collected and plated in IMDM (Gibco)-20% FBS-1% Chick Embryo Extract (MP
202 Biomedical) onto 1:100 Matrigel Reduced Factor (BD) in IMDM coated fluorodishes.
203 Differentiation was triggered by medium switch in IMDM + 2% horse serum and 24 hours later a
204 thick layer of matrigel (1:3 in IMDM) was added. Myotubes were treated with 80 μ g/mL of agrin,
205 or explanted spinal cords from E12 mouse embryos, and the medium was changed every 2 days.
206 Cells in culture were prepared, fixed and stained with antibodies to BIN1-C99D (1:50) and DNM2-
207 R2680 (1:200).

208 **RT-PCR and isoform detection:** Total RNA was extracted from primary myoblasts,
209 differentiated myotubes, and mouse skeletal muscle (embryonic day 18.5 and adult), using Trizol
210 reagent (Tri reagent, MRCGENE). Reverse transcription was performed using Superscript 11
211 reverse transcriptase (Invitrogen) with 1-2 μ g of total RNA, and the presence of BIN1/DNM2
212 isoforms were detected using our previously described protocol⁵. Primers used for PCR
213 amplification were: 5'BIN1, ATGGCAGAGATGGGGAGCAAGG; 3'BIN1,
214 TCACTGCACCCGCTCTGTAAAATT; 5'DNM2, CTAGAGTTGTCTGGTGGAGC; 3'DNM2,
215 GCTTCATGTCCAACAAGCACG. More than 30 clones were sequenced for each sample. The



Supplementary figure 2. Normal heart weight and histology in *Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}* mice

(a) Heart/body weight ratios (%) for male mice. Graph depicts mean \pm s.e.m (w=weeks, m=months). (b) 10 μ m HE histological sections of the right ventricle (upper panel), septum (middle panel), and left ventricle (lower panel), from 12 month old male mice. Scale bar 200 μ m.

216 GTEx database was analyzed for the presence of BIN1 and DNMT2 isoforms in various tissues
217 (www.gtexportal.org; Latest version V6 dbGaP Accession phs000424.v6.p1⁶).

218 **Immunofluorescence assays:** C2C12 cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 min,
219 permeabilized with Triton X-100 (0.2% in PBS), and aspecific sites were blocked with FCS 10%
220 and 0.1% Triton X100 in PBS. Primary antibodies were added overnight at 4°C in 0.1% Triton
221 X100 and 3% FCS in PBS. The following antibodies were used: anti-BIN1 (clone C99D, Sigma
222 Aldrich), anti-dynamin 2 (R2680, IGBMC), anti-DHPR α_1 (Ca_v1.1) subunit (MA3-920; Affinity
223 Bioreagents), anti- α actinin (clone EA-63, Sigma Aldrich), anti-dysferlin (abcam). These
224 antibodies were revealed by employing anti-rabbit AlexaFluor 594 conjugated or anti-mouse
225 AlexaFluor 488 conjugated secondary antibodies (Invitrogen). Nuclei were stained with Hoechst
226 33528 (Sigma Aldrich) and samples were mounted in FluorSaveTM reagent (Calbiochem).

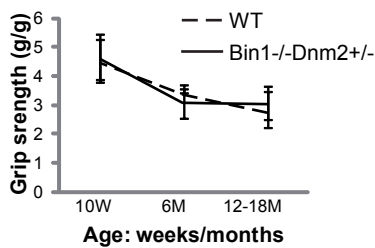
227

228 **In vitro experiments:** DNMT2+12b was generated by primer directed PCR mutagenesis from the
229 wild type construct using primers, and recombinant protein was produced as described previously⁷.
230 BIN1 recombinant protein was produced from pGEX6P1 plasmids, in BL21 bacteria, and purified
231 using glutathione sepharose beads. The GST tag was cut by precision enzyme on the beads and
232 the flow through was recovered. DNMT2 and BIN1 recombinant proteins were used at a ratio of 1:4
233 (DNMT2:BIN1). A malachite green assay for GTP hydrolysis using lipids (BMP + PIP₂) was
234 performed as described previously⁷.

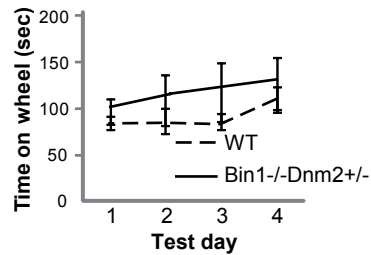
235

236 **Generation of mice lines:** *Bin1 exon20 knockout mice:* The targeting vector was created with
237 LoxP sites flanking exon 20 in case of *Bin1* exon 20 KO mouse (further refer to as *Bin1*^{-/-})
238 (Supplementary Fig. 1) linearized and electroporated into embryonic stem (ES) cells. Recombinant
239 ES cells were injected into C57BL/6 blastocysts that were implanted in pseudo-pregnant females
240 and germline transmission determined. Recombination was triggered using CMV promoter. *Dnm2*
241 *heterozygous mice:* The creation of *Dnm2*^{+/-} mice was described previously⁸. *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-}
242 *mice:* Female heterozygous *Bin1*^{+/-} mice were bred with male *Dnm2*^{+/-} mice to produce four
243 possible genotypes in male offspring: *Bin1*^{+/+}*Dnm2*^{+/+} (WT), *Bin1*^{+/+}*Dnm2*^{+/-}, *Bin1*^{+/-}
244 *Dnm2*^{+/+}, and *Bin1*^{+/-}*Dnm2*^{+/-}. In the next step, male or female *Bin1*^{+/-}*Dnm2*^{+/-} mice were
245 crossed with a female or male *Bin1*^{+/-}*Dnm2*^{+/+}. This cross yielded six possible genotypes:

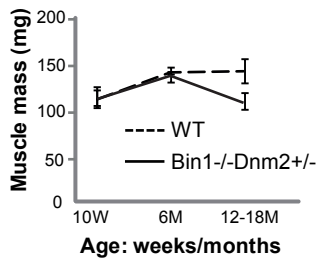
A. GRIP test (2-paw)



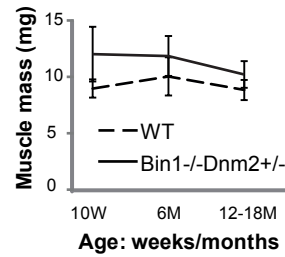
B. Rotarod test (12 months)



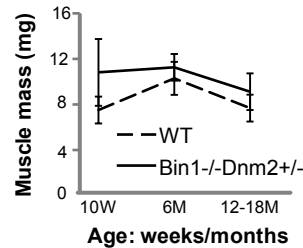
C. Gastrocnemius



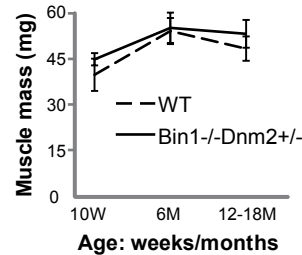
D. EDL



E. Soleus



F. TA



Supplementary figure 3. *Bin1-/-Dnm2+/-* mice exhibit normal motor performance in clinical analysis

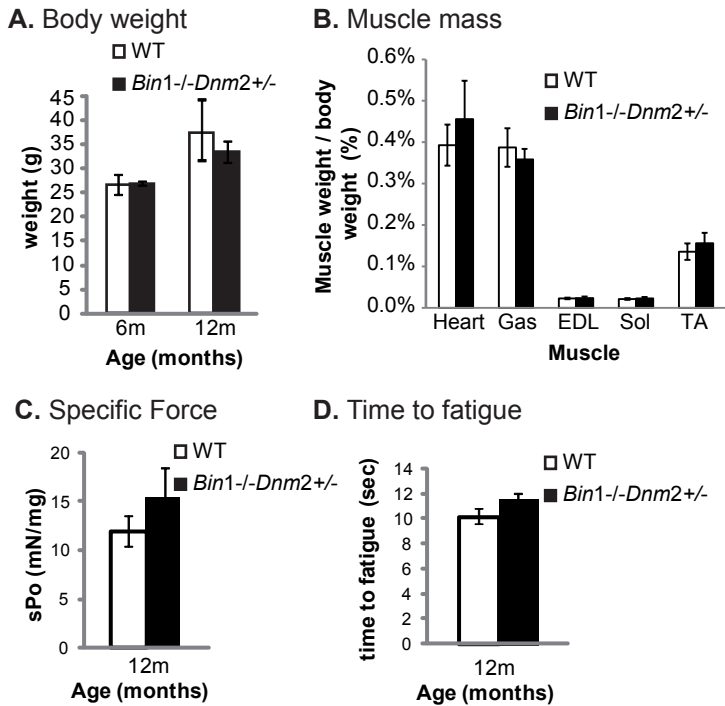
(a) 2 paw grip test at 10 weeks (10w), 6 months (6m), and 12 months (12m). (b) Rotarod test performed in 12 month old mice under acceleration mode (440 rpm in 5 minutes). n=3 trials/mouse/day. Muscle mass of gastrocnemius (c), extensor digitorum longus (EDL) (d), soleus (e), tibialis anterior (TA)(f). All graphs depict mean \pm s.e.m (w=weeks, m=months).

246 *Bin1*^{+/+}*Dnm2*^{+/+} (WT), *Bin1*^{+/+}*Dnm2*^{+/-}, *Bin1*^{+/-}*Dnm2*^{+/+}, *Bin1*^{+/-}*Dnm2*^{+/-}, *Bin1*^{-/-}
247 *Dnm2*^{+/+}, and *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} (Fig. 1b). We analyzed female and male *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} mice and
248 compared them to the WT littermates. Mice belong to a B6J strain (Cre recombinase driven by a
249 CMV promoter).

250 **Animal experiments.** Animal experimentation was approved by the institutional ethical
251 committee Com'Eth IGBMC-ICS (2012-128). Animals were housed in a temperature-controlled
252 room (19–22°C) with a 12:12-h light/dark cycle. Mice were weighed weekly until one year of age.
253 Mice were humanely killed when required by CO₂ inhalation followed by cervical dislocation,
254 according to national and European legislations on animal experimentation. Muscles and other
255 tissues were dissected (TA muscle under anesthesia when required for TEM) and frozen in
256 nitrogen-cooled isopentane and liquid nitrogen for histological and immunoblot assays,
257 respectively.

258 **Phenotyping of *Bin1*^{+/-} and *Dnm2*^{+/-} mice.** Mice aged 10-15 weeks were phenotyped under the
259 EUMODIC phenotyping program (<http://www.eumodic.eu/>) with results made publicly available
260 (<http://www.europenome.org/>). In both cases male and female mutant mice were comparable to
261 the WT littermates. Blood chemistry, ECG measurements, Dexascan, and qNMR presented here
262 for male mice (n= minimum 10 per group) were performed as part of pipelines 1 and 2 of the
263 EUMODIC phenotyping program, at the Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France,
264 <http://www.ics-mci.fr/>).

265 **Grip (2 and 4 paws), hang, and rotarod tests.** Grip strength tests: Performed by placing the 2
266 front paws or all 4 paws on the grid of a dynamometer (Bioseb, Chaville, France) and mice were
267 pulled by the tail in the opposite direction. The maximal strength exerted by the mouse before
268 losing grip was recorded. Three trials per mouse were performed, with 30 seconds rest between
269 trials (2 paws test, n=minimum 5 mice per group; 4 paws test, n=5-7 mice per group). Hanging
270 test: mice were suspended from a cage lid for a maximum of 60 seconds. The time the mouse fell
271 off the cage was recorded for each trial. Three trials per mouse were performed. Rotarod test:
272 Coordination and whole body muscle strength were tested using an accelerated rotating rod test
273 (Panlab, Barcelona, Spain). Mice were placed on the rod which accelerated from 4 to 40 rpm
274 during 5 minutes. Three trials per day, with 5 minutes rest between trials were performed for day
275 1 (training day) then 4 days which were recorded. Animals were scored for their latency to fall (in



Supplementary figure 4. Characterization of *Bin1*^{-/-}*Dnm2*^{+/-} female mice

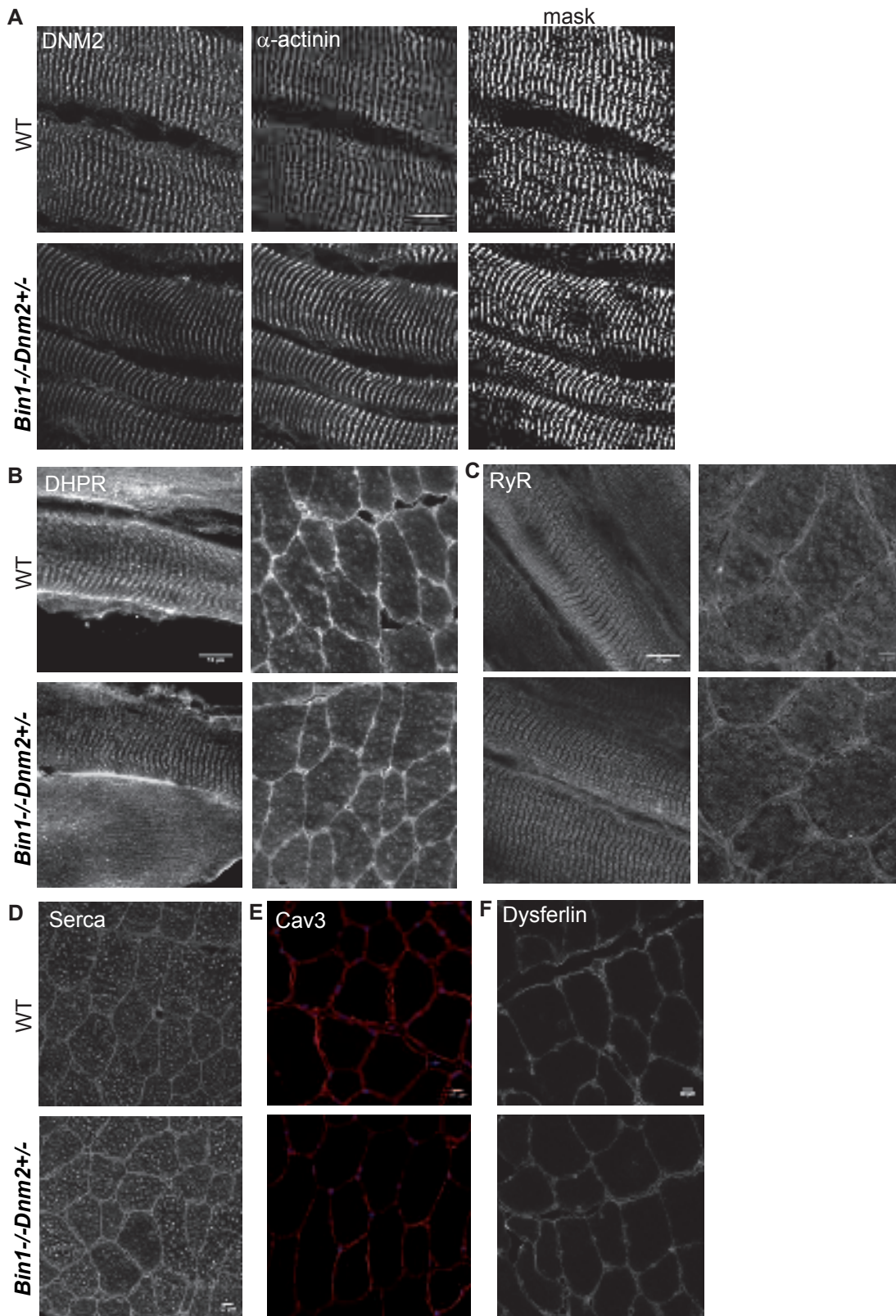
(a) Body weight of 6 and 12 months old female mice (grams, g). (b) Muscle/body weight ratio (%) of heart, gastrocnemius (Gas), extensor digitorum longus (EDL), soleus (Sol), and tibialis anterior (TA) muscles. (c) Specific muscle force (sPo, mg/mN) measured in 12 month old mice. (d) Time to fatigue in 12 month old mice, measured as the time taken to reach 50% of the maximum muscle force (seconds). All graphs depict mean \pm s.e.m. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (w=weeks, m=months).

276 seconds). The mean of the three trials was calculated for each experiment listed above (n=5-7 mice
277 per group).

278 **TA muscle contractile properties.** Muscle force measurements were evaluated by measuring *in*
279 *situ* muscle contraction in response to nerve and muscle stimulation, as described previously with
280 a force transducer (Aurora Scientific)^{1,9}. Results from nerve stimulation are shown (n=5-11 mice
281 per group). Fatigue was measured as time taken to reach 50% of the maximum force produced.
282 After contractile measurements, the animals were killed by cervical dislocation. TA muscles were
283 then dissected and weighed to determine specific maximal force.

284 **Western blotting.** Mouse muscles was minced and homogenized on ice for 3 × 30 s (Ultra Turrax
285 homogenizer) in 10 times the weight/volume of 1% NP-40 Tris-Cl buffer, pH 8, then extracted for
286 30 min at 4°C. Protein concentration was determined using a DC protein assay kit (Bio-Rad
287 Laboratories), and lysates analyzed by SDS-PAGE and western blotting on nitrocellulose
288 membrane. Primary antibodies used were DNM2-R2680 (1:500), DNM2-R2865 (1:500), BIN1-
289 R2405 (1:1000), and GAPDH (1:10,000); secondary antibodies were anti-rabbit HRP or anti-
290 mouse HRP (1:10,000). Western blot films were scanned and band intensities were determined
291 using ImageJ software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda,
292 Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009). Densitometry values were standardized to
293 corresponding total GAPDH values and expressed as a fold difference relative to the listed control
294 (n=3-5 mice per group).

295 **Histological and immunofluorescence analysis of skeletal muscle.** Longitudinal and transverse
296 cryosections (8 µm) sections of mouse skeletal muscles were prepared, fixed and stained with
297 antibodies to DHPR α_1 (1:100), RYR1 (1:200), α -actinin (1:1,000), caveolin-3 (1:1000); DNM2-
298 R2680 (1:200), MTM1-R2827 (1:200), and BIN1-C99D (1:100). Samples were viewed using a
299 laser scanning confocal microscope (TCS SP8; Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Air-
300 dried transverse sections were fixed and stained with haematoxylin and eosin (HE) or succinate
301 dehydrogenase (SDH), and image acquisition performed with a slide scanner NanoZoomer 2 HT
302 equipped with the fluorescence module L11600-21 (Hamamatsu Photonics, Japan) or a DMRXA2
303 microscope (Leica Microsystems GmbH). Cross-sectional area (CSA) was analyzed in HE sections
304 from TA mouse skeletal muscle, using FIJI image analysis software. CSA (µm²) was calculated



Supplementary figure 5. Skeletal muscle triad markers are unaltered in *Bin1^{-/-}Dnm2^{+/-}* mice (a) Immunofluorescence staining of 8 μ m longitudinal sections with DNM2 (left panel), and α -actinin (middle panel). Mask image shows areas of co-localization (right panel). (b) Longitudinal and transverse skeletal muscle sections stained with DHPR antibody. Transverse sections stained for RyR (c), Serca (d), Caveolin 3 (Cav3) (e) and Dysferlin (f). Sections taken from mice at 10 weeks of age. Scale bar 10 μ m.

305 (>500 fibres per mouse) from 4-7 mice per group. The percentage of TA muscle fibres with
306 centralized or internalized nuclei was counted in >500 fibres from 4-6 mice using the cell counter
307 plugin in ImageJ image analysis software.

308 **Transmission electron microscopy.** Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 10 µl
309 per body gram of ketamine (20 mg/ml, Virbac, Carros, France) and xylazine (0.4%, Rompun,
310 Bayer, Wuppertal, Germany). TA muscle biopsies were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M
311 cacodylate buffer (pH 7.2) and processed as described previously^{1,10}. Triad structures were
312 identified on longitudinal sections of muscle and the number of triads per sarcomere was
313 quantified. The ratio of triads / sarcomere was calculated by dividing number of triads clearly
314 identified, by the total number of sarcomeres present in the image, as described previously¹¹. 40-
315 80 triads were counted per mouse.

316 **Microscopy and statistical analysis.** All microscopy was performed at the IGBMC Imaging
317 Centre. All samples for microscopy were mounted in Fluorsave reagent (Merck) and viewed at
318 room temperature. Light microscopy was performed using a fluorescence microscope (DM4000;
319 Leica microsystems) fitted with a colour CCD camera (Coolsnap cf colour, Photometrics) camera.
320 Confocal microscopy was performed using a confocal laser scanning microscope (TCS SP2 or
321 SP5; Leica Microsystems, Mannheim, Germany). ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National
322 Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2009) and FIJI
323 analysis software were used for image analysis. Statistical analysis was performed using the
324 unpaired student's *t* test unless stated otherwise. p-values of <0.05 were considered significant.

325 SUPPLEMENTARY METHODS

326 **Materials.** Primary antibodies used were: mouse anti-RYR1 (clone 34C; Sigma-Aldrich), anti-
327 Serca (MA3-911; ABR), and anti-Dysferlin (abcam) antibodies.

328 **Histological analysis of brain, liver and heart.** Brain, liver and heart were dissected and fixed
329 overnight in formalin and then transferred to 70% ethanol until embedding in paraffin. Sections
330 (10µm) were stained with haematoxylin and eosin (HE) or Masson's trichrome stain in case of the
331 heart.

332

333 ACKNOWLEDGEMENTS

334 We thank Arnaud Ferry (UMRS974), and from the IGBMC Catherine Koch, Julien Becker, Jean-
335 Luc Weickert and Nadia Messaddeq, Olivia Wendling, Hugues Jacobs, Marc Koch and Pascal
336 Kessler for excellent technical assistance; and the animal house, histology platform and Imaging
337 Centre of the IGBMC for support. This study was supported by INSERM, CNRS, University of
338 Strasbourg, the Agence Nationale de la Recherche (14-CE12-0009), SATT Conectus Alsace
339 (2014), Association Francaise contre les myopathies (15352), and Myotubular Trust and Sparks
340 The Children's Medical Research Charity.

341 AUTHOR CONTRIBUTIONS

342 B.C., I.P., J.L. designed the study and analyzed the data. B.C., I.P., H.T., A-S.N, F.H., C.K.,
343 performed experiments. B.C. J.L. and A.R. supervised the study. B.C., I.P., J.L. wrote the
344 manuscript.

345 REFERENCES

- 346 1. Towler, M.C., Kaufman, S.J. & Brodsky, F.M. Membrane traffic in skeletal muscle. *Traffic* **5**, 129-
347 139 (2004).
- 348 2. Cowling, B.S., Toussaint, A., Muller, J. & Laporte, J. Defective membrane remodeling in
349 neuromuscular diseases: insights from animal models. *PLoS Genet* **8**, e1002595 (2012).
- 350 3. Bitoun, M., *et al.* Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* **37**,
351 1207-1209 (2005).
- 352 4. Bohm, J., *et al.* Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations.
353 *Brain* **137**, 3160-3170 (2014).
- 354 5. Nicot, A.S., *et al.* Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause
355 autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* **39**, 1134-1139 (2007).
- 356 6. Ravenscroft, G., Laing, N.G. & Bonnemann, C.G. Pathophysiological concepts in the congenital
357 myopathies: blurring the boundaries, sharpening the focus. *Brain* **138**, 246-268 (2015).
- 358 7. Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R. & Prendergast, G.C. BIN1 is a novel MYC-interacting
359 protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet* **14**, 69-77 (1996).
- 360 8. Peter, B.J., *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure.
361 *Science* **303**, 495-499 (2004).
- 362 9. Lee, E., *et al.* Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science* **297**, 1193-1196
363 (2002).
- 364 10. Razzaq, A., *et al.* Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling
365 machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* **15**, 2967-
366 2979 (2001).
- 367 11. Bohm, J., *et al.* Altered Splicing of the BIN1 Muscle-Specific Exon in Humans and Dogs with Highly
368 Progressive Centronuclear Myopathy. *PLoS Genet* **9**, e1003430 (2013).
- 369 12. Faelber, K., *et al.* Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease. *Prog Mol*
370 *Biol Transl Sci* **117**, 411-443 (2013).
- 371 13. Kenniston, J.A. & Lemmon, M.A. Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations
372 found in centronuclear myopathy patients. *Embo J* **29**, 3054-3067 (2010).

- 373 14. Wang, L., *et al.* Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable
374 polymers. *J Biol Chem* **285**, 22753-22757 (2010).
- 375 15. Chin, Y.H., *et al.* Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic
376 and lead to T-tubule fragmentation. *Hum Mol Genet* **24**, 5542-5554 (2015).
- 377 16. Cowling, B.S., *et al.* Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of
378 dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am J*
379 *Pathol* **178**, 2224-2235 (2011).
- 380 17. Liu, N., *et al.* Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy.
381 *J Clin Invest* **121**, 3258-3268 (2011).
- 382 18. Ramjaun, A.R. & McPherson, P.S. Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin
383 binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem* **70**, 2369-2376 (1998).
- 384 19. Wechsler-Reya, R.J., Elliott, K.J. & Prendergast, G.C. A role for the putative tumor suppressor Bin1
385 in muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol* **18**, 566-575 (1998).
- 386 20. GTEx consortium. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis:
387 multitissue gene regulation in humans. *Science* **348**, 648-660 (2015).
- 388 21. Cao, H., Garcia, F. & McNiven, M.A. Differential distribution of dynamin isoforms in mammalian
389 cells. *Mol Biol Cell* **9**, 2595-2609 (1998).
- 390 22. Fugier, C., *et al.* Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and
391 muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* **17**, 720-725 (2011).
- 392 23. Tjondrokoesoemo, A., *et al.* Disrupted membrane structure and intracellular Ca²⁺(+) signaling in
393 adult skeletal muscle with acute knockdown of Bin1. *PLoS One* **6**, e25740 (2011).
- 394 24. Toussaint, A., *et al.* Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear
395 myopathies. *Acta Neuropathol* **121**, 253-266 (2011).
- 396 25. Takekura, H., Flucher, B.E. & Franzini-Armstrong, C. Sequential docking, molecular differentiation,
397 and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol* **239**, 204-
398 214 (2001).
- 399 26. Cowling, B.S., *et al.* Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J Clin*
400 *Invest* **124**, 1350-1363 (2014).
- 401 27. Muller, A.J., *et al.* Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable
402 endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Mol Cell Biol*
403 **23**, 4295-4306 (2003).
- 404 28. Hong, T., *et al.* Cardiac BIN1 folds T-tubule membrane, controlling ion flux and limiting arrhythmia.
405 *Nat Med* **20**, 624-632 (2014).
- 406 29. D'Alessandro, M., *et al.* Amphiphysin 2 Orchestrates Nucleus Positioning and Shape by Linking the
407 Nuclear Envelope to the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *Dev Cell* **35**, 186-198 (2015).
- 408 30. Rao, Y. & Haucke, V. Membrane shaping by the Bin/amphiphysin/Rvs (BAR) domain protein
409 superfamily. *Cell Mol Life Sci* **68**, 3983-3993 (2011).
- 410 31. Klinge, L., *et al.* Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human
411 skeletal muscle. *Muscle Nerve* **41**, 166-173 (2010).
- 412 32. Daumke, O., Roux, A. & Haucke, V. BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission.
413 *Cell* **156**, 882-892 (2014).
- 414 33. Kojima, C., *et al.* Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *Embo J* **23**, 4413-
415 4422 (2004).
- 416 34. Royer, B., *et al.* The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear
417 myopathies. *EMBO Rep* **14**, 907-915 (2013).
- 418 35. Prokic, I., Cowling, B.S. & Laporte, J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med*
419 (*Berl*) **92**, 453-463 (2014).

420

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Abath Neto, O., A. Martins Cde, M. Carvalho, G. Chadi, K. W. Seitz, A. S. Oliveira, U. C. Reed, J. Laporte and E. Zanoteli (2015). "DNM2 mutations in a cohort of sporadic patients with centronuclear myopathy." Genet Mol Biol **38**(2): 147-151.

Abath Neto, O., M. R. Silva, A. Martins Cde, S. Oliveira Ade, U. C. Reed, V. Biancalana, J. B. Pesquero, J. Laporte and E. Zanoteli (2016). "A Study of a Cohort of X-Linked Myotubular Myopathy at the Clinical, Histologic, and Genetic Levels." Pediatr Neurol **58**: 107-112.

Agrawal, P. B., C. R. Pierson, M. Joshi, X. Liu, G. Ravenscroft, B. Moghadaszadeh, T. Talabere, M. Viola, L. C. Swanson, G. Haliloglu, B. Talim, K. S. Yau, R. J. Allcock, N. G. Laing, M. A. Perrella and A. H. Beggs (2014). "SPEG interacts with myotubularin, and its deficiency causes centronuclear myopathy with dilated cardiomyopathy." Am J Hum Genet **95**(2): 218-226.

Agrawal, S., S. H. Mayrand, P. C. Zamecnik and T. Pederson (1990). "Site-specific excision from RNA by RNase H and mixed-phosphate-backbone oligodeoxynucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1401-1405.

Aidaralieva, N. J., K. Kamino, R. Kimura, M. Yamamoto, T. Morihara, H. Kazui, R. Hashimoto, T. Tanaka, T. Kudo, T. Kida, J. I. Okuda, T. Uema, H. Yamagata, T. Miki, H. Akatsu, K. Kosaka and M. Takeda (2008). "Dynamin 2 gene is a novel susceptibility gene for late-onset Alzheimer disease in non-APOE-epsilon 4 carriers." Journal of Human Genetics **53**(4): 296-302.

Akache, B., D. Grimm, K. Pandey, S. R. Yant, H. Xu and M. A. Kay (2006). "The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9." J Virol **80**(19): 9831-9836.

Akinrinade, O., J. W. Koskenvuo and T. P. Alastalo (2015). "Prevalence of Titin Truncating Variants in General Population." PLoS One **10**(12): e0145284.

Al-Qusairi, L., I. Prokic, L. Amoasii, C. Kretz, N. Messaddeq, J. L. Mandel and J. Laporte (2013). "Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways." FASEB J **27**(8): 3384-3394.

Al-Qusairi, L., N. Weiss, A. Toussaint, C. Berbey, N. Messaddeq, C. Kretz, D. Sanoudou, A. H. Beggs, B. Allard, J. L. Mandel, J. Laporte, V. Jacquemond and A. Buj-Bello (2009). "T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18763-18768.

Alexander, M. S., G. Kawahara, N. Motohashi, J. C. Casar, I. Eisenberg, J. A. Myers, M. J. Gasperini, E. A. Estrella, A. T. Kho, S. Mitsuhashi, F. Shapiro, P. B. Kang and L. M. Kunkel (2013). "MicroRNA-199a is induced in dystrophic muscle and affects WNT signaling, cell proliferation, and myogenic differentiation." Cell Death Differ **20**(9): 1194-1208.

Amantana, A. and P. L. Iversen (2005). "Pharmacokinetics and biodistribution of phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers." Curr Opin Pharmacol **5**(5): 550-555.

Ambler, M. W., C. Neave and D. B. Singer (1984). "X-linked recessive myotubular myopathy: II. Muscle morphology and human myogenesis." Hum Pathol **15**(12): 1107-1120.

Bibliographie

Arneson, L. N., C. M. Segovis, T. S. Gomez, R. A. Schoon, C. J. Dick, Z. Lou, D. D. Billadeau and P. J. Leibson (2008). "Dynamin 2 regulates granule exocytosis during NK cell-mediated cytotoxicity." *J Immunol* **181**(10): 6995-7001.

Arnett, A. L., P. Konieczny, J. N. Ramos, J. Hall, G. Odom, Z. Yablonka-Reuveni, J. R. Chamberlain and J. S. Chamberlain (2014). "Adeno-associated viral (AAV) vectors do not efficiently target muscle satellite cells." *Mol Ther Methods Clin Dev* **1**.

Asokan, A., J. B. Hamra, L. Govindasamy, M. Agbandje-McKenna and R. J. Samulski (2006). "Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry." *J Virol* **80**(18): 8961-8969.

Atchison, R. W., B. C. Casto and W. M. Hammon (1965). "Adenovirus-Associated Defective Virus Particles." *Science* **149**(3685): 754-756.

Ayuso, E., F. Mingozzi and F. Bosch (2010). "Production, purification and characterization of adeno-associated vectors." *Curr Gene Ther* **10**(6): 423-436.

Barth, P. G., G. K. Van Wijngaarden and J. Bethlem (1975). "X-linked myotubular myopathy with fatal neonatal asphyxia." *Neurology* **25**(6): 531-536.

Bataille, J., F. Guillon, A. Urtizbera, B. Estournet, S. Richard and A. Barois (1991). "[Pathological anatomy of the heart in myopathies and infantile muscular atrophies]." *Ann Med Interne (Paris)* **142**(1): 5-8.

Bennett, C. F. and E. E. Swayze (2010). "RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **50**: 259-293.

Bitoun, M., J. A. Bevilacqua, B. Eymard, B. Prudhon, M. Fardeau, P. Guicheney and N. B. Romero (2009). "A new centronuclear myopathy phenotype due to a novel dynamin 2 mutation." *Neurology* **72**(1): 93-95.

Bitoun, M., J. A. Bevilacqua, B. Prudhon, S. Maugenre, A. L. Taratuto, S. Monges, F. Lubieniecki, C. Cances, E. Uro-Coste, M. Mayer, M. Fardeau, N. B. Romero and P. Guicheney (2007). "Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset." *Ann Neurol* **62**(6): 666-670.

Bitoun, M., S. Maugenre, P. Y. Jeannet, E. Lacene, X. Ferrer, P. Laforet, J. J. Martin, J. Laporte, H. Lochmuller, A. H. Beggs, M. Fardeau, B. Eymard, N. B. Romero and P. Guicheney (2005). "Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy." *Nat Genet* **37**(11): 1207-1209.

Blaising, J., P. L. Levy, S. J. Polyak, M. Stanifer, S. Boulant and E. I. Pecheur (2013). "Arbidol inhibits viral entry by interfering with clathrin-dependent trafficking." *Antiviral Research* **100**(1): 215-219.

Bohm, J., V. Biancalana, E. T. Dechene, M. Bitoun, C. R. Pierson, E. Schaefer, H. Karasoy, M. A. Dempsey, F. Klein, N. Dondaine, C. Kretz, N. Haumesser, C. Poirson, A. Toussaint, R. S. Greenleaf, M. A. Barger, L. J. Mahoney, P. B. Kang, E. Zanoteli, J. Vissing, N. Witting, A. Echaniz-Laguna, C. Wallgren-Pettersson, J. Dowling, L. Merlini, A. Oldfors, L. Bomme Ousager, J. Melki, A. Krause, C. Jern, A. S. Oliveira, F. Petit, A. Jacqueline, A. Chaussonot, D. Mowat, B. Leheup, M. Cristofano, J. J. Poza Aldea, F. Michel, A. Furby, J. E. Llona, R. Van Coster, E. Bertini, J. A. Urtizbera, V. Drouin-Garraud, C. Beroud, B. Prudhon, M. Bedford, K. Mathews, L. A. Erby, S. A. Smith, J. Roggenbuck, C. A. Crowe, A.

Bibliographie

Brennan Spitale, S. C. Johal, A. A. Amato, L. A. Demmer, J. Jonas, B. T. Darras, T. D. Bird, M. Laurino, S. I. Welt, C. Trotter, P. Guicheney, S. Das, J. L. Mandel, A. H. Beggs and J. Laporte (2012). "Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy." *Hum Mutat* **33**(6): 949-959.

Bohm, J., V. Biancalana, E. Malfatti, N. Dondaine, C. Koch, N. Vasli, W. Kress, M. Strittmatter, A. L. Taratuto, H. Gonorazky, P. Laforet, T. Maisonobe, M. Olive, L. Gonzalez-Mera, M. Fardeau, N. Carriere, P. Clavelou, B. Eymard, M. Bitoun, J. Rendu, J. Faure, J. Weis, J. L. Mandel, N. B. Romero and J. Laporte (2014). "Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations." *Brain* **137**(Pt 12): 3160-3170.

Bohm, J., N. Vasli, M. Maurer, B. S. Cowling, G. D. Shelton, W. Kress, A. Toussaint, I. Prokic, U. Schara, T. J. Anderson, J. Weis, L. Tiret and J. Laporte (2013). "Altered splicing of the BIN1 muscle-specific exon in humans and dogs with highly progressive centronuclear myopathy." *PLoS Genet* **9**(6): e1003430.

Boiziau, C., R. Kurfurst, C. Cazenave, V. Roig, N. T. Thuong and J. J. Toulme (1991). "Inhibition of translation initiation by antisense oligonucleotides via an RNase-H independent mechanism." *Nucleic Acids Res* **19**(5): 1113-1119.

Borel, F., M. A. Kay and C. Mueller (2014). "Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference." *Mol Ther* **22**(4): 692-701.

Boutin, S., V. Monteilhet, P. Veron, C. Leborgne, O. Benveniste, M. F. Montus and C. Masurier (2010). "Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors." *Human Gene Therapy* **21**(6): 704-712.

Brent, L. J. and P. Drapeau (2002). "Targeted "knockdown" of channel expression in vivo with an antisense morpholino oligonucleotide." *Neuroscience* **114**(2): 275-278.

Brooks, S. V. (2003). "Current topics for teaching skeletal muscle physiology." *Adv Physiol Educ* **27**(1-4): 171-182.

Bucher, H. U., E. Boltshauser, J. Briner, H. E. Gnehm and R. C. Janzer (1986). "Severe neonatal centronuclear (myotubular) myopathy: an X-linked recessive disorder." *Helv Paediatr Acta* **41**(4): 291-300.

Buj-Bello, A., V. Laugel, N. Messaddeq, H. Zahreddine, J. Laporte, J. F. Pellissier and J. L. Mandel (2002). "The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 15060-15065.

Burdick, A. D., S. Sciabola, S. R. Mantena, B. D. Hollingshead, R. Stanton, J. A. Warneke, M. Zeng, E. Martsen, A. Medvedev, S. S. Makarov, L. A. Reed, J. W. Davis, 2nd and L. O. Whiteley (2014). "Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid--modified antisense oligonucleotides." *Nucleic Acids Res* **42**(8): 4882-4891.

Cahill, P. J., A. S. Rinella and R. J. Bielski (2007). "Orthopaedic complications of myotubular myopathy." *J Pediatr Orthop* **27**(1): 98-103.

Cao, H., J. Chen, M. Awoniyi, J. R. Henley and M. A. McNiven (2007). "Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells." *J Cell Sci* **120**(Pt 23): 4167-4177.

Cao, H., H. M. Thompson, E. W. Krueger and M. A. McNiven (2000). "Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin." J Cell Sci **113** (Pt 11): 1993-2002.

Carter, G. C., L. Bernstone, D. Baskaran and W. James (2011). "HIV-1 infects macrophages by exploiting an endocytic route dependent on dynamin, Rac1 and Pak1." Virology **409**(2): 234-250.

Ceyhan-Birsoy, O., P. B. Agrawal, C. Hidalgo, K. Schmitz-Abe, E. T. DeChene, L. C. Swanson, R. Soemedi, N. Vasli, S. T. Iannaccone, P. B. Shieh, N. Shur, J. M. Dennison, M. W. Lawlor, J. Laporte, K. Markianos, W. G. Fairbrother, H. Granzier and A. H. Beggs (2013). "Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy." Neurology **81**(14): 1205-1214.

Chapuis, J., F. Hansmannel, M. Gistelinck, A. Mounier, C. Van Cauwenberghe, K. V. Kolen, F. Geller, Y. Sottejeau, D. Harold, P. Dourlen, B. Grenier-Boley, Y. Kamatani, B. Delepine, F. Demiautte, D. Zelenika, N. Zommer, M. Hamdane, C. Bellenguez, J. F. Dartigues, J. J. Hauw, F. Letronne, A. M. Ayril, K. Slegers, A. Schellens, L. V. Broeck, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, R. Vandenberghe, M. O'Donovan, M. Owen, J. Epelbaum, M. Mercken, E. Karran, M. Bantscheff, G. Drewes, G. Joberty, D. Champion, J. N. Octave, C. Berr, M. Lathrop, P. Callaerts, D. Mann, J. Williams, L. Buee, I. Dewachter, C. Van Broeckhoven, P. Amouyel, D. Moechars, B. Dermaut, J. C. Lambert and G. Consortium (2013). "Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology." Molecular Psychiatry **18**(11): 1225-1234.

Chen, M. S., R. A. Obar, C. C. Schroeder, T. W. Austin, C. A. Poodry, S. C. Wadsworth and R. B. Vallee (1991). "Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis." Nature **351**(6327): 583-586.

Chen, Y. J., P. Zhang, E. H. Egelman and J. E. Hinshaw (2004). "The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes." Nat Struct Mol Biol **11**(6): 574-575.

Cheng, C. Y., W. L. Shih, W. R. Huang, P. I. Chi, M. H. Wu and H. J. Liu (2012). "Bovine Ephemeral Fever Virus Uses a Clathrin-Mediated and Dynamin 2-Dependent Endocytosis Pathway That Requires Rab5 and Rab7 as Well as Microtubules." Journal of Virology **86**(24): 13653-13661.

Childers, M. K., R. Joubert, K. Poulard, C. Moal, R. W. Grange, J. A. Doering, M. W. Lawlor, B. E. Rider, T. Jamet, N. Daniele, S. Martin, C. Riviere, T. Soker, C. Hammer, L. Van Wittenberghe, M. Lockard, X. Guan, M. Goddard, E. Mitchell, J. Barber, J. K. Williams, D. L. Mack, M. E. Furth, A. Vignaud, C. Masurier, F. Mavilio, P. Moullier, A. H. Beggs and A. Buj-Bello (2014). "Gene therapy prolongs survival and restores function in murine and canine models of myotubular myopathy." Sci Transl Med **6**(220): 220ra210.

Chin, Y. H., A. Lee, H. W. Kan, J. Laiman, M. C. Chuang, S. T. Hsieh and Y. W. Liu (2015). "Dynamin-2 mutations associated with centronuclear myopathy are hypermorphic and lead to T-tubule fragmentation." Hum Mol Genet **24**(19): 5542-5554.

Cirak, S., V. Arechavala-Gomez, M. Guglieri, L. Feng, S. Torelli, K. Anthony, S. Abbs, M. E. Garralda, J. Bourke, D. J. Wells, G. Dickson, M. J. Wood, S. D. Wilton, V. Straub, R. Kole, S. B. Shrewsbury, C. Sewry, J. E. Morgan, K. Bushby and F. Muntoni (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.

Bibliographie

Cook, T. A., R. Urrutia and M. A. McNiven (1994). "Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 644-648.

Cowling, B. S., T. Chevremont, I. Prokic, C. Kretz, A. Ferry, C. Coirault, O. Koutsopoulos, V. Laugel, N. B. Romero and J. Laporte (2014). "Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy." J Clin Invest **124**(3): 1350-1363.

Cowling, B. S., A. Toussaint, L. Amoasii, P. Koebel, A. Ferry, L. Davignon, I. Nishino, J. L. Mandel and J. Laporte (2011). "Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness." Am J Pathol **178**(5): 2224-2235.

Cowling, B. S., A. Toussaint, J. Muller and J. Laporte (2012). "Defective membrane remodeling in neuromuscular diseases: insights from animal models." PLoS Genet **8**(4): e1002595.

Crooke, S. T. (1998). "Vitravene--another piece in the mosaic." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **8**(4): vii-viii.

Crooke, S. T. (2000). "Progress in antisense technology: the end of the beginning." Methods Enzymol **313**: 3-45.

Crooke, S. T., K. M. Lemonidis, L. Neilson, R. Griffey, E. A. Lesnik and B. P. Monia (1995). "Kinetic characteristics of Escherichia coli RNase H1: cleavage of various antisense oligonucleotide-RNA duplexes." Biochem J **312** (Pt 2): 599-608.

Damke, H., T. Baba, A. M. van der Blik and S. L. Schmid (1995). "Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin." J Cell Biol **131**(1): 69-80.

David, C., P. S. McPherson, O. Mundigl and P. de Camilli (1996). "A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 331-335.

Daya, S. and K. I. Berns (2008). "Gene therapy using adeno-associated virus vectors." Clin Microbiol Rev **21**(4): 583-593.

De Angelis, M. S., L. Palmucci, M. Leone and C. Doriguzzi (1991). "Centronuclear myopathy: clinical, morphological and genetic characters. A review of 288 cases." J Neurol Sci **103**(1): 2-9.

Decamilli, P., A. Thomas, R. Cofiell, F. Folli, B. Lichte, G. Piccolo, H. M. Meinck, M. Austoni, G. Fassetta, G. Bottazzo, D. Bates, N. Cartledge, M. Solimena and M. W. Kilimann (1993). "The Synaptic Vesicle-Associated Protein Amphiphysin Is the 128-Kd Autoantigen of Stiff-Man Syndrome with Breast-Cancer." Journal of Experimental Medicine **178**(6): 2219-2223.

DeVos, S. L. and T. M. Miller (2013). "Antisense Oligonucleotides: Treating Neurodegeneration at the Level of RNA." Neurotherapeutics **10**(3): 486-497.

Di, A., D. J. Nelson, V. Bindokas, M. E. Brown, F. Libunao and H. C. Palfrey (2003). "Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages." Mol Biol Cell **14**(5): 2016-2028.

Di Paolo, G. and P. De Camilli (2006). "Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics." Nature **443**(7112): 651-657.

Bibliographie

Dorchies, O. M., J. Laporte, S. Wagner, C. Hindelang, J. M. Warter, J. L. Mandel and P. Poindron (2001). "Normal innervation and differentiation of X-linked myotubular myopathy muscle cells in a nerve-muscle coculture system." Neuromuscular Disorders **11**(8): 736-746.

Dowling, J. J., M. W. Lawlor and R. T. Dirksen (2014). "Triadopathies: an emerging class of skeletal muscle diseases." Neurotherapeutics **11**(4): 773-785.

Drouet, A., E. Ollagnon-Roman, N. Streichenberger, V. Biancalana, M. Cossee, L. Guilloton and P. Petiot (2008). "[Unilateral presentation of X-linked myotubular myopathy (XLMTM) in two out of three female carriers in a family with no affected male]." Rev Neurol (Paris) **164**(2): 169-176.

Durieux, A. C., B. Prudhon, P. Guicheney and M. Bitoun (2010). "Dynamin 2 and human diseases." J Mol Med (Berl) **88**(4): 339-350.

Eppinga, R. D., E. W. Krueger, S. G. Weller, L. Zhang, H. Cao and M. A. McNiven (2012). "Increased expression of the large GTPase dynamin 2 potentiates metastatic migration and invasion of pancreatic ductal carcinoma." Oncogene **31**(10): 1228-1241.

Evers, M. M., L. J. Toonen and W. M. van Roon-Mom (2015). "Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders." Adv Drug Deliv Rev **87**: 90-103.

Feng, H., K. W. Liu, P. Guo, P. Zhang, T. Cheng, M. A. McNiven, G. R. Johnson, B. Hu and S. Y. Cheng (2012). "Dynamin 2 mediates PDGFRalpha-SHP-2-promoted glioblastoma growth and invasion." Oncogene **31**(21): 2691-2702.

Ferguson, S. M., A. Raimondi, S. Paradise, H. Shen, K. Mesaki, A. Ferguson, O. Destaing, G. Ko, J. Takasaki, O. Cremona, O. T. E and P. De Camilli (2009). "Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits." Dev Cell **17**(6): 811-822.

Fetalvero, K. M., Y. Yu, M. Goetschkes, G. Liang, R. A. Valdez, T. Gould, E. Triantafellow, S. Bergling, J. Loureiro, J. Eash, V. Lin, J. A. Porter, P. M. Finan, K. Walsh, Y. Yang, X. Mao and L. O. Murphy (2013). "Defective autophagy and mTORC1 signaling in myotubularin null mice." Mol Cell Biol **33**(1): 98-110.

Fidzianska, A. and H. H. Goebel (1994). "Aberrant arrested in maturation neuromuscular junctions in centronuclear myopathy." J Neurol Sci **124**(1): 83-88.

Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver and C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-811.

Fleischer, S., E. M. Ogunbunmi, M. C. Dixon and E. A. Flier (1985). "Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(21): 7256-7259.

Freier, S. M. and K. H. Altmann (1997). "The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes." Nucleic Acids Res **25**(22): 4429-4443.

Fugier, C., A. F. Klein, C. Hammer, S. Vassilopoulos, Y. Ivarsson, A. Toussaint, V. Tosch, A. Vignaud, A. Ferry, N. Messaddeq, Y. Kokunai, R. Tsuburaya, P. de la Grange, D. Dembele, V. Francois, G. Precigout, C. Boulade-Ladame, M. C. Hummel, A. Lopez de Munain, N. Sergeant, A. Laquerriere, C. Thibault, F. Deryckere, D. Auboeuf, L. Garcia, P.

- Zimmermann, B. Udd, B. Schoser, M. P. Takahashi, I. Nishino, G. Bassez, J. Laporte, D. Furling and N. Charlet-Berguerand (2011). "Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy." *Nat Med* **17**(6): 720-725.
- Gaj, T., B. E. Epstein and D. V. Schaffer (2016). "Genome Engineering Using Adeno-associated Virus: Basic and Clinical Research Applications." *Molecular Therapy* **24**(3): 458-464.
- Galkina, S. I., N. V. Fedorova, M. V. Serebryakova, E. A. Arifulin, V. I. Stadnichuk, T. V. Gaponova, L. A. Baratova and G. F. Sud'ina (2015). "Inhibition of the GTPase dynamin or actin depolymerisation initiates outward plasma membrane tubulation/vesiculation (cytoneme formation) in neutrophils." *Biol Cell* **107**(5): 144-158.
- Gao, D. C., J. Yang, Y. T. Wu, Q. W. Wang, Q. L. Wang, E. Y. Lai and J. H. Zhu (2016). "Targeting Dynamin 2 as a Novel Pathway to Inhibit Cardiomyocyte Apoptosis Following Oxidative Stress." *Cellular Physiology and Biochemistry* **39**(6): 2121-2134.
- Gao, X. J., J. W. Zhao, G. Han, Y. J. Zhang, X. Dong, L. M. Cao, Q. S. Wang, H. M. Moulton and H. F. Yin (2014). "Effective Dystrophin Restoration by a Novel Muscle-Homing Peptide-Morpholino Conjugate in Dystrophin-Deficient mdx Mice." *Molecular Therapy* **22**(7): 1333-1341.
- Garibaldi, M., J. Bohm, F. Fattori, C. Koch, C. Surace, P. Ottaviani, F. Laschena, J. Laporte, E. Bertini, G. Antonini and N. B. Romero (2016). "Novel Dominant Mutation in BIN1 Gene Causing Mild Centronuclear Myopathy Revealed by Myalgias and CK Elevation." *J Neuromuscul Dis* **3**(1): 111-114.
- Ge, K., J. DuHadaway, W. Du, M. Herlyn, U. Rodeck and G. C. Prendergast (1999). "Mechanism for elimination of a tumor suppressor: aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17): 9689-9694.
- Ge, K., J. DuHadaway, D. Sakamuro, R. Wechsler-Reya, C. Reynolds and G. C. Prendergast (2000). "Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity." *Int J Cancer* **85**(3): 376-383.
- Ge, Z., Y. Gu, Q. Han, G. Zhao, M. Li, J. Li, B. Chen, T. Sun, S. Dovat, R. P. Gale and C. Song (2016). "Targeting High Dynamin-2 (DNM2) Expression by Restoring Ikaros Function in Acute Lymphoblastic Leukemia." *Sci Rep* **6**: 38004.
- Gerull, B., M. Gramlich, J. Atherton, M. McNabb, K. Trombitas, S. Sasse-Klaassen, J. G. Seidman, C. Seidman, H. Granzier, S. Labeit, M. Frenneaux and L. Thierfelder (2002). "Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy." *Nat Genet* **30**(2): 201-204.
- Goemans, N. M., M. Tulinius, M. van den Hauwe, A. K. Kroksmark, G. Buyse, R. J. Wilson, J. C. van Deutekom, S. J. de Kimpe, A. Lourbakos and G. Campion (2016). "Long-Term Efficacy, Safety, and Pharmacokinetics of Drisapersen in Duchenne Muscular Dystrophy: Results from an Open-Label Extension Study." *Plos One* **11**(9).
- Gold, E. S., D. M. Underhill, N. S. Morrissette, J. Guo, M. A. McNiven and A. Aderem (1999). "Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages." *J Exp Med* **190**(12): 1849-1856.

Bibliographie

Goncalves, M. A. (2005). "Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector." *Virology* **2**: 43.

Gospe, S. M., Jr., D. L. Armstrong, M. V. Gresik and H. K. Hawkins (1987). "Life-threatening congestive heart failure as the presentation of centronuclear myopathy." *Pediatric Neurology* **3**(2): 117-120.

Hackman, P., S. Marchand, J. Sarparanta, A. Vihola, I. Penisson-Besnier, B. Eymard, J. M. Pardal-Fernandez, H. Hammouda el, I. Richard, I. Illa and B. Udd (2008). "Truncating mutations in C-terminal titin may cause more severe tibial muscular dystrophy (TMD)." *Neuromuscular Disorders* **18**(12): 922-928.

Hackman, P., A. Vihola, H. Haravuori, S. Marchand, J. Sarparanta, J. De Seze, S. Labeit, C. Witt, L. Peltonen, I. Richard and B. Udd (2002). "Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin." *Am J Hum Genet* **71**(3): 492-500.

Helliwell, T. R., I. H. Ellis and R. E. Appleton (1998). "Myotubular myopathy: morphological, immunohistochemical and clinical variation." *Neuromuscular Disorders* **8**(3-4): 152-161.

Herman, D. S., L. Lam, M. R. Taylor, L. Wang, P. Teekakirikul, D. Christodoulou, L. Conner, S. R. DePalma, B. McDonough, E. Sparks, D. L. Teodorescu, A. L. Cirino, N. R. Banner, D. J. Pennell, S. Graw, M. Merlo, A. Di Lenarda, G. Sinagra, J. M. Bos, M. J. Ackerman, R. N. Mitchell, C. E. Murry, N. K. Lakdawala, C. Y. Ho, P. J. Barton, S. A. Cook, L. Mestroni, J. G. Seidman and C. E. Seidman (2012). "Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy." *N Engl J Med* **366**(7): 619-628.

Herman, G. E., M. Finegold, W. Zhao, B. de Gouyon and A. Metzberg (1999). "Medical complications in long-term survivors with X-linked myotubular myopathy." *J Pediatr* **134**(2): 206-214.

Herrington, W. G., D. C. Talbot, M. M. Lahn, J. T. Brandt, S. Callies, R. Nagle, C. G. Winearls and I. S. Roberts (2011). "Association of long-term administration of the survivin mRNA-targeted antisense oligonucleotide LY2181308 with reversible kidney injury in a patient with metastatic melanoma." *Am J Kidney Dis* **57**(2): 300-303.

Hill, T., L. R. Odell, J. K. Edwards, M. E. Graham, A. B. McGeachie, J. Rusak, A. Quan, R. Abagyan, J. L. Scott, P. J. Robinson and A. McCluskey (2005). "Small molecule inhibitors of dynamin I GTPase activity: Development of dimeric tyrphostins." *Journal of Medicinal Chemistry* **48**(24): 7781-7788.

Hill, T. A., C. P. Gordon, A. B. McGeachie, B. Venn-Brown, L. R. Odell, N. Chau, A. Quan, A. Mariana, J. A. Sakoff, M. Chircop, P. J. Robinson and A. McCluskey (2009). "Inhibition of Dynamin Mediated Endocytosis by the Dynoles-Synthesis and Functional Activity of a Family of Indoles." *Journal of Medicinal Chemistry* **52**(12): 3762-3773.

Hill, T. A., A. Mariana, C. P. Gordon, L. R. Odell, M. J. Robertson, A. B. McGeachie, N. Chau, J. A. Daniel, N. N. Gorgani, P. J. Robinson and A. McCluskey (2010). "Iminochromene Inhibitors of Dynamins I and II GTPase Activity and Endocytosis." *Journal of Medicinal Chemistry* **53**(10): 4094-4102.

Hill, T. A., L. R. Odell, A. Quan, R. Abagyan, G. Ferguson, P. J. Robinson and A. McCluskey (2004). "Long chain amines and long chain ammonium salts as novel inhibitors of dynamin GTPase activity." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **14**(12): 3275-3278.

Bibliographie

Hinshaw, J. E. (2000). "Dynamin and its role in membrane fission." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 483-519.

Hnia, K., H. Tronchere, K. K. Tomczak, L. Amoasii, P. Schultz, A. H. Beggs, B. Payraastre, J. L. Mandel and J. Laporte (2011). "Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle." J Clin Invest **121**(1): 70-85.

Holla, P., I. Ahmad, Z. Ahmed and S. Jameel (2015). "Hepatitis E Virus Enters Liver Cells Through a Dynamin-2, Clathrin and Membrane Cholesterol-Dependent Pathway." Traffic **16**(4): 398-416.

Hu, L. J., J. Laporte, P. Kioschis, S. Heyberger, C. Kretz, A. Poustka, J. L. Mandel and N. Dahi (1996). "X-linked myotubular myopathy: refinement of the gene to a 280-kb region with new and highly informative microsatellite markers." Hum Genet **98**(2): 178-181.

Hu, L. J., J. Laporte, W. Kress, P. Kioschis, R. Siebenhaar, A. Poustka, M. Fardeau, A. Metzzenberg, E. A. Janssen, N. Thomas, J. L. Mandel and N. Dahl (1996). "Deletions in Xq28 in two boys with myotubular myopathy and abnormal genital development define a new contiguous gene syndrome in a 430 kb region." Hum Mol Genet **5**(1): 139-143.

Hussain, N. K., S. Jenna, M. Glogauer, C. C. Quinn, S. Wasiak, M. Guipponi, S. E. Antonarakis, B. K. Kay, T. P. Stossel, N. Lamarche-Vane and P. S. McPherson (2001). "Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP." Nat Cell Biol **3**(10): 927-932.

Jeannot, P. Y., G. Bassez, B. Eymard, P. Laforet, J. A. Urtizberea, A. Rouche, P. Guicheney, M. Fardeau and N. B. Romero (2004). "Clinical and histologic findings in autosomal centronuclear myopathy." Neurology **62**(9): 1484-1490.

Jones, D. M., L. A. Alvarez, R. Nolan, M. Ferriz, R. S. Urruela, X. Massana-Munoz, H. Novak-Kotzer, M. L. Dustin and S. Padilla-Parra (2017). "Dynamin-2 Stabilizes the HIV-1 Fusion Pore with a Low Oligomeric State." Cell Reports **18**(2): 443-453.

Jungbluth, H., C. Wallgren-Pettersson and J. Laporte (2008). "Centronuclear (myotubular) myopathy." Orphanet J Rare Dis **3**: 26.

Jurkat-Rott, K. and F. Lehmann-Horn (2005). "Muscle channelopathies and critical points in functional and genetic studies." J Clin Invest **115**(8): 2000-2009.

Kamagata, E., T. Kudo, R. Kimura, H. Tanimukai, T. Morihara, M. G. Sadik, K. Kamino and M. Takeda (2009). "Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters A beta metabolism." Biochemical and Biophysical Research Communications **379**(3): 691-695.

Kashiwakura, Y., K. Tamayose, K. Iwabuchi, Y. Hirai, T. Shimada, K. Matsumoto, T. Nakamura, M. Watanabe, K. Oshimi and H. Daida (2005). "Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection." J Virol **79**(1): 609-614.

Kawasaki, A. M., M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummins, C. Gonzalez and P. D. Cook (1993). "Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets." J Med Chem **36**(7): 831-841.

Bibliographie

- Kennerdell, J. R. and R. W. Carthew (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway." *Cell* **95**(7): 1017-1026.
- Kenniston, J. A. and M. A. Lemmon (2010). "Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients." *EMBO J* **29**(18): 3054-3067.
- Koenig, J. H. and K. Ikeda (1989). "Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval." *J Neurosci* **9**(11): 3844-3860.
- Kole, R., A. R. Krainer and S. Altman (2012). "RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides." *Nat Rev Drug Discov* **11**(2): 125-140.
- Kole, R. and P. Sazani (2001). "Antisense effects in the cell nucleus: modification of splicing." *Curr Opin Mol Ther* **3**(3): 229-234.
- Koornneef, A., P. Maczuga, R. van Logtenstein, F. Borel, B. Blits, T. Ritsema, S. van Deventer, H. Petry and P. Konstantinova (2011). "Apolipoprotein B knockdown by AAV-delivered shRNA lowers plasma cholesterol in mice." *Mol Ther* **19**(4): 731-740.
- Korshunov, A., R. Sycheva and A. Golanov (2007). "Recurrent cytogenetic aberrations in central neurocytomas and their biological relevance." *Acta Neuropathologica* **113**(3): 303-312.
- Kumar, R., S. K. Singh, A. A. Koshkin, V. K. Rajwanshi, M. Meldgaard and J. Wengel (1998). "The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA." *Bioorg Med Chem Lett* **8**(16): 2219-2222.
- Labeit, S. and B. Kolmerer (1995). "Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity." *Science* **270**(5234): 293-296.
- Labeit, S., B. Kolmerer and W. A. Linke (1997). "The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology." *Circ Res* **80**(2): 290-294.
- Laporte, J., L. J. Hu, C. Kretz, J. L. Mandel, P. Kioschis, J. F. Coy, S. M. Klauck, A. Poustka and N. Dahl (1996). "A gene mutated in X-linked myotubular myopathy defines a new putative tyrosine phosphatase family conserved in yeast." *Nat Genet* **13**(2): 175-182.
- Lawlor, M. W., M. S. Alexander, M. G. Viola, H. Meng, R. Joubert, V. Gupta, N. Motohashi, R. A. Manfready, C. P. Hsu, P. Huang, A. Buj-Bello, L. M. Kunkel, A. H. Beggs and E. Gussoni (2012). "Myotubularin-deficient myoblasts display increased apoptosis, delayed proliferation, and poor cell engraftment." *Am J Pathol* **181**(3): 961-968.
- Lawlor, M. W., M. G. Viola, H. Meng, R. V. Edelstein, F. Liu, K. Yan, E. J. Luna, A. Lerch-Gaggl, R. G. Hoffmann, C. R. Pierson, A. Buj-Bello, J. L. Lachey, S. Pearsall, L. Yang, C. J. Hillard and A. H. Beggs (2014). "Differential muscle hypertrophy is associated with satellite cell numbers and Akt pathway activation following activin type IIB receptor inhibition in Mtm1 p.R69C mice." *Am J Pathol* **184**(6): 1831-1842.
- Lee, E., M. Marcucci, L. Daniell, M. Pypaert, O. A. Weisz, G. C. Ochoa, K. Farsad, M. R. Wenk and P. De Camilli (2002). "Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle." *Science* **297**(5584): 1193-1196.

Bibliographie

- Lee, Y. Y., H. K. Jeon, J. Lee, J. E. Hong, I. G. Do, C. H. Choi, T. J. Kim, B. G. Kim, D. S. Bae, Y. C. Kim and J. W. Lee (2016). "Dynamin 2 Inhibitors as Novel Therapeutic Agents Against Cervical Cancer Cells." Anticancer Research **36**(12): 6381-6388.
- Lima, W. F., J. B. Rose, J. G. Nichols, H. Wu, M. T. Migawa, T. K. Wyrzykiewicz, A. M. Siwkowski and S. T. Crooke (2007). "Human RNase H1 discriminates between subtle variations in the structure of the heteroduplex substrate." Mol Pharmacol **71**(1): 83-91.
- Liu, N., S. Bezprozvannaya, J. M. Shelton, M. I. Frisard, M. W. Hulver, R. P. McMillan, Y. Wu, K. A. Voelker, R. W. Grange, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2011). "Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy." J Clin Invest **121**(8): 3258-3268.
- Lowenstein, P. R., R. J. Mandel, W. D. Xiong, K. Kroeger and M. G. Castro (2007). "Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: The role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions." Current Gene Therapy **7**(5): 347-360.
- Lu, Y. (2004). "Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy--a review." Stem Cells Dev **13**(1): 133-145.
- Lundmark, R. and S. R. Carlsson (2003). "Sorting nexin 9 participates in clathrin-mediated endocytosis through interactions with the core components." J Biol Chem **278**(47): 46772-46781.
- Macia, E., M. Ehrlich, R. Massol, E. Boucrot, C. Brunner and T. Kirchhausen (2006). "Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin." Developmental Cell **10**(6): 839-850.
- Mack, D. L., K. Poulard, M. A. Goddard, V. Latournerie, J. M. Snyder, R. W. Grange, M. R. Elverman, J. Denard, P. Veron, L. Buscara, C. Le Bec, J. Y. Hogrel, A. G. Brezovec, H. Meng, L. Yang, F. Liu, M. O'Callaghan, N. Gopal, V. E. Kelly, B. K. Smith, J. L. Strande, F. Mavilio, A. H. Beggs, F. Mingozzi, M. W. Lawlor, A. Buj-Bello and M. K. Childers (2017). "Systemic AAV8-Mediated Gene Therapy Drives Whole-Body Correction of Myotubular Myopathy in Dogs." Mol Ther **25**(4): 839-854.
- Maffucci, T. and M. Falasca (2014). "New insight into the intracellular roles of class II phosphoinositide 3-kinases." Biochem Soc Trans **42**(5): 1378-1382.
- Magee, K. R. and G. M. Shy (1956). "A new congenital non-progressive myopathy." Brain **79**(4): 610-621.
- Majczenko, K., A. E. Davidson, S. Camelo-Piragua, P. B. Agrawal, R. A. Manfready, X. Li, S. Joshi, J. Xu, W. Peng, A. H. Beggs, J. Z. Li, M. Burmeister and J. J. Dowling (2012). "Dominant mutation of CCDC78 in a unique congenital myopathy with prominent internal nuclei and atypical cores." Am J Hum Genet **91**(2): 365-371.
- Manoharan, M. (1999). "2'-carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation." Biochim Biophys Acta **1489**(1): 117-130.
- Mansoor, M. and A. J. Melendez (2008). "Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics." Gene Regul Syst Bio **2**: 275-295.

Bibliographie

Marks, B., M. H. Stowell, Y. Vallis, I. G. Mills, A. Gibson, C. R. Hopkins and H. T. McMahon (2001). "GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis." Nature **410**(6825): 231-235.

Masala, A., G. Delitala, G. Lo Dico, I. Stoppelli, S. Alagna and L. Devilla (1978). "Inhibition of lactation and inhibition of prolactin release after mechanical breast stimulation in puerperal women given tamoxifen or placebo." Br J Obstet Gynaecol **85**(2): 134-137.

McCarthy, J. J., R. Srikuea, T. J. Kirby, C. A. Peterson and K. A. Esser (2012). "Inducible Cre transgenic mouse strain for skeletal muscle-specific gene targeting." Skelet Muscle **2**(1): 8.

McCluskey, A., J. A. Daniel, G. Hadzic, N. Chau, E. L. Clayton, A. Mariana, A. Whiting, N. N. Gorgani, J. Lloyd, A. Quan, L. Moshkanbaryans, S. Krishnan, S. Perera, M. Chircop, L. von Kleist, A. B. McGeachie, M. T. Howes, R. G. Parton, M. Campbell, J. A. Sakoff, X. F. Wang, J. Y. Sun, M. J. Robertson, F. M. Deane, T. H. Nguyen, F. A. Meunier, M. A. Cousin and P. J. Robinson (2013). "Building a Better Dynasore: The Dyngo Compounds Potently Inhibit Dynamin and Endocytosis." Traffic **14**(12): 1272-1289.

McCrea, H. J. and P. De Camilli (2009). "Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease." Physiology (Bethesda) **24**: 8-16.

McEntagart, M., G. Parsons, A. Buj-Bello, V. Biancalana, I. Fenton, M. Little, M. Krawczak, N. Thomas, G. Herman, A. Clarke and C. Wallgren-Pettersson (2002). "Genotype-phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy." Neuromuscul Disord **12**(10): 939-946.

McNiven, M. A. (2005). "Dynamin in disease." Nat Genet **37**(3): 215-216.

McNiven, M. A., L. Kim, E. W. Krueger, J. D. Orth, H. Cao and T. W. Wong (2000). "Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape." J Cell Biol **151**(1): 187-198.

McPherson, P. S., K. Takei, S. L. Schmid and P. De Camilli (1994). "p145, a major Grb2-binding protein in brain, is co-localized with dynamin in nerve terminals where it undergoes activity-dependent dephosphorylation." J Biol Chem **269**(48): 30132-30139.

McPherson, R. A. and J. A. Rose (1983). "Structural proteins of adenovirus-associated virus: subspecies and their relatedness." J Virol **46**(2): 523-529.

Mendell, J. R., N. Goemans, L. P. Lowes, L. N. Alfano, K. Berry, J. Shao, E. M. Kaye, E. Mercuri, G. Eteplirsen Study and D. M. D. I. N. Telethon Foundation (2016). "Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy." Ann Neurol **79**(2): 257-271.

Mendell, J. R., L. R. Rodino-Klapac, Z. Sahenk, K. Roush, L. Bird, L. P. Lowes, L. Alfano, A. M. Gomez, S. Lewis, J. Kota, V. Malik, K. Shontz, C. M. Walker, K. M. Flanigan, M. Corridore, J. R. Kean, H. D. Allen, C. Shilling, K. R. Melia, P. Sazani, J. B. Saoud, E. M. Kaye and G. Eteplirsen Study (2013). "Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy." Ann Neurol **74**(5): 637-647.

Mendelson, E., J. P. Trempe and B. J. Carter (1986). "Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide." J Virol **60**(3): 823-832.

Bibliographie

- Millet, R., A. Rossi, A. Ploquin, A. L. Epstein, A. Greco and A. Salvetti (2013). "Les vecteurs AAV pour le transfert de gène in vivo ou comment un petit virus devient grand." *Virologie* **17**(5): 343-353.
- Mishra, L. and J. A. Rose (1990). "Adeno-associated virus DNA replication is induced by genes that are essential for HSV-1 DNA synthesis." *Virology* **179**(2): 632-639.
- Mooren, O. L., T. I. Kotova, A. J. Moore and D. A. Schafer (2009). "Dynamin2 GTPase and cortactin remodel actin filaments." *J Biol Chem* **284**(36): 23995-24005.
- Muhlberg, A. B., D. E. Warnock and S. L. Schmid (1997). "Domain structure and intramolecular regulation of dynamin GTPase." *EMBO J* **16**(22): 6676-6683.
- Muller, A. J., J. F. Baker, J. B. DuHadaway, K. Ge, G. Farmer, P. S. Donover, R. Meade, C. Reid, R. Grzanna, A. H. Roach, N. Shah, A. P. Soler and G. C. Prendergast (2003). "Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation." *Molecular and Cellular Biology* **23**(12): 4295-4306.
- Nakanishi, A., T. Abe, M. Watanabe, K. Takei and H. Yamada (2008). "Dynamin 2 cooperates with amphiphysin 1 in phagocytosis in sertoli cells." *Acta Med Okayama* **62**(6): 385-391.
- Napoli, C., C. Lemieux and R. Jorgensen (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." *Plant Cell* **2**(4): 279-289.
- Neumann, M., S. Heesch, C. Schlee, S. Schwartz, N. Gokbuget, D. Hoelzer, N. P. Konstandin, B. Ksienzyk, S. Vosberg, A. Graf, S. Krebs, H. Blum, T. Raff, M. Bruggemann, W. K. Hofmann, J. Hecht, S. K. Bohlander, P. A. Greif and C. D. Baldus (2013). "Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations." *Blood* **121**(23): 4749-4752.
- Nicot, A. S., A. Toussaint, V. Tosch, C. Kretz, C. Wallgren-Pettersson, E. Iwarsson, H. Kingston, J. M. Garnier, V. Biancalana, A. Oldfors, J. L. Mandel and J. Laporte (2007). "Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy." *Nat Genet* **39**(9): 1134-1139.
- Nonnenmacher, M. and T. Weber (2012). "Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors." *Gene Ther* **19**(6): 649-658.
- North, K. N., C. H. Wang, N. Clarke, H. Jungbluth, M. Vainzof, J. J. Dowling, K. Amburgey, S. Quijano-Roy, A. H. Beggs, C. Sewry, N. G. Laing, C. G. Bonnemann and M. International Standard of Care Committee for Congenital (2014). "Approach to the diagnosis of congenital myopathies." *Neuromuscul Disord* **24**(2): 97-116.
- Obar, R. A., C. A. Collins, J. A. Hammarback, H. S. Shpetner and R. B. Vallee (1990). "Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins." *Nature* **347**(6290): 256-261.
- Obika, S., D. Nanbu, Y. Hari, K. Morio, Y. In, T. Ishida and T. Imanishi (1997). "Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C-3,-endo sugar pucker." *Tetrahedron Letters* **38**(50): 8735-8738.
- Odell, L. R., D. Howan, C. P. Gordon, M. J. Robertson, N. Chau, A. Mariana, A. E. Whiting, R. Abagyan, J. A. Daniel, N. N. Gorgani, P. J. Robinson and A. McCluskey (2010).

Bibliographie

"The Pthaladyns: GTP Competitive Inhibitors of Dynamin I and II GTPase Derived from Virtual Screening." Journal of Medicinal Chemistry **53**(14): 5267-5280.

Oelgeschlager, M., J. Larrain, D. Geissert and E. M. De Robertis (2000). "The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling." Nature **405**(6788): 757-763.

Ogston, P., K. Raj and P. Beard (2000). "Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein." J Virol **74**(8): 3494-3504.

Oh, P., D. P. McIntosh and J. E. Schnitzer (1998). "Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium." J Cell Biol **141**(1): 101-114.

Okamoto, P. M., B. Tripet, J. Litowski, R. S. Hodges and R. B. Vallee (1999). "Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly." J Biol Chem **274**(15): 10277-10286.

Orth, J. D. and M. A. McNiven (2003). "Dynamin at the actin-membrane interface." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 31-39.

Otsuka, A., T. Abe, M. Watanabe, H. Yagisawa, K. Takei and H. Yamada (2009). "Dynamin 2 is required for actin assembly in phagocytosis in Sertoli cells." Biochem Biophys Res Commun **378**(3): 478-482.

Pallan, P. S., C. R. Allerson, A. Berdeja, P. P. Seth, E. E. Swayze, T. P. Prakash and M. Egly (2012). "Structure and nuclease resistance of 2',4'-constrained 2'-O-methoxyethyl (cMOE) and 2'-O-ethyl (cEt) modified DNAs." Chem Commun (Camb) **48**(66): 8195-8197.

Pandey, V. N., A. Upadhyay and B. Chaubey (2009). "Prospects for antisense peptide nucleic acid (PNA) therapies for HIV." Expert Opin Biol Ther **9**(8): 975-989.

Penaud-Budloo, M., C. Le Guiner, A. Nowrouzi, A. Toromanoff, Y. Cherel, P. Chenuaud, M. Schmidt, C. von Kalle, F. Rolling, P. Moullier and R. O. Snyder (2008). "Adeno-associated virus vector Genomes persist as episomal chromatin in primate muscle." Journal of Virology **82**(16): 7875-7885.

Penisson-Besnier, I., V. Biancalana, P. Reynier, M. Cossee and F. Dubas (2007). "Diagnosis of myotubular myopathy in the oldest known manifesting female carrier: a clinical and genetic study." Neuromuscul Disord **17**(2): 180-185.

Pizzato, M., A. Helander, E. Popova, A. Calistri, A. Zamborlini, G. Palu and H. G. Gottlinger (2007). "Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(16): 6812-6817.

Praefcke, G. J. and H. T. McMahon (2004). "The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules?" Nat Rev Mol Cell Biol **5**(2): 133-147.

Prokic, I., B. S. Cowling and J. Laporte (2014). "Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases." J Mol Med (Berl) **92**(5): 453-463.

Qing, K., C. Mah, J. Hansen, S. Zhou, V. Dwarki and A. Srivastava (1999). "Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2." Nat Med **5**(1): 71-77.

- Quan, A., A. B. McGeachie, D. J. Keating, E. M. van Dam, J. Rusak, N. Chau, C. S. Malladi, C. Chen, A. McCluskey, M. A. Cousin and P. J. Robinson (2007). "Myristyl trimethyl ammonium bromide and octadecyl trimethyl ammonium bromide are surface-active small molecule dynamin inhibitors that block endocytosis mediated by dynamin I or dynamin II." Molecular Pharmacology **72**(6): 1425-1439.
- Ravenscroft, G., N. G. Laing and C. G. Bonnemann (2015). "Pathophysiological concepts in the congenital myopathies: blurring the boundaries, sharpening the focus." Brain **138**(Pt 2): 246-268.
- Richardson, W. D. and H. Westphal (1981). "A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno-associated virus." Cell **27**(1 Pt 2): 133-141.
- Robb, S. A., C. A. Sewry, J. J. Dowling, L. Feng, T. Cullup, S. Lillis, S. Abbs, M. M. Lees, J. Laporte, A. Y. Manzur, R. K. Knight, K. R. Mills, M. G. Pike, W. Kress, D. Beeson, H. Jungbluth, M. C. Pitt and F. Muntoni (2011). "Impaired neuromuscular transmission and response to acetylcholinesterase inhibitors in centronuclear myopathies." Neuromuscul Disord **21**(6): 379-386.
- Robinson, R. L., C. Brooks, S. L. Brown, F. R. Ellis, P. J. Halsall, R. J. Quinnell, M. A. Shaw and P. M. Hopkins (2002). "RYR1 mutations causing central core disease are associated with more severe malignant hyperthermia in vitro contracture test phenotypes." Hum Mutat **20**(2): 88-97.
- Romero, N. B. (2010). "Centronuclear myopathies: a widening concept." Neuromuscul Disord **20**(4): 223-228.
- Romero, N. B. and M. Bitoun (2011). "Centronuclear myopathies." Semin Pediatr Neurol **18**(4): 250-256.
- Romero, N. B., N. Monnier, L. Viollet, A. Cortey, M. Chevally, J. P. Leroy, J. Lunardi and M. Fardeau (2003). "Dominant and recessive central core disease associated with RYR1 mutations and fetal akinesia." Brain **126**(Pt 11): 2341-2349.
- Romeu, A. and L. Arola (2014). "Classical dynamin DNMI and DNMI3 genes attain maximum expression in the normal human central nervous system." BMC Res Notes **7**: 188.
- Rose, J. A., J. V. Maizel, Jr., J. K. Inman and A. J. Shatkin (1971). "Structural proteins of adenovirus-associated viruses." J Virol **8**(5): 766-770.
- Royer, B., K. Hnia, C. Gavriilidis, H. Tronchere, V. Tosch and J. Laporte (2013). "The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies." EMBO Rep **14**(10): 907-915.
- Saal, K. A., J. C. Koch, L. Tatenhorst, E. M. Szego, V. T. Ribas, U. Michel, M. Bahr, L. Tonges and P. Lingor (2015). "AAV.shRNA-mediated downregulation of ROCK2 attenuates degeneration of dopaminergic neurons in toxin-induced models of Parkinson's disease in vitro and in vivo." Neurobiol Dis **73**: 150-162.
- Sabha, N., J. R. Volpatti, H. Gonorazky, A. Reifler, A. E. Davidson, X. Li, N. M. Eltayeb, C. Dall'Armi, G. Di Paolo, S. V. Brooks, A. Buj-Bello, E. L. Feldman and J. J. Dowling (2016). "PIK3C2B inhibition improves function and prolongs survival in myotubular myopathy animal models." J Clin Invest **126**(9): 3613-3625.

Bibliographie

- Salmon, F., K. Grosios and H. Petry (2014). "Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera(R))." Expert Rev Clin Pharmacol **7**(1): 53-65.
- Salva, M. Z., C. L. Himeda, P. W. Tai, E. Nishiuchi, P. Gregorevic, J. M. Allen, E. E. Finn, Q. G. Nguyen, M. J. Blankinship, L. Meuse, J. S. Chamberlain and S. D. Hauschka (2007). "Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle." Mol Ther **15**(2): 320-329.
- Salveti, A., S. Oreve, G. Chadeuf, D. Favre, Y. Cherel, P. Champion-Arnaud, J. David-Ameline and P. Moullier (1998). "Factors influencing recombinant adeno-associated virus production." Hum Gene Ther **9**(5): 695-706.
- Sarnat, H. B., S. I. Roth and J. F. Jimenez (1981). "Neonatal myotubular myopathy: neuropathy and failure of postnatal maturation of fetal muscle." Can J Neurol Sci **8**(4): 313-320.
- Sarparanta, J., G. Blandin, K. Charton, A. Vihola, S. Marchand, A. Milic, P. Hackman, E. Ehler, I. Richard and B. Udd (2010). "Interactions with M-band titin and calpain 3 link myospryn (CMYA5) to tibial and limb-girdle muscular dystrophies." J Biol Chem **285**(39): 30304-30315.
- Schafer, D. A. (2004). "Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin." Traffic **5**(7): 463-469.
- Schara, U., W. Kress, J. Tucke and W. Mortier (2003). "X-linked myotubular myopathy in a female infant caused by a new MTM1 gene mutation." Neurology **60**(8): 1363-1365.
- Sei, Y., N. N. Sambughin, E. J. Davis, D. Sachs, P. B. Cuenca, B. W. Brandom, T. Tautz, H. Rosenberg, T. E. Nelson and S. M. Muldoon (2004). "Malignant hyperthermia in North America: genetic screening of the three hot spots in the type I ryanodine receptor gene." Anesthesiology **101**(4): 824-830.
- Sever, S., A. B. Muhlberg and S. L. Schmid (1999). "Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis." Nature **398**(6727): 481-486.
- Sever, S., J. Skoch, S. Newmyer, R. Ramachandran, D. Ko, M. McKee, R. Bouley, D. Ausiello, B. T. Hyman and B. J. Bacskai (2006). "Physical and functional connection between auxilin and dynamin during endocytosis." EMBO J **25**(18): 4163-4174.
- Shaaban, M. M. (1975). "Suppression of lactation by an antiestrogen, tamoxifen." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **4**(5): 167-169.
- Shajahan, A. N., B. K. Timblin, R. Sandoval, C. Tiruppathi, A. B. Malik and R. D. Minshall (2004). "Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells." J Biol Chem **279**(19): 20392-20400.
- Shen, J., W. M. Yu, M. Brotto, J. A. Scherman, C. Guo, C. Stoddard, T. M. Nosek, H. H. Valdivia and C. K. Qu (2009). "Deficiency of MIP/MTMR14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca(2+) homeostasis." Nat Cell Biol **11**(6): 769-776.
- Sher, J. H., A. B. Rimalovski, T. J. Athanassiades and S. M. Aronson (1967). "Familial myotubular myopathy: a clinical, pathological, histochemical, and ultrastructural study." J Neuropathol Exp Neurol **26**(1): 132-133.

Bibliographie

Shi, D., D. Xie, H. Zhang, H. Zhao, J. Huang, C. Li, Y. Liu, F. Lv, E. The, Y. Liu, T. Yuan, S. Wang, J. Chen, L. Pan, Z. Yu, D. Liang, W. Zhu, Y. Zhang, L. Li, L. Peng, J. Li and Y. H. Chen (2014). "Reduction in dynamin-2 is implicated in ischaemic cardiac arrhythmias." J Cell Mol Med **18**(10): 1992-1999.

Shpetner, H. S. and R. B. Vallee (1989). "Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules." Cell **59**(3): 421-432.

Siegel, I. M. (1983). "Foot deformity in myotubular myopathy. Pathology of intrinsic foot musculature." Arch Neurol **40**(9): 589.

Sloan, R. D., B. D. Kuhl, T. Mesplede, J. Munch, D. A. Donahue and M. A. Wainberg (2013). "Productive Entry of HIV-1 during Cell-to-Cell Transmission via Dynamin-Dependent Endocytosis." Journal of Virology **87**(14): 8110-8123.

Smirnova, E., D. L. Shurland, E. D. Newman-Smith, B. Pishvae and A. M. van der Blik (1999). "A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains." J Biol Chem **274**(21): 14942-14947.

Smolenicka, Z., J. Laporte, L. Hu, N. Dahl, J. Fitzpatrick, W. Kress and S. Liechti-Gallati (1996). "X-linked myotubular myopathy: refinement of the critical gene region." Neuromuscul Disord **6**(4): 275-281.

Sonntag, F., K. Schmidt and J. A. Kleinschmidt (2010). "A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(22): 10220-10225.

Sontag, J. M., E. M. Fykse, Y. Ushkaryov, J. P. Liu, P. J. Robinson and T. C. Sudhof (1994). "Differential expression and regulation of multiple dynamins." J Biol Chem **269**(6): 4547-4554.

Spiro, A. J., G. M. Shy and N. K. Gonatas (1966). "Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy." Arch Neurol **14**(1): 1-14.

Srinivasan, S. K., H. K. Tewary and P. L. Iversen (1995). "Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin." Antisense Res Dev **5**(2): 131-139.

Starr, J., M. Lamont, L. Iselius, J. Harvey and J. Heckmatt (1990). "A linkage study of a large pedigree with X linked centronuclear myopathy." J Med Genet **27**(5): 281-283.

Stein, C. A., C. Subasinghe, K. Shinozuka and J. S. Cohen (1988). "Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides." Nucleic Acids Res **16**(8): 3209-3221.

Straarup, E. M., N. Fisker, M. Hedtjarn, M. W. Lindholm, C. Rosenbohm, V. Aarup, H. F. Hansen, H. Orum, J. B. Hansen and T. Koch (2010). "Short locked nucleic acid antisense oligonucleotides potently reduce apolipoprotein B mRNA and serum cholesterol in mice and non-human primates." Nucleic Acids Res **38**(20): 7100-7111.

Summerford, C. and R. J. Samulski (1998). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions." J Virol **72**(2): 1438-1445.

Sun, A., J. Tang, P. F. Terranova, X. Zhang, J. B. Thrasher and B. Li (2010). "Adeno-associated virus-delivered short hairpin-structured RNA for androgen receptor gene silencing

Bibliographie

induces tumor eradication of prostate cancer xenografts in nude mice: a preclinical study." Int J Cancer **126**(3): 764-774.

Sutton, I. J., J. B. Winer, A. N. Norman, S. Liechti-Gallati and F. MacDonald (2001). "Limb girdle and facial weakness in female carriers of X-linked myotubular myopathy mutations." Neurology **57**(5): 900-902.

Svoboda, P., P. Stein, H. Hayashi and R. M. Schultz (2000). "Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference." Development **127**(19): 4147-4156.

Swayze, E. E., A. M. Siwkowski, E. V. Wancewicz, M. T. Migawa, T. K. Wyrzykiewicz, G. Hung, B. P. Monia and C. F. Bennett (2007). "Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals." Nucleic Acids Research **35**(2): 687-700.

Sweitzer, S. M. and J. E. Hinshaw (1998). "Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation." Cell **93**(6): 1021-1029.

Takei, K., V. I. Slepnev, V. Haucke and P. De Camilli (1999). "Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis." Nat Cell Biol **1**(1): 33-39.

Taylor, G. S., T. Maehama and J. E. Dixon (2000). "Myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8910-8915.

Taylor, M., S. Graw, G. Sinagra, C. Barnes, D. Slavov, F. Brun, B. Pinamonti, E. E. Salcedo, W. Sauer, S. Pyxaras, B. Anderson, B. Simon, J. Bogomolovas, S. Labeit, H. Granzier and L. Mestroni (2011). "Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes." Circulation **124**(8): 876-885.

Thompson, H. M., H. Cao, J. Chen, U. Euteneuer and M. A. McNiven (2004). "Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion." Nat Cell Biol **6**(4): 335-342.

Thompson, H. M., A. R. Skop, U. Euteneuer, B. J. Meyer and M. A. McNiven (2002). "The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis." Curr Biol **12**(24): 2111-2117.

Tosch, V., H. M. Rohde, H. Tronchere, E. Zanuteli, N. Monroy, C. Kretz, N. Dondaine, B. Payastre, J. L. Mandel and J. Laporte (2006). "A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P₂ phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy." Hum Mol Genet **15**(21): 3098-3106.

Tsujita, K., T. Itoh, T. Ijuin, A. Yamamoto, A. Shisheva, J. Laporte and T. Takenawa (2004). "Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction." J Biol Chem **279**(14): 13817-13824.

van Poelgeest, E. P., R. M. Swart, M. G. Betjes, M. Moerland, J. J. Weening, Y. Tessier, M. R. Hodges, A. A. Levin and J. Burggraaf (2013). "Acute kidney injury during therapy with an antisense oligonucleotide directed against PCSK9." Am J Kidney Dis **62**(4): 796-800.

Van Vlierberghe, P., A. Ambesi-Impombato, K. De Keersmaecker, M. Hadler, E. Paietta, M. S. Tallman, J. M. Rowe, C. Forne, M. Rue and A. A. Ferrando (2013). "Prognostic

relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia." Blood **122**(1): 74-82.

van Wijngaarden, G. K., P. Fleury, J. Bethlem and A. E. Meijer (1969). "Familial "myotubular" myopathy." Neurology **19**(9): 901-908.

Vandervan, P. F. M., P. H. K. Jap, P. G. Barth, R. C. A. Sengers, F. C. S. Ramaekers and A. M. Stadhouders (1995). "Abnormal Expression of Intermediate Filament Proteins in X-Linked Myotubular Myopathy Is Not Reproduced in-Vitro." Neuromuscular Disorders **5**(4): 267-275.

Vaucheret, H. and M. Fagard (2001). "Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators." Trends Genet **17**(1): 29-35.

Verhies, W., J. M. Brucher, P. Goddeeris, J. Lauweryns and H. De Geest (1976). "Familial centronuclear myopathy associated with 'cardiomyopathy'." Br Heart J **38**(5): 504-509.

Wallgren-Pettersson, C., A. Clarke, F. Samson, M. Fardeau, V. Dubowitz, H. Moser, T. Grimm, R. J. Barohn and P. G. Barth (1995). "The myotubular myopathies: differential diagnosis of the X linked recessive, autosomal dominant, and autosomal recessive forms and present state of DNA studies." J Med Genet **32**(9): 673-679.

Wang, H., C. Castiglioni, A. Kacar Bayram, F. Fattori, S. Pekuz, D. Araneda, H. Per, R. Erazo, H. Gumus, S. Zorludemir, K. Becker, X. Ortega, J. A. Bevilacqua, E. Bertini and S. Cirak (2017). "Insights from genotype-phenotype correlations by novel SPEG mutations causing centronuclear myopathy." Neuromuscul Disord.

Wang, L., B. Barylko, C. Byers, J. A. Ross, D. M. Jameson and J. P. Albanesi (2010). "Dynamin 2 mutants linked to centronuclear myopathies form abnormally stable polymers." J Biol Chem **285**(30): 22753-22757.

Wang, Q. C., J. Liu, Z. B. Wang, Y. Zhang, X. Duan, X. S. Cui, N. H. Kim and S. C. Sun (2014). "Dynamin 2 regulates actin-mediated spindle migration in mouse oocytes." Biol Cell **106**(6): 193-202.

Warnock, D. E., T. Baba and S. L. Schmid (1997). "Ubiquitously expressed dynamin-II has a higher intrinsic GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal dynamin-I." Mol Biol Cell **8**(12): 2553-2562.

Wigge, P., K. Kohler, Y. Vallis, C. A. Doyle, D. Owen, S. P. Hunt and H. T. McMahon (1997). "Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis." Mol Biol Cell **8**(10): 2003-2015.

Wilmshurst, J. M., S. Lillis, H. Zhou, K. Pillay, H. Henderson, W. Kress, C. R. Muller, A. Ndong, V. Cloke, T. Cullup, E. Bertini, C. Boennemann, V. Straub, R. Quinlivan, J. J. Dowling, S. Al-Sarraj, S. Treves, S. Abbs, A. Y. Manzur, C. A. Sewry, F. Muntoni and H. Jungbluth (2010). "RYR1 mutations are a common cause of congenital myopathies with central nuclei." Ann Neurol **68**(5): 717-726.

Wu, S., M. C. Ibarra, M. C. Malicdan, K. Murayama, Y. Ichihara, H. Kikuchi, I. Nonaka, S. Noguchi, Y. K. Hayashi and I. Nishino (2006). "Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients." Brain **129**(Pt 6): 1470-1480.

Bibliographie

- Wu, T., Z. Shi and T. Baumgart (2014). "Mutations in BIN1 associated with centronuclear myopathy disrupt membrane remodeling by affecting protein density and oligomerization." *PLoS One* **9**(4): e93060.
- Wu, Z., A. Asokan and R. J. Samulski (2006). "Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy." *Mol Ther* **14**(3): 316-327.
- Yamada, H., T. Takeda, H. Michiue, T. Abe and K. Takei (2016). "Actin bundling by dynamin 2 and cortactin is implicated in cell migration by stabilizing filopodia in human non-small cell lung carcinoma cells." *Int J Oncol* **49**(3): 877-886.
- Yang, Q., Y. Tang, K. Imbrogno, A. Lu, J. D. Proto, A. Chen, F. Guo, F. H. Fu, J. Huard and B. Wang (2012). "AAV-based shRNA silencing of NF-kappaB ameliorates muscle pathologies in mdx mice." *Gene Ther* **19**(12): 1196-1204.
- Yang, W. (2011). "Nucleases: diversity of structure, function and mechanism." *Q Rev Biophys* **44**(1): 1-93.
- Yarar, D., M. C. Surka, M. C. Leonard and S. L. Schmid (2008). "SNX9 activities are regulated by multiple phosphoinositides through both PX and BAR domains." *Traffic* **9**(1): 133-146.
- Yin, H. F., H. M. Moulton, C. Betts, Y. Seow, J. Boutilier, P. L. Iverson and M. J. A. Wood (2009). "A fusion peptide directs enhanced systemic dystrophin exon skipping and functional restoration in dystrophin-deficient mdx mice." *Human Molecular Genetics* **18**(22): 4405-4414.
- Yoshida, Y., M. Kinuta, T. Abe, S. Liang, K. Araki, O. Cremona, G. Di Paolo, Y. Moriyama, T. Yasuda, P. De Camilli and K. Takei (2004). "The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature." *EMBO J* **23**(17): 3483-3491.
- Zamecnik, P. C. and M. L. Stephenson (1978). "Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(1): 280-284.
- Zhang, J. H., L. Ding, L. Holmfeldt, G. Wu, S. L. Heatley, D. Payne-Turner, J. Easton, X. Chen, J. M. Wang, M. Rusch, C. Lu, S. C. Chen, L. Wei, J. R. Collins-Underwood, J. Ma, K. G. Roberts, S. B. Pounds, A. Ulyanov, J. Becksfort, P. Gupta, R. Huether, R. W. Kriwacki, M. Parker, D. J. McGoldrick, D. Zhao, D. Alford, S. Espy, K. C. Bobba, G. C. Song, D. Q. Pei, C. Cheng, S. Roberts, M. I. Barbato, D. Campana, E. Coustan-Smith, S. A. Shurtleff, S. C. Raimondi, M. Kleppe, J. Cools, K. A. Shimano, M. L. Hermiston, S. Doulatov, K. Eppert, E. Laurenti, F. Notta, J. E. Dick, G. Basso, S. P. Hunger, M. L. Loh, M. Devidas, B. Wood, S. Winter, K. P. Dunsmore, R. S. Fulton, L. L. Fulton, X. Hong, C. C. Harris, D. J. Dooling, K. Ochoa, K. J. Johnson, J. C. Obenauer, W. E. Evans, C. H. Pui, C. W. Naeve, T. J. Ley, E. R. Mardis, R. K. Wilson, J. R. Downing and C. G. Mullighan (2012). "The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia." *Nature* **481**(7380): 157-163.
- Zincarelli, C., S. Soltys, G. Rengo and J. E. Rabinowitz (2008). "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection." *Molecular Therapy* **16**(6): 1073-1080.
- Zoncu, R., R. M. Perera, R. Sebastian, F. Nakatsu, H. Chen, T. Balla, G. Ayala, D. Toomre and P. V. De Camilli (2007). "Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute

Bibliographie

depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(10): 3793-3798.

Zuchner, S., M. Nouredine, M. Kennerson, K. Verhoeven, K. Claeys, P. De Jonghe, J. Merory, S. A. Oliveira, M. C. Speer, J. E. Stenger, G. Walizada, D. Zhu, M. A. Pericak-Vance, G. Nicholson, V. Timmerman and J. M. Vance (2005). "Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease." Nat Genet **37**(3): 289-294.

Sites internet :

http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids_104_musclenerve_path/student_musclenerve/subpages/nl.html

<http://frontalcortex.com/?page=oll&topic=24&qid=86>

<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/groups/hmm/Dynamin/>

<https://www.labome.com/method/siRNAs-and-shRNAs-Tools-for-Protein-Knockdown-by-Gene-Silencing.html>



Hichem TASFAOUT



Physiopathologie et validation préclinique dans les myopathies centronucléaires

Résumé

La myopathie myotubulaire est une maladie musculaire congénitale très sévère. Le laboratoire d'accueil a démontré que les échantillons de muscle de patients atteints de cette maladie ainsi que le modèle murin présentent une surexpression de DNM2, alors que sa réduction par croisement génétique améliore les signes cliniques et histologiques de la maladie.

Le but de ce travail consistait à développer, tester et valider des composés injectables qui ciblent DNM2 et diminuent son niveau. Deux approches thérapeutiques ont été développées l'une basée sur l'utilisation de virus adéno-associés (AAV) exprimant des shRNA, l'autre sur les oligonucleotides antisens (ASO). L'injection des vecteurs AAV-sh*Dnm2* ou bien les ASO-*Dnm2* pouvait corriger les défauts histologiques et fonctionnels des muscles des souris myopathes.

Les résultats obtenus montrent le potentiel thérapeutique de la réduction de DNM2, et présente une nouvelle approche pour le traitement de la myopathie myotubulaire.

Myopathie myotubulaire, myopathies centronucléaires, virus adéno-associés, oligonucleotides antisens, Dynamine2, Myotubularine1

Résumé en anglais

Myotubular myopathy is a severe muscle disease. We previously have shown that muscle specimens of both patients and the mouse model presented an overexpression of DNM2, while its genetic reduction prevents the development of the muscle phenotypes.

The aim of this work was to develop, test and validate deliverable compounds. Two therapeutic approaches were used. Injection of antisense oligonucleotide or adeno-associated virus expressing shRNA restores a normal lifespan with improved muscle structure and function of the myopathic mice.

These results demonstrate that therapeutic potential of reduction of DNM2 level and provides an attractive therapeutic strategy that could be applied to treat myotubular myopathy.

Myotubular myopathy, centronuclear myopathies, adeno-associated virus, antisense oligonucleotides, Dynamin2, Myotubularin1