



**HAL**  
open science

# Identification de composés pharmacologiques augmentant le relâchement calcique dans les cellules musculaires

Lauriane Travard

► **To cite this version:**

Lauriane Travard. Identification de composés pharmacologiques augmentant le relâchement calcique dans les cellules musculaires. Physiologie [q-bio.TO]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV051 . tel-03873597

**HAL Id: tel-03873597**

**<https://theses.hal.science/tel-03873597>**

Submitted on 27 Nov 2022

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant  
Spécialité : Physiologie-Physiopathologies-Pharmacologie  
Unité de recherche : Grenoble Institut des Neurosciences

**Identification de composés pharmacologiques augmentant le relâchement calcique dans les cellules musculaires**

**Identification of pharmacological compounds increasing calcium release in muscle cells**

Présentée par :

**Lauriane TRAVARD**

Direction de thèse :

**Isabelle MARTY**  
Directeur d'équipe, Université Grenoble Alpes  
**Laurent PELLETIER**

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

**Andrei POPOV**  
INSERM/Ecrins Therapeutics

Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

**Maud FRIEDEN**  
PROFESSEUR ASSOCIE, Université de Genève  
**Vincent GACHE**  
CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Auvergne-Rhône-Alpes

Thèse soutenue publiquement le **26 juillet 2022**, devant le jury composé de :

**Isabelle MARTY**  
DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM délégation Auvergne-Rhône-Alpes  
**Maud FRIEDEN**  
PROFESSEUR ASSOCIE, Université de Genève  
**Vincent GACHE**  
CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Auvergne-Rhône-Alpes  
**Laurent PELLETIER**  
MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER, Université Grenoble Alpes  
**François BOUCHER**  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes  
**Corinne ROUCARD**  
DOCTEUR EN SCIENCES, Synapcell

Directrice de thèse

Rapporteuse

Rapporteur

Co-directeur de thèse

Président

Examinatrice

Invités :

**Andrei POPOV**





# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon jury : Pr. Maud Frieden, Dr. Vincent Gache, Pr. François Boucher et Dr. Corinne Roucard, pour avoir accepté avec enthousiasme d'évaluer et discuter de mes travaux de thèse.

De manière plus large, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin et encouragée pendant toutes ces années, et sans qui ce travail n'aurait pas pu être ce qu'il est.

Je souhaite d'abord remercier mes (nombreux !) encadrants.

Merci à Isabelle, ma directrice de thèse pour m'avoir accueillie dans l'équipe CMyPath (on me souffle à l'oreille que ce serait la meilleure équipe du monde...peut-être même de l'univers...) il y a maintenant plus de 5 ans, sans quoi je ne serais peut-être pas tombée dans le muscle. Et ça aurait été bien dommage, parce que le muscle c'est la vie ! Merci pour ta confiance, tes conseils et tes encouragements, et bien sûr un immense merci d'avoir tout fait pour que je puisse rester dans l'équipe jusqu'au bout, même quand ça s'annonçait compliqué.

Merci à Andrei pour m'avoir également accueillie au sein d'Ecrins Therapeutics, me permettant ainsi d'obtenir une bourse CIFRE et de découvrir un autre côté de la recherche, cette fois-ci en entreprise, avec les méthodes de travail et contraintes qui s'y rapportent. Cela a été un réel plus pour moi, et en particulier m'a permis d'appréhender mon avenir professionnel d'une manière qui aurait sans doute été très différente dans un cadre plus classique.

Un énorme merci aussi, bien sûr, à Laurent pour m'avoir supportée toutes ces années ! Je n'aurais pas pu rêver d'un meilleur co-directeur, que ce soit pour le côté scientifique et professionnel ou en dehors. J'ai toujours apprécié les critiques parfois un peu brusques mais toujours justes qui m'ont permis de m'améliorer sur de nombreux aspects, notamment à l'oral où je n'oublierai plus jamais de parler à la fois moins fort, et plus vite. Une petite pensée également pour les tartines, nos discussions plus ou moins longues à toute heure de la journée, et nos fameux thés dansants (thé et danse non inclus) qui ont rendu la rédaction de ce mémoire fort agréable.

Un grand merci également à Aurélie, qui a échappé aux toutes premières galères mais a été un énorme soutien à travers plein d'autres ! Merci pour ta bonne humeur, pour tous tes conseils précieux et ta présence continue, en particulier sur la fin de thèse et pour la préparation de la suite, même quand tu avais parfois d'autres priorités tout à fait compréhensibles. Et puis il faut encore qu'on se fasse ce resto, depuis le temps qu'on en parle !

Et merci à Benoît également, qui est parti vers d'autres horizons à la fin de ma première année mais dont l'encadrement a été très apprécié sur cette période et même un peu au-delà. Tant de galères sur ce satané criblage à l'époque, mais on l'a fait !

Ensuite, que seraient ces remerciements sans citer Cricri, mon Mr Bien-Etre préféré de la citadelle ! Merci de t'être toujours soucie de comment j'allais, même (et surtout) quand ça n'allait pas, et évidemment pour toutes nos petites et grandes discussions sur l'informatique et autres geekeries vidéoludiques. Et puis maintenant que je vais avoir, on l'espère, un peu plus de temps libre, je penserai bien sûr à toi en avançant dans Kaamelot !

Bien sûr, je tiens aussi à remercier mes collègues des deux équipes (ou équivalent) dont j'ai fait partie !

Merci aux membres actuels et anciens (mais pas en âge, promis) de l'équipe 4 « Myologie Cellulaire et Pathologies », on ne le répètera jamais assez, la meilleure du monde et de l'univers ! Je garderai toujours d'excellents souvenirs des années passées parmi vous, dans la joie et la bonne humeur et une ambiance qui a certes évolué depuis mon arrivée mais est toujours restée très conviviale et, il faut le dire, agréable et appréciable.

Merci à Julie, notre adjudant-chef sans qui nous ne serions rien, pour ta patience incroyable et pour tout ce que tu m'as appris, de mes débuts dans l'imagerie calcique aux blots : à défaut d'aimer ça, je sais maintenant faire des blots qui marchent ! Merci à Anne également : on a peut-être été en désaccord sur certaines choses, parfois (une minute de silence pour les noms de fichiers à rallonge...j'en rêve encore la nuit...), mais sans rancune ! Merci à Anne-Sophie et Julien, pour leur rigueur scientifique et les questions qui piquent lors des présentations, et merci à John, Nathalie et Martial, la team CHU.

Ensuite, merci à Mathilde, avec qui j'ai passé d'excellents moments, dont toutes ces soirées rigolotes à dessiner des idioties en groupe et à survivre en forêt avec plus ou moins de difficulté qui se sont naturellement espacées avec l'avancée de nos thèses respectives et la réduction du temps libre qui en a logiquement découlé. Je te souhaite énormément de courage avec la fin de ta thèse (et les clonages...et l'administration de la fac...), et évidemment bonne chance pour la suite ! Et merci à nos thésards passés, présents et futur, comme les Noëls de Scrooge. Merci à Margaux, avec qui je partage le bureau depuis un an maintenant, pour avoir supporté mes divagations qui sortent de nulle part : j'espère que ça ne te manquera pas trop que je ne sois plus là pour te parler de pigeons, et promis, la thèse ce n'est pas si terrible que l'on croit. Merci à Alioune et Amandine, avec qui j'ai aussi passé d'excellents moments. Et bonne chance à vous trois avec vos thèses respectives : quoi qu'il arrive ça va bien se passer, on y croit ! Enfin, merci à Perrine, qui a soutenu pendant ma première année et m'a énormément rassurée lorsque je stressais moi-même à l'idée de m'engager dans une thèse (d'accord, je stresse toujours, mais maintenant il y a plein d'autres raisons...).

Et merci à Robin, mon voisin surprise (entre autres), que j'associerai à un énorme bon courage pour la reprise de la gestion informatique de l'équipe ! Je suis sûre que tu feras un excellent boulot de ce côté-là, et n'hésite pas à user du fouet pour motiver les uns et les autres à garder leur antivirus à jour...

Du côté Ecrins Therapeutics de la force, un gros gros merci à Maud, ça me manquera nos nombreux moments de papotage autour de cellules, de molécules, d'un café ou d'une bonne bière ! Ça n'a pas été simple pour toi (doux euphémisme) et pourtant tu l'as faite, cette thèse, tu peux en être fière et j'espère vraiment que tu t'en sortiras pour tes projets de Canada ! Merci à Marion aussi, et bravo pour ton nouveau poste qui, je l'espère, se passera bien ! Enfin, merci

à Karen, pour ta patience infinie et ton efficacité pour toutes les difficultés administratives auxquelles nous avons dû faire face. J'espère également que tout se passera bien là où tu es maintenant !

Evidemment ce n'est pas tout. Je remercie aussi les ingénieurs de PIC-GIN, là aussi actuels comme anciens. En particulier, merci à Jacques pour ton énergie et ta bonne humeur contagieuse, et surtout ton aide monumentale en ce qui concerne toute la partie modélisation du criblage, ainsi que la macro d'analyse des images du microscope qui a représenté un gain de temps et d'effort absolument fou (et dont je me suis plus tard inspirée pour la mienne) ! Merci aussi pour tes cours de statistiques, à mon avis des rappels réguliers seraient utiles à pas mal de gens, on oublie vite même si on en fait tout le temps ! Ils ont bien de la chance, à Lyon... Merci également à Yasmina pour ta pédagogie et ton aide avec la microscopie, et bien sûr toutes nos discussions autour d'un thé/café/tisane qui ont toujours été des moments de pause bienvenus et bien mérités ! Discussions qui m'auront permis d'en apprendre énormément sur tout un tas de techniques de microscopie, mine de rien, et ce même sans en avoir fait usage moi-même. Mais peut-être dans le futur, qui sait ?

Je tiens aussi à remercier spécialement Margaret, pour s'être occupée des diverses commandes, relances de commandes (d'ailleurs il me semble qu'on n'a toujours pas reçu ce fameux anticorps au moment où j'écris ces lignes...) et autres ordres de mission, presque sans râler alors que c'était parfois mérité. Je te souhaite beaucoup de courage et, surtout, des collègues qui prendront soin de bien renseigner les nomenclatures et de ne pas copier/coller des morceaux de tableau n'importe comment !

Je remercie aussi l'ensemble du personnel du GIN, avec qui j'ai pu avoir plus ou moins de contacts. Merci à Mireille, pour son enthousiasme et ses contributions lors de mes comités de suivi (et désolée de ne pas avoir accroché à l'enseignement !). Merci à Muriel, avec qui j'ai partagé la responsabilité du fluorimètre pendant plusieurs années, et qui a été super efficace lorsqu'il est tombé en panne au pire des moments.

Merci aussi aux doctorants restants, dont certains avec qui on a passé quelques excellentes soirées, et à qui je souhaite une excellente continuation pour leurs thèses.

Pour finir, un grand merci à ma famille et mes amis, dont l'écrasante majorité n'est pas scientifique et pourtant ont fait preuve de beaucoup de patience et souvent de sympathie quand je râlais sur les manips qui ne marchent pas ou pas comme on veut, et ont malgré tout fait beaucoup d'efforts pour essayer de comprendre ce que je pouvais bien leur raconter. Merci en particulier à mon père, qui a toujours été un énorme soutien et m'a toujours poussée à aller plus loin.

Enfin, merci à l'ANRT et à la Région, qui ont financé ce projet.



## Liste des abréviations

<b>4-PBA</b> : 4-phenylbutyrate	<b>ERβ</b> : <i>Estrogen Receptor β</i>
<b>AAV</b> : <i>Adeno-Associated Virus</i>	<b>FKBP12</b> : <i>FK506-Binding Protein</i>
<b>ADME</b> : Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion	<b>FRET</b> : <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
<b>ADV-Cre</b> : Adénovirus Cre	<b>HM</b> : Hyperthermie Maligne
<b>AON</b> : Oligonucléotide Antisens	<b>IV</b> : Intraveineuse
<b>BMD</b> : <i>Becker Muscular Dystrophy</i>	<b>IVCT</b> : <i>In Vitro Contracture Test</i>
<b>Ca<sup>2+</sup></b> : Ions calcium	<b>KO</b> : Knock-out
<b>CaM</b> : Calmoduline	<b>LGMD2A</b> : <i>Limb Girdle Muscular Dystrophy 2A</i>
<b>CAPN3</b> : Calpaine 3	<b>MmD</b> : <i>Multiminicore Disease</i>
<b>CASQ</b> : Calséquestrine	<b>NAC</b> : N-Acétylcystéine
<b>CCD</b> : <i>Central Core Disease</i>	<b>NAM</b> : <i>Native American Myopathy</i>
<b>Couplage EC</b> : Couplage Excitation-Contraction	<b>qPCR</b> : <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
<b>CFTD</b> : Congenital Fiber Type Disproportion	<b>PO</b> : <i>Per os</i>
<b>COMP</b> : Comité des Médicaments Orphelins	<b>RNS</b> : <i>Reactive Nitrogen Species</i>
<b>CRC</b> : Complexe de Relâchement Calcique	<b>ROI</b> : <i>Region of Interest</i>
<b>CSQ</b> : Calséquestrine	<b>ROS</b> : <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>DHPR</b> : Récepteur des Dihydropyridines	<b>RS</b> : Réticulum Sarcoplasmique
<b>DM1</b> : Dystrophie Myotonique	<b>RyR1</b> : Récepteur de la Ryanodine de type 1
<b>DMD</b> : Dystrophie Musculaire de Duchenne	<b>RYR1-RM</b> : <i>RYR1-Related Myopathy</i>
<b>DMSO</b> : Dimethyl Sulfoxyde	<b>SERCA</b> : <i>Sarco/Endoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPase</i>
<b>EDL</b> : <i>Extensor Digitorum Longus</i>	<b>SERM</b> : <i>Selective Estrogen Receptor Modulator</i>
<b>EMA</b> : Agence Européenne des Médicament	<b>SMN</b> : <i>Survival Motor Neuron</i>
<b>ERα</b> : <i>Estrogen Receptor α</i>	<b>SOCE</b> : <i>Store-Operated Calcium Entry</i>

**SOICR** : *Store Overload-Induced Calcium Release*

**STIM** : *Stromal Interaction Molecule*

**TRPC** : *Transient Receptor Cation Channel*

**Tubule T** : *Tubule Transverse*

**UPR** : *Unfolded Protein Response*

**VICR** : *Voltage-Induced Calcium Release*

**XLMTM** : *X-linked myotubular myopathy*

## Résumé

La contraction musculaire est un processus complexe qui comprend plusieurs étapes. Une stimulation provenant du motoneurone provoque d'abord une dépolarisation de la membrane plasmique de la fibre musculaire. Cette dépolarisation se propage jusqu'à la triade, une structure constituée d'une invagination de la membrane plasmique (le tubule T) flanquée de deux citernes terminales de réticulum sarcoplasmique. La dépolarisation active un canal calcique situé dans le tubule T, le récepteur des dihydropyridines (DHPR). Celui-ci active un second canal calcique situé dans la membrane du réticulum, auquel il est mécaniquement couplé, le récepteur de la ryanodine (RyR1). L'ouverture du canal RyR1 conduit à un relâchement de calcium du réticulum vers le cytosol à l'origine du glissement des filaments contractiles au niveau des sarcomères et donc la contraction musculaire. Les mutations de *RYR1*, qui sont très nombreuses, provoquent des altérations de l'expression ou de la fonction de RyR1 qui résultent en une diminution du relâchement calcique et causent des pathologies musculaires appelées « myopathies liées à *RYR1* » (ou *RYR1-related myopathies*, *RYR1*-RM). Le principal symptôme est un défaut de force musculaire de sévérité variable. Il n'existe actuellement aucun traitement pour ces pathologies, bien que plusieurs approches thérapeutiques soient en cours d'investigation. C'est dans ce contexte que nous avons ciblé les altérations du relâchement calcique, que l'on retrouve chez une majorité de patients, quelle que soit la mutation.

L'objectif de ce travail de thèse était d'identifier des petites molécules chimiques capables de restaurer le relâchement calcique dans des cellules musculaires issues de patients atteints de *RYR1*-RM, et ce peu importe la mutation.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet du fulvestrant, un inhibiteur de la voie estrogénique, sur le relâchement calcique de cellules musculaires humaines et murines et sur la force musculaire dans un modèle murin de *RYR1*-RM développé par notre équipe. Le fulvestrant retarde l'évolution de la perte de force chez les souris mâles uniquement et améliore le relâchement calcique dans les cellules murines. Cependant, il n'a aucun effet sur les cellules humaines.

Dans un second temps, nous avons mis au point une méthode de criblage permettant de tester rapidement un grand nombre de molécules et criblé une chimiothèque de 9 252 molécules sur une lignée immortalisée de cellules musculaires d'un patient myopathe. Les *hits* ont été validés statistiquement, et plusieurs d'entre eux sont efficaces sur une lignée immortalisée issue d'un second patient myopathe porteur d'une mutation différente, ainsi que sur des cellules primaires issues de notre modèle murin de *RYR1*-RM. Nous avons finalement sélectionné deux des molécules les plus prometteuses, 38D12 et 64E5, et initié la caractérisation de leur mécanisme d'action. Nous avons mis en évidence que 38D12 agit *a priori* en amont du couplage DHPR/RyR1, alors que 64E5 augmente les stocks calciques libérables du réticulum sarcoplasmique par le biais de l'augmentation de la recapture du calcium. Nous avons ensuite

étudié les propriétés pharmacocinétiques de ces molécules. Nous nous dirigeons à présent vers une démarche de validation pré-clinique des molécules.

## Abstract

Muscle contraction is a complex process with many steps. A stimulation from the motoneuron causes a depolarization of the plasma membrane of the muscle fiber. The depolarization reaches the triad, a structure composed of an invagination of plasma membrane (the T tubule) flanked by two sarcoplasmic reticulum terminal cisternae. It then activates a calcium channel situated in the T-tubule membrane, the dihydropyridine receptor (DHPR). In turn, DHPR activates the ryanodine receptor (RyR1), a second calcium channel to which it is mechanically coupled. RyR1 releases calcium from the reticulum to the cytosol, which leads to the shortening of the sarcomeres and thus muscle contraction. *RYR1* mutations, of which there are many, cause alterations of RyR1 expression or function, which result in defects of calcium release that are the cause of *RYR1*-related myopathies (*RYR1*-RM). The main symptom of these pathologies is a defect of muscle strength of varying severity. There is currently no treatment, though several therapeutic approaches are being studied. Thus, we targeted calcium release alterations, which are found in a majority of patients regardless of the mutation.

The goal of this thesis work was to identify small chemical molecules capable of restoring calcium release in muscle cells from *RYR1*-RM patients, regardless of the mutation.

First, we studied the effect of fulvestrant, an estrogen inhibitor, on the calcium release of human and mouse muscle cells and on muscle strength in a *RYR1*-RM mouse model developed by our team. Fulvestrant delays the loss of muscle strength in male mice only and improves calcium release in mouse cells. However, it has no effect on human muscle cells.

We then developed a screening method suitable for quickly testing many compounds. We screened a chemical library of 9,252 molecules on immortalized muscle cells from a *RYR1*-RM patient. Hits were validated on a second patient cell line with a different mutation, as well as on primary muscle cells from our mouse model of *RYR1*-RM. We selected two of the most promising molecules, 38D12 and 64E5, and characterized their mechanism of action. We showed that 38D12 seems to act upstream from the DHMR/RyR1 coupling, while 64E5 increases releasable calcium stores in the reticulum by increasing calcium recapture. We then studied the pharmacokinetic properties of the molecules. We are now aiming for preclinical validation of the molecules.



# Sommaire

<b>Remerciements .....</b>	<b>2</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>6</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>Sommaire .....</b>	<b>11</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>18</b>
<b>I. Structure et fonction du muscle squelettique sain.....</b>	<b>20</b>
1. Généralités .....	20
2. Structure globale du muscle .....	20
3. Organisation de la fibre musculaire.....	21
4. La contraction musculaire .....	22
a. Le couplage excitation-contraction.....	22
b. Le relâchement calcique .....	23
c. Le glissement des filaments contractiles.....	24
5. Les acteurs du couplage excitation-contraction.....	25
a. La triade .....	25
b. Organisation du complexe de relâchement calcique (CRC) .....	26
c. Les canaux calciques du CRC.....	26
i. Le récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1) .....	26
ii. Le récepteur des dihydropyridines (DHPR).....	28
iii. Le couplage DHPR/RyR1 .....	30
d. Les protéines régulatrices du CRC .....	32
i. FKBP12 .....	32
ii. La calmoduline .....	33
iii. La triadine .....	34
iv. La junctine.....	36
v. La calséquestrine .....	36
6. Les autres protéines impliquées dans l'homéostasie calcique.....	37
a. SERCA.....	37
b. Le store-operated calcium entry (SOCE).....	38

<b>II. Pathologies liées à RYR1 .....</b>	<b>40</b>
1. Présentation générale .....	40
a. Myopathies liées à RYR1 .....	40
b. Hyperthermie maligne .....	41
c. Implication de RyR1 dans d'autres pathologies .....	41
2. Origine génétique et mécanismes des RYR1-RM.....	42
a. Mutations RYR1 .....	42
i. Rôle du calcium dans la pathologie.....	44
ii. Altération de la fonction.....	46
iii. Baisse d'expression .....	47
iv. Relâchement calcique : une cible thérapeutique potentielle ?.....	48
b. Modèles d'étude.....	49
i. Modèles in vivo.....	50
ii. Modèles in vitro .....	51
<b>III. Approches thérapeutiques à l'étude .....</b>	<b>52</b>
1. Thérapie génique .....	52
a. Transfert du gène .....	53
b. Modulation de l'expression d'un paralogue .....	54
c. Modulation de l'ARNm .....	54
d. Edition génétique avec CRISPR-Cas9.....	55
2. Thérapie pharmacologique .....	56
a. Inhibition directe de l'activité de RyR1 .....	56
b. Modulation du stress oxydant .....	57
c. Interaction avec la protéine régulatrice FKBP12.....	58
d. Amélioration du repliement des protéines .....	59
e. Modulation des récepteurs des estrogènes .....	59
3. Avantages et difficultés des différentes thérapies .....	60
4. Criblage pharmacologique.....	62
a. Introduction au criblage pharmacologique .....	62
b. Approches de criblage.....	63
c. Objectifs techniques du criblage .....	66
d. Criblages réalisés sur le muscle .....	67
<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>71</b>

<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>74</b>
<b>I. Culture cellulaire.....</b>	<b>76</b>
1. Choix des modèles cellulaires .....	76
a. Cellules humaines immortalisées.....	76
i. Lignée contrôle (CTRL).....	76
ii. Lignée KO DHPR .....	76
iii. Lignées issues de patients myopathes .....	76
b. Cellules murines primaires .....	76
2. Culture de cellules .....	77
a. Cellules humaines immortalisées.....	77
b. Cellules murines primaires .....	78
3. Traitement des cellules avec le fulvestrant.....	79
4. Application de la chimiothèque .....	79
5. Imagerie calcique.....	80
a. Principe général .....	80
b. Imagerie calcique sur vidéomicroscope.....	81
i. Mesure du relâchement calcique .....	81
ii. Mesure des stocks calciques et de l'activité SOCE.....	81
c. Analyse des images de microscopie .....	82
d. Imagerie calcique sur fluorimètre .....	83
e. Analyse des données du fluorimètre .....	84
<b>II. Biochimie.....</b>	<b>87</b>
1. RT-PCR et PCR quantitative (qPCR).....	87
2. Western blot.....	87
<b>III. Etude des paramètres ADME .....</b>	<b>90</b>
1. Mesure des paramètres ADME in vitro en sous-traitance .....	90
2. Mesure des paramètres ADME in vivo en sous-traitance .....	90
<b>IV. Test préclinique in vivo.....</b>	<b>91</b>
1. Déclaration d'éthique .....	91
2. Animaux .....	91
3. Traitement des animaux.....	91
4. Tests d'agrippement .....	92
<b>V. Statistiques .....</b>	<b>93</b>

<b>Résultats</b> .....	<b>94</b>
<b>I. Choix et caractérisation des modèles cellulaires</b> .....	<b>96</b>
1. Lignées cellulaires humaines.....	96
a. Caractérisation génétique des patients.....	96
b. Caractérisation des lignées cellulaires humaines.....	98
2. Caractérisation des cellules murines primaires .....	102
3. Conclusion.....	104
<b>II. Etude de l'effet du fulvestrant sur des modèles de myopathies liées à RYR1</b> .....	<b>106</b>
1. Test d'agrippement sur souris traitées avec le fulvestrant.....	106
2. Etude du relâchement calcique sur les cellules murines traitées avec le fulvestrant	109
3. Etude du relâchement calcique sur les cellules humaines traitées avec le fulvestrant	110
4. Conclusion.....	111
<b>III. Identification de composés pharmacologiques capables d'augmenter les relâchements calciques dans les cellules musculaires</b> .....	<b>113</b>
1. Mise au point des conditions du criblage .....	113
a. Mise au point technique .....	114
b. Criblage préliminaire .....	119
2. Criblages primaire et secondaire .....	123
3. Effet des composés sur une seconde lignée immortalisée issue d'un patient myopathe	126
4. Effet des composés sur des cellules humaines contrôles.....	127
5. Effet des composés sur des cellules murines primaires.....	129
6. Caractérisation du mécanisme d'action des molécules .....	132
a. Relation dose-réponse.....	132
b. Cinétique du relâchement calcique .....	133
c. Effet avec un traitement court.....	135
d. Effet sur le couplage entre DHPR et RyR1 .....	137
e. Effet sur les stocks calciques du réticulum sarcoplasmique .....	140
f. Effet sur l'activation du SOCE .....	141
g. Effet sur l'expression de protéines liées aux flux calciques .....	142
7. Etude du métabolisme in vitro.....	144
8. Pharmacocinétique sur la souris .....	146
9. Conclusion.....	148

<b>Discussion.....</b>	<b>150</b>
<b>I. Evaluation de l'intérêt thérapeutique du fulvestrant pour les RYR1-RM.....</b>	<b>152</b>
<b>II. Rétrospective sur le criblage .....</b>	<b>154</b>
1. Choix des conditions de criblage.....	154
a. Choix de l'approche.....	154
b. Choix des modèles cellulaires.....	156
2. Retour sur les objectifs techniques .....	157
3. Effet des molécules sur le relâchement calcique .....	159
a. Paramètres d'amélioration du relâchement calcique .....	159
b. Intensité de l'amélioration du relâchement calcique.....	160
c. Relation structure/activité .....	161
d. Instabilité chimique des molécules .....	162
e. 38D12 et 64E5 : deux mécanismes d'action différents .....	162
f. Relâchement calcique et toxicité cardiaque.....	164
4. Etudes du métabolisme de 38D12 et 64E5.....	165
a. Choix du mode d'administration .....	165
b. Métabolisation et propriétés pharmacocinétiques de 38D12 et 64E5.....	166
<b>III. Perspectives et valorisation des résultats .....</b>	<b>167</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>170</b>
Annexe 1 .....	172
Annexe 2 : Utilisation du fulvestrant pour la prise en charge thérapeutique de la myopathie à cores .....	173
Annexe 3 : In vivo RyR1 reduction in muscle triggers a core-like myopathy.....	194
Annexe 4 : Therapies for RYR1-Related Myopathies: Where We Stand and the Perspectives .....	214
<b>Bibliographie .....</b>	<b>226</b>



# Introduction



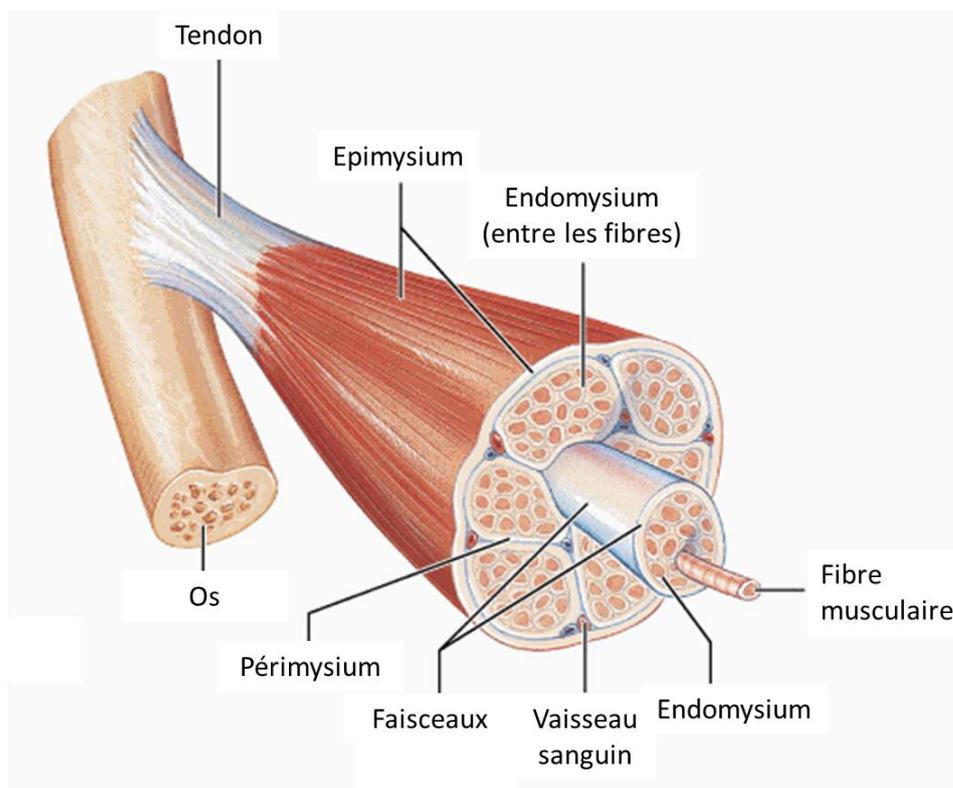
# I. Structure et fonction du muscle squelettique sain

## 1. Généralités

Le système musculaire comprend trois grands types de tissu musculaire : le muscle strié squelettique, le muscle strié cardiaque et le muscle lisse. Les travaux présentés ici s'intéressent à ce premier type, qui représente la grande majorité des muscles du corps (de 40 à 50% du poids corporel).

La fonction principale des muscles striés squelettiques est de permettre le mouvement en se contractant. Cette contraction est volontaire et contrôlée par le système nerveux somatique, ce qui les distingue des muscles cardiaques et lisses dont la contraction est involontaire.

## 2. Structure globale du muscle

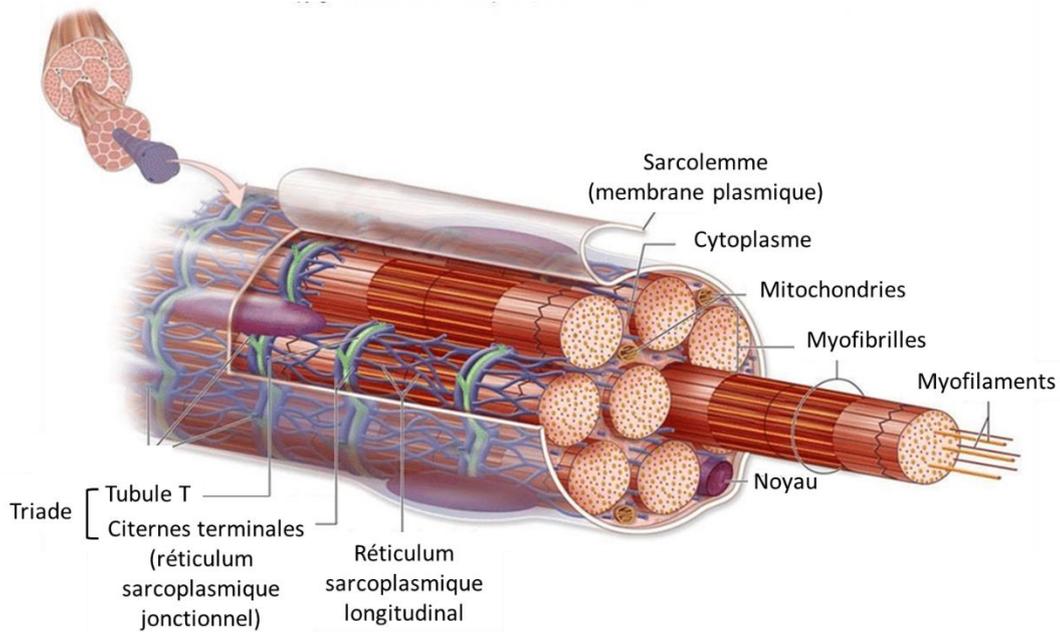


**Figure 1** : Schéma de la structure du muscle squelettique (modifié d'une illustration © Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman Inc 2001)

Les muscles squelettiques sont rattachés au squelette par les tendons. Chaque muscle est constitué de plusieurs milliers de cellules contractiles, appelées fibres musculaires. Ces fibres sont organisées en faisceaux parallèles et entourées de gaines de tissu conjonctif dense à plusieurs niveaux : l'épimysium recouvre le muscle entier, le périmysium entoure chaque

faisceau et l'épimysium entoure chaque fibre musculaire individuelle. Ce tissu conjonctif facilite le passage des vaisseaux sanguins, des nerfs indispensables au contrôle du muscle et réduisent la friction lors de la contraction musculaire.

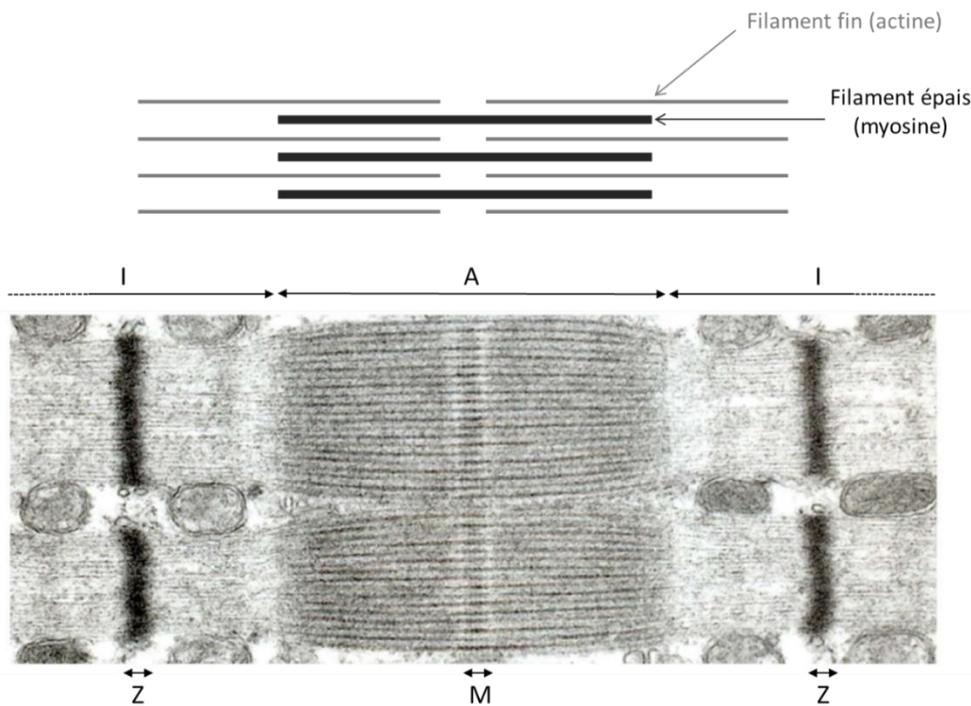
### 3. Organisation de la fibre musculaire



**Figure 2** : Schéma de l'organisation de la fibre musculaire (modifié d'une illustration © Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman Inc 2001)

Les fibres musculaires sont des cellules de grande taille : jusqu'à 100 $\mu$ m de diamètre, et elles peuvent atteindre plusieurs dizaines de centimètres de longueur dans de longs muscles tels que le *sartorius*, un muscle de la cuisse. Ce sont également des cellules plurinucléées qui peuvent contenir plusieurs centaines à plusieurs milliers de noyaux, lesquels sont répartis à intervalles réguliers à la périphérie des fibres (figure 2).

Les fibres musculaires contiennent des myofibrilles, mesurant chacune 1-2 $\mu$ m de diamètre, qui remplissent 80% du cytoplasme. Ces myofibrilles sont elles-mêmes constituées de myofilaments fins d'actine et de myofilaments épais de myosines, organisés en unités contractiles appelées sarcomères (figure 3). Ces sarcomères mesurent environ 2,5 $\mu$ m au repos et sont précisément alignés les uns par rapport aux autres, ce qui donne au muscle son aspect strié.



**Figure 3** : Cliché de microscopie électronique présentant l'organisation ultrastructurale de sarcomères en section longitudinale. Les filaments épais de myosine constituent la bande A alors que les filaments fins d'actine sont ancrés au niveau de la strie Z. (modifié de Ottenheim et al. 2008)

Les fibres musculaires contiennent aussi de nombreuses mitochondries, ainsi qu'un réticulum sarcoplasmique (ou RS) très développé qui forme un réseau complexe autour des myofibrilles et contient la majorité des stocks de calcium de la cellule. Deux régions du RS peuvent être identifiées : le RS longitudinal et le RS jonctionnel (Villa et al. 1993). Le RS longitudinal forme des tubules fins qui font le lien entre deux sections de RS jonctionnel successives. Le RS jonctionnel, ou citernes terminales, est associé à des invaginations de membrane plasmique appelées tubules transverses (ou tubules T) : cette association constitue une structure appelée triade, qui est d'un intérêt particulier dans le contexte de ces travaux car elle forme la base anatomique du couplage excitation-contraction.

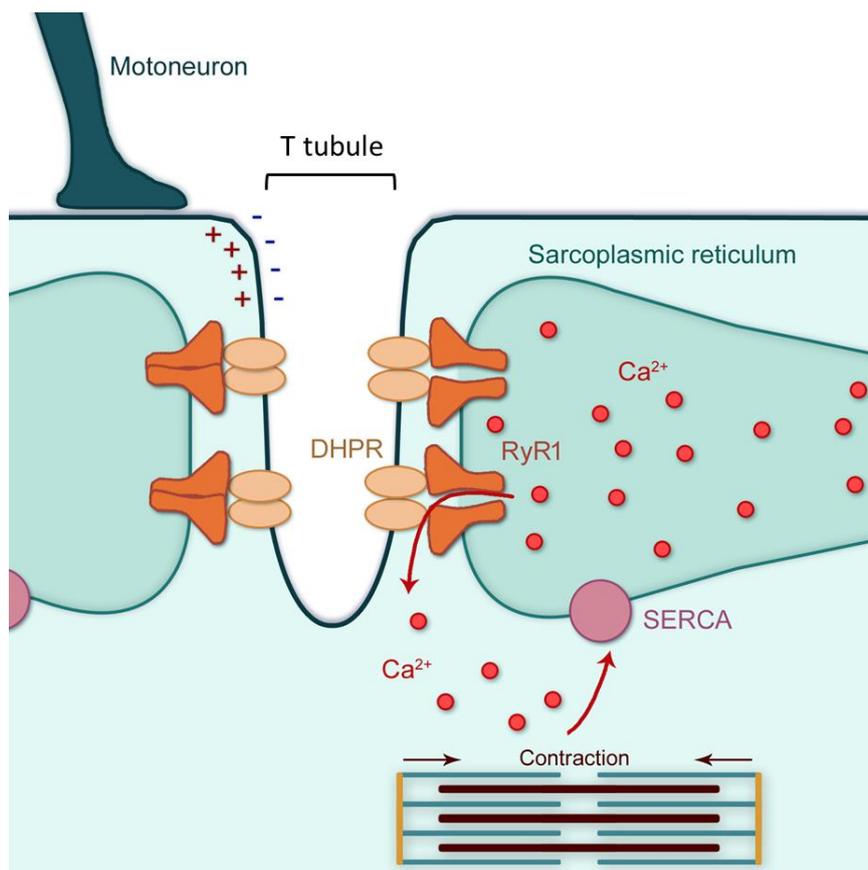
#### 4. La contraction musculaire

##### a. *Le couplage excitation-contraction*

La contraction musculaire est un processus complexe qui comprend plusieurs étapes. Elle prend sa source au niveau de la jonction neuromusculaire, où une stimulation issue du motoneurone conduit à une cascade de signaux qui résulte en un raccourcissement de façon simultanée de tous les sarcomères de la fibre musculaire. Ce processus de transduction du signal électrique en contraction mécanique est appelé couplage excitation-contraction (ou couplage EC ; Sandow et al. 1952).

b. *Le relâchement calcique*

Au niveau de la jonction neuromusculaire, la stimulation issue du motoneurone déclenche une dépolarisation de la membrane plasmique, et donc un potentiel d'action. Celui-ci se propage le long de la membrane jusqu'aux tubules T, où il active un premier canal calcique voltage-dépendant : le récepteur des dihydropyridines (DHPR). Le DHPR est mécaniquement couplé à un second canal calcique : le récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1), situé dans la membrane du RS jonctionnel au niveau de la triade. L'activation de DHPR provoque un changement de conformation de ce dernier qui conduit à l'ouverture de RyR1, ce qui cause un relâchement de calcium du RS vers le cytosol. Ce relâchement calcique est à la fois massif et simultané au niveau de chaque sarcomère, et permet le glissement des myofilaments d'actine et de myosine en libérant les sites de liaison à la myosine bloqués par la tropomyosine, donc le raccourcissement des sarcomères et la contraction de la fibre (figure 4). Lors de la relaxation musculaire, le calcium est recapturé vers le SR par la pompe *Sarco/Endoplasmic Reticulum*  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA) au niveau du RS longitudinal.



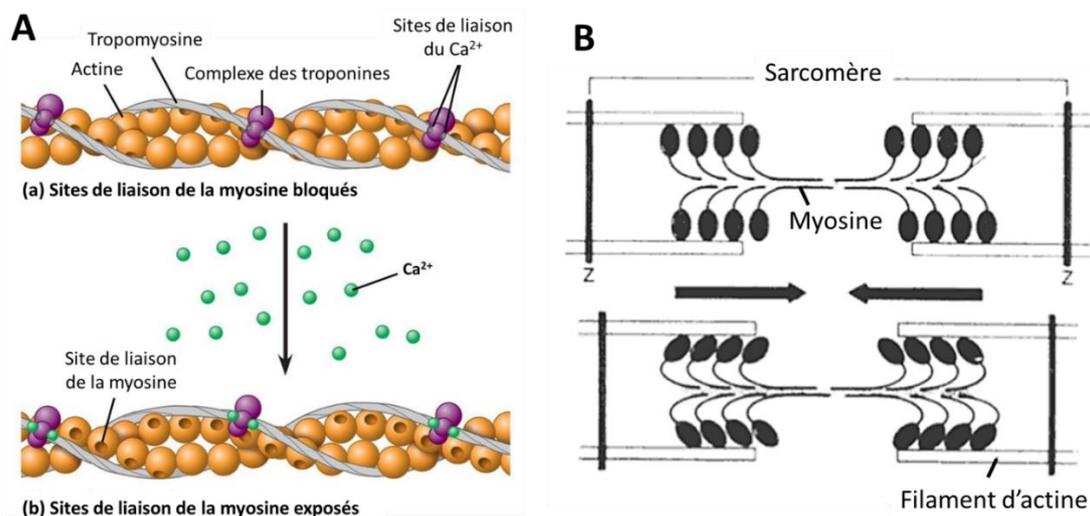
**Figure 4 :** Déroulement du relâchement calcique au niveau de la triade du muscle strié squelettique. Le potentiel d'action active DHPR, qui active RyR1, auquel il est mécaniquement couplé. Le calcium est libéré du RS par l'ouverture de RyR1 et interagit avec les filaments contractiles, dont il permet le glissement. Le calcium est ensuite repompé vers le RS par SERCA.

Dans le muscle strié squelettique, on parle de relâchement calcique induit par le voltage (*Voltage-Induced Calcium Release*, ou VICR) car le rôle du DHPR est principalement celui d'un senseur de voltage (Lamb et al. 2000). Bien qu'une entrée de calcium par le biais du DHPR soit également présente, celle-ci est mineure et peut être abolie sans conséquence sur la performance musculaire chez le mammifère (Dayal et al. 2017) ; elle est également absente dans le muscle squelettique de nombreuses espèces de poissons (Schredelseker et al. 2010).

### c. *Le glissement des filaments contractiles*

La contraction musculaire correspond au glissement relatif des filaments épais de myosine et des filaments fins d'actine de manière simultanée dans tous les sarcomères, ce qui entraîne le raccourcissement global de la fibre musculaire.

Le calcium est indispensable à ce processus. Au niveau des filaments d'actine se trouvent plusieurs protéines régulatrices. Le complexe des troponines est composé de trois sous-unités : les troponines T, I et C. Ce complexe interagit avec la tropomyosine, qui se fixe sur les filaments d'actine et bloque les sites de fixation des filaments de myosine au repos. Lorsque le calcium est présent en grande quantité, il se lie à la troponine C et induit un changement de conformation du complexe qui libère les sites de liaisons de la myosine (figure 5).



**Figure 5 :** A) Les sites de liaison de la myosine bloqués par la tropomyosine sont libérés en présence de calcium. (modifié d'une illustration © Benjamin Cummings, Addison Wesley Longman Inc 2010) B) Le basculement des têtes de myosine entraîne les filaments d'actine (modifié d'une illustration de N. V. Bhagavan, Medical Biochemistry (Fourth Edition), 2002)

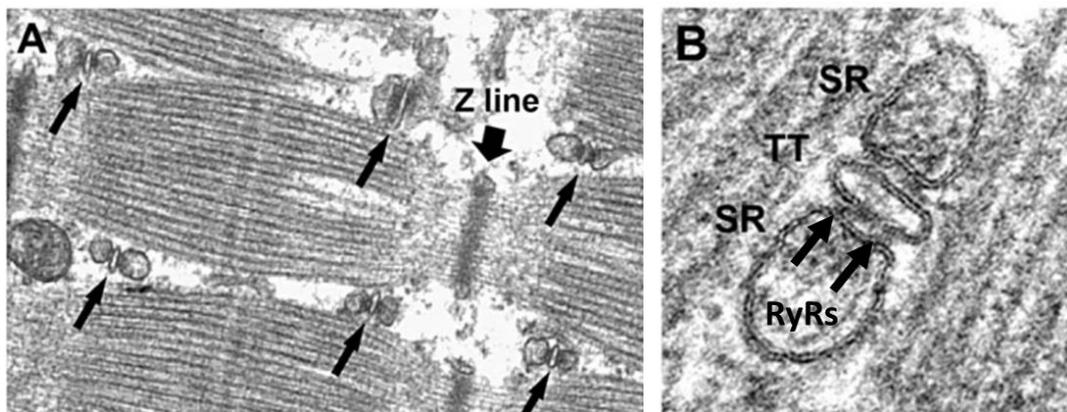
Les têtes de myosine peuvent alors se lier aux filaments d'actine. Leur basculement, qui nécessite l'hydrolyse de l'ATP, entraîne le filament d'actine et permet le glissement des

filaments et le raccourcissement des sarcomères. Lorsque le calcium est recapturé dans le RS, le complexe des troponines reprend sa conformation initiale et la tropomyosine inhibe à nouveau les sites de fixation à la myosine, ce qui induit la relaxation musculaire.

## 5. Les acteurs du couplage excitation-contraction

### a. La triade

Dans le muscle squelettique de mammifère, deux triades sont apposées contre chaque sarcomère, à l'interaction des bandes A et I, orientées perpendiculairement aux sarcomères. Chaque triade est constituée d'un tubule T flanqué de deux citernes terminales de réticulum sarcoplasmique ; ces différents compartiments sont très rapprochés, séparés par seulement 15nm (Marty et Fauré 2016).



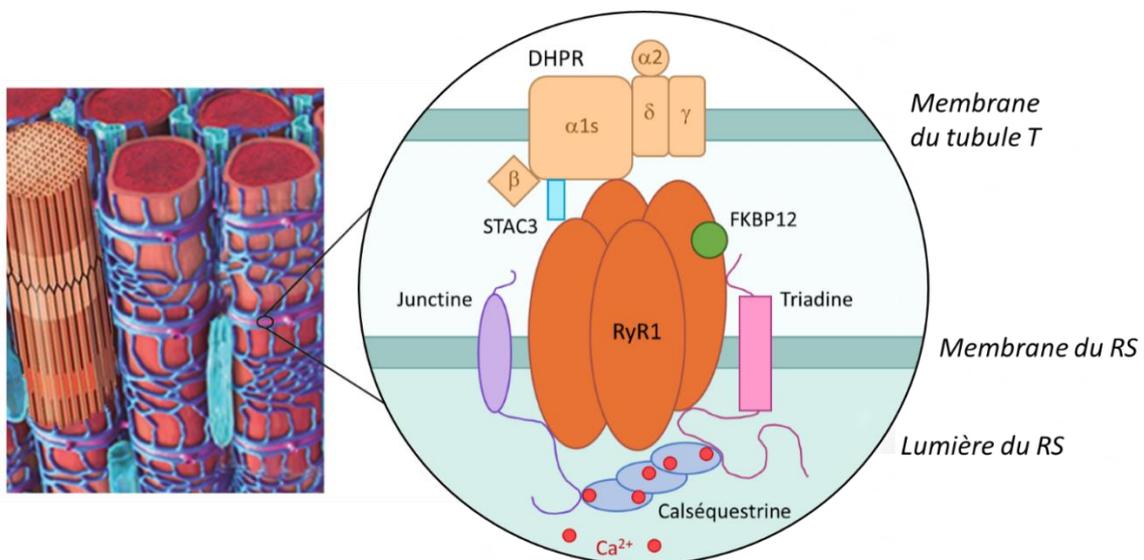
**Figure 6** : Organisation ultrastructurale des triades. A) les triades sont situées au niveau de l'interaction entre les bandes A et I des sarcomères. B) le tubule T est flanqué par deux citernes terminales de RS. TT : tubule T ; SR : réticulum sarcoplasmique. (modifié de Boncompagni et al. 2006)

Plusieurs protéines sont exclusivement exprimées à la triade et forment un complexe multiprotéique appelé complexe de relâchement calcique (CRC). Une organisation très précise de la triade est cruciale car la bonne fonction du CRC en dépend. Une désorganisation de la triade peut alors conduire à des anomalies du couplage EC ou de l'homéostasie calcique, ce qui résulte le plus souvent en des défauts de la fonction du muscle : on retrouve justement une telle désorganisation, dont les causes peuvent être multiples, dans de nombreuses pathologies musculaires (Lawal et al. 2020, Pelletier et al. 2020, Barefield et al. 2021).

b. Organisation du complexe de relâchement calcique (CRC)

Le CRC est le complexe protéique situé au sein de la triade qui permet les relâchements de calcium du SR vers le cytosol. Son bon fonctionnement est donc indispensable à la fois au bon déroulement de la contraction musculaire et au maintien de l'homéostasie calcique de la fibre musculaire.

Il comporte de nombreuses protéines, dont les deux principales sont deux canaux calciques : le récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1), situé dans la membrane du RS, et le récepteur des dihydropyridines (DHPR), situé dans la membrane plasmique au niveau du tubule T (figure 7). Ces deux canaux sont mécaniquement couplés (Marty et al. 1994a), ce qui implique une forte proximité entre les membranes du SR et du tubule T.



**Figure 7** : Schéma de l'organisation du complexe de relâchement calcique (modifié de Marty et Fauré 2016)

De nombreuses protéines régulatrices sont associées directement à ces deux canaux, comme la triadine, la junctine, FKBP12 ou STAC3, ou indirectement comme la calséquestrine (Zhang et al. 1997). Elles ont différents rôles dans la régulation des flux calciques qui seront détaillés par la suite.

c. Les canaux calciques du CRC

i. Le récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1)

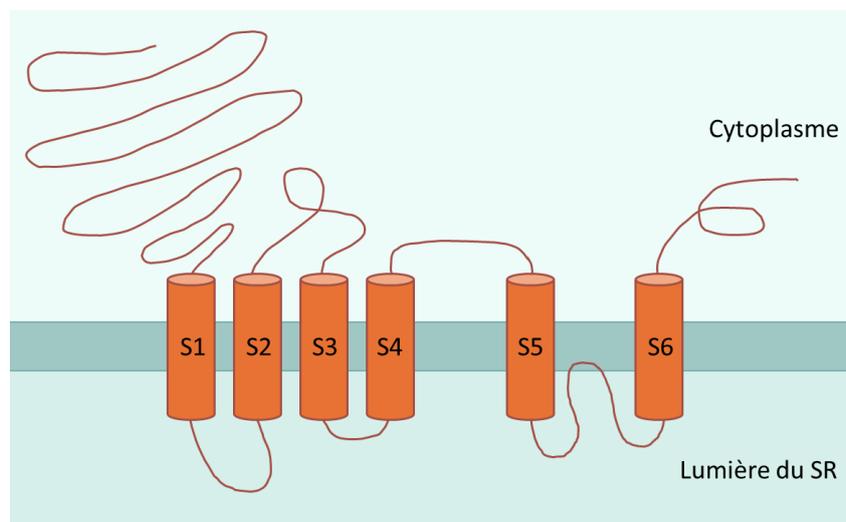
Un des deux canaux calciques majeurs du CRC est le récepteur de la ryanodine (RyR). Il en existe trois isoformes chez les mammifères, qui sont issus de trois gènes (Lanner et al. 2010). Le premier, RyR1, est l'isoforme majoritaire du muscle strié squelettique, dans lequel il a

d'abord été identifié (Takeshima et al. 1989), mais on le retrouve également dans de nombreux autres tissus et types cellulaires tels que les muscles striés cardiaques et lisses (Neylon et al. 1995), les neurones de Purkinje (Furuichi et al. 1994), les ostéoclastes (Zaidi et al. 1992) ou, plus récemment, les lymphocytes B (Vukcevic et al. 2010). Le second, RyR2, est l'isoforme majoritaire dans le cœur et le cerveau ; comme RyR1, il est aussi exprimé en plus faible quantité dans d'autres tissus (Fill et al. 2002). Enfin, RyR3 est ubiquitaire et est retrouvé dans la plupart des tissus de l'organisme (Jeyakumar et al. 1998). Ces trois isoformes possèdent une homologie de séquence d'environ 65% (Hakamata et al. 1992).

Le gène *RYR1* est une séquence de 150 kb localisée sur le chromosome 19q13.2. Il comprend 106 exons et résulte en une protéine de 565 kDa, qui correspond à une sous-unité de RyR1. Le canal fonctionnel est un homotétramère d'environ 2,2 MDa qui est spécifiquement exprimé à la membrane du RS jonctionnel.

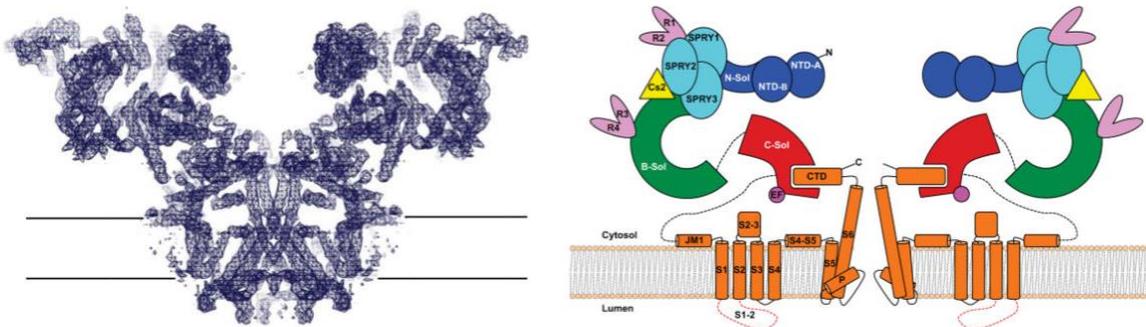
Chaque monomère comprend deux domaines. Le domaine C-terminal, qui est extrêmement conservé entre les trois isoformes de RyR, forme le pore ionique du canal. Il communique avec la lumière du RS, et sa partie luminaire interagit avec la triadine et la junctine, qui forment un complexe avec la calséquestrine. Le domaine N-terminal constitue environ 80% de la protéine et interagit avec DHPR (Nakai et al. 1996) et des protéines régulatrices telles que FKBP12 (Brillantes et al. 1994) et la calmoduline (Yamaguchi et al. 2005). La grande taille de ce domaine le rend visible en microscopie électronique sous forme de « pieds » denses aux électrons au niveau de l'espace cytoplasmique entre la membrane du RS et du tubule T (Block et al. 1988, Boncompagni et al. 2006 ; voir figure 5).

Il est à présent accepté que chaque monomère de RyR1 comporte 6 domaines transmembranaires dans sa partie C-terminale (Samsò 2016, Dulhunty et al. 2018). Il a également été établi que les extrémités N-terminale et C-terminale de la protéine sont cytosoliques (Marty et al. 1994b).



**Figure 8 :** Topologie de RyR1 à 6 domaines transmembranaires.

La structure 3D complète de RyR1 n'est à ce jour pas complètement élucidée. De nombreux modèles ont été proposés depuis plusieurs années (Gao et al. 2000, Zalk et al. 2015), et les avancées des techniques de cryo-EM ont permis d'obtenir des modélisations de plus en plus précises atteignant une résolution de 3,4 Å pour les plus récentes (Melville et al. 2022) qui ont permis de définir la structure globale de la protéine et de ses différents domaines fonctionnels.



**Figure 9** : Structure de RyR1 obtenue en cryoEM à une résolution de 4,8 Å. Gauche : vue dans le plan de la membrane du RS. Droite : représentation schématique des différents sous-domaines du canal. (Extrait de Zalk et al. 2015)

Dans le muscle strié squelettique, RyR1 est le canal responsable de la libération de calcium du RS vers le cytosol lors du couplage EC. Cette fonction est essentielle et son absence ne peut pas être compensée malgré la présence de l'isoforme RyR3 dans le muscle squelettique. Les souris KO *RYR1*, ou « dyspédiques » (nommées ainsi à cause de l'absence des « pieds » de RyR1 qui sont observables en microscopie électronique lorsque le canal est présent à la triade) meurent à la naissance (*a priori* d'insuffisance respiratoire) car la contraction musculaire est impossible (Takeshima et al. 1994). Outre ce rôle indispensable dans la contraction musculaire, RyR1 est impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes à travers un mécanisme appelé couplage excitation-transcription (Chin et al. 2010, Filipova et al. 2016) et il a récemment été montré que la fuite de calcium à travers RyR1 joue un rôle dans la thermorégulation chez les mammifères (Meizoso-Huesca et al. 2022).

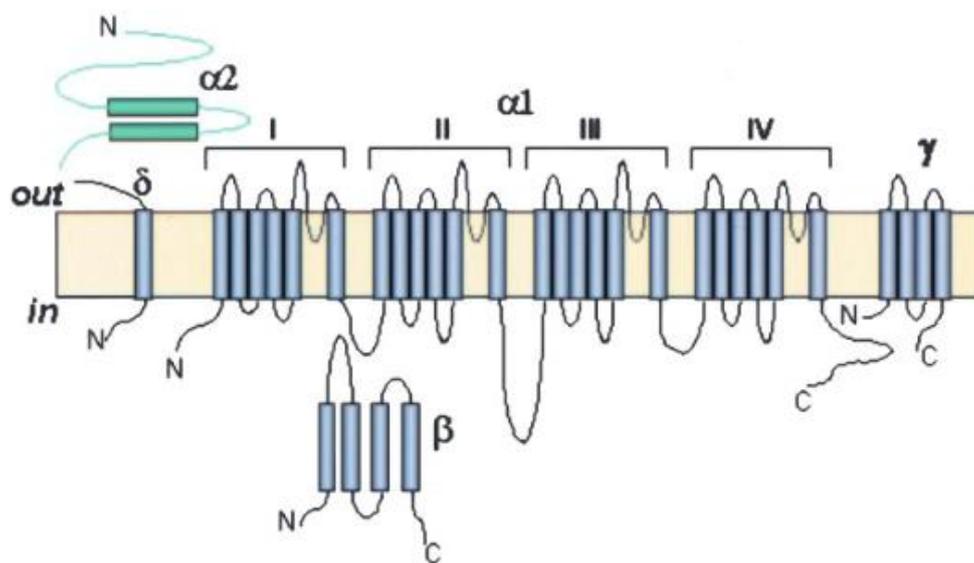
RyR1 a d'abord été identifié grâce à un alcaloïde, la ryanodine, qui a un effet paralysant sur les muscles squelettique et cardiaque et a donné son nom au récepteur (Rogers et al. 1948). La ryanodine se fixe de manière spécifique sur RyR1 et affecte son activité de manière différente selon sa concentration : elle maintient RyR1 en conformation ouverte à des concentrations de l'ordre du nM mais abolit la conduction ionique à des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{M}$ .

## ii. Le récepteur des dihydropyridines (DHPR)

Le second canal calcique du CRC est le récepteur des dihydropyridines, DHPR. C'est un canal calcique voltage-dépendant situé dans la membrane plasmique, au niveau du tubule T (Tanabe et al. 1987, Mikami et al. 1989). Son rôle principal dans le muscle squelettique est celui de

capteur de voltage pendant le couplage EC. DHPR est un hétéropentamère composé des sous-unités  $\alpha 1s$  (aussi appelé Cav1.1),  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , et  $\gamma$ .

La sous-unité  $\alpha 1s$  est à la fois le capteur de voltage et la partie canal de la protéine (Rios et al. 1987, Tanabe et al. 1988). Elle est constituée de 4 répétitions (I-IV) d'un motif de 6 domaines transmembranaires (S1-S6 ; figure 10) : lors de la dépolarisation de la membrane, le domaine transmembranaire S4 provoque le changement de conformation des domaines transmembranaires S5 et S6, ce qui permet l'ouverture du canal (Catterall 2011). La sous-unité  $\alpha 1s$  est indispensable au bon fonctionnement du couplage EC et à la contraction musculaire. De manière semblable à RyR1, les souris KO pour *CACNA1S*, le gène codant pour cette sous-unité, meurent à la naissance d'insuffisance respiratoire (Beam et al. 1986).



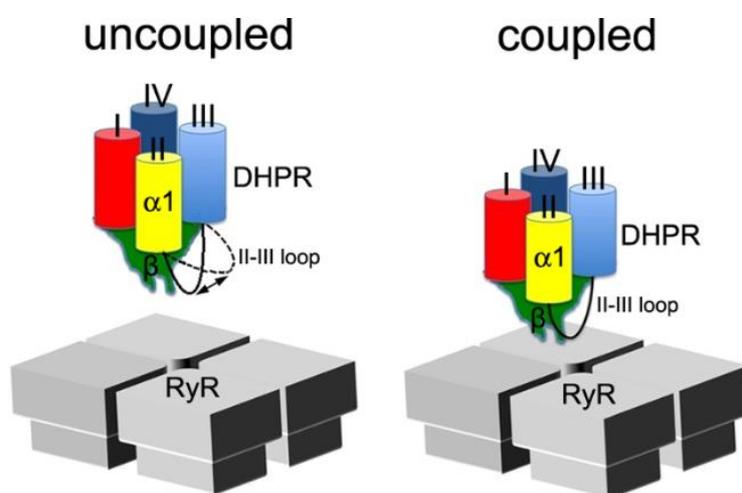
**Figure 10** : Topologie des différentes sous-unités de DHPR dans le muscle squelettique. (extrait de Serysheva et al. 2002)

Les sous-unités  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , et  $\gamma$  ont des rôles différents. Les sous-unités  $\alpha 2$  et  $\delta$  sont codées par un même gène et sont reliées par un pont disulfure,  $\alpha 2$  étant entièrement extracellulaire. Elles jouent un rôle important dans l'adressage et le trafic du canal  $\alpha 1s$  à la membrane ainsi que dans la régulation de ses propriétés biophysiques (Dolphin et al. 2013). La sous-unité  $\gamma$  est impliquée dans la régulation de l'activité du canal  $\alpha 1s$ , sur laquelle elle semble avoir un effet inhibiteur (Polster et al. 2016). Son rôle ne semble cependant pas critique dans le bon fonctionnement du CEC car la souris KO correspondante ne présente pas de défauts majeurs (Ursu et al. 2001). Enfin, la sous-unité  $\beta$  est cytosolique et interagit avec  $\alpha 1s$  par sa boucle I-II. Elle permet également l'adressage d' $\alpha 1s$  à la triade et son absence est létale à la naissance chez la souris (Gregg et al. 1996). Plus récemment, il a été suggéré qu'elle jouerait un rôle dans l'interaction entre DHPR et RyR1 (Bannister et al. 2016).

### iii. Le couplage DHPR/RyR1

Il est établi que DHPR et RyR1 sont mécaniquement couplés dans le muscle squelettique (Block et al. 1988, Marty et al. 1994a). C'est par ce couplage mécanique que passe la transmission du signal de DHPR à RyR1 : en effet, bien que DHPR ait une activité canal calcique, cette activité n'est pas nécessaire au couplage EC (Schredelseker et al. 2010, Dayal et al. 2017). Les sites d'interaction impliqués ne sont pas entièrement élucidés, ni la manière par laquelle ils induisent le changement de conformation qui provoque l'activation de RyR1.

Plusieurs régions de RyR1 ont été identifiées comme interagissant avec le DHPR, mais l'importance de certaines est encore débattue (Nakai 1998, Protasi et al. 2002, Sheridan et al. 2006, Cui et al. 2009, Shishmarev et al. 2020). En parallèle, DHPR interagit principalement avec RyR1 à travers la boucle II-III de sa sous-unité  $\alpha 1s$  et sa sous-unité  $\beta$ . La boucle II-III de la sous-unité  $\alpha 1s$  est nécessaire au couplage EC et l'interaction de plusieurs régions de cette boucle avec RyR1 a été démontrée *in vitro* (Tanabe et al. 1990, Nakai et al. 1998, Cui et al. 2009, Bannister et al. 2016). De façon similaire, la partie C-terminale de la sous-unité  $\beta$  est essentielle au couplage EC et a une forte affinité pour RyR1 *in vitro* ; il a été suggéré que la sous-unité  $\beta$  jouerait notamment le rôle d'une « ancre » qui faciliterait l'interaction entre RyR1 et la boucle II-III de la sous-unité  $\alpha 1s$  (Rebbeck et al. 2011, Hu et al. 2015, Bannister et al. 2016).

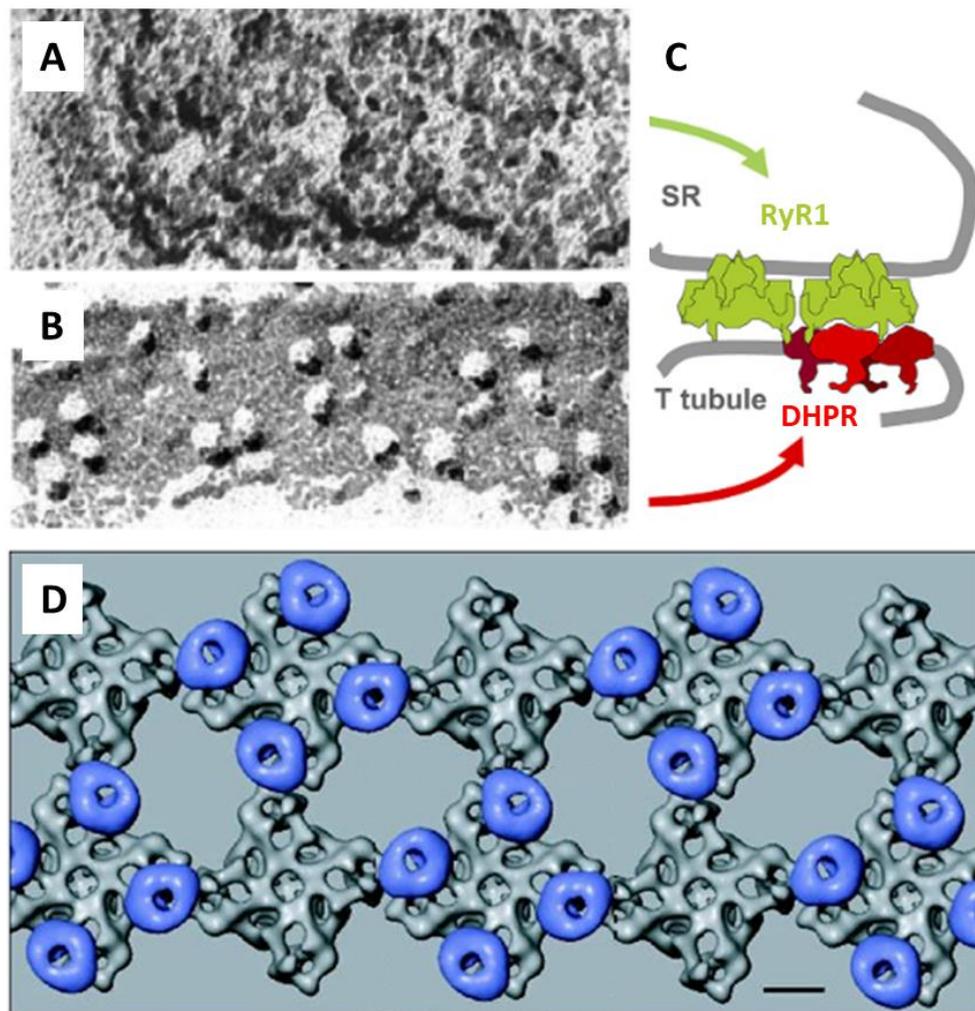


**Figure 11** : Modèle du couplage physique entre DHPR et RyR1. La sous-unité  $\beta$  permettrait l'ancrage du complexe DHPR à RyR1 et faciliterait l'interaction entre la boucle II-III et RyR1. (extrait de Hu et al. 2015)

D'autres protéines sont également impliquées dans le couplage RyR1/DHPR. En particulier, Stac3, une petite protéine de 360 acides aminés spécifique du muscle squelettique, a été identifiée comme essentielle au couplage EC et au couplage DHPR/RyR1 (Nelson et al. 2013, Zaharieva et al. 2018). Stac3 forme un complexe avec DHPR et RyR1 (Nelson et al. 2013) et interagit plus particulièrement avec la boucle II-III de DHPR (Yuen et al. 2017, Polster et al.

2018). Chez la souris, le KO *stac3* est létal à la naissance (Nelson et al. 2013, Reinholt et al. 2013). Chez l'homme, une mutation de *stac3* est la cause d'une myopathie sévère appelée « myopathie amérindienne » (*Native American Myopathy*, NAM), dans laquelle on retrouve des défauts du couplage EC (Horstick et al. 2013, Polster et al. 2016).

Il a été montré *in vitro* qu'il est possible de reconstituer le processus de couplage EC dans des cellules non-musculaires par transfection de cinq protéines : RyR1, les sous-unités  $\alpha 1$ s et  $\beta$  de DHPR, Stac3 et la junctophiline 2 (Perni et al. 2017). La junctophiline participe à la formation des jonctions entre le RS et la membrane plasmique mais pourrait également être impliquée dans le couplage DHPR/RyR1.



**Figure 12** : A, B : Images de RyR1 dans la membrane du RS jonctionnel (A) et de tétrades de DHPR (B) en freeze-fracture. C : Schéma du couplage RyR1/DHPR en vue latérale. D : Modélisation en 3D du couplage RyR1/DHPR vue de la membrane plasmique. Une tétrade de quatre DHPR est associée à un RyR1 sur deux. La barre d'échelle représente 100 Å. (modifié de Rios et al. 2019, Serysheva et al. 2004)

Un bon alignement géométrique est indispensable à l'interaction entre RyR1 et DHPR (Takekura et al. 1994, Protasi et al. 1998). Les DHPR sont assemblés en tétrades au niveau du

tubule T, chaque tétrade faisant face à un RyR1 (Block et al. 1988 ; figure 12). Chaque DHPR d'une tétrade est ainsi au niveau d'une sous-unité de RyR1 pour assurer le couplage fonctionnel entre les deux protéines. Cependant, 50% des RyR1 ne sont pas associés à une tétrade ; la répartition des RyR1 associés et non-associés forme un motif en damier (Block et al. 1988, Protasi et al. 1998, Rios et al. 2019). Ces RyR1 « seuls » seraient activés par le calcium à la suite de l'activation de complexes DHPR-RyR1 voisins (Rios et al. 1987) ou constitueraient une réserve structurelle et fonctionnelle (Rios et al. 2019).

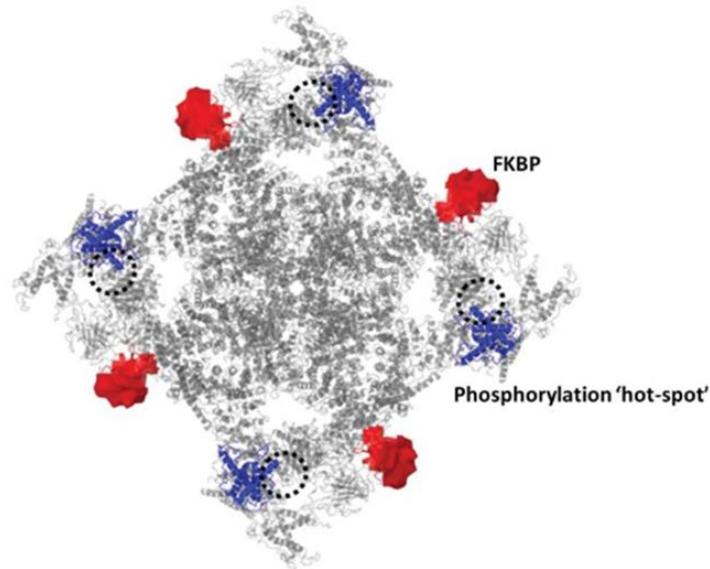
#### d. Les protéines régulatrices du CRC

Nous avons décrit les protéines qui constituent le cœur du CRC, mais le relâchement calcique est un processus complexe qui nécessite une régulation fine. Cette régulation implique de nombreuses protéines qui font partie du CRC, telles que FKBP12, la calmoduline, la triadine, la junctine ou encore la calséquestrine.

##### i. FKBP12

La *FK506-binding protein 12kDa* (FKBP12, aussi appelée calstabin1) est une petite protéine de 12kDa majoritairement exprimée dans le muscle squelettique. Elle est capable de se lier avec les trois isoformes de RyR et de moduler leur activité (Brillantes et al. 1994, Chen et al. 1994, Murayama et al. 1999, Jeyakumar et al. 2001). Il existe une isoforme, FKBP12.6, qui est principalement exprimé dans le muscle cardiaque (Chelu et al. 2004).

La liaison FKBP12/RyR1 a été mise en évidence dès 1989 (Marks et al. 1989). Quatre protéines FKBP12 sont liés à un tétramère RyR1, soit une par monomère (Qi et al. 1998, Avila et al. 2003 ; figure 13). FKBP12 permet la stabilisation de RyR1 dans son état fermé (Brillantes et al. 1994, Gaburjakova et al. 2001). Cette liaison peut être négativement affectée par l'hyperphosphorylation de RyR1, ce qui provoque alors une fuite de calcium du RS par RyR1 que l'on retrouve dans plusieurs pathologies chez l'homme (Reiken et al. 2003).



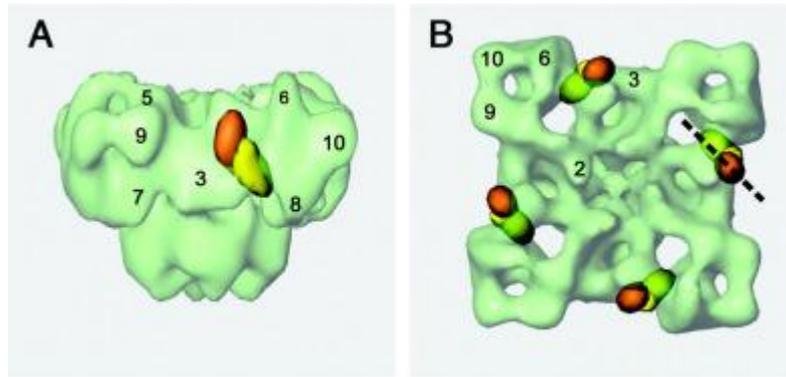
**Figure 13 :** Modélisation de la liaison de FKBP12 sur RyR1 vue du cytosol. FKBP12 est représentée en rouge. Les *hot-spots* de phosphorylation de RyR1 sont représentés en bleu. (extrait de Gonano et al. 2017)

Chez la souris, le KO FKBP12 est létal à la naissance ; bien que la létalité soit principalement liée à une cardiomyopathie sévère, on observe également une augmentation de la probabilité d'ouverture de RyR1.

## ii. La calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine ubiquitaire de 17KDa impliquée dans de nombreux processus physiologiques. La CaM existe sous deux formes selon son état de liaison au calcium : la Ca<sup>2+</sup>-CaM est liée au calcium alors que l'apoCaM ne l'est pas. La CaM se lie au calcium et sa fonction est d'activer différentes cibles de manière calcium-dépendante, telles que les CaM kinases (Chin et al. 2000).

La calmoduline est présente au niveau du CRC. Elle peut se lier à la sous-unité  $\alpha 1s$  de DHPR (Tang et al. 2002) et à RyR1. L'apoCaM et la Ca<sup>2+</sup>-CaM peuvent toutes les deux se lier aux trois isoformes de RyR (Yamaguchi et al. 2005) : une CaM est présente sur chaque monomère de RyR1 et des sites différents sont impliqués selon la forme de la CaM (Samso et al. 2002 ; figure 14).

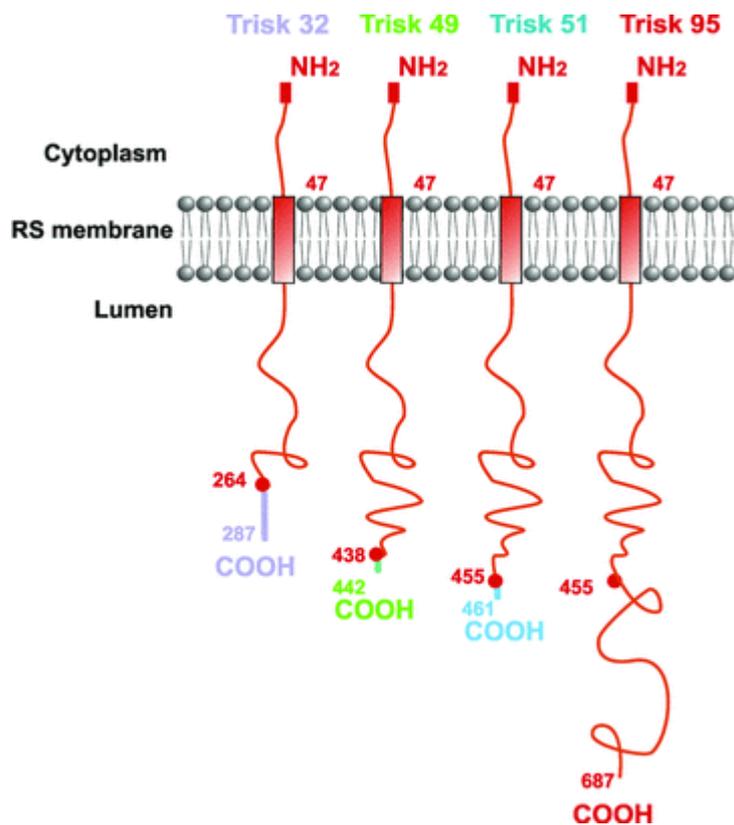


**Figure 14** : Représentation des sites de liaison de la CaM sur la structure 3D de RyR1 en vue latérale (A) ou de dessus (B). L'apoCaM est représentée en orange et la Ca<sup>2+</sup>-CaM est représentée en jaune-vert. (extrait de Samsó et al. 2002)

La CaM régule l'activité de RyR1 de manière différente selon son état de liaison au calcium (Tripathy et al. 1995). L'apoCaM est un activateur de RyR1 à des concentrations calciques de l'ordre du nM ; au contraire, à des concentrations calciques de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , la Ca<sup>2+</sup>-CaM inhibe le canal.

### iii. La triadine

La triadine est une protéine exprimée à la membrane du RS jonctionnel qui forme un complexe protéique avec RyR1, la calséquestrine et la junctine. Elle a d'abord été identifiée sous la forme d'une protéine de 95 kDa (Brandt et al. 1990, Kim et al. 1990) mais il existe en réalité plusieurs isoformes qui résultent de l'épissage alternatif d'un même gène, *TRDN*, et qui ont été largement étudiés dans l'équipe (Marty et al. 2000, Thevenon et al. 2003, Vassilopoulos et al. 2005). Ces isoformes, Trisk95 (T95), Trisk51 (T51), Trisk49 (T49) et Trisk32 (T32), diffèrent par leur partie C-terminale située dans la lumière du RS (figure 15). Les isoformes majoritaires dans le muscle squelettique sont T51 et T95, qui représentent respectivement 60% et 40% de la triadine exprimée chez l'homme (Marty et al. 2009).



**Figure 15** : Schéma des différentes isoformes de la triadine. Les domaines N-terminaux et transmembranaires des isoformes sont identiques alors que les extrémités C-terminales sont spécifiques. (extrait de Marty et al. 2009)

La triadine joue un rôle important dans le couplage EC et permet un relâchement rapide du calcium à la suite de la stimulation (Goonasekera et al. 2007, Boncompagni et al. 2012, Marty 2014). En particulier, la surexpression de T95 dans des cellules primaires de rat en culture provoque un blocage du CEC sans affecter l'expression ou la fonction de RyR1 et DHPR : ceci suggère que l'encombrement stérique causé par la surexpression de T95 bloque le changement conformationnel de RyR1 habituellement induit par DHPR (Rezgui et al. 2005). La surexpression de T51 n'a par contre aucun effet sur le CEC, ce qui suggère une fonction différente.

La triadine joue également un rôle dans la structure de la triade et du RS (Oddoux et al. 2009, Vassilopoulos et al. 2010, Fourest-Lieuvin et al. 2012). Ce rôle structurel dépend en partie de l'interaction indirecte de la triadine avec les microtubules par le biais d'une autre protéine, CLIMP-63 (Osseni et al. 2016).

Chez la souris, la délétion du gène de la triadine provoque des défauts à la fois au niveau des muscles squelettique et cardiaque (Shen et al. 2007, Oddoux et al. 2009). Ces souris présentent à la fois un défaut de force modéré associé à une réduction de l'amplitude du relâchement calcique, des anomalies de l'orientation des triades et des arythmies cardiaques, ce qui confirme les rôles de la triadine.

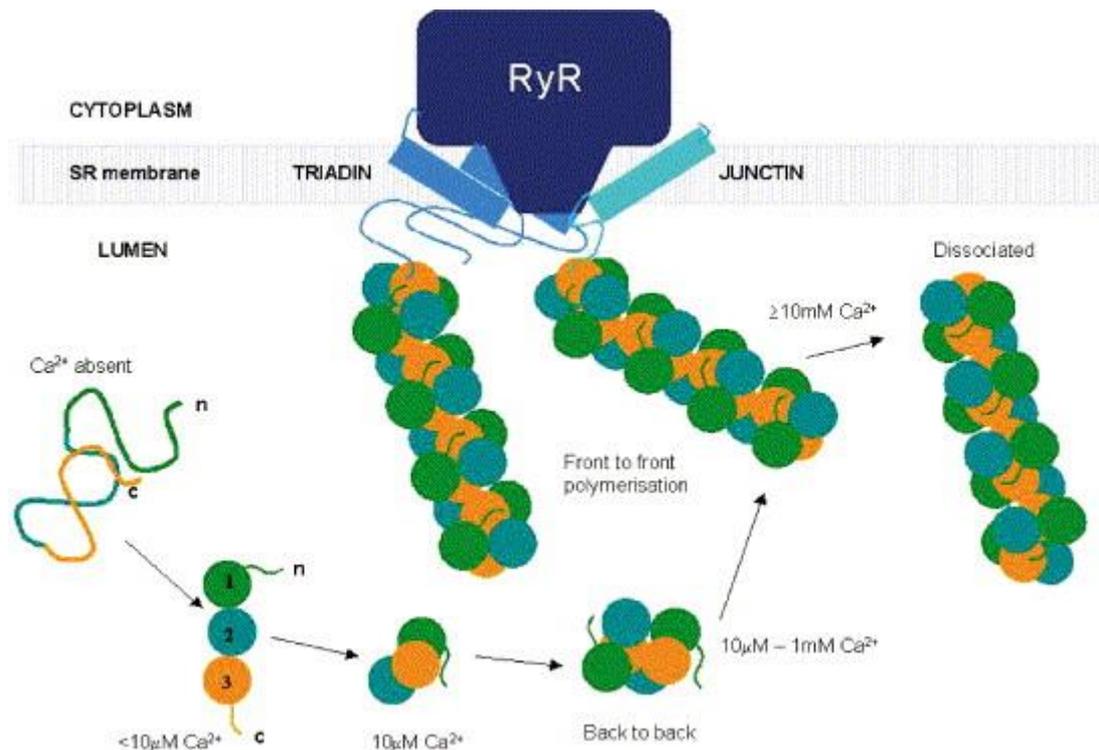
#### iv. La junctine

La junctine est une protéine de 26 kDa exprimée dans le muscle squelettique et cardiaque au niveau du RS jonctionnel (Mitchell et al. 1988). Elle forme un complexe avec RyR1, la calséquestrine et la triadine et interagit avec RyR1 par sa partie N-terminale, qui est très conservée d'une espèce à l'autre (Jones et al. 1995, Li et al. 2015). La junctine est nécessaire à l'inhibition de RyR1 par la calséquestrine (Wei et al. 2009).

Chez la souris, la surexpression et l'ablation de la junctine ont mis en évidence un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique (Yuan et al. 2007, Boncompagni et al. 2012) ainsi qu'un rôle structurel au niveau des triades (Zhang et al. 2001). En particulier, elle est impliquée dans l'ancrage de la calséquestrine au niveau de la triade avec la triadine ainsi que dans l'organisation des citernes terminales du RS (Boncompagni et al. 2012).

#### v. La calséquestrine

La calséquestrine (CSQ) est une protéine de 42 kDa présente en grande quantité dans la lumière du RS jonctionnel : elle représente environ 30% des protéines du RS. Dans le muscle squelettique, la calséquestrine est principalement présente sous forme de polymères et polymérise ou dépolymérise de manière calcium-dépendante (Beard et al. 2004). Il existe deux isoformes de calséquestrine, CSQ1 et CSQ2, codées par deux gènes différents : *CASQ1* et *CASQ2* (Zarain-Herzberg et al. 1988, Scott et al. 1988). CSQ1 est l'isoforme majoritaire dans le muscle squelettique, alors que CSQ2 est la seule forme présente dans le muscle cardiaque : les deux isoformes sont toutefois exprimées dans le muscle squelettique en proportions variables selon le type de muscle et le stade de développement. CSQ1 et CSQ2 sont toutes les deux exprimées dans le muscle embryonnaire, puis CSQ2 est graduellement remplacée par CSQ1 au cours du développement (Sacchetto et al. 1993). Dans le muscle adulte, seule CSQ1 est exprimée dans les fibres rapides mais CSQ2 reste présente dans les fibres lentes où elle représente environ 25% de la CSQ totale (Damiani et al. 1990).



**Figure 16 :** Polymérisation de la calséquestrine en fonction de la concentration calcique. La calséquestrine est dépliée en absence de calcium. Lorsque la concentration en calcium augmente, la calséquestrine forme des monomères qui s’assemblent en dimères puis en polymères qui s’associent à la triadine et la junctine. (extrait de Beard et al. 2004)

La calséquestrine est le principal chélateur du calcium dans la fibre musculaire et assure le stockage du calcium dans le RS (Beard et al. 2004). Elle lie le calcium avec une haute capacité mais une faible affinité, ce qui permet une libération rapide de celui-ci lors du couplage EC. Sa position à proximité de RyR1, maintenue par la triadine et la junctine, assure également la disponibilité rapide des stocks calciques (Franzini-Armstrong et al. 1987).

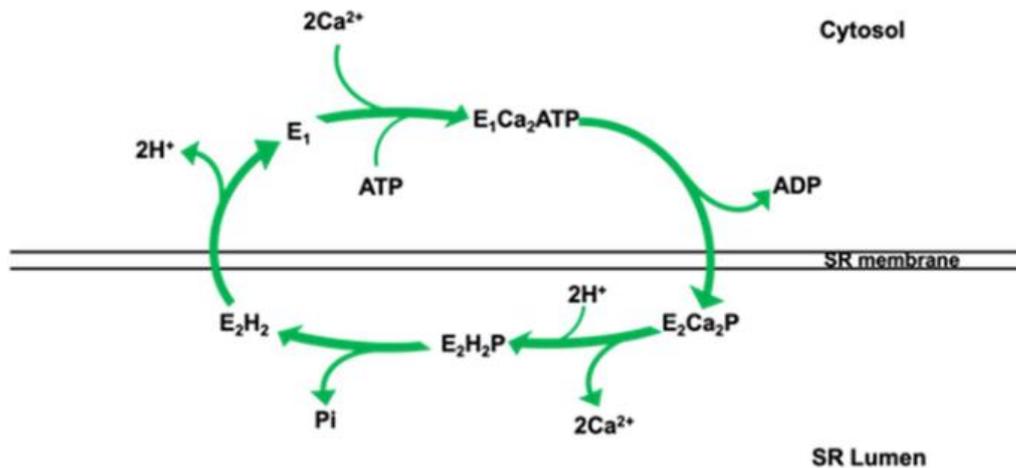
La calséquestrine a donc deux fonctions principales : d’une part, son rôle de tampon calcique permet de maintenir une concentration de calcium libre relativement basse dans la lumière du RS. D’autre part, elle joue un rôle dans la régulation de l’homéostasie calcique à différents niveaux. Il a été montré que la calséquestrine inhibe l’activité de RyR1 par le biais de la triadine et la junctine (Beard et al. 2002). Elle interagit également avec les protéines STIM1 et STIM2 et inhibe ainsi le processus de *Store-Operated Calcium Entry* (SOCE ; Zhang et al. 2016, Michelucci et al. 2020, Jeong et al. 2021).

## 6. Les autres protéines impliquées dans l’homéostasie calcique

### a. SERCA

La *Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase* (SERCA) est une pompe transmembranaire située dans la membrane du RS longitudinal (Stammers et al. 2015). Lors du couplage

excitation-contraction, une grande quantité de calcium est rapidement libérée dans le cytosol de la fibre musculaire pour permettre la contraction. Or, une haute concentration de calcium cytosolique prolongée est délétère (Murphy et al. 2006) : la recapture rapide du calcium par SERCA est donc indispensable. SERCA permet également l'alternance des cycles de contraction/relaxation.



**Figure 17** : Cycle cinétique de la pompe SERCA. Pendant le transport du calcium, la liaison de l'ATP est accompagnée d'un changement de conformation de SERCA entre deux états « E1 » et « E2 », qui ont une affinité pour le calcium différente. (extrait de Xu et al. 2021)

La fonction principale de SERCA est le pompage du calcium du cytosol vers le RS contre le gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  grâce à l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP (Olesen et al. 2007). L'hydrolyse de l'ATP est accompagnée d'un changement de conformation de SERCA entre deux états « E1 » et « E2 », qui ont une affinité pour le calcium différente (Toyoshima et al. 2002 ; figure 17). SERCA maintient ainsi la concentration de calcium cytosolique au repos entre 50 et 100 nM (Berchtold et al. 2000).

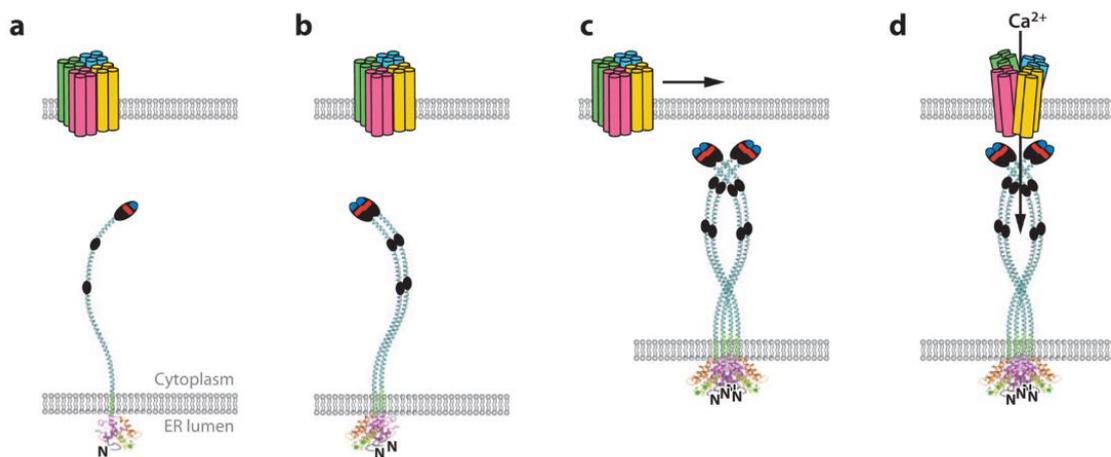
#### b. *Le store-operated calcium entry (SOCE)*

Le *store-operated calcium entry* (SOCE) est une voie d'entrée du calcium extracellulaire activée par la déplétion des stocks calciques du RS (Kurebayashi et al. 2001). Ce mécanisme est présent dans de nombreux types cellulaires, dont le muscle squelettique au sein duquel il est impliqué dans le maintien des stocks calciques. Bien qu'il soit plus rapide dans le muscle squelettique que dans les autres tissus, le SOCE est plus long à se mettre en place que le couplage EC et la recapture du calcium par SERCA (environ une seconde plutôt que quelques millisecondes ; Cho et al. 2017).

Les principales protéines impliquées dans le mécanisme de SOCE sont le canal Orai et la protéine *stromal interaction molecule* (STIM). Il existe plusieurs isoformes de STIM et Orai.

STIM1 et STIM2 sont toutes les deux exprimées dans le muscle squelettique (Darbellay et al. 2010) ; un épissage alternatif de STIM1 produit également une forme longue, STIM1L, principalement exprimée dans le muscle squelettique (Darbellay et al. 2011). Orai possède trois isoformes : Orai1, Orai2 et Orai3, mais Orai2 et Orai3 sont encore peu étudiées (Cho et al. 2017).

Dans le muscle squelettique, les isoformes principalement responsables du SOCE sont STIM1 et Orai1. STIM1 est un senseur de calcium. Lorsque le calcium du RS est dépleted, STIM1 oligomérisé et recrute Orai1, qui est sous forme monomérique dans la membrane plasmique (Zhou et al. 2015). Orai1 oligomérisé également et l'association d'un oligomère de STIM1 avec un oligomère d'Orai1 forme un canal qui permet l'entrée de calcium dans le cytosol depuis le milieu extracellulaire (Penna et al. 2008). Le calcium est ensuite recapturé vers le RS par SERCA.



**Figure 18 :** Séquence des étapes du SOCE. A : STIM1 est sous forme monomérique lorsque les stocks calciques sont pleins. B : Oligomérisation de STIM1 lorsque les stocks calciques sont dépleteds. C : Recrutement de Orai1. D : Entrée de calcium extracellulaire vers le cytosol par le biais d'Orai1. (modifié de Hogan et al. 2010)

STIM1 et ORAI1 ne sont pas les seules protéines responsables du SOCE dans le muscle squelettique. Certains canaux appelés *Transient Receptor Potential Cation Channels* (TRPC), notamment TRPC1 et TRPC4, sont exprimés dans le muscle squelettique et seraient impliqués dans le SOCE (Louis et al. 2008, Antigny et al. 2017, Choi et al. 2020). Comme pour Orai1, cette fonction se ferait par le biais d'une interaction avec STIM1, particulièrement STIM1L (Yuan et al. 2007, Antigny et al. 2017).

## II. Pathologies liées à RYR1

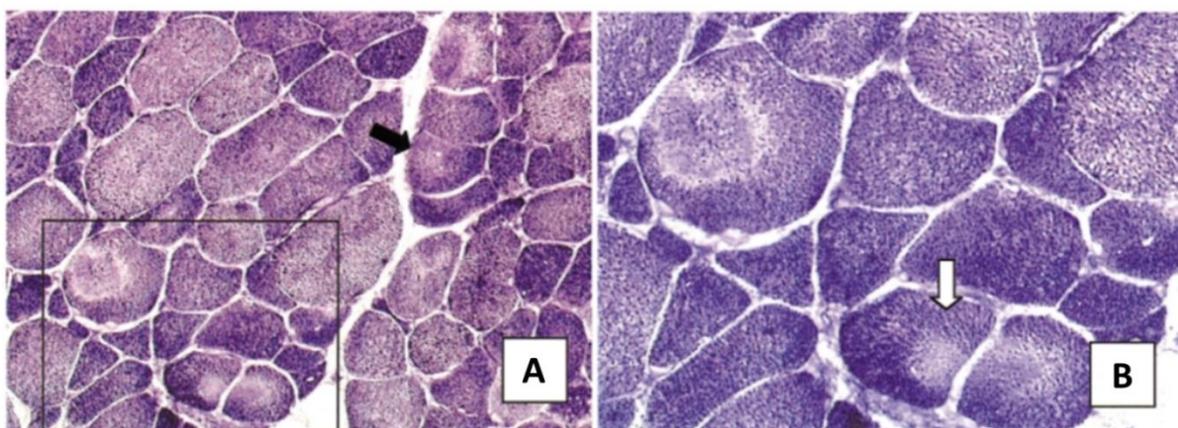
### 1. Présentation générale

Comme nous venons de le voir, le canal calcique RyR1 joue un rôle crucial dans le processus de contraction musculaire. Les altérations du gène *RYR1* affectant la protéine conduisent donc à des pathologies congénitales rares d'origine génétique, dites « myopathies liées à *RYR1* ».

#### a. Myopathies liées à *RYR1*

Les myopathies liées à *RYR1* (*RYR1*-related myopathies, ou *RYR1*-RM) sont des maladies génétiques rares (1/90 000 naissances aux Etats-Unis ; Amburgey et al. 2011) dont la caractéristique principale est un défaut de force musculaire. Leur sévérité peut être très variable, de même que la présentation histopathologique des patients (Lawal et al. 2020). On recense ainsi des formes néonatales très sévères pouvant conduire au décès périnatal ou, à l'inverse, des formes modérées avec un retard des acquisitions musculaires et une légère atteinte de la force qui n'est parfois diagnostiquée qu'à l'âge adulte.

Historiquement, la nomenclature de ces myopathies était principalement basée sur des caractéristiques histologiques, telles que la présence de noyaux centraux (myopathie centronucléaire), de bâtonnets de némaline (myopathie à némaline) ou de cores, qui sont des régions de la cellule de forme variable et dépourvues d'activité oxydative (myopathie à cores centraux, myopathie à multi-minicores ; figure 19). Depuis quelques années, une nouvelle nomenclature basée sur le gène affecté (en l'occurrence, *RYR1*) est de plus en plus adoptée. Ces différentes présentations histopathologiques sont donc toutes rassemblées sous le terme de « myopathies liées à *RYR1* » (Lawal et al. 2018).



**Figure 19** : Mise en évidence de cores sur des coupes transversales d'un patient atteint de myopathie à multi-minicores avec une coloration NADH-tétrazolium reductase. La section encadrée en A est agrandie en B. Les cores sont des zones de la cellule dépourvues d'activité enzymatique retrouvées dans de nombreuses formes de *RYR1*-RM. (extrait de Monnier et al. 2003)

Actuellement, aucun traitement curatif n'est disponible pour les patients atteints de *RYR1*-RM. Ces patients sont pris en charge de manière symptomatique, avec principalement de la kinésithérapie.

Avant de rentrer dans le détail des myopathies liées à des mutations du gène *RYR1*, je vais brièvement évoquer l'hyperthermie maligne, qui est liée à RyR1 mais n'est pas une myopathie, et l'implication de RyR1 dans d'autres pathologies musculaires liées à des mutations d'autres gènes.

### *b. Hyperthermie maligne*

L'hyperthermie maligne (HM) est une maladie pharmacogénétique à transmission autosomique dominante qui peut être seule ou associée à une myopathie. Elle consiste en une prédisposition génétique à une hypersensibilité de RyR1 en réponse à certains anesthésiques halogénés, tels que l'isoflurane ou l'halothane. L'exposition à ces agents peut conduire à des crises : une hyperactivation de RyR1 provoque un relâchement de calcium massif dans tous les muscles qui conduit à une contracture musculaire généralisée avec une hyperthermie généralisée, une rhabdomyolyse, une hyperkaliémie et un hypermétabolisme. Sans traitement, la crise conduirait au décès du patient dans 70% des cas. La crise peut être enrayée par l'administration rapide de dantrolène. Le dantrolène est un inhibiteur de RyR1 et constitue le seul traitement approuvé pour l'HM à ce jour.

Les crises d'HM ne sont pas systématiques, et un patient peut subir plusieurs anesthésies avant le déclenchement de la première crise. Le diagnostic est posé grâce à un test de contracture *in vitro* (*In Vitro Contracture Test*, IVCT), qui permet de mesurer la sensibilité de la réponse à l'halothane et la caféine sur une biopsie du patient.

### *c. Implication de RyR1 dans d'autres pathologies*

Le canal RyR1 est parfois indirectement impliqué dans d'autres pathologies musculaires, en conséquence de mutations d'autres gènes que *RYR1*. Dans la *Limb Girdle Muscular Dystrophy 2A* (LGMD2A), des mutations de *CAPN3*, le gène de la calpaïne 3, peuvent conduire indirectement à une baisse d'expression de *RYR1* (Kramerova et al. 2008, Kramerova et al. 2012, Vallejo-Illarramendi et al. 2014, Chen et al. 2021). La fonction de RyR1 est également impactée dans la dystrophie de Duchenne (DMD), causée par des mutations du gène de la dystrophine (Duan et al. 2021, Mareedu et al. 2021), ou dans d'autres myopathies causées par des mutations du gène de la sélénoprotéine N (Ferreiro et al. 2002).

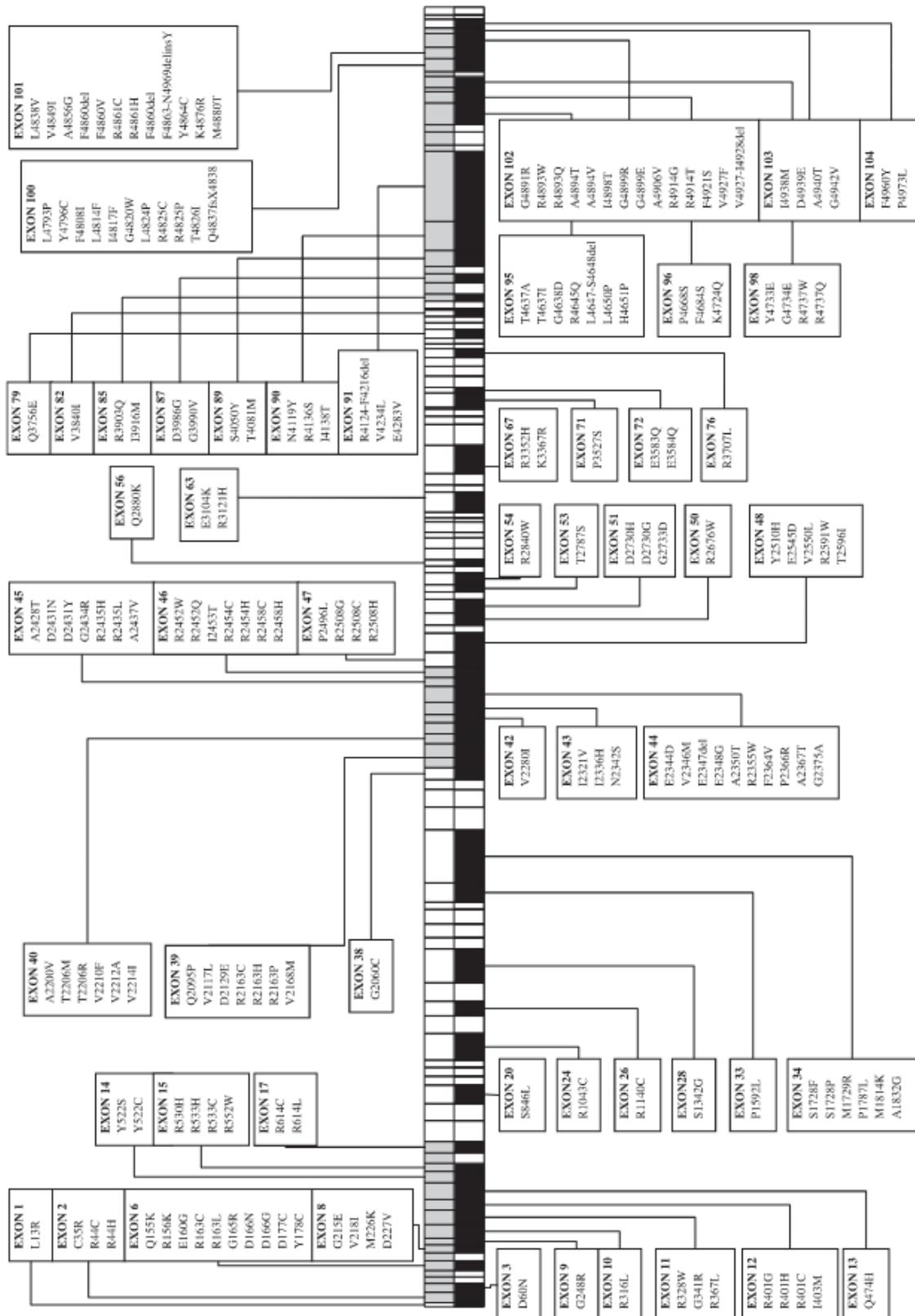
Ces pathologies n'étant pas issues de mutations du gène *RYR1*, elles ne sont pas considérées comme des myopathies liées à *RYR1* mais ont généralement des mécanismes

physiopathologiques en commun avec celles-ci, par exemple des altérations de l'homéostasie calcique.

## 2. Origine génétique et mécanismes des *RYR1*-RM

### a. *Mutations RYR1*

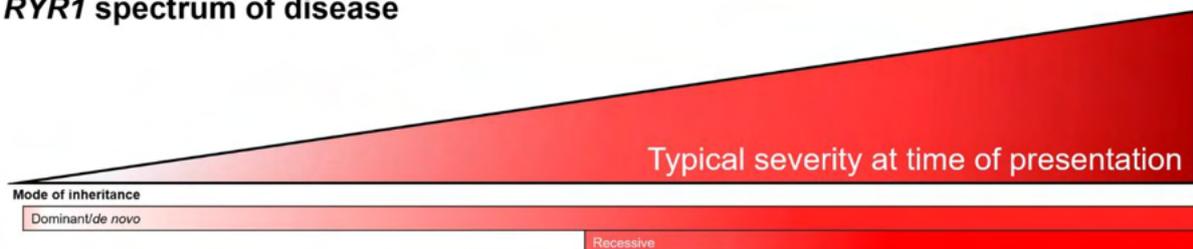
Actuellement, plusieurs centaines de mutations ont été identifiées sur le gène *RYR1* (Garibaldi et al. 2019, Lawal et al. 2020). On recense aussi de nombreux variants de signifiante inconnue (*variant of unknown significance*, ou VUS) dont la pathogénicité n'est pas encore établie. Elles sont la cause des différentes pathologies rassemblées sous le nom de « maladies liées à *RYR1* », telles que l'HM et des myopathies que l'on nomme historiquement d'après leurs caractéristiques histopathologiques, telles que le *Central Core Disease* (CCD) et le *Multiminicore Disease* (MmD). Ces mutations sont le plus souvent spécifiques d'une famille ou un faible nombre de patients ; les mutations les plus répandues sont celles associées à l'hyperthermie maligne.



**Figure 20 :** Répartition des mutations répertoriées sur la séquence du gène RYR1. Les mutations dominantes, qui sont rassemblée autour de trois hotspots, sont représentées en gris et les mutations récessives, qui sont réparties sur l'ensemble du gène, sont représentées en noir. (extrait de Robinson et al. 2006)

Il existe des formes dominantes et récessives de ces pathologies. Les formes dominantes impliquent très majoritairement des mutations faux-sens : trois hotspots ont été rapportés pour ce type de mutations, dont la plupart sont localisées dans la partie canal de la protéine (Robinson et al. 2006, Todd et al. 2018 ; figure 20). Les formes récessives, au contraire, sont réparties sur la totalité de la protéine (Robinson et al. 2006). Les conséquences des mutations récessives sont plus variées : on recense là aussi des mutations faux-sens, mais également des mutations qui résultent en une protéine tronquée, un non-sens ou un décalage du cadre de lecture. On rapporte également des mutations introniques qui résultent en des altérations de l'épissage (Rendu et al. 2013). La sévérité de la pathologie est corrélée au mode de transmission des mutations : en particulier, les cas résultant de mutations récessives tendent à être plus sévères que ceux issus de mutations dominantes (Lawal et al. 2020 ; figure 21).

### ***RYR1* spectrum of disease**



**Figure 21** : La sévérité de la pathologie est corrélée au mode de transmission des mutations *RYR1* (extrait de Lawal et al. 2020)

#### i. Rôle du calcium dans la pathologie

L'altération de l'homéostasie calcique est un mécanisme très répandu dans le contexte des pathologies musculaires. Dans certaines de ces pathologies, ce mécanisme joue un rôle central et est indissociable des symptômes observés : c'est par exemple le cas de la plupart des *RYR1*-RM et de l'HM (Treves et al. 2008, Marty et al. 2016, Witherspoon et al. 2016, Lawal et al. 2020).

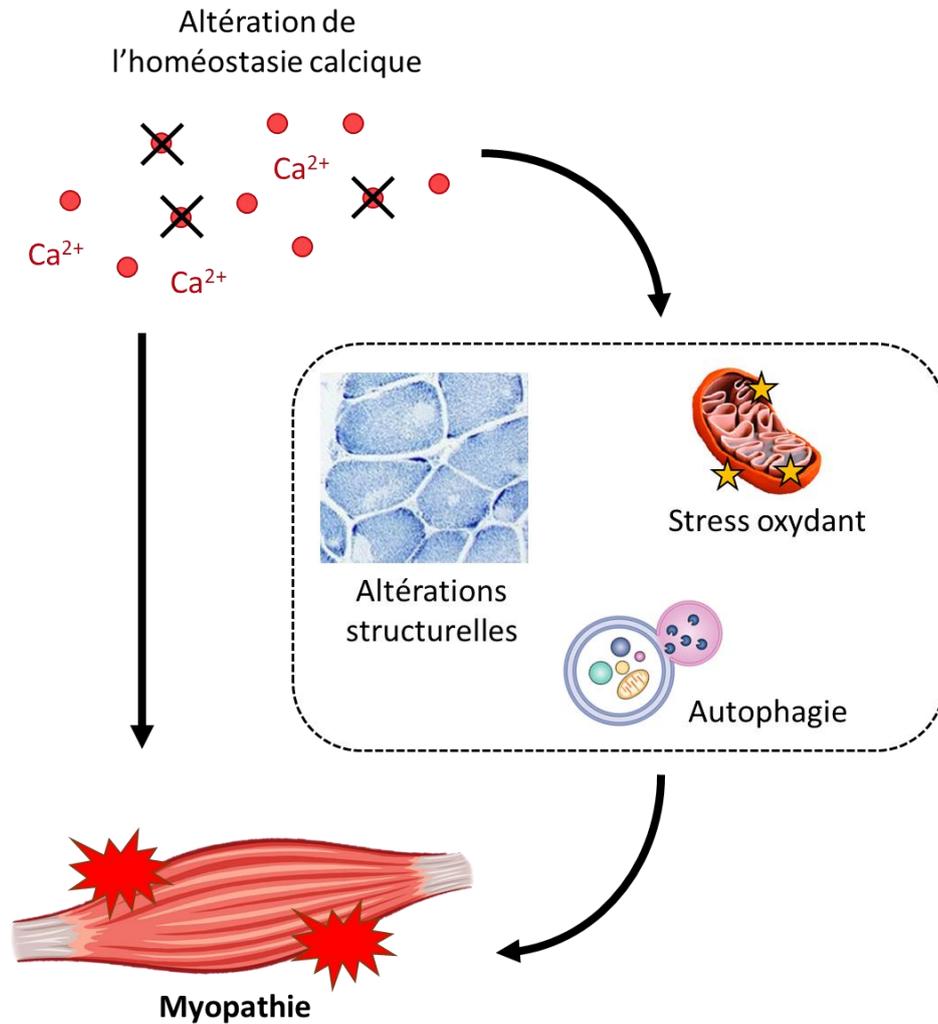
Ce mécanisme n'est pas spécifique des *RYR1*-RM, et son importance a été montrée dans le contexte d'autres pathologies musculaires. Comme cela a été décrit précédemment, l'homéostasie calcique est altérée dans plusieurs pathologies qui impliquent indirectement RyR1, telles que la LGMD2A ou la DMD. Les défauts de l'homéostasie calcique ne sont pas toujours la cause principale de la pathologie, par exemple dans la DMD (Duan et al. 2021). L'absence de dystrophine conduit ici à un défaut d'intégrité des cellules musculaires dû à une perte de liaison entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Campbell et al. 1995). La détérioration de la membrane qui en résulte provoque alors une dérégulation du calcium, avec une élévation de la concentration calcique cytosolique et une augmentation du stress oxydant causée par l'altération de la signalisation calcique (Altamirano et al. 2012, Yao et al. 2021).

Dans ces pathologies, d'autres altérations peuvent accompagner les anomalies liées au calcium. Bien qu'elles soient en apparence distinctes de l'altération de l'homéostasie calcique, certaines de ces altérations en découlent directement ou indirectement.

Les plus évidentes sont d'abord des altérations structurelles, sur lesquelles est basée la classification historique des *RYR1*-RM. A l'échelle du muscle, on observe dans certains cas des altérations liées aux types de fibres (Korematsu et al. 2006, Ogasawara et al. 2020), et les mutations de *RYR1* sont connues pour être la cause de myopathies à « disproportion congénitale du type de fibres » (*congenital fiber type disproportion*, ou CFTD) dont c'est la principale caractéristique au niveau histologique. A l'échelle de la cellule, on retrouve des caractéristiques morphologiques telles que des cores, des bâtonnets, et noyaux centraux ou encore une désorganisation des sarcomères. Au niveau génétique, l'absence de RyR1 conduit à une baisse d'expression de nombreux gènes dans la différenciation du muscle ainsi que dans son organisation et sa structure (Filipova et al. 2016). Le calcium est également connu pour réguler l'expression génique dans le muscle squelettique : ce mécanisme est appelé couplage excitation-transcription et pourrait expliquer certaines des altérations structurelles (Chin et al. 2010). Cependant, ces modifications pourraient aussi être le résultat de l'absence totale du canal plutôt que de l'abolition des relâchements de calcium.

Au niveau métabolique, l'augmentation du stress oxydant impliquant les mitochondries et le RS est très répandue dans le contexte des *RYR1*-RM (Jungbluth et al. 2011, Dowling et al. 2012). Dans certaines myopathies, il a été suggéré que l'augmentation du stress oxydant est le résultat d'une élévation de la concentration calcique cytosolique (Paolini et al. 2015).

Il a également été suggéré que l'autophagie, déjà connue pour être altérée dans d'autres pathologies musculaires, pourrait également être inhibée dans certaines *RYR1*-RM (Durieux et al. 2012, Al-Qusairi et al. 2013, Pelletier et al. 2020). Il a aussi été montré que la signalisation calcique a un rôle crucial dans la cascade de régulation de l'autophagie, qu'elle peut stimuler ou inhiber à différentes étapes (Bootman et al. 2018).



**Figure 22** : L'altération de l'homéostasie calcique est directement ou indirectement liée à d'autres altérations retrouvées dans les *RYR1*-RM tels que des défauts structurels, une augmentation du stress oxydant ou une modification des flux autophagiques.

Lorsqu'on s'intéresse aux *RYR1*-RM en particulier, on peut identifier 3 grands cas de figure : un gain de fonction, une perte de fonction ou un défaut d'expression de RyR1 (qui s'apparente également à une perte de fonction, du fait d'un défaut quantitatif de protéine fonctionnelle).

## ii. Altération de la fonction

Dans les deux premiers cas de figure, on observe une modification de la fonction de RyR1 lui-même.

Bien souvent, cette altération résulte en un gain de fonction. Cela peut résulter en un canal « fuyant » : on observe alors une fuite constante de calcium à travers le canal, ce qui conduit à un épuisement des stocks réticulaires associé à une augmentation de la concentration calcique

dans le cytosol et donc, *in fine*, à une baisse des capacités de libération du calcium. La littérature suggère que cette fuite découle d'une hyperactivité du canal, que la mutation rend plus sensible à l'activation par le calcium (Lynch et al. 1999). Ce mécanisme provoque également un stress du réticulum ainsi qu'une production de ROS qui aggrave l'altération du canal car elle conduit à des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation. Cette phosphorylation déstabilise la liaison RyR1/FKBP12 : FKBP12 ayant un rôle de stabilisation de RyR1 en configuration fermée, la fuite de calcium est amplifiée par son absence.

Il est également important de noter que ce type de mécanisme est également associé à l'hyperthermie maligne : dans ces pathologies, on retrouve une hyperactivité du canal en réponse à certains agents stimulants tels que la caféine ou les anesthésiants halogénés (halothane). Ce type de mutation est donc fréquemment associé à une susceptibilité à l'HM.

Dans le second cas, on observe au contraire une perte de la fonction de RyR1. Cette altération est souvent appelée « découplage excitation-contraction ». A tort, car contrairement à ce que suggère cette appellation, cela consiste en réalité en une baisse du relâchement calcique induit à la suite de la dépolarisation de la fibre du fait d'une baisse de la perméabilité au calcium de RyR1 (Loy et al. 2011). Le couplage mécanique entre DHPR et RyR1, en revanche, n'est *a priori* pas à l'origine de la pathologie : en effet, une mutation ponctuelle relativement répandue chez l'homme (I4898T ; Hernandez-Lain et al. 2010) est la cause d'un nombre important de ce type de myopathies, or le couplage entre les deux canaux est trop complexe pour être déstabilisé par une seule mutation ponctuelle. Contrairement à ce qui est observé dans les cas de fuite de calcium, il n'y a ici ni diminution des stocks calciques ni modification de la concentration cytosolique au repos. De plus, l'expression de RyR1 n'est pas affectée par cette mutation (Zvaritch et al. 2009).

### iii. Baisse d'expression

Dans le troisième cas de figure, on observe un défaut quantitatif de la protéine RyR1. La baisse d'expression de RyR1 peut s'opérer à plusieurs niveaux : soit au niveau de l'ARNm, qui est instable et ne conduit pas à une expression protéique suffisante, soit au niveau de la protéine elle-même : on a alors un ARNm en quantité normale mais la protéine résultante est instable ou dégradée. Dans les deux cas, la protéine RyR1 est présente en quantité diminuée par rapport à la situation normale (Monnier et al. 2003, Zhou et al. 2006, Zhou et al. 2007, Rendu et al. 2013, Garibaldi et al. 2019).

Là encore, on observe une baisse de relâchement calcique sans doute causée par une quantité de RyR1 insuffisante (Rendu et al. 2013) sans qu'une altération fonctionnelle soit forcément présente au niveau du canal lui-même : en particulier, Zhou et collègues (Zhou et al. 2007) rapportent le cas d'une famille présentant un défaut de quantité de RyR1 mais une activité normale à l'échelle du canal isolé.

Il est important de noter qu'une baisse d'expression légère ne semble pas être délétère. Chez la souris hétérozygote *RYR1*<sup>+/-</sup>, l'expression monoallélique de RyR1 résulte en une quantité d'ARNm de 50% et une quantité protéique d'environ 85% mais ne s'accompagne d'aucun symptôme ni baisse de relâchement calcique (Cacheux et al. 2015). Chez l'homme, les travaux de l'équipe ont mis en évidence des cas asymptomatiques dans une situation équivalente, soit un allèle nul ou hypomorphique et un allèle sain (Monnier et al. 2003, Rendu et al. 2013).

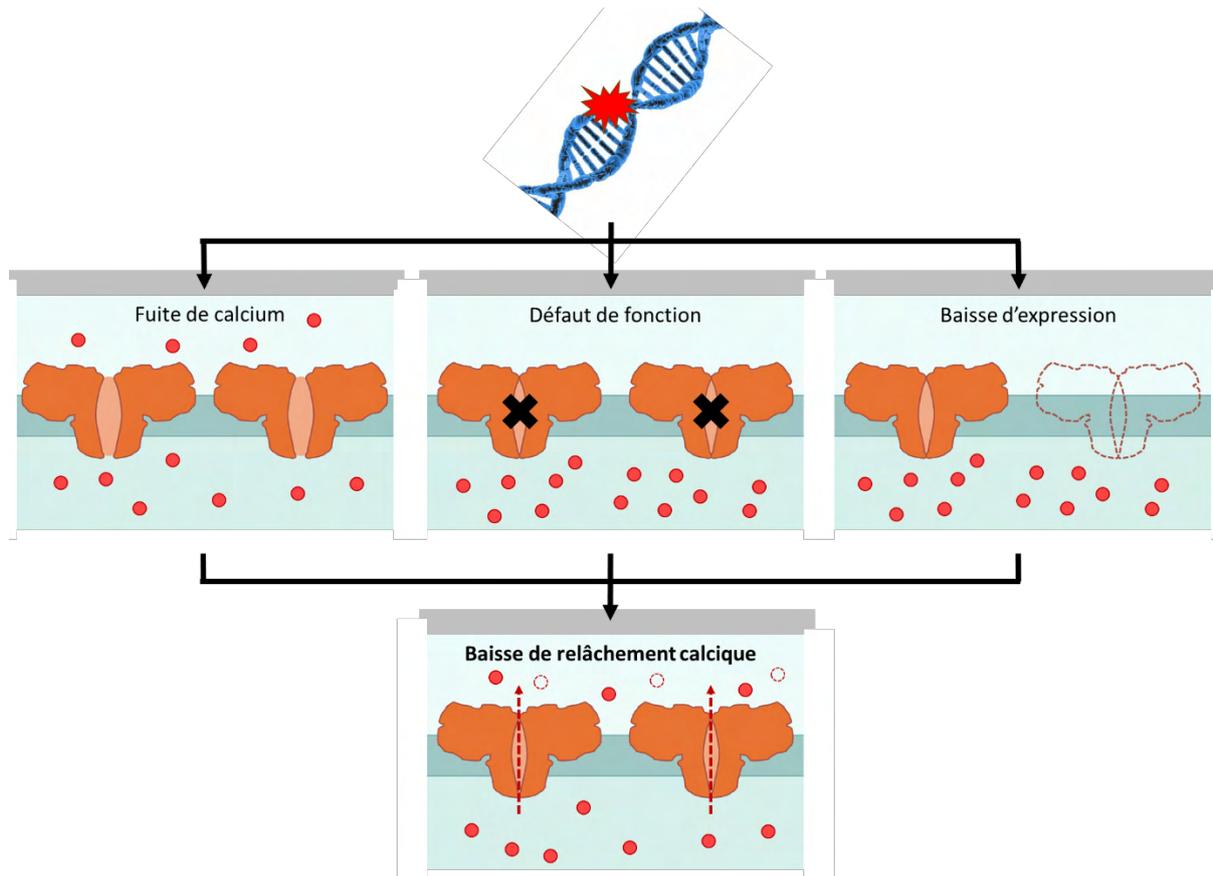
Ces observations ont conduit à émettre l'hypothèse qu'il existe un seuil minimum d'expression de RyR1 en dessous duquel la quantité de protéine devient insuffisante pour assurer une fonction normale, conduisant ainsi à la pathologie (Monnier et al. 2003, Monnier et al. 2008). Chez de nombreux patients, on retrouve justement l'association d'un allèle *null* et d'un allèle portant une seconde mutation hypomorphique conduisant à une baisse d'expression bien plus prononcée que ce qui est observé dans la situation monoallélique. Dans ces cas, l'expression de RyR1 est généralement inférieure à 50% par rapport à la normale et peut être inférieure à 10% dans les cas les plus sévères. Il a également été montré qu'il existe une corrélation entre le taux d'expression de RyR1 et la sévérité de la pathologie (Amburgey et al. 2013, Garibaldi et al. 2019).

#### iv. Relâchement calcique : une cible thérapeutique potentielle ?

A l'échelle des patients, les trois cas de figure présentés précédemment ne sont en réalité pas toujours si distincts. Dans les cas à transmission dominante, où une seule mutation est identifiée, cette mutation peut avoir plusieurs impacts, tels qu'une baisse d'expression associée à une altération de la perméabilité du canal (Cacheux et al. 2015). Dans les cas récessifs, la pathologie résulte souvent de l'interaction de plusieurs mutations. Dans ces cas plus complexes, on observe là aussi l'association de plusieurs mécanismes, et il est difficile d'attribuer les altérations fonctionnelles et morphologiques observées à l'un ou l'autre mécanisme (Zhou et al. 2006, Monnier et al. 2008, Amburgey et al. 2013).

Un point commun est cependant retrouvé dans tous ces cas de figure : quel(s) que soi(en)t le (ou les) mécanisme(s), le relâchement calcique est altéré (figure 23). En se basant sur cette observation, on peut alors supposer que corriger le relâchement calcique permettrait de corriger ces conséquences.

Cette correction pourrait être partielle ou totale. En parallèle des défauts calciques, il y a très souvent des altérations structurales. Il a été suggéré que certaines de ces altérations structurales seraient la conséquence de l'altération de l'homéostasie calcique, le calcium étant impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes (Filipova et al. 2016, Pelletier et al. 2020). On peut alors faire l'hypothèse qu'une restauration du relâchement calcique aurait également un effet bénéfique sur la structure.



**Figure 23** : Conséquences fonctionnelles des mutations de RyR1. Qu'il s'agisse d'une altération de la fonction du canal ou d'un défaut d'expression, la principale conséquence est une baisse de relâchement calcique.

La baisse de relâchement calcique n'est pas limitée aux *RYR1*-RM. Une amélioration de l'homéostasie calcique pourrait être bénéfique dans d'autres pathologies musculaires pour lesquelles le relâchement calcique est altéré : on peut par exemple citer la LGMD2A (dans laquelle on peut retrouver une baisse d'expression de RyR1 associée à une baisse de relâchement calcique (Kramerova et al. 2008, Vallejo-Illarramendi et al. 2014, Chen et al. 2021) et les myopathies congénitales dues à des mutations de DHPR (Schartner et al. 2017) ou MTM1 (Kutchukian et al. 2019). En s'éloignant des pathologies d'origine génétique, on peut également s'intéresser aux altérations de l'homéostasie calcique associées au vieillissement, qui résultent ici aussi en une perte de force (Romero-Suarez et al. 2010, Andersson et al. 2011).

#### b. Modèles d'étude

Il existe de nombreux modèles d'étude pour les *RYR1*-RM de complexité variable qui récapitulent plus ou moins bien la pathologie telle qu'elle est décrite chez l'homme. La grande diversité des mutations et, dans une moindre mesure, des mécanismes physiopathologiques est

le principal moteur qui pousse la génération de nouveaux modèles, car il ne peut par définition pas exister un modèle généraliste unique qui représenterait exactement toutes les situations.

On peut ainsi recenser une multitude de modèles, à la fois animaux et cellulaires : certains reproduisent précisément la ou les mutations d'un patient, là où d'autres modélisent au contraire un mécanisme plus large et représentent ainsi un plus grand éventail de patients. Une revue récente, publiée par Lawal et collègues, recense la plupart de ces modèles ainsi que les modèles d'HM (Lawal et al. 2020) à laquelle il convient d'ajouter le modèle développé dans l'équipe (Pelletier et al. 2020).

#### i. Modèles *in vivo*

Les mutations de *RYR1* sont nombreuses et ont des conséquences complexes au niveau structurel (histologique) et fonctionnel. Il y a donc besoin de modèles également complexes qui récapitulent les altérations à tous ces niveaux afin de mieux les comprendre. Les modèles animaux sont ceux qui offrent la plus grande complexité.

La majorité de ces modèles utilisent la souris : outre la facilité d'élevage, cela peut s'expliquer par la haute conservation de RyR1 chez les mammifères. Il existe cependant des modèles de *RYR1*-RM chez d'autres animaux non-mammifères tels que le poisson zèbre *D. rerio* ou le nématode *C. elegans*.

La plupart des modèles murins sont des modèles de *knock-in* d'une ou plusieurs mutation(s) existant chez l'homme, ou leur équivalent dans la séquence codante murine (Lawal et al. 2020). Deux modèles à transmission dominante sont particulièrement utilisés : les souris Y524S (« YS », équivalent à la mutation Y522S chez l'homme) et I4895T (« IT », équivalent à la mutation I4898T chez l'homme). La souris YS est un modèle de fuite de calcium associée à une myopathie modérée et une susceptibilité à l'HM (Chelu et al. 2006, Boncompagni et al. 2009). La souris IT, au contraire, est un modèle de défaut de perméabilité de RyR1 causant une myopathie sans susceptibilité à l'HM, qui a été générée sur deux fonds génétiques différents (Zvaritch et al. 2007, Lee et al. 2017). Plus récemment, des modèles de *RYR1*-RM sévère à transmission récessive ont été publiés tels que la souris T4706M/Indel (équivalent à la mutation T4709M chez l'homme) et la souris Q1970fsX16/A4329D. Ceux-ci présentent une forte baisse d'expression de RyR1 associée à des altérations de la fonction de RyR1 avec respectivement une sensibilité à l'HM (Brennan et al. 2019) et un défaut de perméabilité (Elbaz et al. 2019).

Le principal avantage de ces modèles est que l'utilisation de mutations existant chez l'homme garantit une certaine pertinence, notamment pour le développement thérapeutique par la suite. Néanmoins, leur principale faiblesse découle également de cette spécificité extrême, car chaque mutation (ou association de mutations) est unique.

D'autres modèles animaux, au contraire, sont basés sur une approche plus généraliste. Ils ne reproduisent pas une mutation humaine mais une altération retrouvée en conséquence de plusieurs mutations. C'est le cas de la souris « RyR1-Rec », un modèle de baisse d'expression exclusive de RyR1 développé par notre équipe et publié en 2020 (Pelletier et al. 2020). Dans

ce modèle, un *knock-down* de *RYR1* est induit par injection de tamoxifène grâce à un système Cre-lox et conduit à des défauts fonctionnels et histologiques similaires à ceux retrouvés chez de nombreux patients présentant des mutations différentes.

Enfin, il existe d'autres modèles KO *RYR1* dans différentes espèces. Chez la souris, le KO total de *RYR1* est létal à la naissance (Takeshima et al. 1994) et la délétion d'un allèle à l'état hétérozygote n'a pas de conséquences fonctionnelles (Cacheux et al. 2015). De tels modèles existent aussi chez le poisson zèbre *D. rerio* ou le nématode *C. elegans*. Les vertébrés non-mammifères tels que le poisson zèbre possèdent deux isoformes de RyR1 : *ryr1a* et *ryr1b* (Sorrentino et al. 1995). Chez le poisson-zèbre, le KO *ryr1b* provoque un phénotype sévère avec une mort prématurée et le double KO *ryr1a/ryr1b* provoque une paralysie totale (Hirata et al. 2007, Chagovetz et al. 2019). *C. elegans* possède un orthologue de *RYR1*, *unc-68* (Maryon et al. 1996). La délétion de ce gène provoque des défauts fonctionnels et morphologiques chez ces animaux. Cependant la contraction n'est pas complètement abolie comme c'est le cas chez les vertébrés grâce à l'entrée de calcium extracellulaire (Maryon et al. 1998). Bien que cela ne remette pas en question leur intérêt pour la compréhension des mécanismes liés à RyR1, ces modèles KO sont moins pertinents que les autres modèles par rapport à la pathologie humaine, car aucun KO *RYR1* n'a actuellement été recensé chez l'homme.

## ii. Modèles *in vitro*

En parallèle des différents modèles animaux, de nombreux modèles cellulaires sont utilisés pour l'étude des *RYR1*-RM. Ces modèles sont comparativement plus simples à générer et utiliser mais ils sont également moins complexes, et ne peuvent par définition pas refléter la réalité à l'échelle du muscle ou du corps entier. Ils sont donc principalement utilisés pour l'étude de caractéristiques fonctionnelles à l'échelle cellulaire.

Les modèles récapitulant le mieux la situation pathologique des patients sont ceux qui expriment la ou les mutations de ces patients dans des cellules musculaires. Il peut s'agir de cellules issues de biopsies de patients : ce type de cellules est souvent utilisé pour toutes les formes de *RYR1*-RM, y compris dans notre équipe (Rendu et al. 2013, Cacheux et al. 2015). Alternativement, l'ADNc de *RYR1* porteur d'une mutation de patient peut également être transfecté dans des cellules musculaires dyspédiques murines qui n'expriment pas *RYR1* mais expriment les autres protéines du CRC (Lawal et al. 2020).

La majorité des modèles cellulaires sont des modèles d'expression hétérologue de *RYR1* dans des cellules non musculaires, telles que des cellules HEK293 ou COS-7. Plus de 160 variants de *RYR1* ont été exprimés dans de tels modèles (Lawal et al. 2020). L'inconvénient majeur de ces cellules est que la plupart des protéines du CRC ne sont exprimées que dans les cellules musculaires. Or, en conditions physiologiques, ces protéines interagissent avec RyR1 et régulent sa fonction : en leur absence, l'étude de la fonction de RyR1 est donc forcément biaisée.

### III. Approches thérapeutiques à l'étude

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pour les patients atteints de *RYR1*-RM. Ce vide thérapeutique s'explique par plusieurs facteurs. Les mutations *RYR1* ne sont pas concentrées sur un hotspot unique, mais sont réparties sur l'intégralité du gène. Or, *RYR1* est un gène de grande taille, sur lequel plusieurs centaines de mutation pathogènes ont été recensées (Robinson et al. 2006, Garibaldi et al. 2019, Lawal et al. 2020). Enfin, les conséquences des mutations sont très diverses. Comme cela a été décrit précédemment, elles peuvent résulter en une baisse d'expression de la protéine ou en différentes altérations de la fonction du canal, et le cas d'un patient donné peut résulter d'une combinaison de plusieurs de ces mécanismes (et de plusieurs mutations, particulièrement dans les cas récessifs). Ces facteurs font des *RYR1*-RM des pathologies complexes et compliquent grandement la recherche d'un traitement, car cette diversité dans la pathologie rend très difficile une approche globale.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie permet la construction de modèles qui récapitulent bien les *RYR1*-RM. Ce sont ces modèles qui permettent l'étude de différentes applications thérapeutiques pour le traitement de ces mêmes pathologies.

Deux grandes catégories de traitements sont à l'étude aujourd'hui. Dans le premier cas, la thérapie génique, il s'agit de corriger directement le gène muté ou plus généralement de restaurer l'expression d'une protéine fonctionnelle en quantité suffisante. Dans le second cas, la thérapie pharmacologique, on cherche plutôt à cibler les conséquences fonctionnelles des mutations afin de restaurer des mécanismes physiologiques. Dans un cas comme dans l'autre, le but est de corriger la force musculaire du patient. Nous avons récemment publié une revue sur les avancées thérapeutiques (Beaufils et al. 2022), qui est également inclus en annexe de ces travaux (annexe 4).

#### 1. Thérapie génique

La thérapie génique cherche à corriger la pathologie en agissant à son origine, c'est à dire au niveau génique. Depuis ses débuts dans les années 1980, ce type de thérapie est étudié et développé pour de nombreuses pathologies dont l'origine est génétique et bien identifiée. C'est justement le cas de la plupart des pathologies musculaires. Actuellement, la thérapie génique est utilisée pour le traitement d'une de ces pathologies, l'amyotrophie spinale (SMA), et des résultats prometteurs ont été obtenus dans d'autres telles que la dystrophie de Duchenne (DMD), la dystrophie myotonique (DM1) ou encore les *RYR1*-RM, auxquelles ces travaux s'intéressent particulièrement.

Les méthodes de thérapie génique peuvent impliquer le transfert de matériel génétique ou sa modification directement dans les cellules afin d'obtenir une protéine fonctionnelle.

### a. Transfert du gène

L'approche de thérapie génique la plus simple est l'introduction dans le génome d'une copie fonctionnelle du gène muté. Cette approche est théoriquement idéale dans le cas d'une protéine absente ou non fonctionnelle, ou pour toutes les mutations d'un petit gène. Dans le cas des RYR1-RM, elle ne serait cependant pas indiquée pour les formes à transmission dominante, car ces mutations restent délétères en présence d'une protéine fonctionnelle produite par le second allèle.

L'introduction du gène peut se faire par le biais d'un vecteur, par exemple un vecteur viral adéno-associé (AAV), ce qui permet de disséminer le traitement à l'organisme entier. De plus, elle est indépendante de la mutation individuelle de chaque patient.

Ce type de thérapie est déjà approuvé en clinique pour le traitement d'une pathologie musculaire, la SMA. Elle est causée par des mutations du gène *SMN1* qui causent une absence de protéine Survival Motor Neuron (SMN), donc la dégénérescence des neurones moteurs. Une copie fonctionnelle du gène *SMN1* est ainsi transférée au patient par le biais d'un vecteur AAV (Onasemnogene Aseparvovec, commercialisé sous le nom Zolgensma ; Al-Zaidy et al. 2019) et permet une amélioration spectaculaire de la fonction motrice et de la survie dans les formes juvéniles de la pathologie (Mendell et al. 2017). Le transfert de gène est également étudié pour une seconde pathologie, la myopathie myotubulaire (*X-linked myotubular myopathy*, XLMTM) avec le transfert du gène *MTM1* (Ross et al. 2020). Un essai clinique est en cours (NCT03199469).

Le transfert du gène entier a cependant ses limites. Les vecteurs AAV utilisés aujourd'hui ont une capacité relativement faible, d'environ 5kb au total, bien que des alternatives qui permettraient de transférer de plus gros gènes soient à l'étude depuis plusieurs années (Koo et al. 2014, McClements et al. 2016). En l'état, la méthode est donc inapplicable au gène *RYR1*, dont la séquence codante de 15kb est bien au-delà de cette capacité.

Ce même problème est rencontré dans le contexte de la DMD, qui est causée par des mutations du gène de la dystrophine (14kb). Des alternatives au transfert de gène entier sont à l'étude, avec l'utilisation de « mini gènes ». En effet, la dystrophine est une protéine modulaire contenant des domaines répétés. Or, des patients atteints d'une forme modérée de cette pathologie (appelée dystrophie de Becker, BMD) expriment une forme tronquée de la dystrophine avec une délétion de ces domaines répétés, contrairement aux patients atteints de formes sévères chez lesquels la dystrophine est complètement absente. Il a donc été suggéré que restaurer l'expression d'une protéine tronquée permettrait d'atténuer un phénotype sévère vers un phénotype modéré, avec des résultats encourageants dans des modèles de DMD chez la souris et le chien (McGreevy et al. 2015, Kodippili et al. 2018). Un essai clinique en phase 3 est également en cours (NCT04281485).

Malheureusement, cette alternative n'est pas non plus applicable au gène *RYR1*. Contrairement à la dystrophine, RyR1 n'est pas modulaire et aucun exon n'est superflu : la délétion d'une partie de la protéine résulterait donc en une protéine instable ou non fonctionnelle. Aucun

patient atteint d'une forme modérée de *RYR1*-RM et exprimant une protéine RyR1 tronquée n'a été identifié à l'heure actuelle : rien ne suggère donc qu'un « mini RyR1 » serait fonctionnel.

#### *b. Modulation de l'expression d'un paralogue*

Dans certain cas, un gène peut être non fonctionnel ou absent dans le muscle adulte, mais un paralogue est présent dans le muscle embryonnaire. Il est alors possible de forcer l'expression du gène embryonnaire afin de compenser l'absence du gène adulte.

Une telle approche est étudiée dans le contexte de la DMD. La surexpression de l'utrophine, un paralogue embryonnaire de la dystrophine, corrige les symptômes de la pathologie dans un modèle murin (Tinsley et al. 1998). Cette surexpression peut être induite de différentes manières : activation pharmacologique du promoteur (Tinsley et al. 1998), inhibition de sa régulation négative normale (Sengupta et al. 2020) ou encore utilisation de facteurs de transcription artificiels (Pisani et al. 2018).

Dans le cas de *RYR1*, une stratégie similaire pourrait éventuellement être considérée en utilisant le gène *RYR3*. RyR3 est présent en faible quantité dans le muscle adulte et en plus grande quantité dans le muscle embryonnaire (Lanner et al. 2010). Cependant, RyR3 est ubiquitaire et sa fonction est encore mal comprise : il n'est par exemple pas certain qu'il puisse être activé par DHPR et prendre la place de RyR1 au niveau du CRC. Il est donc impossible d'affirmer à l'heure actuelle qu'il constitue un substituant convenable pour RyR1.

#### *c. Modulation de l'ARNm*

Lorsque la correction du gène est impossible, cibler l'ARNm peut être une autre alternative. La modulation de l'ARNm est particulièrement adaptée aux mutations qui affectent l'épissage, avec une délétion ou insertion d'exons ou une rétention d'introns : le but est alors de corriger l'épissage afin de restaurer l'expression d'une protéine normale et fonctionnelle.

Elle est également utilisable dans d'autres situations. Dans le cas d'une mutation qui conduit à un codon stop ou un décalage du cadre de lecture, il est parfois possible de supprimer l'exon muté pour obtenir une protéine tronquée, mais au moins partiellement fonctionnelle. Cette méthode est à l'étude pour la DMD, avec la délétion de l'exon 23 chez la souris et 45, 51 ou 53 chez l'homme grâce à des oligonucléotides antisens (AON ; Alter et al. 2006, Goemans et al. 2018, Chiu et al. 2020). Comme pour les thérapies utilisant des mini-dystrophines, le but est d'atténuer un phénotype sévère vers un phénotype modéré. Cependant, RyR1 n'étant pas modulaire comme la dystrophine, cette méthode n'est pas non plus applicable aux *RYR1*-RM.

Un autre cas est celui de la SMA, qui est causée par des mutations du gène *SMN1*. Il existe une seconde copie du gène *SMN1*, *SMN2* : les deux gènes ne diffèrent que par quelques nucléotides, mais l'épissage de *SMN2* est distinct et résulte en une protéine tronquée et non fonctionnelle dans laquelle l'exon 7 est absent. Une stratégie est donc de modifier l'épissage de *SMN2* afin

de forcer l'inclusion de l'exon 7 dans le transcrit et permettre la production d'une protéine fonctionnelle à partir de ce gène. Cette modulation peut être réalisée par le biais d'AON (Finkel et al. 2017, Gidaro et al. 2019) ou de molécules chimiques (Zhao et al. 2016) : l'un comme l'autre ont été validés lors d'essais cliniques et sont aujourd'hui approuvés pour le traitement de la SMA, seuls ou en combinaison avec le remplacement de *SMN1*. Une fois de plus, cette méthode n'est cependant pas applicable aux *RYR1*-RM car il n'existe pas d'équivalent à *SMN2* pour ces pathologies.

Deux approches impliquant la modulation de l'ARNm ont été étudiées pour les *RYR1*-RM. La première a été appliquée au cas d'un patient dont l'une des mutations résulte en un épissage alternatif et l'inclusion d'un exon surnuméraire qui cause l'instabilité de la protéine. Des résultats très encourageants au niveau cellulaire ont été obtenus avec l'utilisation d'AONs pour exclure cet exon surnuméraire et restaurer un épissage normal, avec une restauration du relâchement calcique au niveau du contrôle non muté (Rendu et al. 2013). Le second cas a été appliqué à deux modèles murins avec des mutations dominantes de *RYR1*, Y522S et I4895T. Il a été montré que l'extinction de l'ARN porteur des mutations avec des ARNi permet une restauration partielle de la fonction, notamment au niveau du relâchement calcique (Loy et al. 2012).

Ces deux approches sont très prometteuses mais partagent un inconvénient majeur : ce sont des approches très personnalisées, qui nécessitent un AON ou un ARNi spécifique de chaque mutation.

#### d. *Edition génétique avec CRISPR-Cas9*

CRISPR/Cas9 (Jinek et al. 2012) est adapté d'un mécanisme de défense des bactéries contre les virus et est de plus en plus utilisé comme outil d'édition génomique, notamment dans le but de développer des thérapies pour de nombreuses maladies génétiques (Sharma et al. 2021).

De manière simplifiée, le système CRISPR/Cas9 fonctionne en deux étapes.

- La première étape est un clivage ciblé de l'ADN par un système qu'on qualifie de « ciseaux moléculaires ». La Cas9, guidée par un ARN, commence par couper l'ADN à l'endroit souhaité, par exemple près d'une mutation.
- La seconde étape est la réparation de l'ADN par la cellule. Cette réparation se fait le plus souvent de manière « imparfaite » par jonction d'extrémités non homologues, ce qui résulte en des insertions ou des délétions au niveau du site de clivage. En présence d'un brin modèle (par exemple sans la mutation), la réparation peut au contraire se faire par recombinaison homologue, de manière « dirigée ». Cette réparation par recombinaison homologue ne se fait que dans les cellules en cours de division.

Comme pour les autres approches de thérapie génique, les outils moléculaires nécessaires à ce système (Cas9, guides ARN) peuvent être transmis aux cellules avec des vecteurs viraux ou non viraux (nanoparticules, électroporation).

Actuellement, dans le contexte des pathologies musculaires, ce type d'approche est principalement étudié pour la DMD et la DM1. Dans le cas de la DMD, elle est appliquée au saut d'exon, pour lequel l'efficacité obtenue avec CRISPR-Cas9 est supérieure à celle obtenue avec des AONs et a été testée dans plusieurs modèles de différentes espèces (Long et al. 2016, Nelson et al. 2016, Amoasii et al. 2018, Moretti et al. 2020). Dans le cas de la DM1, la pathologie est causée par une répétition de 3 nucléotides dans une région non codante du gène DMPK. La stratégie privilégiée est donc l'excision de cette région non-codante (Marsh et al. 2020).

Dans le contexte des RYR1-RM spécifiquement, CRISPR-Cas9 serait sans doute applicable dans les mêmes cas que la modulation de l'ARNm, à savoir la correction des mutations affectant l'épissage et l'extinction d'un allèle porteur d'une mutation dominante. Il est actuellement impossible d'éditer le gène de manière plus précise dans le muscle, par exemple pour corriger un nucléotide affecté par une mutation ponctuelle, car cela nécessiterait obligatoirement une réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Or, la recombinaison homologue n'est possible que dans les cellules en cours de division alors que les fibres musculaires sont très différenciées et ne se divisent plus. Dans tous les cas, comme pour la modulation de l'ARNm, la personnalisation extrême de la thérapie reste un inconvénient majeur.

## 2. Thérapie pharmacologique

Contrairement à la thérapie génique, la thérapie pharmacologique vise à contrer les conséquences fonctionnelles des mutations. Elle nécessite donc une bonne connaissance des mécanismes physiopathologiques de la maladie.

Les effets de ces thérapies peuvent s'opérer à différents niveaux. Dans le cas des *RYR1*-RM, elles peuvent cibler RyR1 (directement ou non), par exemple en modifiant sa conformation ou son interaction avec d'autres protéines régulatrices. Mais elles peuvent aussi agir en aval de RyR1, en corrigeant d'autres mécanismes affectés par l'altération des flux calciques.

### *a. Inhibition directe de l'activité de RyR1*

Dans le cas des *RYR1*-RM qui impliquent un canal RyR1 hyperactif ou fuyant, il peut sembler pertinent de chercher à inhiber directement RyR1.

Le dantrolène a été décrit pour la première fois en 1967 comme relaxant musculaire (Snyder et al. 1967). Bien que son mécanisme d'action ne soit pas complètement élucidé, il est connu pour inhiber le couplage EC et semble agir directement sur le canal RyR1 en se liant sur un site différent du site de liaison de la ryanodine (Danko et al. 1985, Nelson et al. 1996, Palnitkar et

al. 1997). Le dantrolène est la seule molécule approuvée pour le traitement de l'HM, qui est causée par une hyperactivité de RyR1 en présence de certains anesthésiants halogénés tels que l'halothane. L'administration de dantrolène permet d'arrêter les crises, qui seraient le plus souvent létales en absence de traitement (Wappler et al. 2002, Krause et al. 2004).

L'action du dantrolène sur la fuite de calcium à travers RyR1 a été étudiée dans le contexte de la DMD, dans laquelle ce défaut est retrouvé (Bertorini et al. 1991). Sept patients de 6 à 13 ans ont été traités avec du dantrolène de façon chronique pendant 2 ans à la suite d'une période « contrôle » de 2 ans également. Cette étude a montré une diminution significative de la quantité de créatine kinase dans le sérum des patients pendant la période de traitement par rapport à la période contrôle, mais pas de bénéfice significatif sur la force musculaire. Il serait cependant intéressant d'étudier ses effets dans le contexte des *RYR1*-RM dans lesquelles la fuite de calcium est le mécanisme physiopathologique principal et n'est pas toujours accompagnée d'une élévation de la créatine kinase (Lawal et al. 2018).

Dans la DMD, l'effet du dantrolène a également été évalué en conjonction avec des thérapies géniques de saut d'exon utilisant des AONs (Kendall et al. 2012, Wang et al. 2018). Dans un modèle murin de DMD, un traitement oral avec le dantrolène améliore significativement l'efficacité des AONs. Cette utilisation en renfort de la thérapie génique pourrait également être bénéfique pour le traitement des *RYR1*-RM.

D'autres inhibiteurs de RyR1 permettant de réduire la fuite de calcium du RS ont récemment été identifiés grâce à des criblages de molécules chimiques (Murayama et al. 2018, Rebbeck et al. 2020). L'un d'eux, un dérivé de l'acide oxolinique, est efficace pour le traitement des crises d'HM dans un modèle murin mais n'a actuellement pas été testé sur des modèles de myopathie (Yamazawa et al. 2021).

Quelle que soit la molécule, l'inhibition de l'activité de RyR1 ne permettrait de traiter que des patients ayant un canal RyR1 hyperactif ou fuyant. Pour les formes de *RYR1*-RM avec une baisse de fonction ou un défaut quantitatif, d'autres approches sont nécessaires.

#### *b. Modulation du stress oxydant*

Les espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) sont des molécules produites par de nombreux processus biologiques. Dans le muscle squelettique, elles jouent un rôle dans la régulation de l'expression génique et de certaines voies de signalisation, ainsi que dans la maintenance de la fonction contractile. Cependant, une production excessive de ROS est la cause d'un stress oxydant qui peut mener à la mort cellulaire (Wei et al. 2011).

Une telle élévation du stress oxydant est retrouvée dans plusieurs modèles animaux de *RYR1*-RM ou d'HM et dans des cellules musculaires issues de patients (Durham et al. 2008, Dowling et al. 2012, Michelucci et al. 2017). Dans ces pathologies, il est suggéré qu'une hausse de l'activité mitochondriale calcium-dépendante entraîne une surproduction de ROS et d'espèces réactives de l'azote (*Nitrogen Reactive Species*, RNS). Cette altération serait due soit à l'élévation de la concentration de calcium cytosolique (dans le cas d'un canal RyR1 fuyant),

soit à une augmentation des flux calciques du RS vers les mitochondries causée par une surcharge calcique du RS (dans le cas d'un défaut de perméabilité de RyR1 ; Dowling et al. 2012). Le stress oxydant induit alors une oxydation, nitrosylation ou glutathionylation de RyR1, qui aggrave d'autant plus la fuite calcique et le stress des mitochondries.

Un antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC), a été testé sur plusieurs modèles de *RYR1*-RM présentant une élévation du stress oxydant dans le poisson-zèbre et la souris, ainsi que sur des cellules de patients (Durham et al. 2008, Dowling et al. 2012, Michelucci et al. 2017). Dans ces modèles, le phénotype est amélioré à la fois au niveau moléculaire et fonctionnel par le traitement. En se basant sur les résultats de ces études, l'efficacité du NAC a été testée sur 16 patients atteints de formes modérées de *RYR1*-RM. Cependant, aucune réduction du stress oxydant n'a été mesurée chez les patients traités ; d'un point de vue fonctionnel, une tendance vers l'amélioration a été observée avec la mesure de la distance parcourue pendant 6 minutes de marche mais elle n'est pas significative. Ces résultats décevants pourraient être dus à une taille de cohorte trop faible par rapport à l'hétérogénéité de la population, à une mauvaise sélection, ou à un test fonctionnel non approprié pour détecter l'amélioration recherchée.

### c. *Interaction avec la protéine régulatrice FKBP12*

Comme évoqué précédemment, l'activité de RyR1 est régulée par de nombreuses protéines dont FKBP12, qui stabilise le canal dans sa configuration fermée. L'association de FKBP12 et RyR1 est déstabilisée par des modifications post-traductionnelles de RyR1 telles que l'oxydation, la nitrosylation ou la glutathionylation (Chelu et al. 2004). Ceci conduit à une aggravation de la fuite de calcium par RyR1.

Les « Rycals » sont des molécules dérivées des benzothiazépines développées par ARMGO Pharma Inc. Ces molécules, par exemple le S107, stabilisent la liaison FKBP12/RyR1 et empêchent leur dissociation (Bellinger et al. 2008, Mei et al. 2013). Le S107 a d'abord été testé sur un modèle murin de DMD, dans lequel on retrouve une fuite de calcium associée à une dissociation de FKBP12/RyR1 : une restauration de la liaison FKBP12/RyR1, une réduction de la fuite de calcium et une amélioration de la fonction musculaire ont été observées après quatre semaines de traitement (Bellinger et al. 2009).

Dans le contexte des *RYR1*-RM, l'efficacité du S107 a été évaluée sur des biopsies de patients (Kushnir et al. 2020). La fuite de calcium, une réduction de la quantité de FKBP12 associée à RyR1 et une oxydation de RyR1 ont été préalablement confirmées chez ces patients. Sur ces biopsies, le traitement restaure la liaison FKBP12/RyR1 de façon spectaculaire et réduit également la fuite de calcium. Ces bénéfices sont indépendants de l'oxydation et de la nitrosylation de RyR1, qui ne sont pas modifiés.

Un essai clinique est également en cours pour une autre molécule de la famille des Rycals, le S48168 (NCT04141670). La cohorte est constituée de 10 patients atteints de *RYR1*-RM pour lesquels la présence d'un canal fuyant et une réponse positive au S48168 ont été vérifiés *ex vivo*. L'objectif premier est d'évaluer l'effet du traitement sur la fonction musculaire et la

fatigue ; en parallèle, la tolérance au traitement ainsi que la sûreté et la pharmacocinétique sont aussi étudiées.

Plus récemment, une nouvelle famille de molécules ciblant la liaison FKBP12/RyR1 dans le contexte de l'élévation du stress oxydant a été décrite (Aizpurua et al. 2021). Ces molécules, différentes des Rycals, pourraient également constituer une piste thérapeutique intéressante.

#### d. Amélioration du repliement des protéines

Une autre piste thérapeutique a été explorée dans le cas d'un autre mécanisme physiopathologique, avec un canal RyR1 dit « découplé ». Dans le modèle murin I4895T reproduisant une mutation de patient, une baisse d'expression de la triadine associée à une dissociation de la calséquestrine de la triade a été observée (Lee et al. 2017). Cette dissociation induirait alors une augmentation de la production de ROS et un stress du RS associée à la réponse *Unfolded Protein Response* (UPR).

Dans l'objectif de diminuer le stress du RS, les souris I4895T ont été traitées pendant 2 semaines avec une chaperonne chimique déjà approuvée en clinique pour le traitement de pathologies non-musculaires : le sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA). Les auteurs ont observé une amélioration du stress du RS comme attendu, mais également une amélioration de la fonction musculaire et de la structure du muscle (Lee et al. 2017). De manière surprenante, ces bénéfices s'opèrent sans restauration du flux calcique par RyR1. Cela suggère que restaurer le repliement de protéines associées à RyR1 telles que la triadine et la calséquestrine pourrait suffire à améliorer le phénotype sans agir directement sur le RyR1 muté. Cependant, cette piste n'a été explorée que sur ce modèle, et il serait intéressant de vérifier l'efficacité du 4-PBA dans d'autres modèles.

#### e. Modulation des récepteurs des estrogènes

Les récepteurs des estrogènes sont des protéines intracellulaires de la famille des récepteurs des stéroïdes qui possèdent donc une fonction de facteur de transcription. Il existe deux types de récepteurs des estrogènes, ER $\alpha$  (*Estrogen Receptor  $\alpha$* ) et ER $\beta$  (*Estrogen Receptor  $\beta$* ), codés par deux gènes différents : *ESR1* et *ESR2*, respectivement. Leur profil d'expression dépend du tissu : les deux sont présents dans le muscle (Wiik et al. 2009) dans lequel ils régulent l'expression de groupes de gènes distincts. ER $\beta$  favoriserait notamment la croissance et la régénération du muscle squelettique (Velders et al. 2012), et un traitement par des agonistes d'ER $\beta$  provoque une hypertrophie du muscle (Parr et al. 2014). De plus, un défaut de force et de régénération musculaire est observé chez des souris en situation de déficience d'estrogènes (ovariectomie ; Kitajima et al. 2016).

L'effet d'un modulateur spécifique des récepteurs aux estrogènes (*Selective Estrogen Receptor Modulator*, SERM), le tamoxifène, a d'abord été étudié dans le contexte de la DMD. Il améliore

l'histologie, la structure et la fonction du muscle et diminue la fibrose sur un modèle murin de DMD (Dorchies et al. 2013). Un essai clinique portant sur 13 patients atteints de DMD âgés de 6 à 14 ans a récemment été publié (Tsabari et al. 2021). Les patients ont été traités avec 20mg/jour de tamoxifène administré par voie orale pendant 3 ans. Chez ces patients, une diminution de la détérioration de la fonction motrice et respiratoire a été observée par rapport aux cohortes historiques. Ces résultats encourageants pourraient être confirmés par un essai clinique de plus grande envergure : un tel essai clinique en phase 3 est justement en cours (Nagy et al. 2019 ; NCT03354039).

Le tamoxifène a été évalué dans le contexte d'une seconde pathologie musculaire, la XLMTM. Deux équipes ont séparément montré que le tamoxifène améliore fortement la durée de vie de souris présentant cette maladie ainsi que la structure et la fonction du muscle, avec en particulier une restauration du relâchement calcique dans les fibres musculaires (Gayi et al. 2018, Maani et al. 2018).

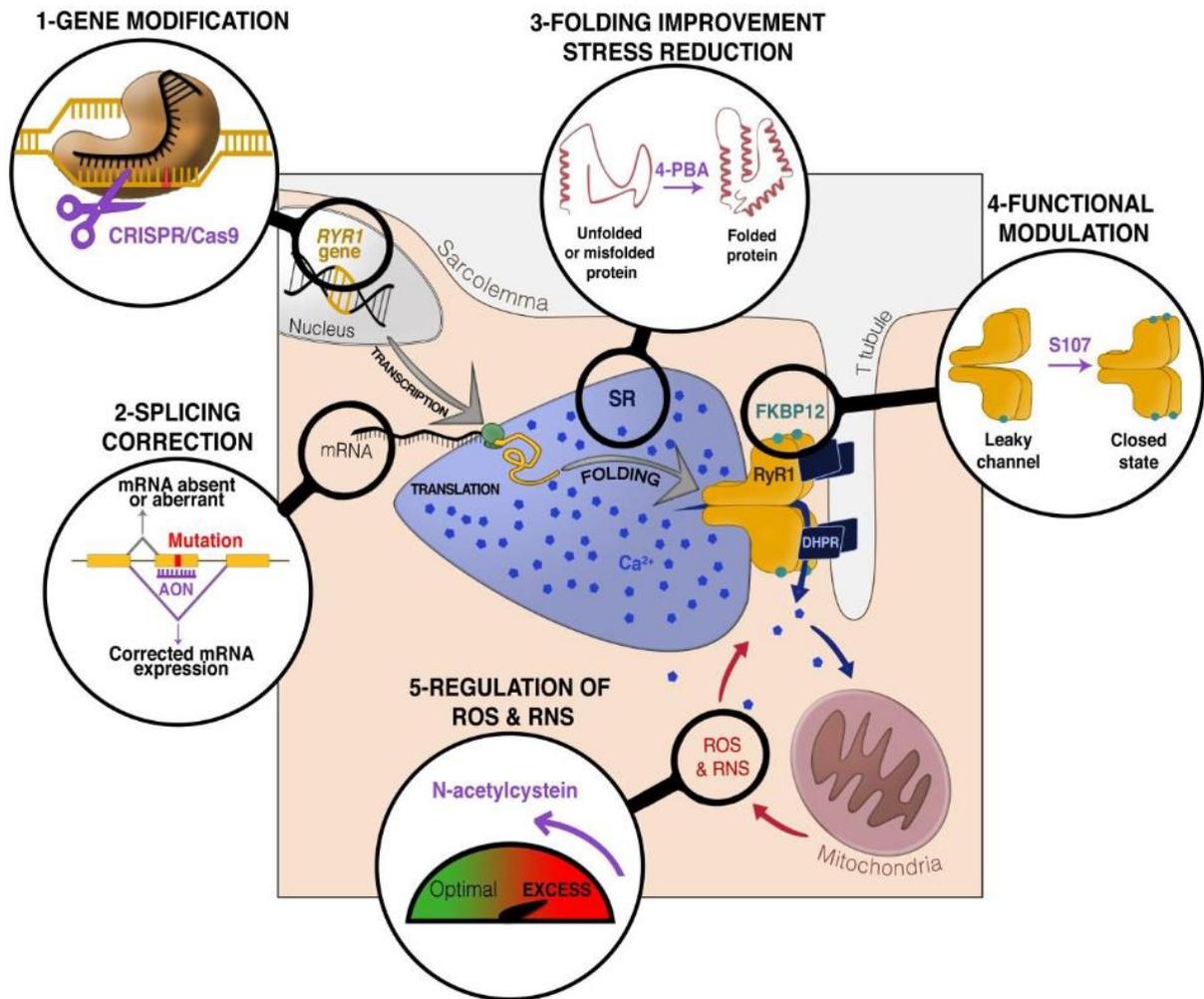
Le mécanisme par lequel le tamoxifène agit sur ces pathologies est encore mal connu. Il a été montré par Maani et collègues que son effet est dépendant des récepteurs aux estrogènes dans le cas de la XLMTM, mais les mécanismes n'ont pas été explorés dans la DMD et il n'est pas exclu que le tamoxifène puisse avoir un second effet indépendant des récepteurs aux estrogènes. De plus, on ne sait pas à l'heure actuelle si l'effet est spécifiquement musculaire ou systémique.

Dans tous les cas, l'action du tamoxifène est complexe : celui-ci agit comme agoniste ou antagoniste des récepteurs aux estrogènes de façon tissu-dépendante (Berry et al. 1990), en fonction notamment des proportions dans lesquelles sont exprimés les deux récepteurs. Il a en effet une action agoniste à travers ER $\alpha$ , et antagoniste à travers ER $\beta$  (Salvatori et al. 2003). Il est par exemple agoniste dans l'utérus ou les os, antagoniste dans le sein mais son action dans le muscle est encore mal caractérisée, bien qu'elle semble être plutôt agoniste (Komm et al. 2014).

Il est intéressant de noter que des altérations du relâchement calcique sont observées à la fois dans la DMD (De Luca et al. 2001, Plant et al. 2003) et dans la XLMTM (Dowling et al. 2009, Dowling et al. 2010), et que le relâchement calcique est restauré par le traitement par le tamoxifène dans la XLMTM. De telles altérations étant le principal mécanisme physiopathologique des *RYR1*-RM, les SERM constituent également une piste thérapeutique pertinente pour ces pathologies.

### 3. Avantages et difficultés des différentes thérapies

Bien qu'il n'existe pas de traitement pour les *RYR1*-RM à l'heure actuelle, les pistes thérapeutiques pour ces pathologies forment un champ de recherche très actif ces dernières années. Ces thérapies à l'étude, dont certaines sont à un stade plus avancé que d'autres, agissent sur une grande variété de mécanismes qui sont récapitulés sur le schéma suivant (figure 24).



**Figure 24 :** Résumé des principales voies ciblées par les différentes approches thérapeutiques à l'étude aujourd'hui. 1. Correction de l'ADN au niveau du noyau. 2. Correction de l'épissage de l'ARNm dans le cytoplasme. 3. Amélioration du repliement des protéines et réduction du stress du RS. 4. Régulation de la fuite de calcium à la triade. 5. Régulation de la production de ROS et RNS dans le cytoplasme et la mitochondrie. (extrait de Beaufils et al. 2021)

La thérapie génique offre sans doute le plus grand potentiel thérapeutique à long terme, et permettrait une guérison en corrigeant la mutation responsable de la pathologie. Cependant, ces thérapies sont relativement nouvelles et les premiers succès remontent à 20 ans à peine (Hacein-Bey-Abina et al. 2002) : les difficultés qui s'y rapportent ne sont donc pas toujours bien maîtrisées à l'heure actuelle. L'efficacité de l'édition génomique par CRISPR-Cas9 est par exemple contrebalancée par des problèmes de réponse immunitaire aux vecteurs viraux ou à la Cas9 elle-même (Nelson et al. 2019). Un autre problème majeur spécifique à CRISPR-Cas9 est le risque de coupure dit « *off-target* », c'est-à-dire dans une partie de l'ADN qui n'est pas ciblée par les guides en risquant ainsi de créer des mutations (Marsh et al. 2020).

De manière plus générale, l'intégration du transgène dans le génome du patient peut également être délétère et provoquer des cancers (Hanlon et al. 2019). Une autre difficulté pourrait être une correction insuffisante liée à la distribution du traitement, qui doit à la fois atteindre tous

les muscles de l'organisme et corriger une fraction suffisante des noyaux d'une fibre pour restaurer une fonction (van Westering et al. 2020).

Malgré tout, la recherche sur les thérapies génique est extrêmement active et certains de ces problèmes pourraient trouver des solutions dans les années qui viennent. Ce type de thérapie doit toutefois être « dépersonnalisé » pour être pertinent dans le contexte des *RYR1*-RM car il est difficilement envisageable de développer un traitement pour chaque mutation individuelle.

Actuellement, la thérapie pharmacologique offre plusieurs avantages par rapport à la thérapie génique et est l'approche la plus prometteuse à court terme. Viser les conséquences fonctionnelles des mutations plutôt que les mutations elles-mêmes permet une approche plus généraliste et applicable à un grand nombre de patients. En ciblant une variété de mécanismes différents, ces thérapies peuvent également s'adresser à différents groupes de patients, par exemple les patients dont la myopathie est due à une fuite de calcium par RyR1 (S107, NAC) ou ceux dont la perméabilité du canal est altérée (4-PBA). Le développement d'un nouveau médicament est long et complexe mais les difficultés qui y sont associées sont maintenant bien connues. Une stratégie de repositionnement d'une molécule déjà utilisée en clinique permet de contourner plusieurs de ces difficultés, notamment en ce qui concerne les risques de toxicité et le temps de développement, et peut résulter en une mise sur le marché très rapide. Cependant, l'efficacité à l'échelle de la cellule ou de l'animal ne se traduit pas forcément par une efficacité sur le patient, comme cela a été montré avec l'exemple de la NAC.

Le repositionnement ne représente cependant pas l'intégralité des thérapies pharmacologiques, et de nouvelles molécules sont sans cesse développées. Le criblage de molécules chimiques est de plus en plus utilisé dans la recherche de thérapies pour les maladies rares, et notamment pour les *RYR1*-RM : il est donc probable que de nouvelles molécules ciblant potentiellement de nouveaux mécanismes soient développées dans les années à venir.

#### 4. Criblage pharmacologique

##### *a. Introduction au criblage pharmacologique*

Développer un nouveau médicament est un procédé long, incertain et coûteux. Les stratégies de développement sont ainsi en constante évolution afin de chercher à rendre ce processus toujours moins coûteux en temps, financièrement et en réactifs, tout en testant toujours plus de composés afin d'assurer les meilleures chances de succès. Quelles qu'en soient les spécificités, le criblage tel qu'on le conçoit aujourd'hui répond à un besoin bien spécifique : tester un grand nombre de composés structurellement variés, de manière rapide, efficace et à moindre coût.

Le criblage pharmacologique dit « haut débit » a été une avancée majeure pour le développement pharmacologique et l'industrie pharmaceutique. Ces avancées techniques permettant de tester rapidement un grand nombre de composés sont relativement récentes, et n'ont été conceptualisées qu'à la fin des années 1980 voire au début des années 1990 (Pereira et al. 2007, Dolle 2011). Concernant l'augmentation rapide de la capacité de test, on peut ici s'intéresser à l'exemple de Pfizer qui, en 1986, la multiplie par 50 à 200 (de 20-50

composés/semaine à 1 000-10 000 composés/semaine) en adaptant les tests d'activité antibiotique au format plaque 96 puits, ce qui était une nouveauté à ce moment-là (Pereira et al. 2007). Les années 1990 sont également marquées par le développement de la chimie à haut débit, avec la création de chimiothèques synthétiques de plus en plus larges et variées. La chimie haut débit aura ainsi facilité la synthèse de très nombreuses chimiothèques, qui peuvent être ciblées (c'est-à-dire privilégiant des structures présentes dans des pharmacophores afin d'augmenter les chances d'interaction avec une cible) ou non, comprenant chacune plusieurs millions de molécules : bien au-delà des quelques milliers de composés disponibles dans les chimiothèques historiques déjà existantes, dont la diversité de structures était, à l'époque, considérée comme plutôt faible (Dolle 2011).

On peut donc considérer que le criblage haut débit tel qu'il existe actuellement est issu de l'association de ces deux avancées : l'augmentation de la capacité et de la rapidité de test, et l'augmentation du nombre de molécules à tester.

Le criblage a depuis connu un essor grandissant jusqu'à aujourd'hui. L'accélération des avancées techniques a permis d'atteindre des capacités de criblage telles que ce qui était considéré comme « haut débit » il y a quelques années est à présent considéré comme « bas débit » : bien qu'il n'existe pas de consensus précis, on parle aujourd'hui de criblage haut débit à partir de 10 000 à 100 000 composés/jour (Wildey et al. 2017, Mukherjee et al. 2019). Cette accélération est aidée d'une part par la miniaturisation des tests (Sundberg et al. 2000, Wildey et al. 2017) : le développement des formats 384 puits puis 1536 puits a permis de drastiquement diminuer les volumes réactionnels nécessaires pour cribler toujours plus de molécules. D'autre part, la montée de l'automatisation avec des équipements robotiques toujours plus performants et adaptés à ces nouveaux formats a grandement réduit le temps de manipulation nécessaire, bien que les contraintes spatiales et financières liées à ces équipements les restreignent principalement à une utilisation industrielle.

En parallèle, bien que l'industrie reste à la pointe des avancées technologiques, l'apparition de nombreuses plateformes spécialisées et la facilitation de l'accès aux nouvelles techniques ainsi qu'aux bibliothèques chimiques conduisent à une démocratisation du criblage au sein des laboratoires de recherche académique. Mais ces criblages académiques ont un débit bas à moyen, loin de ce qui est pratiqué dans le milieu de l'industrie pharmaceutique, et utilisent le plus souvent des chimiothèques de taille réduite (de quelques centaines à quelques milliers de molécules).

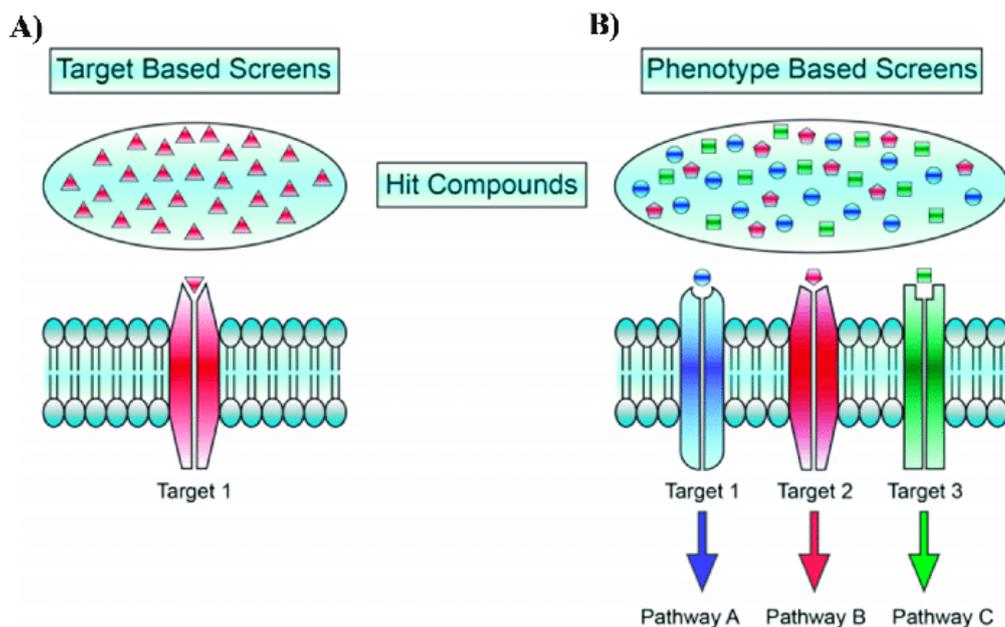
#### *b. Approches de criblage*

Chaque criblage ayant une combinaison d'objectifs et de contraintes qui lui sont propres, il existe une multitude d'approches différentes. On peut cependant réduire ces nombreuses approches à deux grandes catégories.

Dans le premier cas, l'objectif est d'identifier des molécules capables d'interagir avec une cible d'intérêt, par le biais de laquelle on espère modifier un phénotype ou un processus

biologique : l'approche est basée sur la cible (*target-based*). Cette cible, qui est forcément moléculaire, peut être une enzyme, un canal, ou encore un complexe protéique. Le critère étudié dans ce cadre, qu'il s'agisse d'une interaction ou de la modulation d'une activité, est généralement bien caractérisé. Son implication dans la pathologie d'intérêt est suffisamment connue pour assurer la pertinence des *hits* obtenus. Dans tous les cas, ce type d'approche n'est possible que si la cible est déjà connue et peut être isolée. Elle peut alors être utilisée sous forme purifiée ou être exprimée de manière hétérologue dans un modèle cellulaire (Rebbeck et al. 2017, Murayama et al. 2018, Rebbeck et al. 2020).

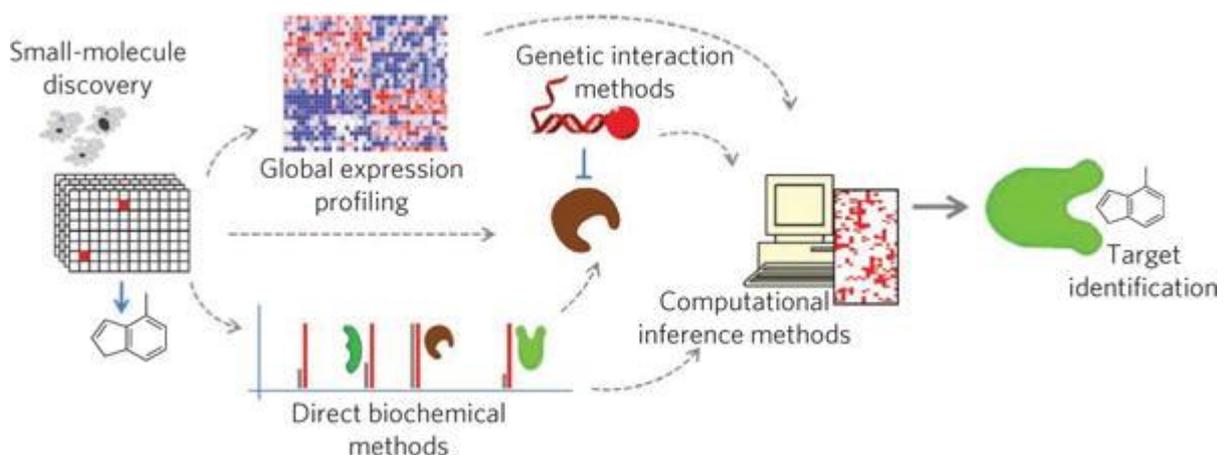
Dans le second cas, l'objectif est d'identifier des molécules capables de modifier directement ou non un phénotype ou un processus biologique d'intérêt. L'approche est basée sur le phénotype (*phenotype-based*), car on s'intéresse à l'effet au sens plus large sans *a priori* sur la cible directe, qui peut être inconnue (figure 25). Ce type de criblage est le plus souvent réalisé sur des modèles cellulaires, mais la littérature fait également état d'approches utilisant des modèles animaux simples tels que le nématode *C. elegans* (Kaletta et al. 2006, Kwok et al. 2006, Volpatti et al. 2020) ou le poisson zèbre *D. rerio* (Khersonsky et al. 2003, Volpatti et al. 2020).



**Figure 25 :** Un criblage peut être basé sur une cible moléculaire ou sur un phénotype. Dans le premier cas (A), l'objectif est d'identifier des molécules interagissant directement avec la cible. Dans le second cas (B), l'objectif est d'identifier des molécules capables de moduler un phénotype de manière directe ou indirecte, ce qui peut impliquer différentes cibles et cascades moléculaires. (extrait de Henry et al. 2019)

Les deux types d'approches confèrent certains avantages, mais apportent aussi chacun leurs inconvénients dont il est indispensable d'avoir conscience dès la conception du projet de criblage.

- Une approche *phenotype-based*, sans *a priori* sur la cible ou le mécanisme, offre la possibilité de sélectionner des molécules efficaces dont le mécanisme est indirect car il implique par exemple une cascade métabolique ou une protéine participant à la régulation de l'activité d'un canal (qu'il s'agisse ou non de RyR1 spécifiquement, dans le cas présent). De telles molécules ne pourraient pas être détectées avec une approche *target-based*.
- En conséquence du point précédent, plusieurs molécules dont l'effet s'opère par différents mécanismes peuvent être développées en parallèle. C'est une richesse en soi, car cela offre l'opportunité de les combiner en espérant obtenir un effet additif ou synergique.
- L'utilisation d'un modèle cellulaire permet de sélectionner des hits qui sont à l'épreuve du vivant, au moins au niveau cellulaire. Par exemple, dans le cas où la molécule interagit avec une cible intracellulaire, cela garantit qu'elle est bien soluble et capable de pénétrer les membranes. De façon proche, l'utilisation d'un modèle cellulaire permet également de filtrer les molécules présentant une toxicité cellulaire. Ce n'est pas le cas des approches *target-based* utilisant spécifiquement un modèle moléculaire, qui nécessitent alors une étape de validation cellulaire à l'issue du criblage.
- Les approches *phenotype-based* ont cependant un inconvénient majeur : les molécules sont identifiées par leur activité sur le mécanisme complexe mais la cible moléculaire est inconnue. Il est alors nécessaire de passer par des étapes dites de « déconvolution » afin d'identifier celle-ci ainsi que le mode d'action des hits (figure 26). Or, cette déconvolution peut être extrêmement longue et coûteuse sans pour autant être fructueuse.



**Figure 26 :** Exemple d'un workflow pour la déconvolution de la cible moléculaire d'une molécule identifiée par un criblage *phenotype-based* (Schenone et al. 2013)

Dans certain cas, à l'issue du développement d'un médicament, le mécanisme n'est identifié que tardivement voire jamais : c'est par exemple le cas de la metformine pour le diabète. En effet, le mécanisme d'action de cette dernière n'est à ce jour pas entièrement élucidé alors qu'elle est utilisée dans le traitement du diabète depuis les années 1950 (Pernicova et al. 2014). De nos jours, l'ignorance des mécanismes compliquerait considérablement l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché.

### *c. Objectifs techniques du criblage*

Secondairement aux objectifs scientifiques, trois critères doivent également être établis : la rapidité, la reproductibilité et le coût financier. Il est souhaitable de considérer des tests techniques en parallèle de la réflexion pour définir ces critères.

- La rapidité de criblage est le fruit de nombreux facteurs : le processus ou la cible étudié(e), la complexité du modèle d'étude et de l'analyse, et la nécessité du traitement humain. Elle dépend également du besoin de la réplication des mesures, et donc de la reproductibilité du signal.
- La reproductibilité du signal d'une itération à l'autre (en l'absence de modification par les molécules) conditionne la sensibilité et la spécificité du test. Elle conditionne donc le seuil de détection : une grande variabilité du signal nécessite un seuil de détection plus éloigné du bruit de fond afin de minimiser les faux positifs. Une meilleure sensibilité minimise le besoin de réplication. Il existe malgré tout des seuils de détection standard : pour un grand nombre de criblages, les conditions de test sont par exemple ajustées pour permettre la détection d'un écart de 20% par rapport aux contrôles non traités.
- Le coût financier dépend de l'envergure du projet et des moyens disponibles. Ce facteur est toujours contraint dans une certaine mesure car le budget alloué à un projet est forcément limité, même dans le cas d'un criblage industriel. Il est souvent possible d'améliorer les deux autres paramètres en augmentant le coût financier. L'automatisation d'une partie au moins du criblage permet d'améliorer la rapidité du criblage ainsi que la reproductibilité avec la possibilité d'avoir plus de répliqués.

Dans tous les cas, il est évident qu'il est impossible de fixer ces trois critères en même temps car ils sont interconnectés et chacun dépend des deux autres. Fixer un critère limite forcément les autres : par exemple, augmenter la reproductibilité implique une rapidité moindre à moins de compenser cette dernière par l'augmentation des moyens financiers.

d. Criblages réalisés sur le muscle

Depuis dix ans environ, de nombreux criblages se sont intéressés aux pathologies du muscle squelettique. Une liste non exhaustive de ces criblages est présentée dans le tableau en page suivante (tableau 1). Ils ont également été classés selon le type d'approche (*target* ou *phenotype-based*) et de modèle (biomoléculaire, *in vitro* sur modèle cellulaire ou *in vivo* sur modèle animal).

Références	Intérêt pour les RYR1-RM ?	Pathologies ciblées	Type d'approche	Modèles			Type de test
				Animaux	Cellules	Biomol.	
Rebbeck et al, 2017 ; Rebbeck et al, 2020	Oui	RYR1-RM	Target-based			Biosenseurs FRET (calmoduline - FKBP12.6) dans vésicules de RS	FRET
Murayama et al, 2018	Oui	RYR1-RM, HM	Target-based		Expression hétérologue (RYR1 + R-CEPIA1ER) dans cellules HEK293		Imagerie calcique
Volpatti et al, 2020	Oui	RYR1-RM	Phenotype-based	C. elegans (unc-68)			Mesure de l'arrêt de croissance induit par la nemadipine
Zhang et al, 2022	Oui	Cardiomyopathies liées à RYR2, RYR1-RM	Phenotype-based	Zebrafish (RYR1 KO)			Mesure de motilité
Schaaf et al, 2017	Non	Pathologies liées à SERCA	Target-based		Expression de biosenseurs FRET (SERCA - phospholamban) dans cellules HEK293	Biosenseurs FRET (résidu NTR de RYR2)	FRET
Guhathakurta et al, 2018	Non	Myopathies, cardiomyopathies	Target-based			Biosenseurs FRET (actine - myosine)	FRET
Biesemann et al, 2018	Non	Sarcopénie	Phenotype-based		Myotubes humains immortalisés		Mesure de la quantité d'ATP (Cell Titer Glo)
Shu et al, 2019 ; Shu et al, 2020	Non	DMD	Phenotype-based		Lignée rapportrice : expression de EGFP sur promoteur hSSPN dans cellules C2C12		Mesure de la fluorescence GFP
Liu et al, 2020	Non	LGMD2A	Phenotype-based		Lignée rapportrice : expression de luciférase sur promoteur Myf2 dans cellules C2C12		Mesure de luminescence
Kinder et al, 2020	Non	Myosites	Phenotype-based		Lignée rapportrice : expression de protéine de fusion HLA-B*08:01-Hibit dans myotubes humains		Mesure de luminescence Hibit
Collibee et al, 2021	Non	Scière latérale Amyotrophique	Target-based			Préparation de myofibrilles issues de myotubes de lapin	Mesure de l'activité enzymatique des myofibrilles

**Tableau 1** : Présentation non exhaustive des criblages en rapport avec les pathologies musculaires réalisés entre 2017 et 2022

Il y a une grande diversité dans les approches et les modèles. On retrouve ainsi des approches *target* ou *phenotype-based* en proportions équivalentes, qui utilisent les trois types de modèles. Il faut toutefois noter que les approches *target-based* sont particulièrement basées sur des méthodes de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) dans cet échantillonnage. La diversité des méthodes pourrait apparaître comme le reflet de celle des pathologies musculaires elles-mêmes, qui peuvent reposer sur des mécanismes très différents et avoir comme seul point commun l'implication du muscle squelettique.

Toutefois, on retrouve aussi des approches diverses dans des criblages qui s'intéressent à une même pathologie voire partagent un objectif.

Nous pouvons en particulier nous intéresser aux criblages qui ciblent les *RYR1*-RM. Sur ces quatre criblages, trois sont *target-based* et cherchent à identifier des inhibiteurs de RyR1 (et RyR2, dans un cas) afin de traiter la fuite de calcium par ce canal (Rebbeck et al. 2017, Murayama et al. 2018, Zhang et al. 2022). Deux d'entre eux, réalisés par le même groupe, utilisent le FRET avec des biosenseurs purifiés en solution (Zhang et al. 2022) ou inclus dans des vésicules de réticulum sarcoplasmique (Rebbeck et al. 2017) alors que la troisième se base sur un modèle cellulaire d'expression hétérologue de RyR1.

Les criblages FRET ont permis d'identifier plusieurs modulateurs (inhibiteurs et activateurs) de l'activité de RyR1 ; ils modulent également l'activité de RyR2, ce qui est attribuable à une forte conservation de certaines parties du canal entre les deux isoformes. Le FRET ne permet en réalité pas de mesurer directement l'activité de RyR1 : ce qui est mesuré ici est la distance entre deux structures, qui rend compte de modifications de conformation ou d'interaction entre des protéines et est supposée refléter la fonction de RyR1. C'est lors d'étapes de validation ultérieures au criblage que les auteurs confirment l'effet des composés en mesurant la liaison de la ryanodine tritiée à RyR1. La ryanodine se fixe sur RyR1 lorsque le canal est en configuration ouverte : ce test est donc traditionnellement utilisé pour mesurer plus directement son activité.

Deux des inhibiteurs de RyR1 identifiés par les criblages FRET ont d'ailleurs été également identifiés par une autre équipe dans les travaux de Murayama et collègues. Dans le cas d'une troisième molécule, les résultats obtenus par les deux groupes divergent : l'effet rapporté est inhibiteur pour Rebbeck et collègues et activateur pour Murayama et collègues. Les raisons de cette opposition n'ont pas été identifiées mais pourraient être associées aux méthodes et modèles différents.

Le criblage de Murayama et collègues a également permis d'identifier trois nouveaux inhibiteurs de RyR1 (ainsi que le dantrolène, qui était déjà connu comme tel). Pour l'un de ces hits, l'acide oxolinique, un dérivé a été synthétisé et validé *in vivo* dans des modèles murins d'hyperthermie maligne, dont la survie est significativement améliorée par le traitement (Yamazawa et al. 2021). Ces travaux étant centrés sur l'hyperthermie maligne, les molécules n'ont pas été testées sur des modèles de myopathies, mais on peut supposer que leur effet inhibiteur pourrait être transposable aux myopathies impliquant un canal RyR1 fuyant ou hyperactif.

Le quatrième criblage (Volpatti et al. 2020) est *phenotype-based* et utilise deux modèles animaux de KO *RYR1* en parallèle : le ver *C. elegans unc-68* et le poisson zèbre double mutant *ryr1a/ryr1b*. La méthode de criblage est différente selon l'espèce. Sur *C. elegans*, cette méthode est indirecte. Brièvement, un arrêt de croissance est observé chez les vers KO après traitement avec un inhibiteur de DHPR, la nemadipine-A (Kwok et al. 2006). Le criblage repose sur l'hypothèse que l'effet d'un composé restaurant la croissance des vers passerait par l'amélioration du phénotype musculaire. Sur le poisson zèbre, il s'agit d'une mesure de motilité des animaux KO, qui sont immobiles en absence de traitement. Ce criblage a permis d'identifier 74 hits sur *C. elegans*, comprenant un grand nombre d'inhibiteurs de kinase p38 ; cependant, aucune des molécules testées n'améliore le phénotype fonctionnel chez le poisson zèbre. Lors d'étapes ultérieures, les auteurs rapportent toutefois une amélioration du relâchement calcique après inhibition de p38 dans un troisième modèle, des cellules C2C12 KO *RYR1*. Cette amélioration serait indépendante de RyR1 et impliquerait plutôt les récepteurs IP3 ou les SOCE. Malgré des résultats mitigés dans l'étude publiée, ils suggèrent que cette voie pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante pour les *RYR1*-RM qui devrait être étudiée dans d'autres modèles plus proches de la pathologie humaine.

On peut donc dégager les tendances suivantes de la littérature concernant les criblages qui ciblent les *RYR1*-RM :

- Les approches *target-based* sont les plus utilisées. Un seul criblage fait usage d'une approche *phenotype-based* : celui de Volpatti et al. Ce criblage utilise cependant des modèles animaux de KO *RYR1* : or, le KO total est léthal chez la souris (Takashima et al. 1994) et n'a jamais été rapporté chez l'homme, ce qui rend ces modèles peu représentatifs de la situation des patients.
- La majorité des criblages ne mesurent pas directement l'activité de RyR1 mais utilisent des méthodes indirectes qui peuvent être compliquées à interpréter et ne correspondent pas toujours à une réalité biologique. Notamment, aucun des criblages publiés ne repose directement sur le principal mécanisme affecté dans le contexte des *RYR1*-RM, à savoir le relâchement de calcium du SR vers le cytosol.
- Enfin, les 4 criblages portant sur RyR1 ont criblé des chimiothèques de molécules connues, déjà caractérisées, et souvent approuvées par les autorités sanitaires pour d'autres utilisations. Ce sont donc des stratégies de repositionnement. Aucun de ces criblages n'utilise une chimiothèque originale, qui permettrait d'identifier de nouvelles molécules.

## Objectifs de la thèse

Ma thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'équipe Myologie Cellulaire et Pathologies (CMyPath) dirigée par le Dr Isabelle Marty et l'entreprise de biotechnologie Ecrins Therapeutics, dirigée par le Dr Andrei Popov.

Notre laboratoire est un centre de référence pour les *RYR1*-RM en France. Elle associe une forte expertise génétique à une expertise sur l'aspect fonctionnel de la myologie, ce qui a permis de définir le rôle physiologique de certaines mutations *RYR1*, notamment grâce à des modèles cellulaires uniques issus de biopsies de patients. A cette expertise est associée une expérience ancienne en termes de thérapies pour ces pathologies.

Plusieurs années avant mon arrivée dans l'équipe, des travaux ont été entrepris par le Dr Laurent Pelletier sur le transfert vers la clinique des travaux prometteurs réalisés dans l'équipe par le Dr John Rendu (Rendu et al. 2013). Il s'agissait d'utiliser des AON pour corriger l'épissage anormal de l'ARNm RyR1 induit par une mutation spécifique. Comme la quasi-totalité des mutations du gène RyR1, la mutation en question n'est trouvée que chez une famille. Le passage en phase clinique dans une telle situation, avec un seul patient, s'avère complexe car il n'existe aucun modèle économique pour un médicament à cette échelle. En 1999, l'Union Européenne a lancé un programme qui a pour vocation d'aider au développement d'agents thérapeutiques dans le cadre des maladies rares. L'équipe a donc entamé la déclaration des ARN antisens comme « médicament orphelin » auprès du Comité des Médicaments Orphelins (COMP) de l'Agence Européenne des Médicament (EMA). Malheureusement, il n'a pas été possible de poursuivre cette démarche en raison du caractère extrême de la rareté.

Cet événement a impacté tous les projets de l'équipe présentant un objectif thérapeutique en considérant qu'ils devaient dès lors concerner non plus une mutation, mais l'ensemble le plus important possible de mutations.

L'objectif général de ma thèse a été d'identifier des molécules chimiques capables d'augmenter les relâchements calciques dans les cellules musculaires. Mon second objectif, qui découle du contexte particulier de ma thèse, était d'obtenir des résultats valorisables d'un point de vue industriel, qui permettraient à plus long terme d'aboutir à un développement pharmaceutique. J'ai en réalité cherché à atteindre ces objectifs par deux démarches en parallèle.

La première s'inspire des travaux du Dr Urs Rugg sur le traitement de pathologies musculaires avec le tamoxifène (Dorchies et al. 2013). L'efficacité du tamoxifène est en cours d'étude sur deux pathologies présentant des anomalies de relâchement calcique, la DMD et la XLMTM. Le mécanisme de l'effet du tamoxifène n'étant pas élucidé, nous avons fait l'hypothèse que le tamoxifène agirait sur le relâchement calcique et serait également applicable aux *RYR1*-RM. Un projet cherchant à répondre à cette question est en cours au sein du laboratoire.

Cependant, l'action du tamoxifène est complexe : celui-ci agit comme agoniste ou antagoniste des récepteurs aux estrogènes de façon tissu-dépendante (Berry et al. 1990). Afin de mieux

comprendre le mécanisme responsable des effets du tamoxifène et sur la base de travaux que j'ai réalisés en 2<sup>ème</sup> année de Master, nous avons choisi d'étudier les effets d'une seconde molécule dont l'effet est purement antagoniste : le fulvestrant. J'ai donc étudié les effets du fulvestrant sur le relâchement calcique dans des modèles cellulaires de *RYR1-RM in vitro*, et sur la force musculaire du modèle murin de *RYR1-RM* de notre équipe *in vivo*.

La seconde démarche consiste à identifier et caractériser d'autres agents chimiques susceptibles d'améliorer le relâchement calcique, cette fois-ci sans *a priori*. Ecrins Therapeutics a l'expertise du développement de molécules *in vitro* et *in vivo* dans le contexte pré-clinique et clinique, principalement dans le domaine de la cancérologie. L'entreprise se présentait donc comme le partenaire idéal pour ce projet de recherche à la frontière entre recherche fondamentale de pointe et valorisation économique dans le cadre des maladies rares. C'est ce travail collaboratif entre deux univers qui a permis de développer le projet sous sa forme actuelle, grâce à l'obtention d'une bourse de thèse CIFRE.

C'est ainsi que nous avons initié un projet de criblage de molécules chimiques susceptibles d'augmenter les relâchements calciques, qui représente le cœur de mes travaux de thèse. Le défaut de relâchement calcique est en effet retrouvé chez beaucoup de patients. C'est une anomalie retrouvée en conséquence de nombreuses mutations du gène *RYR1*, ainsi que dans d'autres pathologies musculaires.

J'ai donc cherché à sélectionner de telles molécules parmi une chimiothèque d'environ 10 000 composés par le biais d'un criblage sur des modèles cellulaires de *RYR1-RM in vitro*. J'ai également travaillé à la caractérisation de ces molécules et des mécanismes de leur effet et affiné la sélection initiale afin de me concentrer sur les molécules les plus pertinentes à développer. Enfin, une caractérisation du métabolisme de ces molécules a été entamée afin de nous préparer à une étude préclinique chez la souris.

Des travaux de valorisation de ces molécules sont en cours. Elles feront l'objet d'un dépôt de brevet, actuellement en cours de rédaction, dans les mois suivant ma soutenance.



# Matériel et méthodes



## I. Culture cellulaire

### 1. Choix des modèles cellulaires

#### a. *Cellules humaines immortalisées*

Au cours de mes travaux de thèse, trois lignées de cellules musculaires humaines immortalisées ont été utilisées. L'une est issue d'un sujet sain et les deux autres sont issues de patients myopathes. Ces myoblastes ont été immortalisés par l'équipe de V. Mouly (Institut de Myologie, Paris).

#### i. Lignée contrôle (CTRL)

La première lignée qui a été utilisée est une lignée de myoblastes humains immortalisés produite à partir d'un donneur sain. C'est donc une lignée contrôle, qui a été utilisée comme point de référence auquel comparer les lignées issues de patients myopathes.

#### ii. Lignée KO DHPR

La lignée « KO DHPR » est dérivée de la lignée CTRL. Ces cellules ont été modifiées par CRISPR-Cas9 afin d'abolir l'expression de *CACNA1S*. Elles présentent une délétion du gène *CACNA1S* au niveau de l'exon 40 et de l'intron 40, soit une suppression de 325 paires de bases.

La modification et le clonage des cellules ont été réalisés par Mathilde Beaufiles au laboratoire.

#### iii. Lignées issues de patients myopathes

Trois lignées de myoblastes immortalisés issus de patients myopathes (qui seront appelées « MELA », « PLA » et « VANY » dans la suite de ce document) ont été utilisées. Elles présentent un défaut d'expression de RyR1 plus ou moins prononcé, ainsi qu'un défaut de relâchement calcique. Chacune des lignées possède une ou plusieurs mutations qui lui sont propres (ces dernières sont détaillées dans la partie Résultats I. 1. a. Caractérisation génétique des patients).

Nous disposons donc d'un éventail de mutations variées.

#### b. *Cellules murines primaires*

Les cellules murines primaires sont issues de notre modèle murin de myopathie (décrit dans Pelletier et al. 2020, également décrit plus en détail dans le paragraphe Matériels et méthodes

IV. 2. Animaux). Dans ces cellules, comme chez la souris correspondante, les exons 9 à 11 du gène *RYR1* sont flanqués de sites LoxP sur les deux allèles (*RYR1* fl/fl) : cela permet l'exclusion par recombinaison de ces exons en présence de Cre recombinase, ce qui conduit à la production d'un ARNm instable et donc à une baisse d'expression de RyR1.

Ces cellules ont été isolées à partir de souris nouveau-nées. Les muscles des membres inférieurs ont été disséqués et les fragments tissulaires ont été incubés pendant 30 minutes à 37°C dans de la trypsine 0,25% (Life Technologies) diluée au 1/3 dans du PBS 1X stérile. Une dissociation mécanique des cellules a été pratiquée par aspiration et refoulement avec une pipette de 5ml, la suspension a été centrifugée pendant 5 minutes à 100 rcf (soit 500 rpm dans nos conditions). Le surnageant a été récupéré et centrifugé de nouveau pendant 10 minutes à 300 rcf (soit 1 500 rpm dans nos conditions) afin de culotter les cellules. Le culot a été repris dans du milieu de prolifération (Ham's F10 (Life Technologies), FBS 20% (Life Technologies), P/S 2% (Life Technologies), Ultrosor G 2% (PALL)) et les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de 35mm de diamètre préalablement coatées avec 500µl de laminine (Corning) à une concentration de 10µg/ml, à raison d'une boîte par souris.

Après 24h, les cellules ont été trypsinées, centrifugées pendant 5 minutes à 300 rcf et resuspendues dans du milieu de congélation (Ham's F10 (Life Technologies), FBS 25% (Life Technologies), DMSO 10% (Sigma-Aldrich)) pour être congelées à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/ampoule.

## 2. Culture de cellules

### a. *Cellules humaines immortalisées*

Nous avons constitué un stock d'ampoules de cellules congelées et conservées dans l'azote liquide au début du projet pour les trois lignées humaines. Le contenu d'une ampoule de 10<sup>6</sup> cellules a été décongelé et repris dans du Ham's F-10 (Life Technologies) préalablement chauffé à 37°C. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 1500 rpm, et le culot a été re-suspendu dans du milieu de prolifération (Ham's F10 (Life Technologies), FBS 20% (Life Technologies), P/S 2% (Life Technologies), Ultrosor G 2% (PALL)). Les cellules ont étéensemencées en boîte de culture Ø100mm dans du milieu de prolifération et amplifiées. Des passages ont été réalisés à 60-80% de confluence. Afin de minimiser les risques de dérive pouvant être provoquée par la sélection d'une sous-population à force de passages répétés, les cellules n'ont pas été conservées au-delà du passage 20, après lequel une nouvelle ampoule a été décongelée.

Pour les besoins des expériences, ces cellules ont été cultivées sur deux formats de plaques différents : 96 puits et 24 puits. Dans ces cas, les cellules étaient utilisées ou jetées à l'issue de cette étape.

Dans le premier cas, elles ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (Falcon) à 50 000 cellules/puits dans 100µl de milieu de prolifération. Après 24h, le milieu a été remplacé par 100µl de milieu de différenciation (DMEM 1g/l glucose (Life Technologies), P/S 1% (Life

Technologies), sérum de cheval 2% (Life Technologies)). Après 4 jours, le milieu de différenciation a été renouvelé et le traitement y a été ajouté si nécessaire (voir section Matériels et méthodes I. 4. Application de la chimiothèque) pour une durée totale de différenciation de 6 jours.

Dans le second cas, elles ont étéensemencées dans des plaques 24 puits (Falcon). Afin de concentrer les cellules au centre des puits, chaque puits a été préalablement coâté avec une goutte de 15µl de laminine (Corning) à 10µg/ml dans du PBS +Ca/+Mg (Life Technologies) déposée au centre de chaque puits (37°C pendant 30 minutes). Les gouttes ont ensuite été retirées et la plaque a été séchée. Les cellules ont étéensemencées à 20 000 cellules/puits dans des gouttes de 20µl de milieu de prolifération déposées sur les spots de laminine. Après 3 heures d'adhérence, 500µl de milieu de prolifération a été ajouté à chaque puits. Après 24h, le milieu a été remplacé par 500µl de milieu de différenciation. Après 4 jours, le milieu de différenciation a été renouvelé et le traitement y a été ajouté si nécessaire (voir section Matériels et méthodes I. 4. Application de la chimiothèque) pour une durée totale de différenciation de 6 jours.

#### *b. Cellules murines primaires*

Contrairement aux cellules humaines immortalisées, les cellules murines primaires ont besoin d'un support matriciel. Chaque puits d'une plaque 96 puits a donc été préalablement coâté avec de la laminine : 50µl à 10µg/ml dans du PBS +Ca/+Mg. Après 30 minutes à 37°C, la laminine a été retirée et la plaque a été séchée.

Plusieurs lots de cellules ont été produits, chacun à partir de plusieurs animaux. Un lot différent a été utilisé pour chaque répétition de l'expérience. Comme dans le cas des cellules humaines, le contenu d'une ampoule de 10<sup>6</sup> cellules a été décongelé et repris dans du Ham's F-10 préalablement chauffé à 37°C. Les cellules ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 300 rcf, re-suspendues dans du milieu de prolifération et ont étéensemencées sur la plaque 96 puits à une densité de 50 000 cellules/puits dans 100µl de milieu de prolifération.

Afin d'induire la recombinaison du gène *RYRI* floxé, les cellules ont été transduites 12h après l'ensemencement avec des adénovirus permettant l'expression de la Cre recombinase (ADV-Cre ; Utah University, USA) à une *multiplicity of infection* (MOI) de 6, ce qui correspond à 6 virus pour une cellule.

Après 24h, le milieu est retiré et remplacé par du milieu de différenciation avec ou sans traitement (voir section Matériels et méthodes I. 4. Application de la chimiothèque) pour une durée totale de différenciation de 2 à 3 jours. La variabilité sur la durée est due au fait que la différenciation ne s'opère pas dans un temps parfaitement identique d'un lot de cellules à l'autre.

### 3. Traitement des cellules avec le fulvestrant

Le fulvestrant en poudre (Tocris) a été dissous dans du DMSO afin d'obtenir une solution stock à 10mg/ml, conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

Cette solution stock a été diluée dans du milieu de différenciation pour atteindre une concentration finale de 100nM ou 250nM. Les cellules murines et humaines ont été traitées dès la mise en différenciation, soit 24h après l'ensemencement.

Dans le cas des cellules humaines, un changement de milieu a été effectué au 3<sup>ème</sup> jour de différenciation.

### 4. Application de la chimiothèque

Il existe déjà de nombreuses chimiothèques de molécules cliniquement approuvées qui sont couramment utilisées pour des criblages qui s'inscrivent dans des stratégies de repositionnement. Nous avons au contraire fait le choix d'utiliser une chimiothèque originale, car nous souhaitons identifier une molécule originale et donc brevetable à l'issue du projet.

La chimiothèque dont nous disposons comporte 9 252 petites molécules chimiques. Ces composés ont été préalablement sélectionnés par Benoit Bestgen (Ecrins Therapeutics) à partir d'un catalogue de 1,6M molécules (ChemDiv) sur la base de leurs propriétés « *drug-like* » à partir de différents critères :

- Poids moléculaire : entre 200 et 400 g/mol afin de favoriser des molécules dont l'action est directe (sans métabolisation nécessaire), tout en conservant une assez bonne spécificité d'interaction avec une cible potentielle
- Lipophilie : LogP < 5 afin de favoriser des molécules biodisponibles, qui ne restent pas bloquées dans les membranes
- Structure : pas plus de 2 cycles aromatiques, car davantage risquerait de rendre les composés moins solubles

Une sélection a également été réalisée sur la toxicité : les groupements chimiques connus comme étant toxiques ont été écartés, et la toxicité des molécules de la chimiothèque a été évaluée sur des fibroblastes humains à une concentration de 20µM en amont de ces travaux.

Les molécules sont conservées dans du DMSO à une concentration de 10mM à -80°C. Selon la partie de l'étude, 1 ou 2 molécules ont été utilisées par puits.

Pour les différents criblages, les molécules ont été utilisées à une concentration unique de 10µM, cette concentration étant classique pour un criblage.

Le criblage ayant été réalisé sur des plaques 96 puits, les puits de la colonne 1 sont utilisés comme témoins (figure 27). Ils contiennent 0,1% (pour 1 molécule) à 0,2% (pour 2 molécules)

de DMSO, cette proportion étant identique à celle des puits traités. Dans le cas du criblage primaire, chaque plaque a été réalisée en duplicat.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	1 + 2										
B	DMSO	3 + 4										
C	DMSO	5 + 6										
D	DMSO	...										
E	DMSO											
F	DMSO											
G	DMSO											
H	DMSO											

**Figure 27** : Plan de traitement des plaques de criblage. Les puits de la colonne 1 (en bleu) ont été utilisés comme contrôles non traité et ont reçu 0,1% ou 0,2% de DMSO. Les puits des colonnes 2 à 12 ont été traités avec les molécules de la chimiothèque.

## 5. Imagerie calcique

### a. Principe général

Pour les mesures de relâchement calcique, nous avons choisi d'utiliser la sonde calcique Fluo-4 (Gee et al, 2000). Cette sonde fluorescente, dérivée du Fluo-3, a un pic d'absorption à 494nm et un pic d'émission à 516nm en présence de calcium. Dans nos conditions expérimentales, elle est très majoritairement présente dans le cytosol et nous permet donc d'observer les variations de la concentration calcique dans ce compartiment.

Les cellules ont été chargées pendant 30 minutes avec du Fluo-4 Direct (Thermofisher) dilué au 1/2 dans du milieu de différenciation, avec un volume total de 30µl/puits de plaque 96 puits ou 200µl/puits de plaque 24 puits.

Les cellules ont été stimulées pour provoquer un relâchement de calcium du réticulum vers le cytosol avec deux agents : le KCl qui provoque une dépolarisation de la membrane plasmique et déclenche un relâchement de calcium *via* le couplage DHPR/RyR1, et le 4-chloro-m-crésol (4CMC) qui active directement RyR1. Les mesures ont été réalisées sur deux appareils, un microscope et un fluorimètre.

## b. Imagerie calcique sur vidéomicroscope

Les films d'imagerie calcique ont été réalisés avec un vidéomicroscope Leica DMI6000 (Leica Microsystems) équipé d'une caméra EMCCD (Quantem, Photometrics), d'un filtre GFP et d'un objectif 10x/0,5. Le microscope est piloté par le logiciel MetaMorph 7.8.5 (Molecular Devices).

### i. Mesure du relâchement calcique

Le principal paramètre étudié au cours de notre projet est le relâchement de calcium du réticulum sarcoplasmique. En pratique, nous cherchons à quantifier la vitesse et le volume du relâchement calcique, qui correspondent respectivement à la hauteur du pic et à l'aire sous la courbe.

Un champ de chaque puits de plaque 96 puits a été filmé en continu pendant 40 secondes à une cadence d'1 image/seconde (figure 28). A  $t = 10$  secondes, les cellules ont été stimulées avec une injection de 110 $\mu$ l de KCl 140mM (110mM final) ou de 4CMC 625 $\mu$ M (500 $\mu$ M final). L'analyse de ces images est décrite plus loin.



**Figure 28 :** Déroulement d'un film d'imagerie calcique dans le but d'évaluer les relâchements de calcium.

### ii. Mesure des stocks calciques et de l'activité SOCE

Un second protocole a permis d'évaluer les stocks calciques, c'est-à-dire la quantité totale de calcium libérable par le réticulum sarcoplasmique suite à une stimulation, et l'activité SOCE, c'est-à-dire l'entrée de calcium du milieu extérieur par un système dédié. Un champ de chaque puits a été filmé en continu pendant 1 150 secondes (soit environ 19 minutes) à une cadence d'1 image/5 secondes. Le déroulement de ce protocole est décrit dans le tableau ci-dessous (tableau 2, figure 29). Le milieu est retiré du puits entre chaque étape.

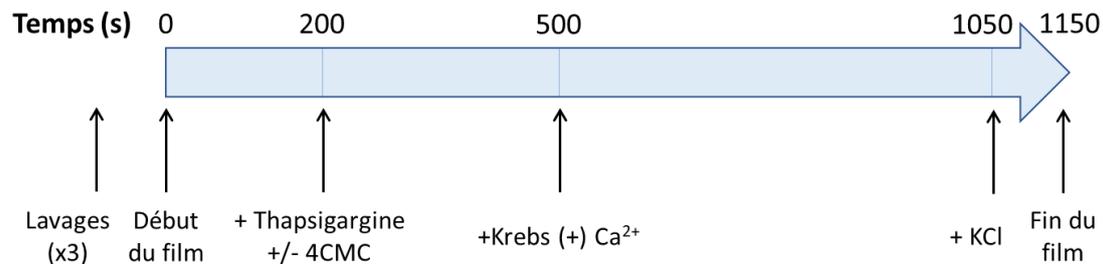
La composition des solutions utilisées est la suivante :

- **Krebs (+) Calcium** : NaCl 136mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, HEPES 10mM
- **Krebs (-) Calcium** : NaCl 136mM, KCl 5mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, HEPES 10mM, EGTA 1mM

La thapsigargine (Invitrogen) a été dissoute dans du DMSO à une concentration de 1mM puis diluée dans la solution de Krebs (-) calcium à une concentration finale de 10µM.

Temps (s)	Action
- 100	Lavages Krebs (-) Calcium (x3)
0	Début du film
200	+ 300µl Thapsigargine (10µM) OU +300µl Thapsigargine (10µM) + 4CMC (500µM)
500	+ 300µl Krebs (+) Calcium
1 050	+300µl KCl 140mM
1 150	Fin du film

**Tableau 2** : Déroulement d'un film d'imagerie calcique dans le but d'évaluer les stocks calciques et l'activité SOCE.



**Figure 29** : Illustration du déroulement d'un film d'imagerie calcique dans le but d'évaluer les stocks calciques et l'activité SOCE.

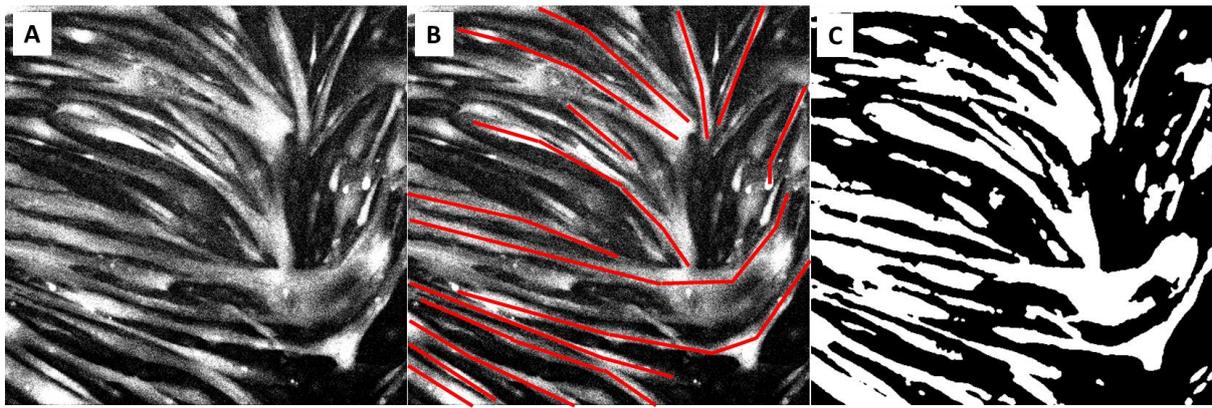
### c. Analyse des images de microscopie

L'analyse des images de microscope a été réalisée sur le logiciel Fiji (Schindelin et al, 2012).

Afin de mesurer l'évolution de la fluorescence des myotubes, il a été nécessaire d'identifier les myotubes en définissant des régions d'intérêt, ou ROI, sous la forme d'un trait dans le sens de la longueur. Un maximum de 15 ROI ont été sélectionnées pour chaque puits.

Dans les cas où un grand nombre de films devait être analysé, le traitement manuel n'était pas envisageable. Une macro Fiji a été programmée par Jacques BROCARD afin de réaliser un traitement automatique. Cette macro permet de sélectionner automatiquement les zones de l'image dont l'intensité de fluorescence varie au cours du temps, c'est-à-dire celles correspondant aux myotubes. Contrairement au traitement manuel, elle définit une unique ROI par puits qui correspond à toute la surface occupée par des myotubes (figure 30) : cela occasionne une réduction du nombre d'échantillons et par conséquent une faiblesse statistique, mais offre une rapidité d'analyse bien supérieure.

Préalablement à l'utilisation de la macro, nous avons également vérifié que les valeurs obtenues sont comparables avec les deux techniques d'analyse.



**Figure 30** : Illustration des deux techniques d'analyse des films de microscopie. L'image représentée en exemple correspond à  $t = 11s$ , immédiatement après une stimulation avec du KCl 110mM. A) image non éditée. B) ROI délimitées manuellement ; chaque trait rouge représente une ROI correspondant à un myotube. C) ROI délimitée automatiquement par la macro Fiji ; l'ensemble de la surface blanche représente une ROI unique correspondant à l'ensemble des myotubes du puits.

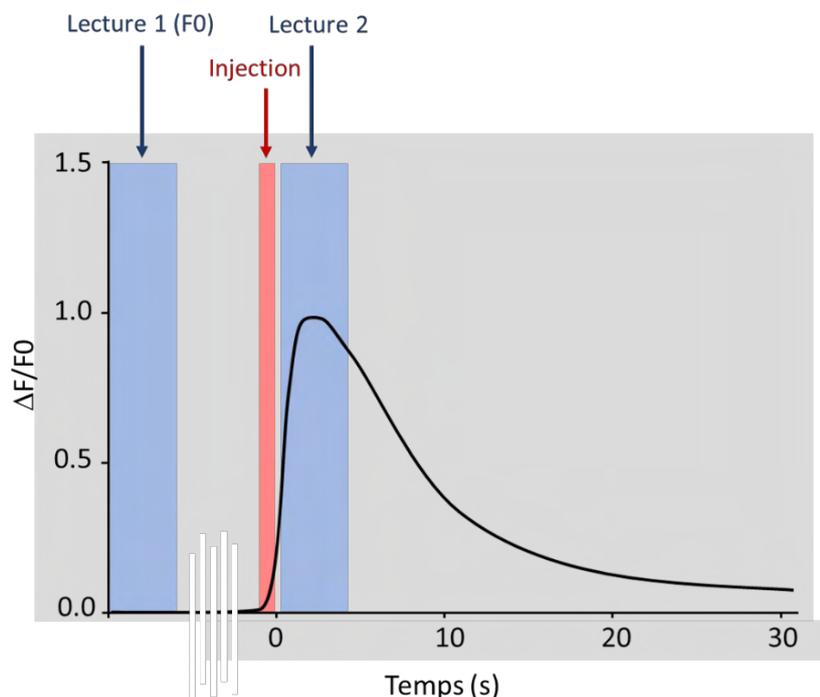
#### *d. Imagerie calcique sur fluorimètre*

Même de façon optimisée, l'imagerie sur microscope ne permet pas un débit suffisant par rapport à ce que nécessite le criblage. Nous avons donc dû adapter la méthode de criblage à nos besoins en réalisant les mesures de fluorescence avec un fluorimètre PheraSTAR FS (BMG Labtech) équipé avec un filtre 485/520.

De la même façon que pour le microscope, nous avons besoin d'une analyse par ROI car la culture est hétérogène : celle-ci sera détaillée par la suite.

Deux lectures successives ont été réalisées. La première mesure sans stimulation correspond à la fluorescence de base ( $F_0$ ). Cette mesure dure 4 secondes pour chaque puits (figure 31).

Dans un second temps, le fluorimètre commence par injecter 110 $\mu$ l de KCl 140mM (110mM final) puis mesure la fluorescence 1 seconde après le début de l'injection, pendant 4 secondes également.



**Figure 31** : Illustration de la correspondance entre les deux lectures effectuées avec le fluorimètre et un exemple de mesure de relâchement calcique obtenue avec une lecture continue.

Le signal obtenu est une moyenne de la fluorescence émise entre 1 et 5 secondes après la stimulation : ce timing correspond à un temps encadrant le pic de relâchement calcique engendré par la stimulation KCl.

#### e. Analyse des données du fluorimètre

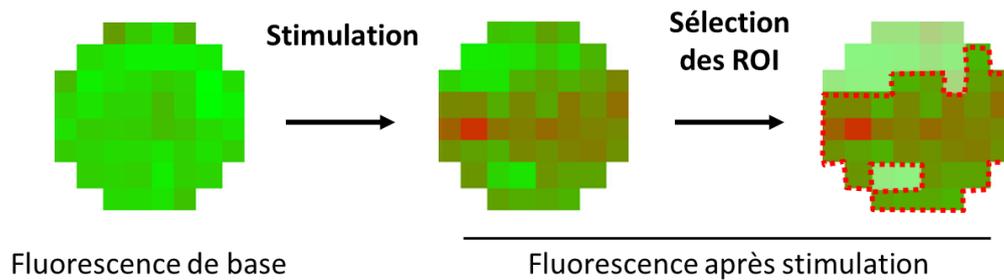
La répartition des cellules différenciées est variable au sein d'un puits. Ceci génère d'une part une hétérogénéité intra-puits, puisque toutes les zones d'un même puits ne sont pas équivalentes ; d'autre part, une hétérogénéité inter-puits en découle puisque la surface couverte par les cellules différenciées est plus ou moins importante d'un puits à l'autre. Afin de minimiser cette hétérogénéité inter-puits, qui introduirait un biais dans l'interprétation des résultats, il est nécessaire de rapporter le signal à la surface couverte uniquement.

Il est donc essentiel de définir des ROI qui ne contiennent que les zones couvertes. Pour cela, nous avons utilisé un mode de lecture du signal qui subdivise chaque puits en 52 pixels.

Le traitement est réalisé à l'aide d'une macro Microsoft Excel qui a été réalisée pour le projet et comprend trois grandes étapes.

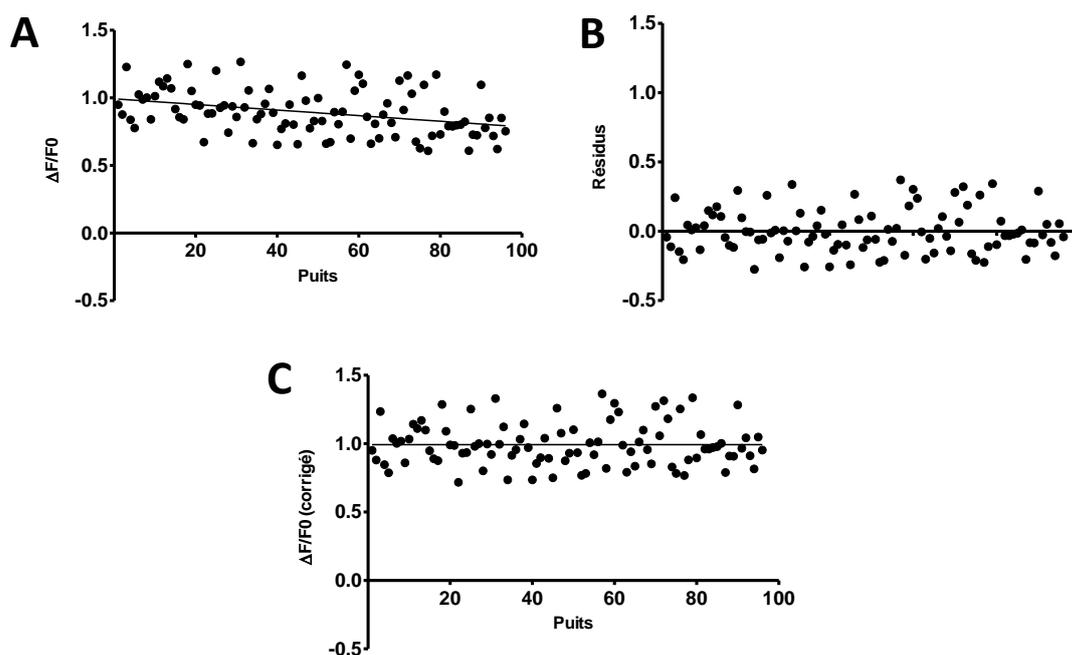
A chaque puits correspond deux sets de 52 valeurs correspondant à la fluorescence avant et après stimulation (figure 32). Chaque condition expérimentale est présente en duplicat. Les deux premières étapes d'analyse sont réalisées sur les valeurs obtenues après stimulation :

d'abord, les pixels dont la valeur est inférieure à un seuil fixe (déterminé empiriquement à partir des premières expériences de criblage) sont éliminés afin de retirer les zones « vides ». Un second tri est réalisé afin d'éliminer les pixels dont la valeur est aberrante, c'est-à-dire dont la valeur est supérieure à la moyenne + 3 écart-types de chaque puits. Enfin, le même masque est appliqué sur les données avant stimulation. Pour chaque puits, les valeurs des pixels restants sont ensuite moyennées et le ratio  $\Delta F/F_0$  est calculé. En conclusion, une valeur  $\Delta F/F_0$  est conservée pour chaque puits.



**Figure 32 :** Illustration de la définition des ROI par la macro sur un puits de plaque 96 puits. L'intensité du signal est représentée selon un dégradé de couleur : les zones de signal faible sont représentées en vert et les zones de signal fort en rouge.

Un second traitement des données est alors nécessaire : en effet, il existe un biais de lecture qui fait apparaître une variation du signal en fonction de la position du puits sur la plaque. En pratique, la valeur de fluorescence décroît de façon linéaire du premier au dernier puits lu. Il ne s'agit pas d'un effet de position sur la plaque car il subsiste quel que soit le sens de lecture : en conclusion, c'est un effet inhérent au lecteur. Afin de compenser ce biais, nous avons procédé à un « redressement » des données : cette étape a été réalisée sur chaque plaque de façon indépendante et consiste à réaliser une régression linéaire sur les ratios  $\Delta F/F_0$ , puis additionner l'ordonnée à l'origine aux résidus pour chaque valeur (figure 33).



**Figure 33** : Illustration du redressement des données pour une plaque. Chaque point correspond au signal  $\Delta F/F0$  d'un puits. A) régression linéaire sur les données brutes d'une plaque. B) représentation graphique des résidus. C) données corrigées en additionnant l'ordonnée à l'origine ( $Y = 0,9927$  sur cet exemple) aux résidus.

Enfin, les ratios  $\Delta F/F0$  des duplicats de chaque condition ont été moyennés. Lors du criblage primaire, nous avons considéré comme « hits » les molécules pour lesquelles la moyenne des ratios  $\Delta F/F0$  des duplicats était au moins 20% supérieure à la moyenne des ratios  $\Delta F/F0$  des puits non traités (DMSO).

## II. Biochimie

### 1. RT-PCR et PCR quantitative (qPCR)

L'ARNm a été extrait en utilisant le kit *SingleShot Cell Lysis Kit* (Bio-Rad) selon les instructions du fournisseur. En bref, après rinçage avec du PBS, 20µL de SingleShot Mix supplémenté avec de la Proteinase K et de la DNase ont été déposés sur chaque puits. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, le mix contenant l'ARNm a été transféré dans un tube à PCR et chauffé à 37°C pendant 5 minutes puis à 75°C pendant 5 minutes.

L'ARNm a été rétrotranscrit en utilisant le kit *iScript Advanced cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad) selon les instructions du fabricant. En bref, 2µL de mix a été ajouté à 2µL de l'échantillon précédemment produit dans un volume final de 10µL. Le mix a été chauffé à 25°C pendant 5 minutes, puis à 46°C pendant 40 minutes et à 95°C pendant 1 minute. L'ADNc résultant a été conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Les qPCR ont été réalisées sur les ADNc en utilisant le *SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad). L'efficacité de l'amplification est entre 95% et 105% pour l'ensemble des jeux d'amorces suivants (Eurogentec) :

Nom	Gène	Concentration (nM)	Séquence
mDES-F	Desmine	300	AGGCTCAAGGCCAAACTACAGGAG
mDES-R		500	ATCCACATCCGCTCGGAAGG
mRZR1-1-F	RZR1	300	AGGTGAAGGCGAGGACGAGG
mRZR1-1-R		300	GGCCAGACACAACCTTCAGCTGTTCC

**Tableau 3 :** Liste des amorces utilisées pour les PCR et qPCR.

Le programme utilisé pour la qPCR est le suivant :

- 95°C (30 secondes)
- 95°C (10 secondes)
- 60°C (20 secondes) ] **X 39**
- 60°C-95°C (gradient de température : +0,5°C/5 secondes)

### 2. Western blot

Les quantités de molécules de la chimiothèque étant limitées, nous avons limité les volumes à traiter : les cellules MELA ont étéensemencées sur des plaques 96 puits à 50 000 cellules/puits dans du milieu de prolifération. Comme pour la préparation pour l'imagerie calcique (voir Matériel et méthodes I. 2. a. Cellules humaines immortalisées), elles ont été mises en

différenciation après 24h et traitées après 4 jours de différenciation avec les molécules de la chimiothèque à une concentration de 10 $\mu$ M.

Après 6 jours de différenciation, le milieu a été retiré et les cellules ont été rincées avec 100 $\mu$ l de PBS 1X. Elles ont été lysées en déposant directement 15 $\mu$ l/puits de tampon de Laemmli 1X (Tris/HCl 62,5mM, SDS 2%, Glycérol 10%, b-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les échantillons ont été récupérés et stockés à -20°C jusqu'à utilisation (dans un maximum de 3 mois après récupération).

15 $\mu$ l de chaque échantillon ont été déposés sur des gels 4–15% Mini-PROTEAN™ TGX Stain-Free™ (Bio-rad). Après séparation, les protéines ont été transférées sur des membranes Immobilon-P (Merck) pendant 210 minutes à 0,8A (pour les protéines de poids moléculaire supérieur à 150kDa : RyR1, DHPR) ou 120 minutes à 0,5A (pour les protéines de poids moléculaire inférieur à 150kDa : Stim1, SERCA1, CASQ1, CASQ2).

Les sites de liaison aspécifiques ont été saturés avec une solution de PBS Tween 0,3% + 4% lait (Régilait) puis incubées avec les anticorps primaires (voir tableau ci-dessous) dilués dans du PBS Tween 0,3% + 4% lait pendant la nuit. Le lendemain, elles ont été lavées avec du PBS-Tween 0,1% ou 0,3% puis incubées avec les anticorps secondaires (voir tableau ci-dessous) dilués dans du PBS Tween 0,3% + 4% lait pendant 1h40. Les membranes ont été de nouveau lavées avec du PBS Tween 0,1% ou 0,3% (5 lavages de 5 minutes) avant la révélation.

Les anticorps utilisés sont référencés dans le tableau qui suit.

Cible	Type	Dilution	Fournisseur	Référence	% Tween
RyR1	Polyclonal / lapin	1/10 000	Dr I. Marty (GIN)	/	0,3
DHPR	Polyclonal / lapin	1/3 000	Sigma	HPA048892	0,3
Stim1	Polyclonal / lapin	1/2 000	Millipore	AB9870	0,3
SERCA1	Polyclonal / lapin	1/10 000	Dr M-J. Moutin (GIN)	/	0,3
CASQ1	Monoclonal / souris	1/10 000	Thermofisher	MA3-913	0,1
CASQ2 + CASQ1	Polyclonal / lapin	1/5 000	Abcam	ab3516	0,3
MYH1E (MF20)	Monoclonal / souris	1/10 000	DSHB	AB_2147781	0,1

**Tableau 4 :** Liste des anticorps primaires utilisés en western Blot.

Cible	Type	Dilution	Fournisseur	Référence	% Tween
Anti-souris	Polyclonal / chèvre	1/10 000	Jackson	115 036 072	0,1
Anti-lapin	Polyclonal / chèvre	1/10 000	Jackson	111 035 144	0,3

**Tableau 5 :** Liste des anticorps secondaires utilisés en western Blot.

La composition des solutions utilisée est la suivante (pour 1l de solution) :

- **Tampon de migration** : Tris/Glycine 1X (Bio-rad), SDS 0,1% (Bio-rad)
- **Tampon de transfert (> 150kDa)** : Tris/Glycine 1X (Bio-rad), EtOH 10% (VWR), SDS 0,025% (Bio-rad)
- **Tampon de transfert (< 150kDa)** : Tris/Glycine 1X (Bio-rad), EtOH 20% (VWR), SDS 0,025% (Bio-rad)
- **PBS Tween** : PBS 1X (Euromedex), Tween 0,1% ou 0,3% (Bio-rad)

Le complexe secondaire a été mis en évidence en utilisant un substrat Pierce ECL (ThermoFisher) et un appareil d'imagerie ChemiDoc Touch (Bio-rad). La quantification a été réalisée sur le logiciel ImageLab 4.1 (Bio-rad) en utilisant la quantité de protéines totale mesurée après l'activation des gels comme référence.

### III. Etude des paramètres ADME

#### 1. Mesure des paramètres ADME *in vitro* en sous-traitance

Une prestation a été réalisée par le service d'analyse TechMed<sup>ILL</sup> de la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (PCBIS - UMS 3286).

Brièvement, des hépatocytes de souris ont été traités avec les molécules 38D12 et 64E5 à une concentration finale de 1  $\mu$ M. Des prélèvements ont été réalisés aux temps 0, 4, 20, 40, 80 et 120 minutes. Après le prélèvement, les réactions sont arrêtées par l'ajout d'un volume équivalent d'acétonitrile. La quantité de molécule restante a été dosée par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

En parallèle, la testostérone et le dextrométorphane ont été testés dans les mêmes conditions que les molécules en tant que contrôles positifs. Un contrôle négatif a également été réalisé avec les molécules sans hépatocytes afin d'identifier une éventuelle instabilité chimique, avec un prélèvement unique à 120 minutes.

#### 2. Mesure des paramètres ADME *in vivo* en sous-traitance

Une seconde prestation a été réalisée par le service d'analyse TechMed<sup>ILL</sup> de la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (PCBIS - UMS 3286).

Brièvement, des souris Swiss ont été traitées avec la molécule 64E5 par voie intraveineuse (IV) à une dose de 1,6 mg/kg ou *per os* (PO) à une dose de 10mg/kg. Pour le traitement par voie IV, la solution a été préparée dans une formulation saline + 10% Kolliphor EL. Pour le traitement PO, la solution a été préparée dans une formulation saline + 15% Kolliphor HS15, 5% éthanol.

Les souris ont été euthanasiées et leur sang a été prélevé aux temps 5 minutes, 30 minutes, 1h, 2h, 5h, 8h. Le plasma a été séparé par centrifugation et la quantité de molécule restante a été dosée par chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

## IV. Test préclinique in vivo

### 1. Déclaration d'éthique

Toutes les expériences impliquant des animaux ont été approuvées par le Comité d'Éthique local et respectent la législation européenne (Projet APAFIS#887S-2017020708485395v3 approuvé le 30 août 2017).

### 2. Animaux

Pour cette étude, un modèle inductible et non-létal de souris knockdown (KD) pour RyR1 (décrit dans Pelletier et al. 2020, également inclus en annexe 3) a été utilisé. Chez ces souris, les exons 9 à 11 du gène RYR1 sont flanqués de sites LoxP sur les deux allèles (RYR1 fl/fl). Ces souris possèdent également un transgène HSA-Cre/ERT2 (RyR1-Rec) codant pour la recombinaise Cre, alors que cette construction est absente chez les souris contrôles (RyR1-Ctrl).



**Figure 34** : Schéma de la construction du modèle KO inductible RyR1.

Le KO a été induit par des injections intrapéritonéales de tamoxifène (Sigma) huit semaines après la naissance, à raison de 1mg/jour pendant cinq jours. Il est important de noter que tous les animaux ont reçu ces injections, qu'ils possèdent ou non l'allèle HSA-Cre. De façon exclusive chez les animaux possédant l'allèle HSA-Cre, le tamoxifène provoque la translocation de la recombinaise Cre vers le noyau, permettant ainsi la recombinaison des sites LoxP et la délétion des exons 9-11 du gène RYR1. Afin d'améliorer la compréhension, les souris chez lesquelles la recombinaison ne peut pas s'opérer seront dénommées souris RyR1-Ctrl dans la suite du document. Les souris recombinées après l'administration de TAM seront dénommées souris RyR1-Rec.

### 3. Traitement des animaux

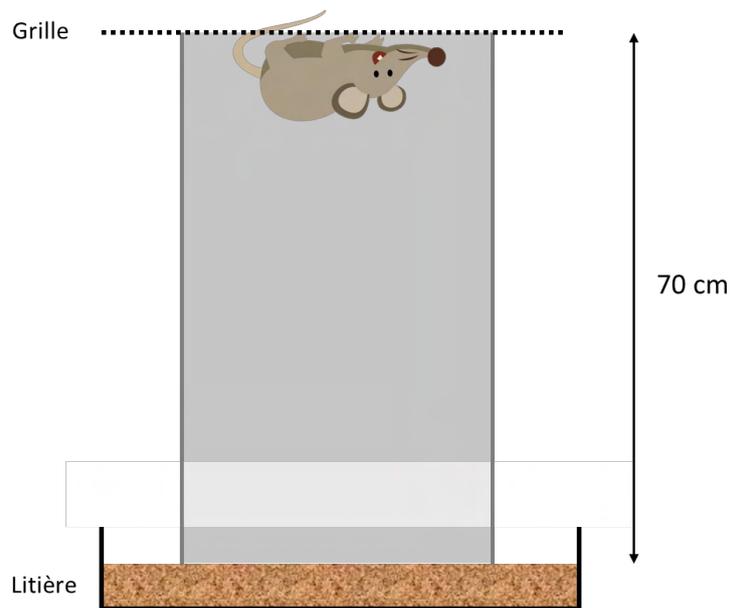
L'administration du fulvestrant aux animaux a été réalisée par injection intramusculaire (IM) dans le quadriceps. Chaque animal a reçu une injection hebdomadaire pendant 70 jours à partir de la semaine suivant l'induction de la recombinaison. Le fulvestrant a été utilisé dans sa formulation utilisée chez l'homme (AstraZeneca) et dilué dans du sérum physiologique pour

atteindre une dose de 0,64mg/souris. Les animaux non traités ont reçu des injections de sérum physiologique.

L'injection IM est douloureuse et altère donc les performances des souris lors des tests d'agrippement. Les injections ont été réalisées immédiatement après les tests de force pour maximiser le temps de récupération des souris jusqu'au prochain test. De plus, l'injection a été pratiquée de chaque côté de façon alternative chaque semaine.

#### 4. Tests d'agrippement

La force musculaire des animaux a été évaluée par des tests d'agrippement. Les souris ont été placées sur une grille qui a ensuite été retournée et maintenue à environ 70cm au-dessus d'une couche de litière. Le temps pendant lequel les souris restent agrippées à la grille a été mesuré, dans une limite de trois chutes ou 300 secondes : seul le dernier temps a été retenu. Cette mesure a été réalisée de façon hebdomadaire sur toutes les souris pendant 75 jours suivant l'induction de la recombinaison.



**Figure 35** : Illustration du système de test d'agrippement.

## V. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism 6 (GraphPad). Les comparaisons ont été réalisées avec une ANOVA suivie d'un test post-hoc de Dunnett. Les différences sont considérées comme significatives quand la p-valeur est inférieure à 0,05. Les tailles d'échantillon sont indiquées dans les légendes des figures correspondantes.

# Résultats



## I. Choix et caractérisation des modèles cellulaires

Le but de mon projet était d'identifier des molécules chimiques susceptibles d'améliorer le relâchement calcique dans les cellules musculaires. Pour atteindre cet objectif, il était indispensable de bien choisir les modèles cellulaires en amont du projet. Notre choix s'est porté d'une part sur plusieurs lignées de myoblastes humains immortalisés issus de biopsies de patients, et d'autre part sur des myoblastes murins primaires issus de notre modèle de *RYR1*-RM.

### 1. Lignées cellulaires humaines

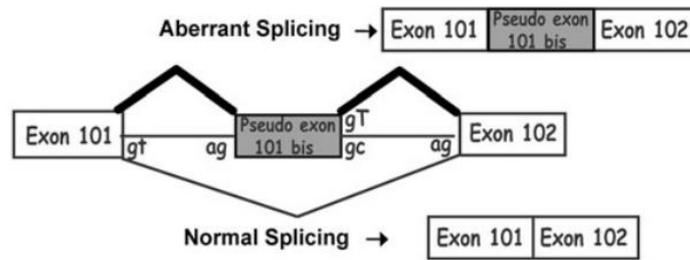
Au cours de ce projet, nous avons utilisé 4 lignées de myoblastes humains : l'une est issue d'un sujet sain et trois sont issues de patients atteints de *RYR1*-RM.

La lignée issue d'un sujet sain est notre lignée de référence, appelée « CTRL ». Aucune mutation pathogène n'a été identifiée chez ce sujet.

Les trois autres lignées sont issues de trois patients myopathes portant des mutations de *RYR1* différentes. Ces trois patients ont précédemment fait l'objet de publications de notre équipe.

#### a. *Caractérisation génétique des patients*

La première lignée issue d'un patient, MELA, est celle sur laquelle ont été réalisés la majorité des travaux présentés ici. Le patient dont elle est issue est porteur de deux mutations (Rendu et al. 2013). La mutation maternelle, c.11778G>A (Q3926Q) est une mutation récessive silencieuse avec un effet sur l'épissage : une partie des transcrits utilise un site donneur en +4, ce qui conduit à une dégradation de cette partie des transcrits conduisant à une baisse de l'expression de la protéine RyR1. La mutation paternelle, c.14646+2563C>T, est une mutation dominante qui a également un effet sur l'épissage : l'utilisation d'un site donneur cryptique résulte en l'ajout de 99 nucléotides ou 33 acides aminés résultant de l'inclusion d'un pseudo-exon 101bis surnuméraire au niveau de la partie canal de la protéine. Il est supposé que l'inclusion de ce pseudo-exon cause une instabilité de la protéine, donc sa dégradation et ainsi la baisse de quantité de la protéine RyR1 qui a été observée.



**Figure 36 :** La mutation c.11778G>A conduit à un épissage alternatif de RYR1 avec l'inclusion d'un pseudo-exon surnuméraire « 101 bis » qui cause une instabilité de la protéine. (extrait de Rendu et al. 2013)

La mère du patient est asymptomatique et son oncle paternel présente une atteinte légère, indiquant que chaque mutation est faiblement pathogène. Mais le patient lui-même est très sévèrement atteint : le phénotype est donc accentué par l'association des deux mutations. De plus, le test IVCT est positif sur la biopsie de l'oncle paternel, ce qui suggère une susceptibilité à l'hyperthermie maligne.

Un western blot réalisé sur un extrait de la biopsie a montré une réduction de 65% de la quantité de protéine RyR1. Un défaut de relâchement calcique sévère a également été mis en évidence.

La seconde lignée, PLA, est issue d'une biopsie d'une patiente porteuse d'une mutation dominante, c.14590T>C (Y4864H ; Cacheux et al. 2015). Cette mutation est responsable de la déstabilisation de l'ARNm. L'analyse en RT-qPCR et un western blot réalisés sur un extrait de la biopsie ont révélé une baisse de 47% de l'ARN et de 23% de la quantité de protéine RyR1. De plus, la mutation est située au niveau de la partie canal de la protéine ce qui en altère la fonction. Cette mutation est donc responsable d'un double effet quantitatif et qualitatif sur RyR1. Dans les cellules immortalisées, la mise en évidence d'une réduction des stocks calciques ainsi qu'un test IVCT positif (reflétant une hypersensibilité du canal à divers stimuli) sur la biopsie de la patiente suggèrent que ce canal muté est de type hyperactif et/ou fuyant. Ces cellules présentent également un défaut de relâchement calcique.

Le père de la patiente présente une atteinte légère qui a été diagnostiquée tardivement (à 60 ans), mais la patiente présente une atteinte plus sévère depuis l'enfance. De plus, les enfants de cette dernière sont tous deux atteints également, l'un plus sévèrement que l'autre : cette variation phénotypique intra-familiale suggère l'existence d'une seconde mutation maternelle récessive qui n'a pas été identifiée.

Une troisième lignée, VANY, est issue d'une biopsie d'une patiente porteuse d'une mutation dominante, c.14387A>G (Y4796C), située au niveau de la partie canal de la protéine (Monnier et al. 2000). Comme pour MELA et PLA, la mutation conduit à la fois à une réduction de quantité de RyR1 et à une altération de la fonction du canal. Un western blot sur un extrait de la biopsie a montré une réduction de 29% de la quantité de protéine RyR1.

Le canal muté (ou non) a été exprimé dans des cellules HEK, ce qui a permis de mettre en évidence un défaut de relâchement calcique, une hypersensibilité du canal muté à la caféine ainsi qu'une augmentation de la concentration calcique au repos : ce canal est donc de type

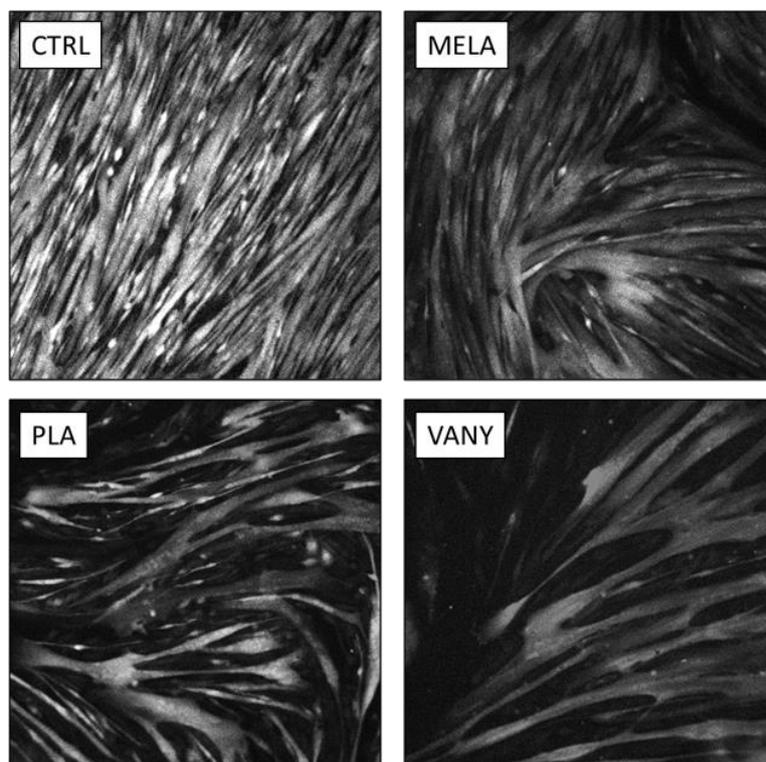
hyperactif et/ou fuyant. Ceci est renforcé par le fait que le test IVCT est positif chez la patiente et cette mutation est connue pour être une mutation causant l'HM.

Dans les trois cas, on retrouve une baisse d'expression de la protéine RyR1 associée à un défaut de relâchement calcique. La sévérité de l'altération de ces deux paramètres est variable d'un patient à l'autre.

#### *b. Caractérisation des lignées cellulaires humaines*

La caractérisation des modèles utilisés ici a principalement été réalisée sur les biopsies des patients ou sur des modèles cellulaires différents de ceux dont nous disposons (cellules primaires, cellules HEK transfectées). Il était donc important de vérifier que nos cellules immortalisées étaient conformes à la littérature existante : en particulier, nous devons nous assurer que ces cellules présentaient bien une baisse d'expression de RyR1 associée à une baisse de relâchement calcique.

Avant tout, nous nous sommes intéressés à la morphologie des myotubes issus des différentes lignées. Bien que les quatre lignées humaines aient été immortalisées par la même méthode par l'équipe du Dr. Vincent Mouly (Institut de Myologie, Paris), chaque lignée étant issue d'un clonage, elles ne sont pas strictement identiques même au-delà des mutations génétiques portées par le gène *RYR1* qui diffèrent d'une lignée à l'autre.

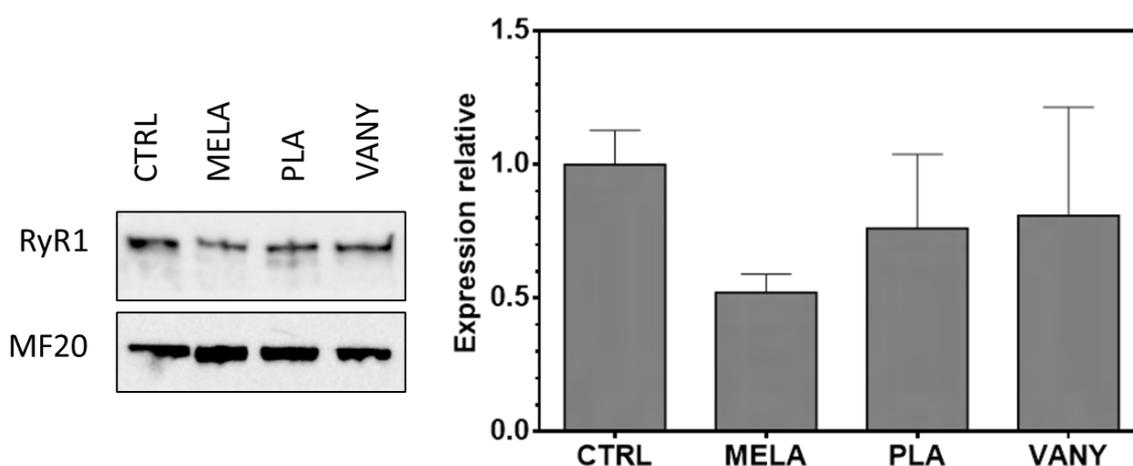


**Figure 37 :** Aspect visuel des myotubes issus des 4 lignées humaines CTRL, MELA, PLA et VANY.

Nous avons observé des différences morphologiques des myotubes d'une lignée à l'autre (figure 37). La lignée CTRL forme un tapis de myotubes fins recouvrant l'intégralité du puits. Les lignées MELA et VANY forment des myotubes comparativement plus larges, moins nombreux, répartis de manière hétérogène au sein du puits. Pour la lignée VANY en particulier, nous avons également noté un fort décollement à la fois avant et pendant la stimulation : ce défaut n'a pas pu être corrigé, même en ensemençant ces cellules sur une matrice telle que la laminine ou le matrigel. Enfin, la lignée PLA forme un mélange hétérogène de myotubes fins et épais.

Nous avons ensuite vérifié que ces cellules présentaient bien une baisse de l'expression de RyR1 au niveau de la protéine.

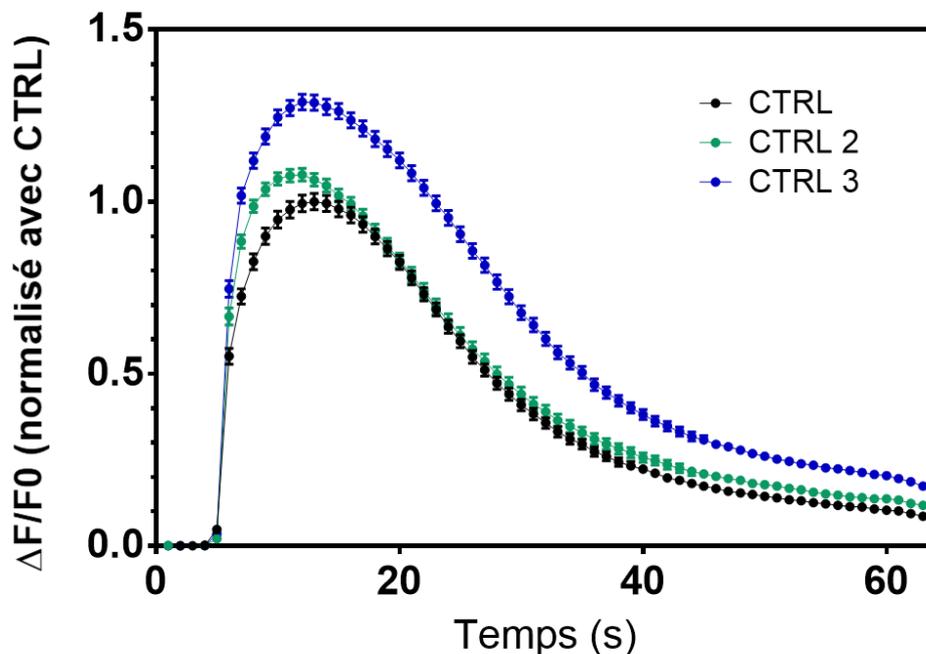
L'expression de la protéine RyR1 a été quantifiée par western blot (figure 38). Les myotubes issus des différentes lignées étant morphologiquement différents, il était probable qu'ils se différencient aussi de manière différente par trois aspects : le nombre, la taille et le degré de différenciation. Afin de pouvoir comparer les lignées entre elles, nous avons choisi de normaliser les données en fonction de l'expression de la chaîne lourde de la myosine (MYH1E, ou MF20) car l'expression de cette protéine, comme celle de RyR1, varie en fonction du stade de différenciation des cellules musculaires.



**Figure 38** : Mesure de l'expression protéique de RyR1 dans les 4 lignées cellulaires humaines. Les valeurs ont été normalisées sur l'expression de MYH1E (MF20). CTRL, MELA, PLA : n = 3, VANY : n = 2 (3 expériences indépendantes).

L'expression protéique de RyR1 dans les trois lignées issues de patients semble bien être réduite par rapport à la lignée CTRL. L'expression est de 52,0 +/- 6,9% pour les cellules MELA, 76,0 +/- 27,0% pour les cellules PLA et 80,9 +/- 40,6% pour les cellules VANY : bien qu'elle ne soit pas significative du fait d'une forte variabilité associée à un faible nombre d'expériences, cette baisse correspond à celle qui avait été mesurée dans les biopsies et rapportée dans la littérature.

Nous avons ensuite vérifié que la baisse d'expression de RyR1 est bien associée à un défaut de relâchement calcique. Au préalable, nous avons vérifié que notre lignée CTRL ne présentait pas de particularité par rapport à une population contrôle : notre laboratoire disposant de deux autres lignées de myoblastes issues de sujets sains (appelées « CTRL2 » et « CTRL3 » ici), nous avons comparé le relâchement calcique des CTRL en réponse à la stimulation KCl (110mM) à celui de ces deux autres lignées (Figure 39).

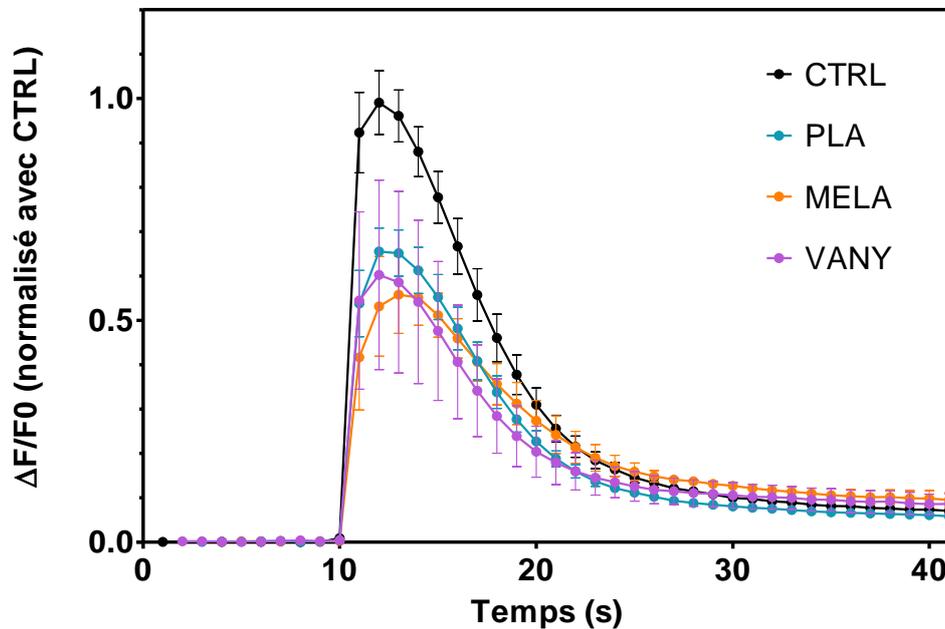


**Figure 39 :** Mesure du pic de relâchement calcique dans les cellules CTRL, CTRL2 et CTRL3. Après 6 jours de différenciation, les cellules ont été chargées avec du Fluo-4 Direct et la fluorescence a été mesurée ; chaque puits a été stimulé avec 110mM de KCl à  $t = 5$  secondes.  $n = 173$  à 210 myotubes (issus de 3 expériences indépendantes). Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les expériences ont été réalisées par Julie Brocard (ingénieure d'étude).

La variation de fluorescence moyenne au pic de relâchement calcique de la seconde lignée issue de sujets sains, CTRL2, en réponse à la stimulation KCl ( $1,07 \pm 0,03$ ) est proche de celui de notre lignée CTRL ( $1,00 \pm 0,03$ ). La troisième lignée, CTRL3, a un relâchement calcique sensiblement supérieur à celui des deux autres lignées ( $1,28 \pm 0,02$ ). A l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure d'expliquer cette variabilité entre CTRL3 et les deux autres lignées issues de sujets sains car les cellules CTRL2 et CTRL3 sont une acquisition très récente de notre équipe et sont encore en cours de caractérisation.

Il y a donc une variabilité dans la capacité des lignées contrôles à relâcher le calcium. Notre lignée CTRL est proche d'une seconde lignée, CTRL2, et est celle dont le pic de relâchement calcique est le plus bas : en choisissant cette lignée comme point de référence, nous nous assurons ainsi de ne pas surestimer le déficit de relâchement calcique de nos cellules de patients.

Notre lignée CTRL étant conforme à nos attentes, nous l'avons utilisée comme lignée de référence afin de vérifier que les lignées issues de patients myopathes présentent bien un défaut de relâchement calcique (figure 40).



**Figure 40** : Mesure du pic de relâchement calcique dans les cellules CTRL, MELA, PLA et VANY. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits. Après 24h, elles ont été mises en différenciation pour une durée de 6 jours. Après 6 jours, les cellules ont été chargées avec du Fluo-4 Direct et la fluorescence a été mesurée avec le vidéomicroscope ; chaque puits a été stimulé avec 110mM de KCl à  $t = 10$  secondes.  $n = 12$  puits (issus de 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

Conformément à nos attentes, le relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl (110mM) des trois lignées issues de patients est réduit par rapport à la lignée de référence. Par rapport aux CTRL, le relâchement calcique restant est de  $55,7 \pm 8,7$  % pour les cellules MELA,  $65,5 \pm 5,2$  % pour les cellules PLA et  $60,2 \pm 21,3$  % pour les cellules VANY.

Lignée	Relâchement calcique	Expression RyR1 (protéine)	Aspect morphologique des myotubes
CTRL	100 %	100 %	Nombreux (tapis), fins
MELA	55,7 %	52,0 %	Larges
PLA	65,5 %	76,0 %	Fins et larges
VANY	60,2 %	80,9 %	Larges, fort décollement

**Tableau 6 :** Synthèse des altérations du relâchement calcique et de l'expression de RyR1 mesurées dans les différentes lignées cellulaires humaines.

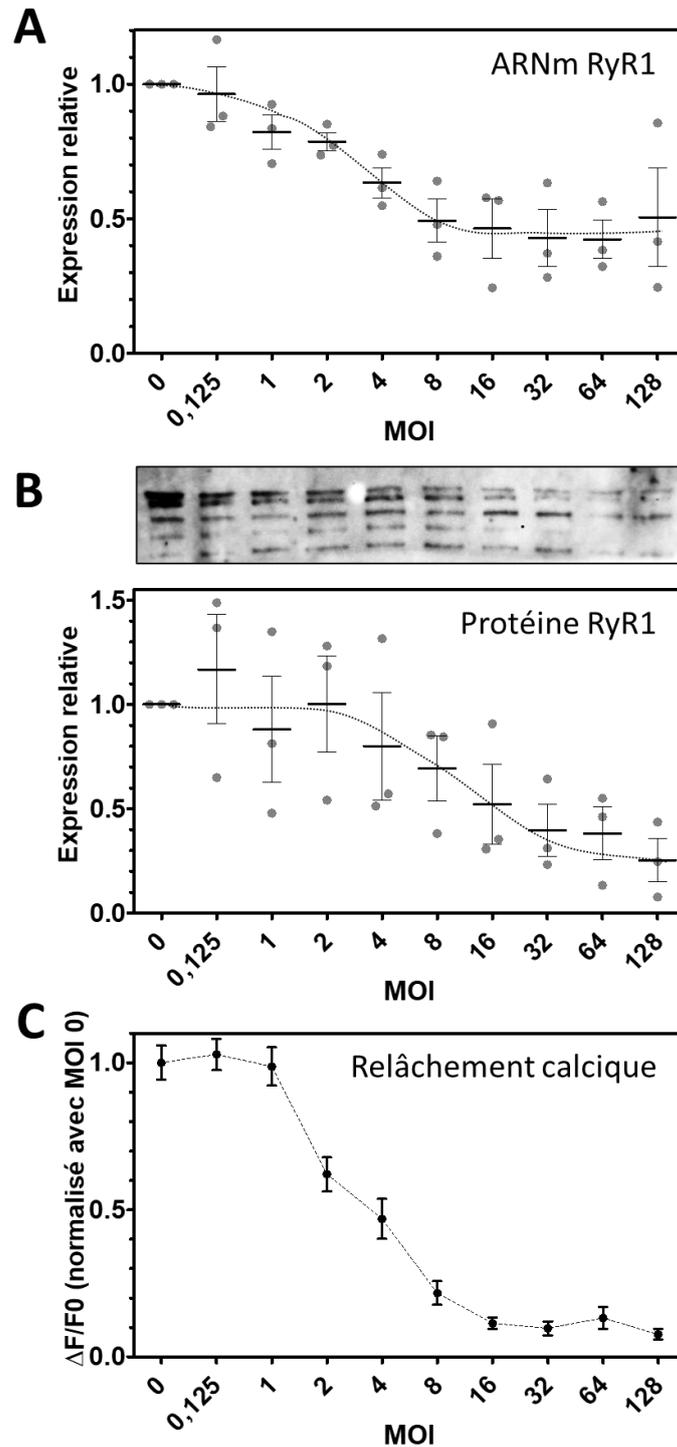
Nous disposons donc de trois lignées humaines issues de patients myopathes associant une baisse de relâchement calcique à une baisse d'expression de RyR1. La sévérité de ces altérations est variable d'une lignée à l'autre et le degré d'altération du relâchement calcique est corrélé à la baisse d'expression RyR1. La lignée MELA est la plus sévèrement atteinte alors que les lignées PLA et VANY présentent des défauts plus modérés.

## 2. Caractérisation des cellules murines primaires

Nous disposons d'un autre modèle cellulaire : des cellules primaires issues du modèle murin RyR1-Rec. Cette souris est un modèle de baisse d'expression de RyR1 inducible de manière muscle-spécifique grâce à un système Cre-lox. Chez l'animal, la recombinaison des exons 9 à 11 de *RYR1* est induite grâce à des injections de tamoxifène qui permettent la translocation de la recombinase Cre dans le noyau. Dans les cellules primaires, cette recombinaison est induite par une transduction avec des adénovirus Cre. Cette méthode permet d'obtenir une proportion de myoblastes recombinés plus ou moins élevée en fonction de la quantité d'ADV, qui résulte en une recombinaison plus ou moins forte dans les myotubes différenciés.

Il y a plusieurs années, notre équipe s'est intéressée à la relation entre l'expression et la fonction de RyR1. En effet, bien que la littérature suggère que (1) la baisse d'expression de RyR1 conduit à une baisse de relâchement calcique et que (2) il existe une corrélation entre la sévérité de la baisse d'expression et la sévérité du défaut fonctionnel, cette relation n'avait encore jamais été caractérisée auparavant.

L'étude de la relation entre l'expression et la fonction de RyR1 a été réalisée par Irinka Seraudie, étudiante en 1<sup>ère</sup> année de Master, pendant un stage au sein du laboratoire. Les cellules RyR1-Rec ont été mises en culture et transduites à une *multiplicity of infection* (MOI, qui correspond au nombre de virus par cellule) de 0,125 à 128. Après 2 à 3 jours de différenciation, nous avons étudié l'expression de RyR1 au niveau transcriptionnel et protéique et le relâchement calcique en réponse à la dépolarisation (figure 41).



**Figure 41** : Etude de la relation entre l'expression et la fonction de RyR1 dans les cellules murines primaires RyR1-Rec. Les cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits à une densité de 50 000 cellules/puits, transduites avec l'ADV Cre à une MOI de 0,125 à 128 et mises en différenciation pendant 48 à 72h. A) Expression de RyR1 au niveau de l'ARN. L'expression a été normalisée sur l'expression de la desmine. n = 3 puits (au total 3 expériences indépendantes). B) Expression de RyR1 au niveau protéique en fonction de la quantité d'ADV Cre. L'expression a été normalisée sur la quantité de protéine totale de la bande. n = 3 puits (au total 3 expériences indépendantes). C) Amplitude du pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl (110mM). n = 35 à 51 myotubes (au total 3 expériences indépendantes). Les expériences ont été réalisées par Irinka Seraudie (étudiante Master 1).

L'expression transcriptionnelle restante diminue à partir de MOI 1 (82,1 +/- 6,4%). Elle baisse ensuite progressivement jusqu'à atteindre un plateau à MOI 16 (46,3 +/- 10,1%). La diminution de l'expression protéique est visible à partir de MOI 4 (80,0 +/- 25,8%) ; elle baisse ensuite de plus en plus avec des quantités de virus croissantes, jusqu'à atteindre un minimum de 25,4 +/- 10,4% avec une MOI de 128. Nous pouvons noter que nous n'avons pas atteint une recombinaison totale qui correspondrait à un niveau d'expression nul.

Au niveau fonctionnel, il y a une baisse du relâchement calcique à partir de MOI 2 (62,1 +/- 5,8%). L'amplitude du relâchement calcique atteint son minimum à MOI 16 (11,4 +/- 2,0%). Ces données sont récapitulées dans le tableau 7.

MOI	Expression ARN	Expression protéine	Relâchement calcique
0	100 %	100 %	100 %
0,125	96,3 %	116,8 %	102,8 %
1	82,2 %	88,1 %	98,7 %
2	78,6 %	100 %	62,1 %
4	63,4 %	80 %	46,9 %
8	49,3 %	69,3 %	21,7 %
16	46,3 %	52,3 %	11,4 %
32	42,9 %	39,6 %	9,7 %
64	42,4 %	38,2 %	13,2 %
128	50,6 %	25,4 %	7,6 %

**Tableau 7** : Synthèse de l'expression et la fonction de RyR1 en fonction de la MOI dans les cellules murines primaires RyR1-Rec.

Ces expériences mettent bien en évidence la relation entre l'expression et la fonction de RyR1 et montrent qu'une diminution de l'expression de RyR1 est suffisante pour entraîner une diminution de la fonction de RyR1, et donc du relâchement calcique.

Ces résultats montrent également que la sévérité des altérations de l'expression et la fonction est modulable : nous sommes donc en mesure de contrôler ces paramètres, par exemple pour nous rapprocher de la situation des patients.

### 3. Conclusion

Pour conclure, nous disposons de plusieurs modèles cellulaires humains et murins associant une baisse d'expression de RyR1 à un défaut fonctionnel.

L'étude de la relation expression/fonction de RyR1 sur les cellules murines primaires a montré que la baisse d'expression de RyR1 suffit à induire la baisse de fonction : le défaut fonctionnel des cellules MELA, PLA et VANY peut donc au moins en partie être imputé à la baisse d'expression. Cette conclusion peut *a priori* être étendue à toute situation impliquant une baisse

d'expression de RyR1, conformément aux travaux précédents de l'équipe (Garibaldi et al. 2019, Pelletier et al. 2020).

## II. Etude de l'effet du fulvestrant sur des modèles de myopathies liées à RYR1

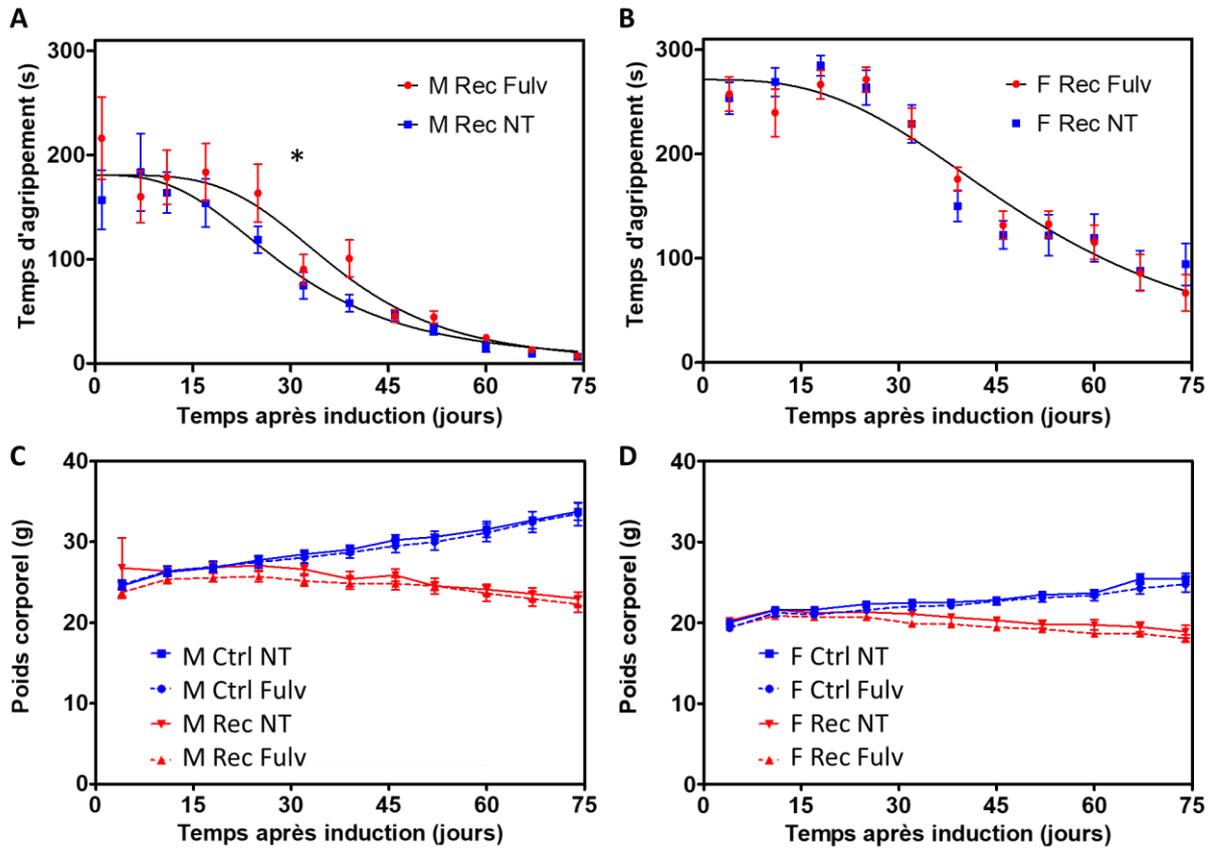
Comme cela a été exposé en introduction, plusieurs approches thérapeutiques sont à l'étude pour le traitement des myopathies, qu'elles soient liées à *RYR1* ou non. Il a été montré que les modulateurs des récepteurs aux estrogènes, et plus spécifiquement le tamoxifène, apportent des bénéfices structurels et fonctionnels dans des modèles murins de DMD et de XLMTM (Dorchies et al. 2013, Gayi et al. 2018, Maani et al. 2018). Ce sont deux pathologies dans lesquelles on observe un défaut de relâchement calcique.

Le tamoxifène joue le rôle d'agoniste ou d'antagoniste des récepteurs des estrogènes de manière tissu-dépendante. Nous avons souhaité évaluer cette approche sur notre modèle, dans l'espoir de proposer une solution thérapeutique à une grande partie des patients souffrant de *RYR1*-RM. Nous avons choisi d'évaluer l'effet d'une molécule purement antagoniste des récepteurs des estrogènes, le fulvestrant, sur nos modèles de *RYR1*-RM.

### 1. Test d'agrippement sur souris traitées avec le fulvestrant

Dans le contexte de la DMD et de la XLMTM, l'efficacité du tamoxifène a d'abord été démontrée *in vivo* chez la souris. Les estrogènes, et la modulation des récepteurs aux estrogènes, sont impliqués dans de nombreux mécanismes au niveau systémique, tels que la vascularisation (Cigarella et al. 2022) ou le métabolisme énergétique (Barros et al. 2009) et peuvent donc affecter la fonction musculaire de manière directe ou indirecte. Afin de pouvoir détecter un tel effet indirect, nous avons également fait le choix de tester cette molécule chez la souris en premier lieu.

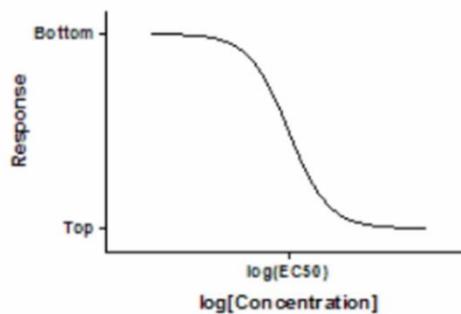
Nous avons administré du fulvestrant à des souris *RyR1*-Rec par voie intramusculaire de façon hebdomadaire pendant 70 jours, à partir de la semaine suivant l'induction de la recombinaison. Le fulvestrant a été utilisé dans sa formulation clinique chez l'homme (AstraZeneca), dilué dans du sérum physiologique pour atteindre une dose de 0,64mg/souris/semaine : cette dose a été calculée en nous basant sur la dose humaine. Les animaux non traités ont reçu des injections de sérum physiologique. La force des souris a été mesurée par test d'agrippement une fois par semaine pendant 75 jours après induction (figure 42). Les estrogènes étant des hormones sexuelles dont la régulation est très différente chez les mâles et les femelles, nous avons analysé séparément les résultats en fonction du sexe des animaux.



**Figure 42 :** Suivi de la force et du poids des souris RyR1-Rec traitées ou non avec le fulvestrant pendant 75 jours après l'induction de la recombinaison. A) Mesures de force des souris recombinées mâles. B) Mesures de force des souris recombinées femelles. C) Suivi du poids des souris mâles. D) Suivi du poids des souris femelles. M Ctrl NT : n = 12 ; M Ctrl Fulv : n = 11 ; M Rec NT : n = 12 ; N Rec Fulv : n = 15 ; F Ctrl NT : n = 19 ; F Ctrl Fulv : n = 15 ; F Rec NT : n = 19 ; F Rec Fulv : n = 19 (au total 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne +/- SEM. Les comparaisons ont été réalisées sur les modélisations des courbes comme décrit plus bas. (\*) p < 0,05.

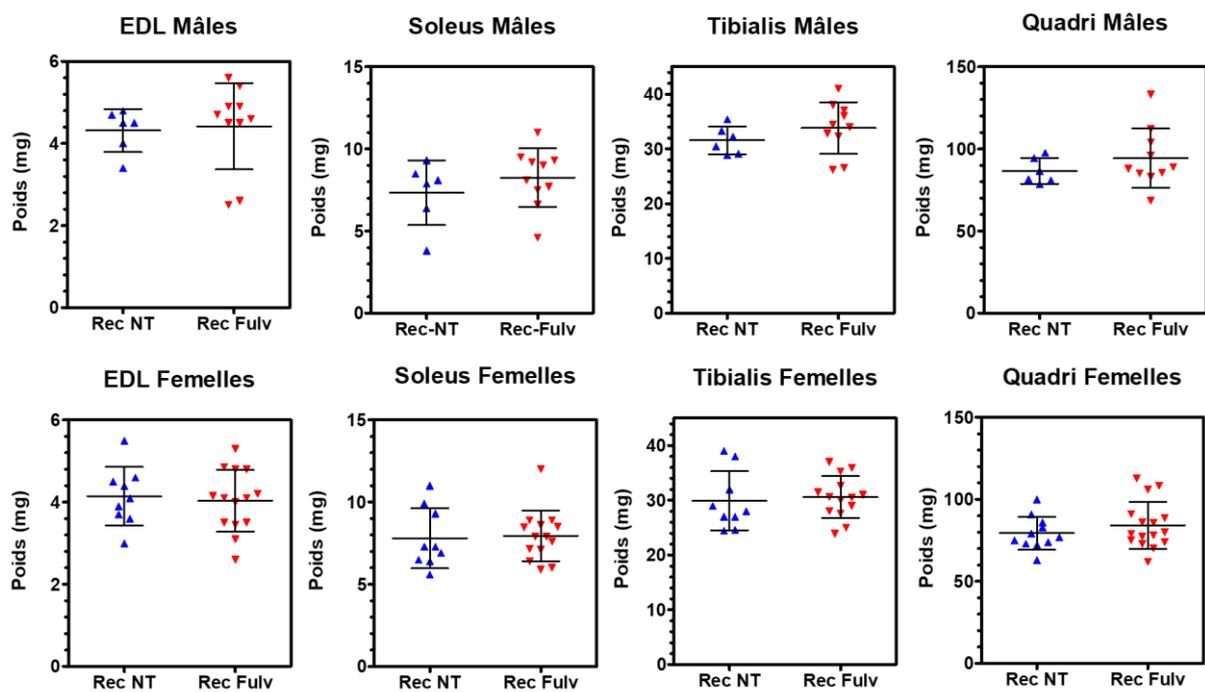
Pour les deux sexes, on observe une baisse de force graduelle induite par la recombinaison, à partir de 15 à 20 jours chez les mâles et de 25 à 30 jours chez les femelles. L'évolution de la force a pu être modélisée selon l'équation suivante :

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + 10^{X - \text{LogEC50}}}$$



En comparant la modélisation de l'évolution de la force des souris traitées ou non, chez les souris mâles, on observe que le traitement avec le fulvestrant retarde significativement cette baisse de force ( $p < 0,05$ ). Cependant, il n'y a aucune différence de performance entre les souris traitées et non traitées au bout de 75 jours. Chez les souris femelles, le fulvestrant n'a aucun effet sur la force musculaire. Chez les deux sexes, le traitement ne modifie pas l'évolution du poids des animaux.

Nous avons néanmoins pesé les muscles des souris mâles et femelles à la fin de l'expérience afin de vérifier si la masse musculaire de ces souris pouvait être augmentée malgré l'absence de modification leur poids corporel (figure 43). Les muscles que nous avons prélevés sont *l'extensor digitorum longus* (EDL), le *soleus*, le *tibialis* et le *quadriceps* (Quadri).



**Figure 43 :** Mesure du poids des muscles des souris RyR1-Rec mâles et femelles traitées ou non avec le fulvestrant au moment du sacrifice, 75 jours après l'induction de la recombinaison. M Rec NT :  $n = 12$  ; N Rec Fulv :  $n = 15$  ; F Rec NT :  $n = 19$  ; F Rec Fulv :  $n = 19$  (issus de 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne +/- écart-type.

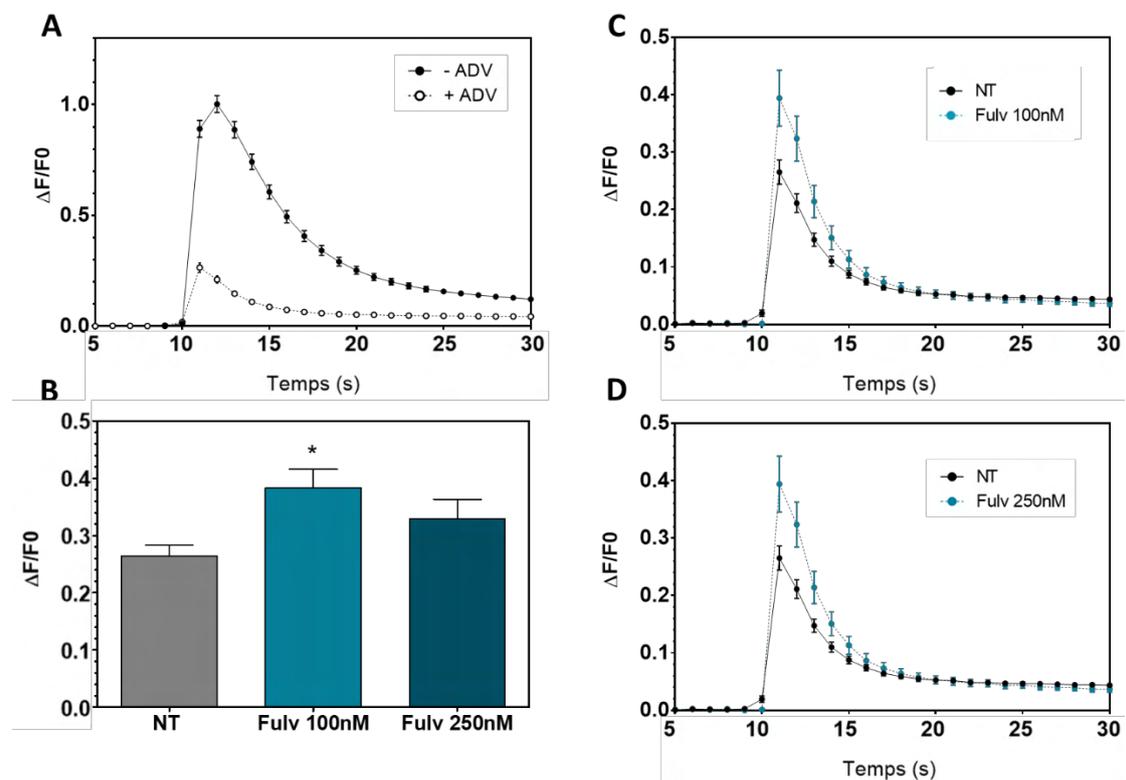
Le traitement ne modifie pas le poids des 4 muscles étudiés, chez les mâles comme chez les femelles.

Le fulvestrant a donc bien un effet bénéfique modeste sur l'évolution de la force musculaire chez les souris RyR1-Rec mâles. Cette amélioration n'est pas associée à une augmentation du poids corporel des souris, ni à une augmentation de la masse musculaire.

## 2. Etude du relâchement calcique sur les cellules murines traitées avec le fulvestrant

Comme cela a été mentionné précédemment, les modulateurs des récepteurs aux estrogènes ont la possibilité d'agir sur le muscle de façon directe ou indirecte. Un défaut de relâchement calcique étant retrouvé à la fois dans les *RYR1*-RM et dans les deux pathologies sur lesquelles le tamoxifène est efficace, l'hypothèse que nous souhaitions tester était celle d'une action directe du fulvestrant sur le muscle en améliorant le relâchement calcique.

Nous avons donc testé cette hypothèse dans les cellules primaires RyR1-Rec. Ces cellules ont été transduites avec l'ADV Cre à MOI 64 afin d'induire une baisse sévère de l'expression de RyR1, et donc du relâchement calcique. Nous avons vérifié si le traitement avec le fulvestrant pendant 2 à 3 jours, à partir de la mise en différenciation, pouvait restaurer (en partie ou totalement) le relâchement calcique à partir de cet état par imagerie calcique (figure 44).



**Figure 44 :** Evaluation de l'effet du fulvestrant sur le relâchement calcique des cellules RyR1-Rec. Des cellules RyR1-Rec ont été ensemencées en plaque 96 puits à une densité de 50 000 cellules/puits et transduites avec l'ADV Cre à MOI 64. Après 24h, elles ont été mises en différenciation pour une durée de 48 à 72h et traitées pendant toute la durée de la différenciation. La fluorescence a été mesurée pendant 40 secondes ; les cellules de chaque puits ont été stimulées avec 110mM de KCl à t = 10 secondes. A) Mesure de la baisse de relâchement calcique induite par la transduction avec l'ADV Cre à MOI 64. Les cellules utilisées pour les conditions NT et traitées ont toutes été transduites. B) Amplitude du pic de fluorescence les cellules RyR1-Rec traitées avec le fulvestrant. C, D) Mesure de la fluorescence au cours du temps sur les cellules RyR1-Rec traitées avec 100nM (C) ou 250nM (D) de fulvestrant. n = 153 à 256 myotubes (issus de 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett ;  $p < 0,05$ .

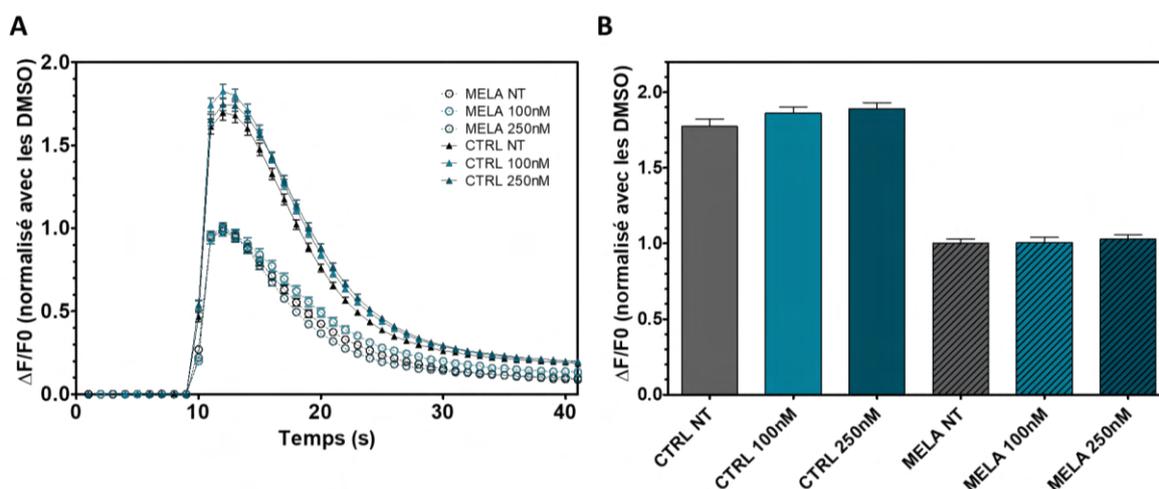
Après transduction avec l'ADV Cre, l'amplitude du relâchement calcique des cellules en culture est de 27,6 +/- 2,1% par rapport à la situation contrôle. A partir de cet état, le traitement avec 100nM de fulvestrant augmente le relâchement calcique de 35,1 +/- 12,3% ( $p < 0,05$ ) ; avec un traitement à une concentration de 250nM, on observe également une tendance vers une amélioration (24,5 +/- 13%) qui n'est pas significative ( $p = 0,08$ ).

Le fulvestrant améliore donc le relâchement calcique dans les cellules murines RyR1-Rec dont l'expression de RyR1 a été diminuée. Cette amélioration est modeste et ne permet pas de normaliser le relâchement calcique ; cela pourrait justement correspondre à l'amélioration également modeste observée *in vivo* chez les souris RyR1-Rec.

### 3. Etude du relâchement calcique sur les cellules humaines traitées avec le fulvestrant

Nous avons montré que le fulvestrant a un effet bénéfique sur la force musculaire des souris RyR1-Rec mâles et sur le relâchement calcique des cellules primaires RyR1-Rec. L'objectif principal de cette étude est d'identifier des molécules susceptibles d'augmenter le relâchement calcique dans les cellules musculaires de patients présentant un relâchement calcique altéré en conséquence de mutations *RYR1* : nous avons donc recherché si l'effet du fulvestrant est retrouvé dans ces cellules.

Nous avons donc mis en culture des cellules humaines CTRL et MELA. Ces cellules ont été traitées avec le fulvestrant aux mêmes concentrations que les cellules murines, soit 100nM et 250nM, pendant toute la durée de la différenciation (6 jours) et le relâchement calcique a été mesuré par imagerie calcique (figure 45).



**Figure 45 :** Evaluation de l'effet du fulvestrant sur le relâchement calcique des cellules CTRL et MELA. Des cellules CTRL et MELA ont été ensemencées en plaque 96 puits à une densité de 50 000 cellules/puits. Après 24h, elles ont été mises en différenciation pour une durée de 6 jours et traitées pendant toute la durée de la différenciation. Après 6 jours, la fluorescence a été mesurée pendant 40 secondes ; les cellules de chaque puits ont été stimulées avec 110mM de KCl à  $t = 10$  secondes. A : Mesure de la fluorescence au cours du temps. B : Amplitude du pic de fluorescence.  $n = 159$  à 227 myotubes (issus de 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

Comme attendu, le signal de fluorescence mesuré sur les MELA est bien inférieur à celui des CTRL (56% du signal CTRL). Quelle que soit la dose, le traitement avec le fulvestrant ne modifie pas significativement le relâchement calcique dans ces deux lignées.

#### 4. Conclusion

Nous avons mis en évidence que le fulvestrant retarde la perte de force musculaire chez les souris RyR1-Rec mâles et augmente le relâchement calcique dans des myotubes en culture issus de ce même modèle. Cependant, cet effet modeste n'est pas retrouvé avec les lignées humaines.

Cette différence peut avoir plusieurs origines. Une première hypothèse est que l'effet du fulvestrant est spécifique à l'espèce : il serait donc efficace chez la souris mais inefficace chez l'homme. Il est également possible que la dose efficace sur les cellules humaines soit différente de celle efficace sur les cellules murines. Enfin, une autre hypothèse est que le ralentissement de la perte de force observé chez la souris est en réalité dû à un effet indirect sur le muscle. L'augmentation du relâchement calcique sur les cellules murines, bien que significative, pourrait alors être un artefact ou un effet réel n'y étant pas directement lié. Des expériences supplémentaires (test de différentes doses sur les cellules murines et humaines, évaluation de l'effet du fulvestrant dans un autre modèle murin dans lequel le relâchement calcique est altéré) permettraient de vérifier ces hypothèses.

Sur la base des résultats obtenus sur les souris mâles et les cellules primaires murines, nous avons déposé un brevet sur l'utilisation du fulvestrant pour le traitement des *RYR1*-RM en avril 2019 (brevet n°EP3725316, inclus en annexe 2).

### III. Identification de composés pharmacologiques capables d'augmenter les relâchements calciques dans les cellules musculaires

La seconde partie de mon projet visait à identifier de nouvelles molécules capables d'augmenter les relâchements calciques dans les cellules musculaires, cette fois-ci sans *a priori*. Contrairement aux travaux réalisés sur le fulvestrant, nous ne disposions pas d'une seule molécule mais de plusieurs milliers. Cela a nécessité une approche différente, plus adaptée au grand nombre de composés qui devaient être testés dans un temps relativement court, débutant par un criblage.

#### 1. Mise au point des conditions du criblage

Comme cela a été décrit en introduction, chaque approche de criblage est unique et est le fruit d'un ensemble de choix et de contraintes. Notre objectif étant l'identification de molécules susceptibles d'augmenter le relâchement calcique (qui est un mécanisme complexe), cela nous aiguillait vers un criblage *phenotype-based*.

Le choix des modèles d'étude a été dicté par trois critères :

- Afin d'obtenir des résultats reproductibles, à la fois au sein d'une même expérience et d'une expérience à l'autre, nous devons disposer d'un système également reproductible.
- Le criblage impliquant un nombre relativement élevé de molécules candidates, il fallait pouvoir produire une grande quantité de cellules rapidement.
- Les modèles devaient, si possible, être représentatifs de la diversité des mutations *RYR1-RM* afin de sélectionner des molécules efficaces sur plusieurs patients. Cela nous dirigeait vers une approche globale, ce qui a renforcé notre choix de criblage *phenotype-based*.

En nous basant sur ces contraintes, nous avons rapidement écarté les cellules murines primaires. Ces cellules sont produites en quantité restreinte et par lots, chaque lot étant différent d'un autre : elles ne satisfont donc pas les critères de reproductibilité ni de rapidité de production.

Nous avons donc décidé d'utiliser quatre lignées de cellules musculaires humaines immortalisées : trois lignées issues de patients *RYR1-RM* porteurs de mutations différentes et une lignée de référence issue d'un sujet sain (CTRL).

Le *readout* que nous avons choisi était l'intensité du relâchement calcique dans les cellules musculaires. Le critère de sélection des *hits* que nous avons initialement fixé était une augmentation du relâchement calcique d'au moins 20% dans au moins 2 des 3 lignées issues de patients myopathes.

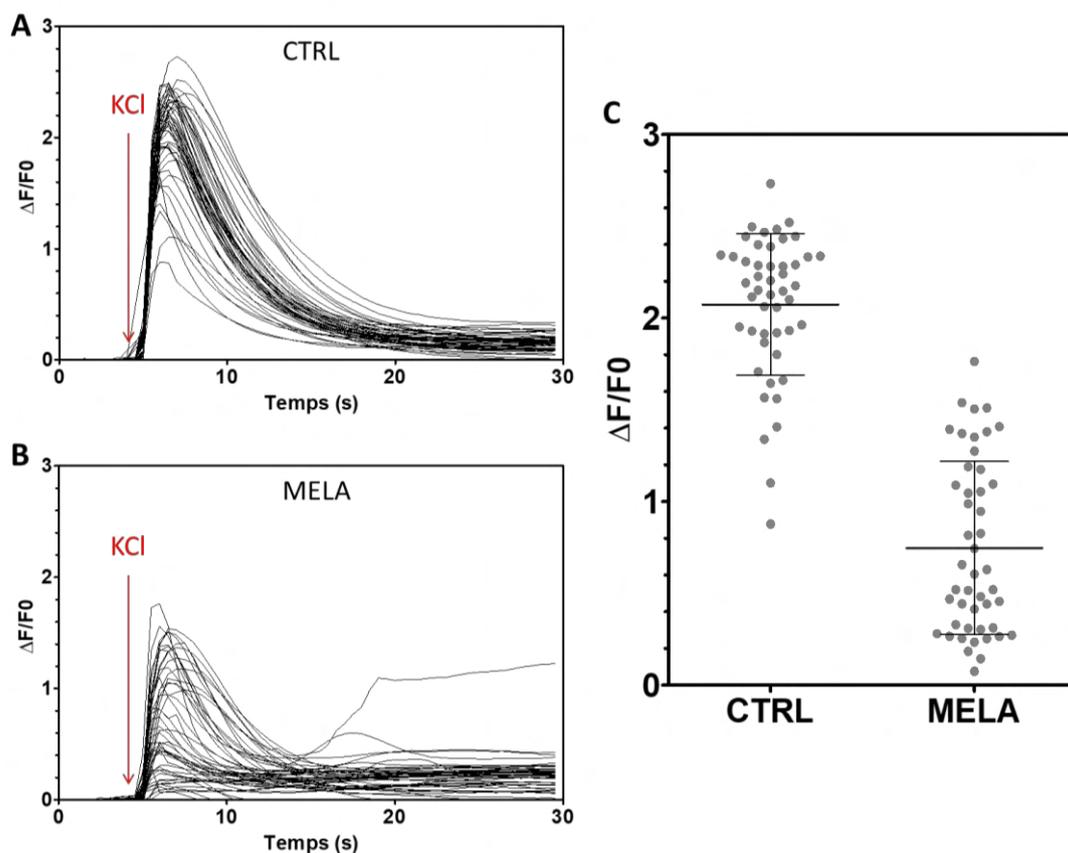
a. *Mise au point technique*

Un criblage doit satisfaire certains objectifs techniques. Des étapes de mise au point ont donc été nécessaires pour ajuster les conditions et la méthode afin d'atteindre ces objectifs.

Nous avons besoin de cribler une chimiothèque de 9 252 molécules en quelques mois. Il fallait donc mettre au point une technique permettant une lecture et une analyse rapides. Nous avons choisi de mesurer le relâchement calcique en quantifiant la fluorescence avec le Fluo-4, une sonde calcique fluorescente. Notre équipe avait déjà une expérience de plusieurs années avec cette technique, en utilisant plus particulièrement le Fluo-4 AM. Dans le contexte de ce projet, nous avons utilisé le Fluo-4 Direct, une formulation différente de cette sonde qui se distingue par un temps de chargement plus court (30 minutes sans nécessité de rinçages, contre 1h de chargement et 30 minutes de désestérification suivies de lavages pour le Fluo-4 AM) ; nous avons précédemment réalisé des essais fructueux de miniaturisation en plaque 96 puits, notamment avec le fulvestrant. Concernant la lecture, nous avons immédiatement écarté le vidéomicroscope : avec la méthode couramment utilisée au sein du laboratoire, la lecture d'une plaque 96 puits (soit 88 molécules) aurait nécessité environ 2 heures suivies de 8 à 9 heures d'analyse. Cela n'était pas compatible avec le débit que nous attendions.

Notre laboratoire dispose d'un fluorimètre PheraStar FS équipé d'un injecteur automatique. Cet appareil nous a d'abord permis de réduire le temps de lecture à environ une heure (y compris l'injection de l'agent stimulant) par plaque 96 puits sans intervention humaine.

Nous avons d'abord vérifié la reproductibilité du signal d'un puits à l'autre sur des cellules non traitées. Ces premiers tests ont été uniquement réalisés sur les cellules CTRL et MELA (figure 46).



**Figure 46** : Mesure du relâchement calcique dans les cellules CTRL et MELA avec le fluorimètre. Des cellules CTRL et MELA ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, sur une demi-plaque (48 puits) pour chaque lignée. Après 24h, elles ont été mises en différenciation pour une durée de 6 jours. Après 6 jours, la fluorescence a été mesurée pendant 30 secondes sur un point central pour chaque puits ; chaque puits a été stimulé avec 110mM de KCl à  $t = 5$  secondes. L'hétérogénéité de l'amplitude de la fluorescence n'est pas compatible avec la réalisation d'un criblage. A, B : Mesure de la fluorescence au cours du temps sur les cellules CTRL (A) et MELA (B). C : Amplitude du pic de fluorescence. Un tracé ou un point correspond à un puits ; les données sont présentées en moyenne  $\pm$  écart-type. CTRL :  $n = 48$  puits, MELA :  $n = 48$  puits.

Le signal mesuré est plus fort dans les cellules CTRL que dans les cellules MELA, ce qui correspond à nos attentes : l'amplitude du pic de fluorescence est de  $2,07 \pm 0,38$  avec les CTRL et  $0,75 \pm 0,47$  avec les MELA. Cependant, la distribution de l'intensité maximale du signal est extrêmement large : de 0,88 à 2,73 pour CTRL et de 0,08 à 1,76 pour MELA. Sur les MELA en particulier, on observe de nombreux puits dans lesquels la réponse est extrêmement faible, voire absente. Quoi qu'il en soit, une telle distribution du signal ne permettrait pas de détecter une amélioration de 20%, ou alors avec un grand nombre de réplicats. Or, il était préférable de ne pas augmenter le temps de criblage, donc ne pas accroître le nombre de réplicats afin de réduire l'hétérogénéité.

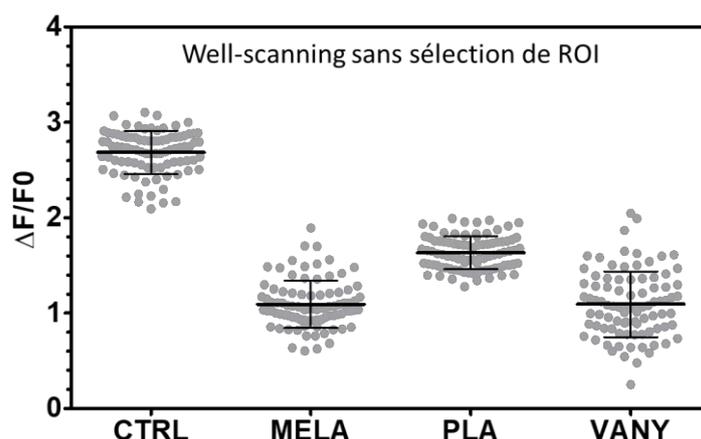
Il a donc fallu comprendre les raisons de cette hétérogénéité. Nous avons réalisé de nombreux tests afin d'en identifier la cause. Nous avons par exemple suspecté un ensemencement variable d'un puits à l'autre dû à une mauvaise homogénéisation des cellules ou un pipetage

imprécis : nous avons vérifié à la fois la fiabilité du pipetage de nos pipettes multi-canaux et l'homogénéité de l'ensemencement d'un puits à l'autre d'une même plaque 96 puits, ce qui nous a permis de rapidement écarter ces deux hypothèses. Nous avons également pensé à un défaut des plaques 96 puits, qui a aussi été écarté. Finalement, l'hypothèse la plus probable que nous avons retenue est un problème d'hétérogénéité de la couverture du puits par les myotubes.

En effet, toutes les cellules musculaires ensemencées (myoblastes) ne se différencient pas. Le degré de différenciation est variable d'une zone à l'autre du puits. De ce fait, le support n'est pas uniformément couvert de cellules différenciées. Il existe donc des zones qui contiennent des myotubes, dans lesquelles on peut mesurer un signal de fluorescence correspondant au relâchement calcique en réponse à la stimulation, et des zones qui n'en contiennent pas. Or, le gain de temps obtenu avec le fluorimètre est accompagné d'une perte d'information, car le fluorimètre ne produit pas d'image et ne mesurait qu'un point unique au centre de chaque puits lors de nos premiers essais avec une configuration standard. Le faisceau étant très fin, la zone de détection peut contenir des cellules différenciées ou non.

Nous avons alors ajusté la méthode de lecture en conséquence. Le fluorimètre dispose d'un mode de lecture « *well-scanning* », par lequel il mesure la fluorescence sur le puits entier. Chaque puits est divisé en 52 « pixels », correspondant chacun à une zone.

Cependant, ce mode de lecture n'est pas compatible avec une lecture en continu. Il ne peut donc pas suivre l'évolution de la fluorescence depuis la stimulation jusqu'au retour au repos. Chaque puits a été lu deux fois. Une première lecture, réalisée sans stimulation, permet de mesurer la fluorescence de base. Une seconde lecture, réalisée immédiatement après l'ajout de KCl, mesure la fluorescence correspondant à une fenêtre temporelle encadrant le pic du relâchement calcique (et dans une moindre mesure, à la cinétique du relâchement calcique, car la lecture dure en réalité plusieurs secondes). Ce mode de lecture rend possible une amélioration de la résolution spatiale, au détriment de la résolution temporelle. A cela s'ajoute également une amélioration de la rapidité de lecture : avec ce système, 16 minutes suffisent à lire une plaque 96 puits (88 molécules).



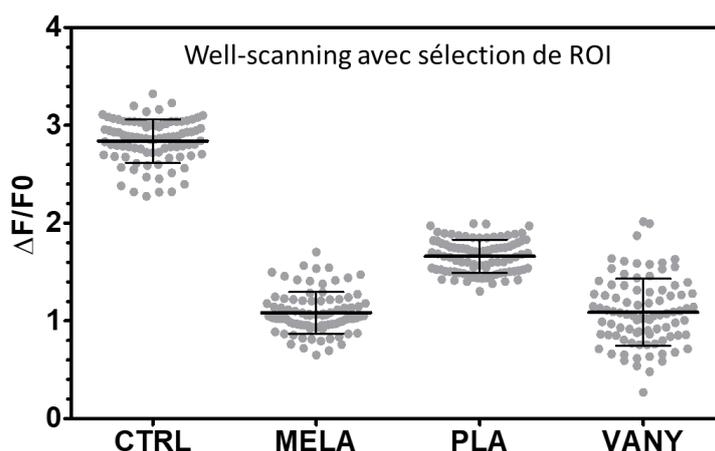
**Figure 47** : Mesure du relâchement calcique des cellules CTRL, MELA, PLA et VANY avec le fluorimètre en mode « well-scanning », qui mesure la fluorescence dans le puits entier. n = 96 puits. Les données sont présentées en moyenne +/- écart-type.

		CTRL	MELA	PLA	VANY
<b>Configuration standard</b>	<b>Moyenne</b>	2,07	0,75	/	/
	<b>Ecart-type</b>	0,38	0,47	/	/
<b>Well-scanning sans sélection de ROI</b>	<b>Moyenne</b>	2,68	1,09	1,63	1,09
	<b>Ecart-type</b>	0,23	0,25	0,17	0,34
<b>Diminution de la variabilité avec le well-scanning (%)</b>		- 53 %	- 63 %	/	/

**Tableau 8** : Distribution des valeurs du pic de fluorescence mesurées sur les cellules CTRL, MELA, PLA et VANY en configuration standard ou en well-scanning.

Ce nouveau mode de lecture a nettement amélioré la reproductibilité des mesures sur les cellules CTRL et MELA par rapport à la configuration standard avec la lecture au centre du puits (figure 47 ; les valeurs sont détaillées dans le tableau 8). La reproductibilité du signal des cellules PLA est aussi très bonne, cependant ce n'est pas le cas des cellules VANY, pour lesquelles on observe une fois encore une forte hétérogénéité d'un puits à l'autre.

Nous avons vérifié si la sélection des régions d'intérêt de manière semblable à ce qui est fait sur les images de vidéomicroscope pouvait encore améliorer la reproductibilité. J'ai donc réalisé une macro permettant la sélection des pixels (donc des ROI) dont la fluorescence est au-dessus d'un seuil après la stimulation.



**Figure 48** : Mesure du relâchement calcique des cellules CTRL, MELA, PLA et VANY avec le fluorimètre en mode « well-scanning », avec sélection de ROI. Dans le cas de MELA en particulier, la reproductibilité peut être légèrement améliorée par la sélection de ROI correspondant aux zones dans lesquelles les myotubes sont présents. n = 96 puits. Les données sont présentées en moyenne +/- écart-type.

		CTRL	MELA	PLA	VANY
<b>Well-scanning sans sélection de ROI</b>	<b>Moyenne</b>	2,68	1,09	1,63	1,09
	<b>Ecart-type</b>	0,23	0,25	0,17	0,34
<b>Well-scanning avec sélection de ROI</b>	<b>Moyenne</b>	2,83	1,08	1,66	1,09
	<b>Ecart-type</b>	0,22	0,21	0,17	0,34
<b>Diminution de la variabilité avec sélection de ROI (%)</b>		- 9,44 %	- 15,2 %	- 1,82 %	0 %

**Tableau 9** : Distribution des valeurs du pic de fluorescence mesurées sur les cellules CTRL, MELA, PLA et VANY en *well-scanning* avec ou sans sélection de ROI.

Bien que la sélection des ROI ait globalement amélioré la reproductibilité du signal, particulièrement pour les cellules MELA (pour lesquelles on observe une diminution de la variabilité de 15,2%), aucune amélioration n'est observée pour les cellules VANY (figure 48 ; les valeurs sont détaillées dans le tableau 9).

Nous avons précédemment observé au microscope le décollement d'une forte proportion de myotubes VANY avant et lors de la stimulation, et ce de manière très variable à la fois au sein d'un même puits et d'un puits à l'autre. Pour cette raison, nous avons fait le choix d'écarter la lignée VANY du criblage.

Le second problème que nous avons rencontré concernait la production des cellules. Afin d'atteindre un débit de criblage satisfaisant, nous avons besoin de produire plusieurs dizaines de millions de cellules par semaine. Or, la vitesse de croissance des cellules PLA s'est avérée très lente par rapport à celle des autres lignées. Nous avons donc également écarté la lignée

PLA du criblage primaire ; cependant, nous avons décidé de réintroduire cette lignée lors d'étapes ultérieures pour lesquelles la quantité de cellules nécessaires est plus faible.

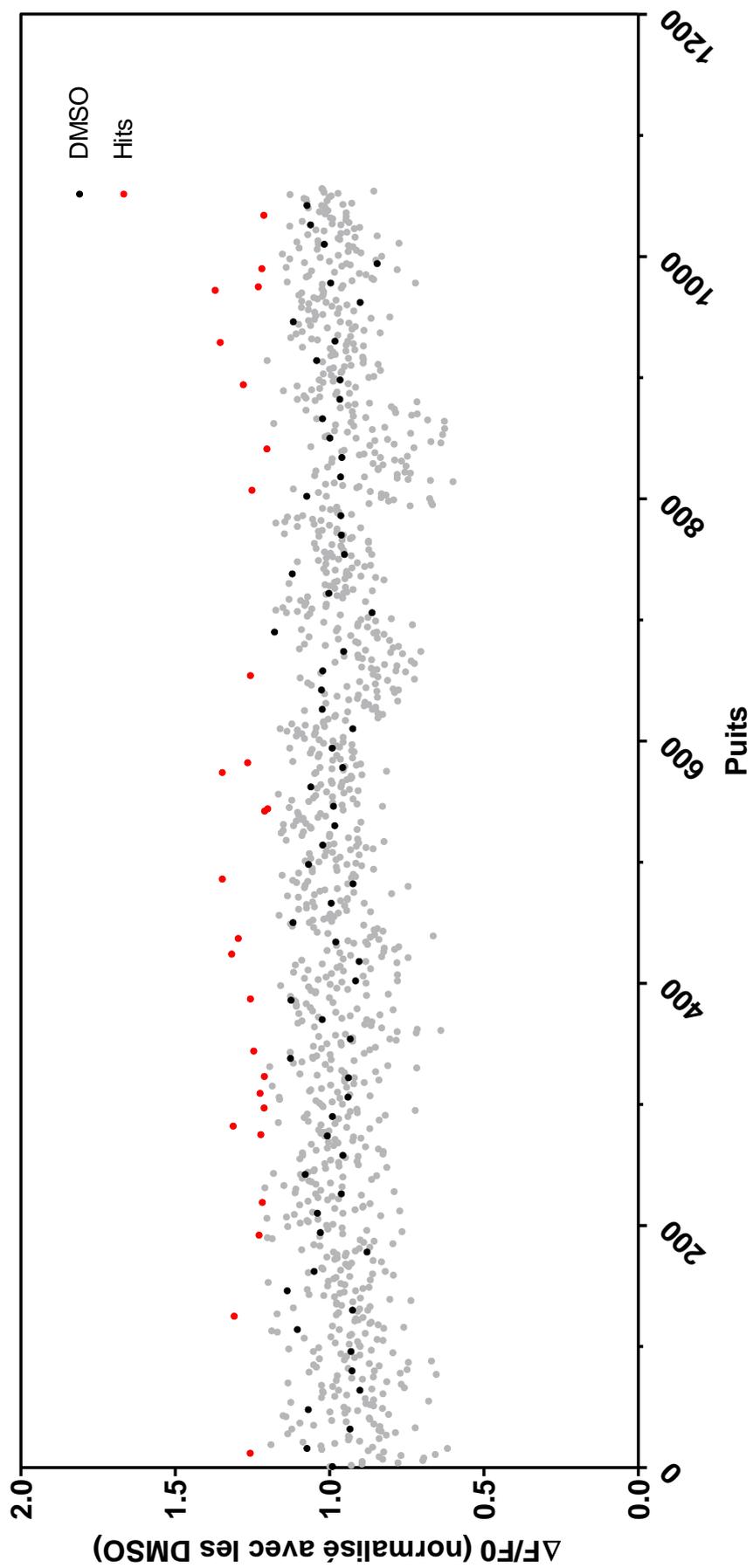
Finalement, nous avons ajusté les conditions de criblage comme suit :

- Le criblage primaire est réalisé sur la lignée MELA uniquement, avec chaque condition de traitement testée en duplicat technique.
- La lecture est réalisée sur l'ensemble du puits en deux temps : pré-stimulation (lecture 1) et post-stimulation (lecture 2).
- Des ROI, qui correspondent aux zones du puits qui contiennent des myotubes, sont sélectionnées lors de l'analyse grâce à une macro (détaillée dans Matériels et méthodes I. 5. e. Analyse des données du fluorimètre).

#### *b. Criblage préliminaire*

A la suite de la mise au point technique, nous avons cherché à savoir si nos conditions de criblage nous permettaient bien d'identifier des *hits*. Nous avons réalisé un criblage préliminaire sur environ 10% de la chimiothèque (12 plaques, soit 1 056 molécules).

Chaque molécule a été diluée au 1/1 000 dans du milieu de différenciation à une concentration finale de 10 $\mu$ M. 100 $\mu$ l de ce milieu a été appliqué sur les cellules en culture du jour 4 au jour 6 de différenciation, donc pour une durée totale de 48h.

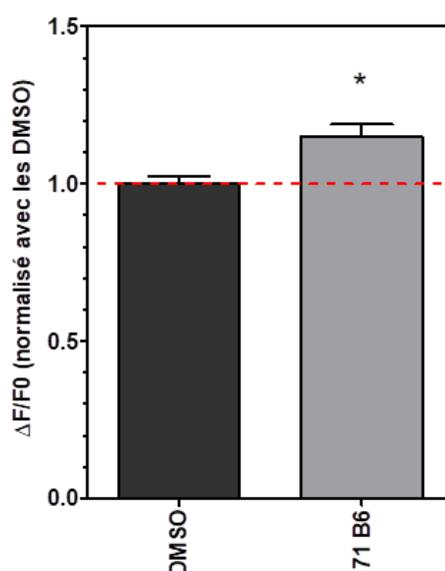


**Figure 49 :** Résultats du criblage préliminaire sur les cellules MELA. Chaque point correspond à la moyenne des deux duplicats d'une condition de traitement (1 molécule). Les contrôles non traités sont représentés en noir, les puits négatifs en gris et les hits en rouge.

Grâce à ce criblage préliminaire, 27 *hits* ont été identifiés (figure 49).

Chaque *hit* a été à nouveau testé sur les cellules MELA avec une taille d'échantillon plus grande, soit  $n = 4$  puits. L'expérience a été répétée trois fois pour chaque molécule. Un *hit* était considéré comme confirmé si son effet était statistiquement significatif (et ce même si cet effet s'avérait inférieur à 20% d'augmentation par rapport au contrôle non traité).

Un seul *hit* a été confirmé, 71B6, avec une augmentation du relâchement calcique de  $14,8 \pm 1,4\%$  ( $p < 0,05$  ; figure 50).



**Figure 50 :** Validation de l'effet de la molécule 71B6 sur le relâchement calcique des cellules MELA. DMSO :  $n = 4$  à 5 puits, 71B6 :  $n = 12$  puits (au total 3 expériences indépendantes). Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. La comparaison a été réalisée avec un test de Student ;  $p < 0,05$ .

Ce résultat nous a confortés dans notre approche et nous a apporté la confirmation que notre méthode nous permettait bien d'identifier des *hits*, même ayant un effet faible. Cependant, cet unique *hit* confirmé associé à une grande majorité de faux positifs nous a également amenés à nous questionner.

En parallèle de la réalisation du criblage préliminaire, nous avons voulu déterminer la fiabilité de notre méthode de détection des *hits*.

Pour répondre à cette interrogation, une modélisation de la réponse des cellules MELA a été réalisée par le Dr. Jacques BROCARD à partir des données des 6 premières expériences de criblage préliminaire. Ces données ont été utilisées pour extraire la moyenne, la variabilité et les influences topographiques de la plaque. Il s'agissait de prédire la réponse des cellules à la stimulation, c'est-à-dire l'intensité du relâchement calcique.

Une modélisation simplifiée a d'abord été réalisée à partir des données traitées, c'est-à-dire les ratios  $df/f0$  après définition des ROI (Matériel et méthodes I. 5. e. Analyse des données du fluorimètre). Ce modèle simple n'a cependant pas permis de produire une distribution simulée de ratios comparable à celle des expériences réelles : il a donc fallu se diriger vers un modèle complexe, réalisé à partir des données brutes.

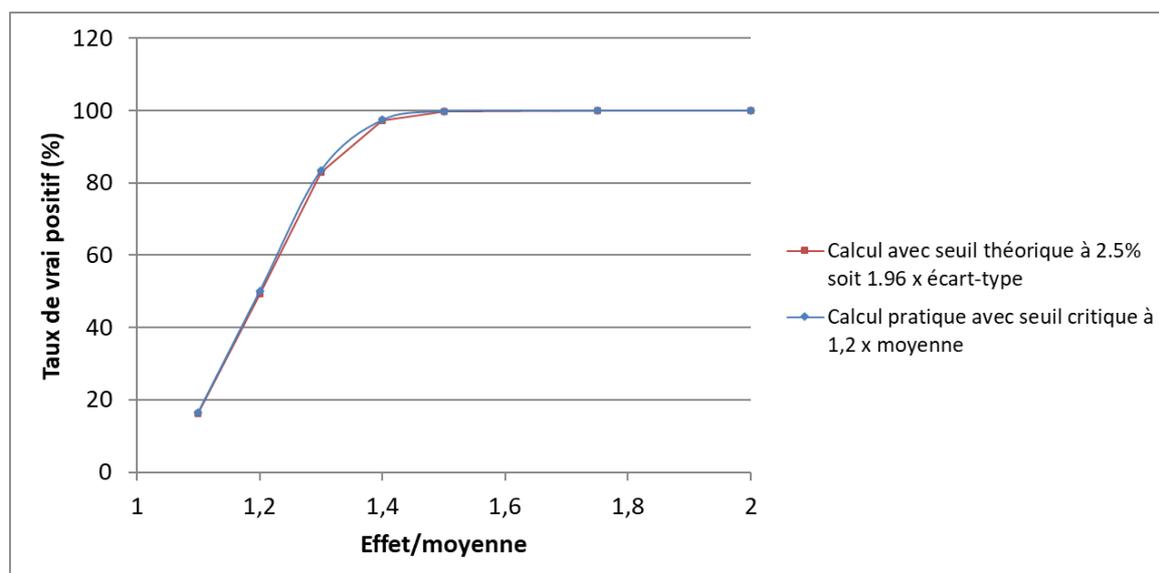
Cette seconde modélisation complexe a mis en évidence plusieurs points.

Concernant les effets de position, il existe d'abord un effet intra-puits : l'intensité de réponse est variable au sein du puits et a tendance à être plus forte sur les bords des puits car les cellules ont tendance à y être plus nombreuses. Cet effet avait déjà observé empiriquement pendant la mise au point des conditions du criblage.

Il existe également un effet inter-puits : l'intensité est décroissante entre les premiers puits et les derniers, il y a donc besoin de « redresser » les données avant l'analyse pour compenser cet effet. Ce « redressement » consiste à réaliser une régression linéaire sur les données, puis additionner l'ordonnée à l'origine au résidu pour chaque valeur (voir Matériel et méthodes I. 5. e. Analyse des données du fluorimètre).

Cette modélisation a également mis en évidence que la moyenne des deux duplicats d'une plaque donnée suivent une loi normale N (moyenne, écart type).

Cette modélisation a enfin permis de construire un outil permettant de déterminer la probabilité qu'une molécule ayant un effet théorique donné soit bien identifiée comme un *hit* (c'est-à-dire le taux de vrai positif, et par extension le taux de faux négatif ; figure 51), ainsi que le taux de faux positif.



**Figure 51** : Modélisation du taux de vrai positif en fonction de l'effet d'une molécule donnée en utilisant les valeurs de moyenne et d'écart type d'une plaque exemple. Les deux modélisations sont superposables quel que soit le seuil de détection utilisé.

Pour le taux de faux positif, cet outil détermine donc la probabilité qu'une valeur suivant la loi normale (moyenne, écart type) soit au-dessus d'un seuil donné. Le calcul est réalisé avec deux seuils : un seuil arbitraire que nous avons fixé à (moyenne + 20%), et un seuil théorique plus « classique » de (moyenne + 1,96\*écart type).

Cet outil a d'abord montré qu'on obtient des probabilités tout à fait comparables avec les seuils arbitraire et théorique. Il a également montré que la fiabilité de la détection des hits dépend de la force de l'effet de la molécule : on a ainsi 50% de chance qu'une molécule ayant un effet de 20% d'augmentation soit correctement identifiée, et cette détection est presque assurée (97,4% de chance de détection) à partir d'un effet de 40% sur le relâchement calcique (figure 51).

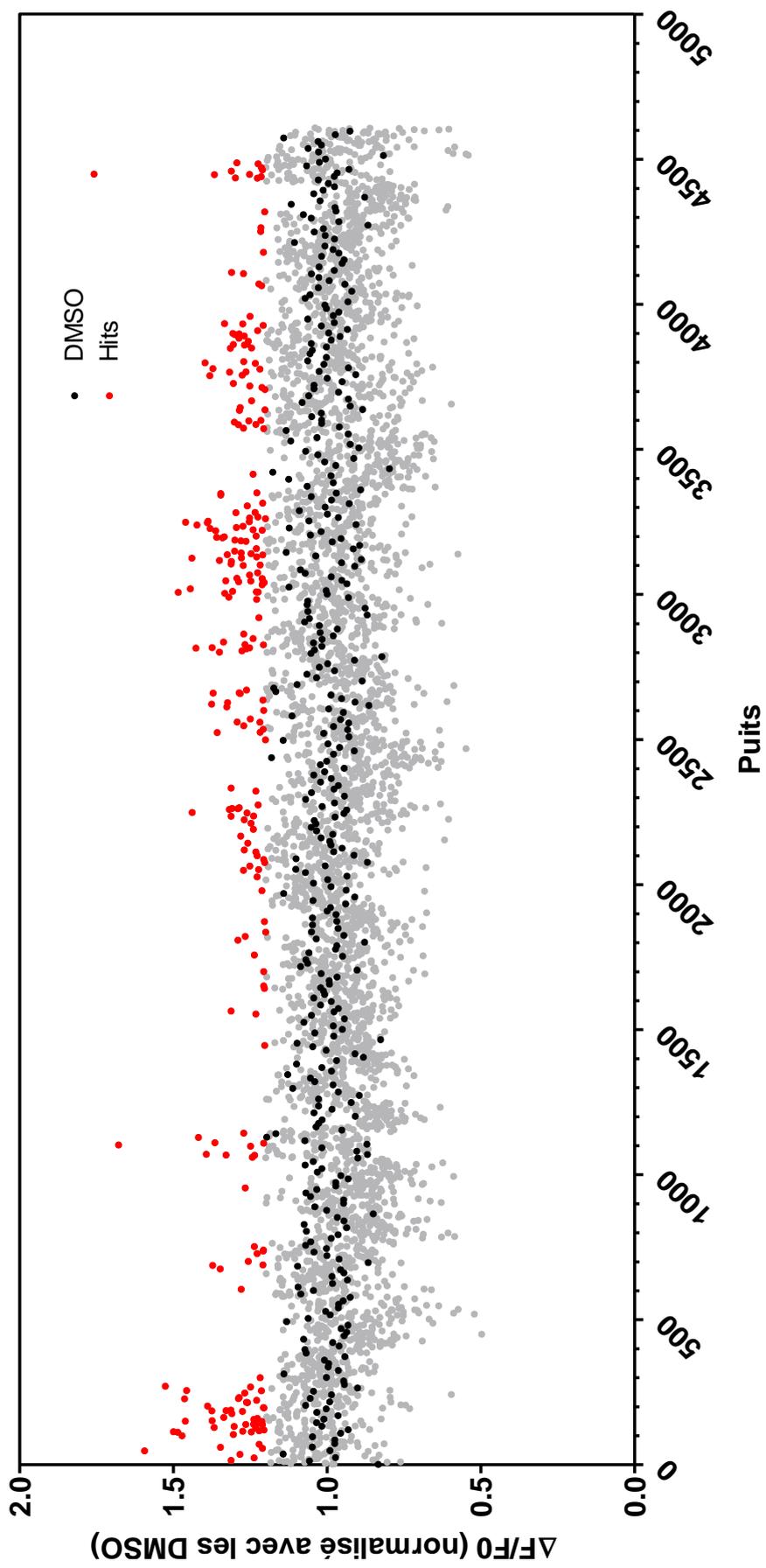
Cet outil répond également à nos inquiétudes concernant les faux positifs identifiés par le criblage préliminaire. Sur chacune des plaques que nous avons testées, le taux de faux positif prédit est proche de 2,5%. Sur un total de 1 056 molécules, on s'attend donc à obtenir environ 26 faux positifs avec un taux de 2,5%. Cela correspond exactement aux résultats que nous avons obtenus.

## 2. Criblages primaire et secondaire

L'analyse des performances du criblage préliminaire nous a incité à conserver la majorité des conditions de criblage à l'identique. Cependant, malgré toutes les améliorations apportées depuis le début du projet, la rapidité de criblage n'était toujours pas satisfaisante, en particulier dans le cadre d'une thèse.

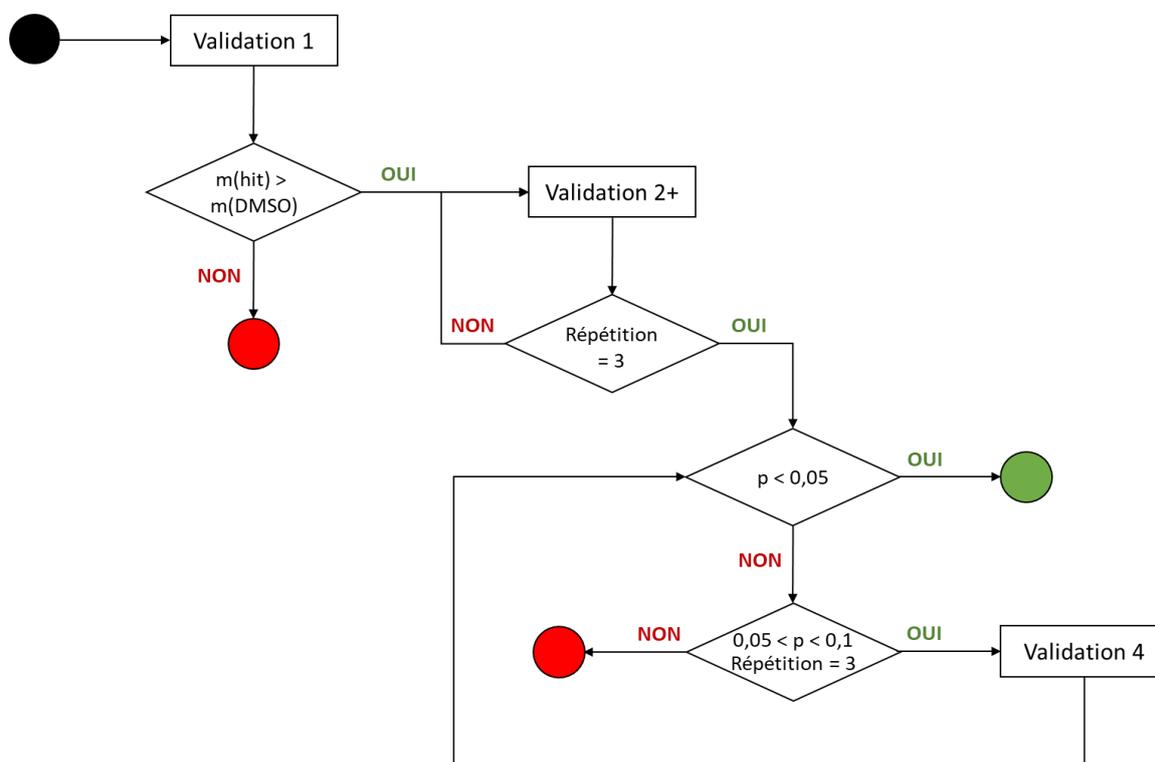
Afin d'améliorer ce paramètre, nous avons décidé de cribler les molécules restantes en traitant les cellules de chaque puits avec une combinaison de 2 molécules, chaque condition de traitement étant toujours présente en duplicat. Cela nous a permis de réduire d'un facteur 2 la durée du criblage primaire pour aboutir à 6 mois environ, alors qu'il nous aurait sinon fallu près d'un an.

Au terme du criblage primaire (figure 52), nous avons identifié 217 conditions de traitement (associant 2 molécules dans un puits) positives correspondant chacune à 2 molécules, soit 434 molécules. Par la suite, nous avons qualifié ces molécules de « *hits* potentiels » de façon individuelle car il est probable qu'une seule des deux molécules de chaque condition soit responsable de l'effet, et constitue un vrai *hit*.



**Figure 52 :** Résultats du criblage primaire sur les cellules MELA. Chaque point correspond à la moyenne des deux duplicats d'une condition de traitement (combinaison de 2 molécules). Les contrôles non traités sont représentés en gris, les puits négatifs en noir et les hits en rouge.

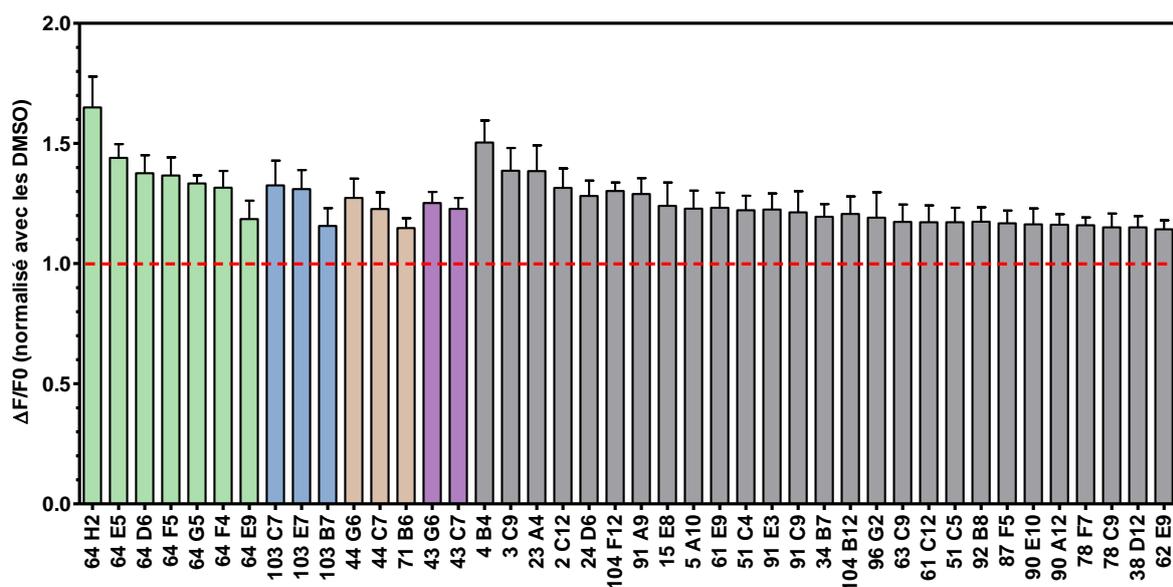
Chaque *hit* potentiel a été validé séparément lors d'un criblage secondaire avec une taille d'échantillon plus grande. Du fait du grand nombre de *hits* potentiels, il était difficilement envisageable de confirmer l'effet de chacune des molécules concernées sur  $n = 4$  puits répété 3 fois, tel que cela avait été fait lors du criblage préliminaire. La procédure utilisée pour le criblage secondaire est donc légèrement différente et est schématisée en figure 53.



**Figure 53** : Logigramme décrivant la procédure de criblage secondaire sur les cellules MELA. Un rond vert représente la validation de l'effet de la molécule ; un rond rouge représente l'abandon de la molécule.

En bref, chacune des molécules a été re-restée au moins une fois sur  $n = 4$  puits. Si la moyenne des 4 puits traités était supérieure à la moyenne des puits contrôles, l'expérience était répétée 2 fois de plus comme précédemment. Dans le cas contraire, la molécule était considérée comme un faux positif. Un hit était considéré comme validé si son effet était statistiquement significatif à l'issue des trois répétitions. Une quatrième répétition pouvait être réalisée dans les cas proches de la significativité.

Sur la base des résultats obtenus lors du criblage préliminaire, nous nous attendions à obtenir une dizaine de *hits* validés lors du criblage secondaire. Finalement, 41 *hits* (42 au total en y ajoutant 71B6, qui avait été confirmé lors du criblage préliminaire) ont été validés sur les cellules MELA (figure 54), soit quatre fois plus qu'attendu.



**Figure 54 :** Validation des hits sur les cellules MELA. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits et mises en différenciation pendant 6 jours au total. Le traitement a été appliqué pendant les dernières 48h de la différenciation et l'imagerie calcique a été réalisée avec le fluorimètre. Les molécules colorées en vert, bleu, orange ou violet sont rassemblées en « familles » présentant des similitudes de structure. Chacune des molécules représentées a été statistiquement validée. n = 12-16 puits (issus de 3 à 4 expériences indépendantes). Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA suivie d'un test post-hoc de Dunnett ; p < 0,05. Les données sont représentées en moyenne +/- SEM.

L'augmentation de l'intensité de l'effet des hits validés est très variable : de 65 +/- 12,8% (64H2) à 14,3 +/- 3,7% (62E9). Bien qu'ils aient été sélectionnés avec un seuil d'augmentation de 20% lors du criblage primaire, 18 des 42 hits ont un effet réel inférieur à ce seuil (qui est toutefois significatif).

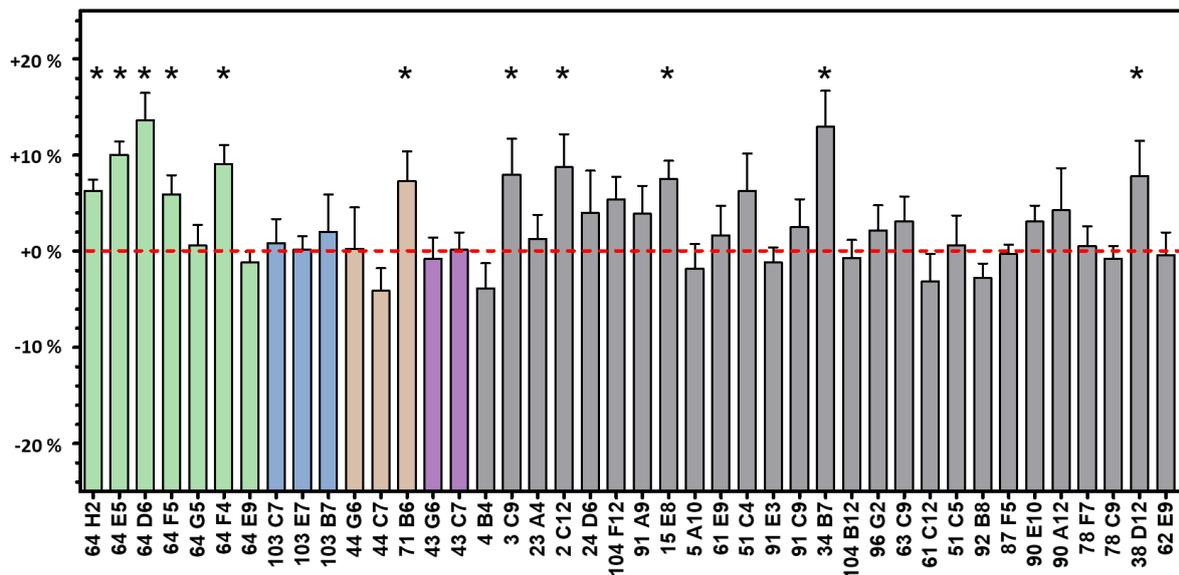
Lorsque nous nous sommes intéressés à la structure chimique de ces molécules, nous avons remarqué que certaines d'entre elles étaient structurellement proches. Ces familles structurales sont représentées par des couleurs distinctes (vert, bleu, orange et violet) sur les figures 54, 55 et 56. Les molécules représentées en gris ne peuvent pas être regroupées sur la base d'une homologie de structure.

### 3. Effet des composés sur une seconde lignée immortalisée issue d'un patient myopathe

Notre objectif était d'identifier des molécules capables d'augmenter le relâchement calcique altéré en conséquence de différentes mutations affectant l'expression de RyR1. L'efficacité ne doit donc pas dépendre de la mutation. Les *hits* identifiés sur les cellules MELA ont donc été testés sur les cellules PLA, issues d'un patient porteur d'une mutation différente du patient

« MELA », mais présente également une baisse d'expression de RyR1 associée à un défaut de relâchement calcique.

Sur cette seconde lignée, 11 des 42 *hits* améliorent significativement le relâchement calcique en réponse à la stimulation avec le KCl (110 mM). Parmi ces 11 molécules, 5 font partie de la famille structurale « verte » identifiée précédemment (figure 55).



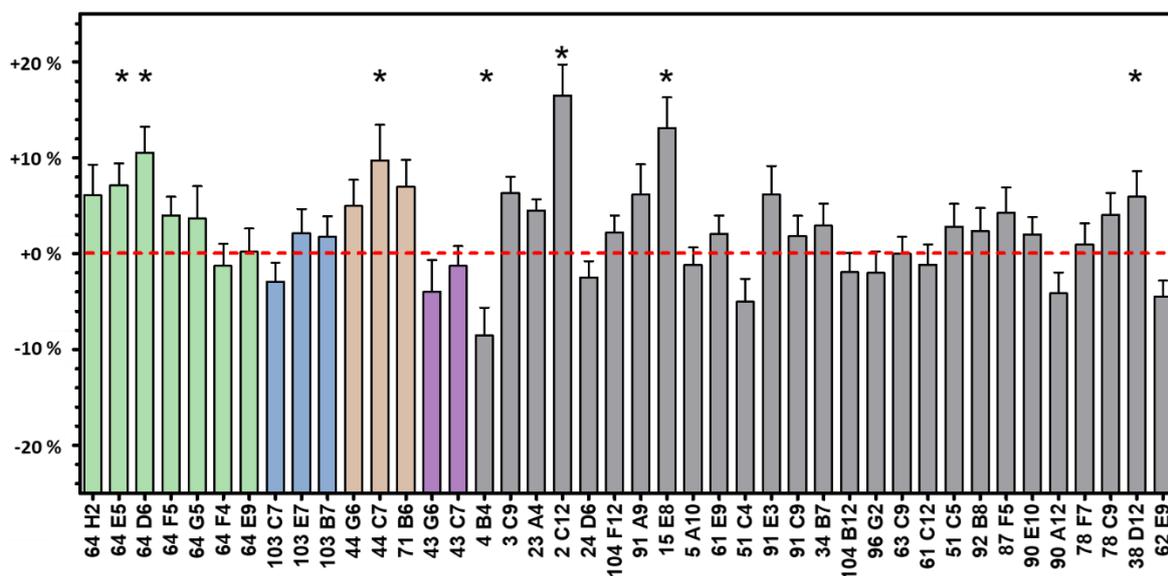
**Figure 55 :** Validation des hits sur les cellules PLA. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits et mises en différenciation pendant 6 jours au total. Le traitement a été appliqué pendant les dernières 48h de la différenciation et l'imagerie calcique a été réalisée avec le fluorimètre. La famille « verte » est particulièrement représentée parmi les molécules efficaces sur cette seconde lignée. n = 12 à 16 puits (3 à 4 expériences indépendantes). Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA suivie d'un test post-hoc de Dunnett ; (\*) p < 0,05. Les données sont représentées en moyenne +/- SEM.

Quelle que soit la molécule, l'effet observé est modeste par rapport à celui observé sur les cellules MELA : de 6 +/- 2% pour le plus faible (64F5) à 13,8 +/- 2,8% pour le plus efficace (64D6). Cela pourrait être dû au fait que le relâchement calcique des cellules PLA est moins altéré que celui des cellules MELA en absence de traitement. En effet, les cellules PLA présentent une réduction du relâchement calcique de 35% (vidéomicroscope) à 42% (fluorimètre) , contre 45% (vidéomicroscope) à 61% (fluorimètre) pour MELA. La marge d'amélioration possible serait alors plus réduite.

#### 4. Effet des composés sur des cellules humaines contrôles

Nous avons identifié 42 molécules améliorant le relâchement calcique sur les cellules musculaires, dont plusieurs pour lesquelles l'effet n'est pas dépendant de la mutation. Cela nous a amenés à nous poser la question suivante : l'effet des molécules est-il spécifique de la situation pathologique ?

Afin d'y répondre, nous avons utilisé des cellules CTRL, qui sont issues d'un sujet sain et n'ont pas de défaut de relâchement calcique. Un renforcement du relâchement calcique significatif en réponse à la stimulation KCl (110 mM) a été observé pour 5 des molécules, dont 2 font partie de la famille structurale « verte » (figure 56). Une tendance positive non significative est également retrouvée pour 3 autres molécules de cette famille.



**Figure 56 :** L'effet de plusieurs hits est indépendant de la situation pathologique et est retrouvé sur les cellules CTRL. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits et mises en différenciation pendant 6 jours au total. Le traitement a été appliqué pendant les dernières 48h de la différenciation et l'imagerie calcique a été réalisée avec le fluorimètre. n = 12 à 16 puits. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA suivie d'un test post-hoc de Dunnett ; (\*) p < 0,05. Les données sont représentées en moyenne +/- SEM.

Comme dans le cas des cellules PLA, l'effet sur les cellules CTRL est modeste par rapport à ce qui avait été observé sur les cellules MELA : de 7,2 +/- 2,2% pour le plus faible (64E5) à 16,5 +/- 3,2% pour le plus efficace (2C12).

Ce résultat est intéressant car il montre que le relâchement calcique des cellules CTRL n'est pas à son maximum et peut encore être augmenté, même si cette augmentation demeure relativement faible.

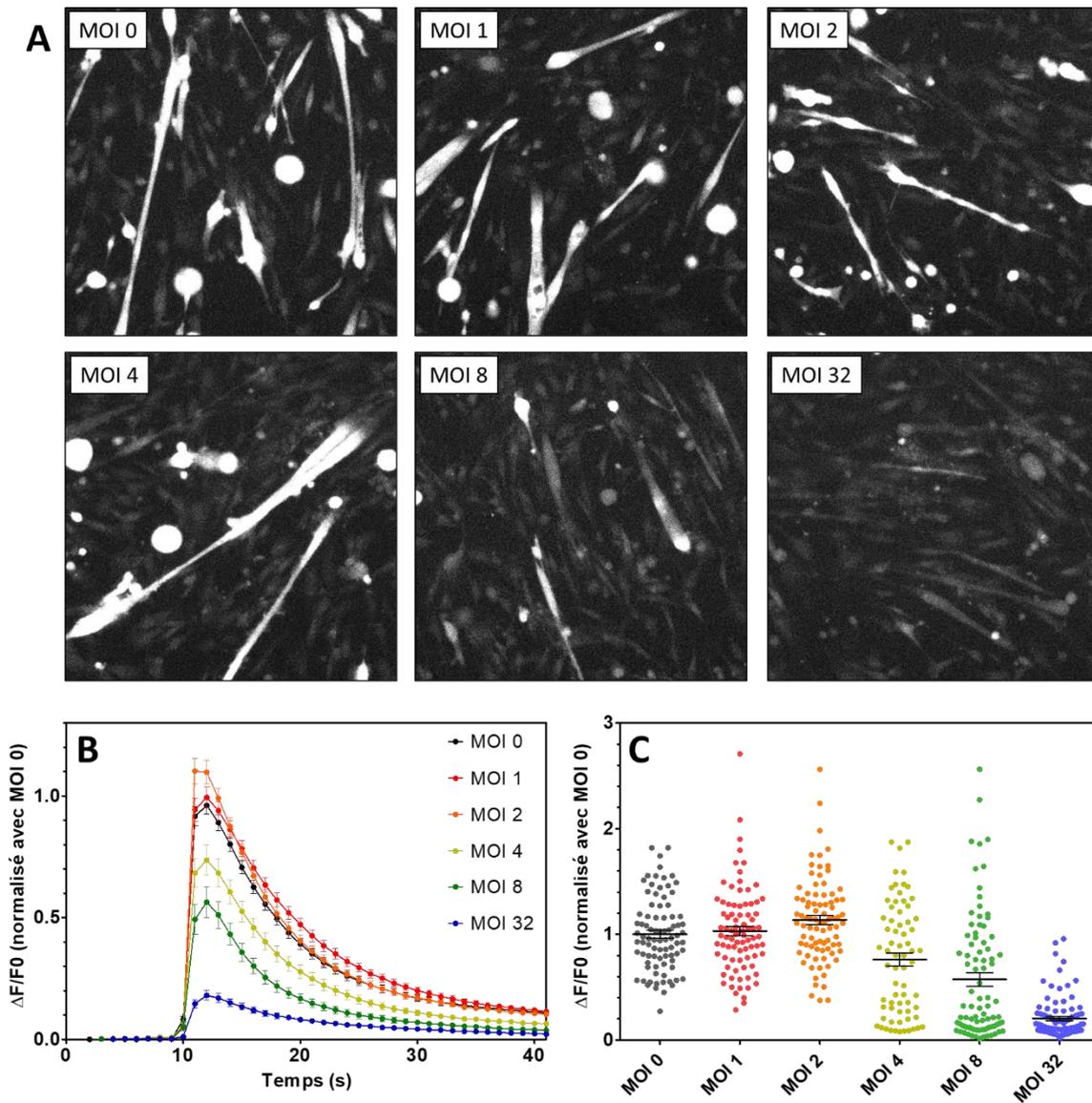
Nous avons fait le choix de ne pas faire de sélection des molécules sur la base de leur effet (ou non) sur les CTRL car notre objectif est l'augmentation du relâchement calcique dans les cellules de patients indépendamment des mutations de RyR1. Que cet effet soit ou non retrouvé sur les cellules CTRL est purement informatif à ce stade du projet.

## 5. Effet des composés sur des cellules murines primaires

Le développement d'une molécule à visée thérapeutique pour l'homme inclut obligatoirement des tests précliniques sur l'animal, qui est le plus souvent la souris. Dans notre cas, nous prévoyons d'évaluer l'efficacité de nos molécules *in vivo* par le biais de tests d'agrippement sur notre modèle murin RyR1-Rec, comme cela a été fait pour le fulvestrant.

En amont de ces futurs tests sur la souris *in vivo*, il est donc nécessaire de vérifier que nos molécules sont bien efficaces sur ce modèle *in vitro*. Nous avons donc évalué l'effet de nos *hits* sur des cellules primaires issues de souris RyR1-Rec. Ces mesures ont été réalisées sur le microscope car ces myotubes couvrent une surface très réduite par rapport aux lignées immortalisées humaines du fait d'un nombre important de fibroblastes : la lecture sur le fluorimètre est donc moins adaptée.

Afin de nous rapprocher autant que possible de la situation des cellules de patients, l'expression de RyR1 a été baissée dans ces cellules de manière à obtenir une baisse de relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl d'environ 25% et 50%, ce qui est comparable aux cellules PLA et MELA. Un nouveau lot d'adénovirus Cre ayant été acheté depuis cette étude de la relation entre l'expression et la fonction de RyR1, nous avons d'abord défini la quantité de ce nouveau lot d'adénovirus nécessaire à la baisse du relâchement calcique recherchée (figure 57).

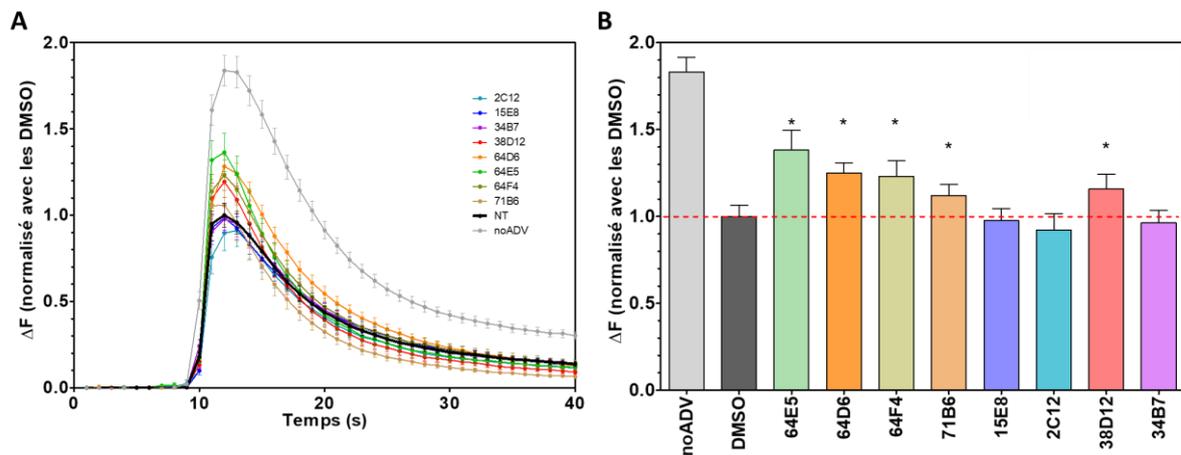


**Figure 57 :** Mesure du relâchement calcique des myotubes RyR1-Rec en réponse à la stimulation KCl en fonction de la quantité d'adénovirus Cre. A) Clichés des myotubes en microscopie à fluorescence avec un filtre GFP au moment du pic de relâchement calcique. B) Evolution de la fluorescence des myotubes en réponse à la stimulation KCl à  $t = 10s$ . C) Amplitude du pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl. Chaque point représente un myotube.  $n = 69$  à 90 myotubes (3 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

Les cellules RyR1-Rec ont été transduites avec l'ADV Cre à MOI 1, 2, 4, 8 ou 32 puis mises en différenciation pendant 48h à 72h. L'évolution de la fluorescence en réponse à la stimulation KCl (110mM) a ensuite été étudiée. Les conditions pour lesquelles nous avons obtenu un défaut de relâchement calcique proche de ce que nous attendions sont MOI 4, avec une baisse de  $24 \pm 6\%$ , et MOI 8, avec une baisse de  $44 \pm 6\%$ . Nous avons choisi d'utiliser une MOI de 6 pour la suite de l'expérience afin d'obtenir une situation intermédiaire.

Dans ces conditions, nous avons évalué l'effet de 8 des 11 molécules qui étaient efficaces à la fois sur les cellules MELA et PLA (figure 58). Parmi les 3 restantes, nous avons choisi d'écartier 2 des molécules les moins efficaces de la famille « verte » car il nous semblait superflu d'inclure toutes les molécules de cette famille déjà très représentée. Une troisième molécule, 3C9 a également été écartée de ces tests car elle s'est révélée instable au cours du temps.

Les cellules RyR1-Rec ont été transduites avec l'ADV Cre à MOI 6 puis traitées dès la mise en différenciation pendant 48h à 72h.



**Figure 58 :** Le pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl des myotubes RyR1-Rec est augmenté par 5 des 8 molécules. A : Evolution de la fluorescence des myotubes en réponse à la stimulation KCl à t = 10s. B : Amplitude du pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl. n = 65 à 109 myotubes. (\*) : p < 0,05. Les données sont représentées en moyenne +/- SEM.

Sur les 8 molécules testées, 5 améliorent la réponse à la stimulation KCl dans les myotubes murines RyR1-Rec dont l'expression de RyR1 a été réduite. Ces molécules sont 65E5 (38,4 +/- 11,2%), 64D6 (25,0 +/- 5,9%), 64F4 (23,1 +/- 9%), 71B6 (12,0 +/- 6,4%) et 38D12 (15,8 +/- 8,5%).

A ce stade de l'étude, nous avons donc identifié 5 molécules capables d'augmenter le relâchement calcique *in vitro* sur deux lignées de cellules musculaires issues de patients myopathes porteurs de mutations différentes, ainsi que sur des cellules musculaires murines dont l'expression de RyR1 est réduite. Ces molécules sont donc susceptibles d'améliorer le relâchement calcique dans les situations impliquant un défaut d'expression de RyR1 indépendamment de la mutation et sont compatibles avec une étude préclinique plus poussée chez la souris.

Nous avons choisi de poursuivre l'étude avec les deux molécules ayant l'effet le plus fort sur les différents modèles et n'étant pas apparentées. Notre choix s'est donc porté sur les molécules 64E5 et 38D12 (64D6 et 64F4 faisant partie de la famille structurelle « verte », donc apparentées à 64E5).

## 6. Caractérisation du mécanisme d'action des molécules

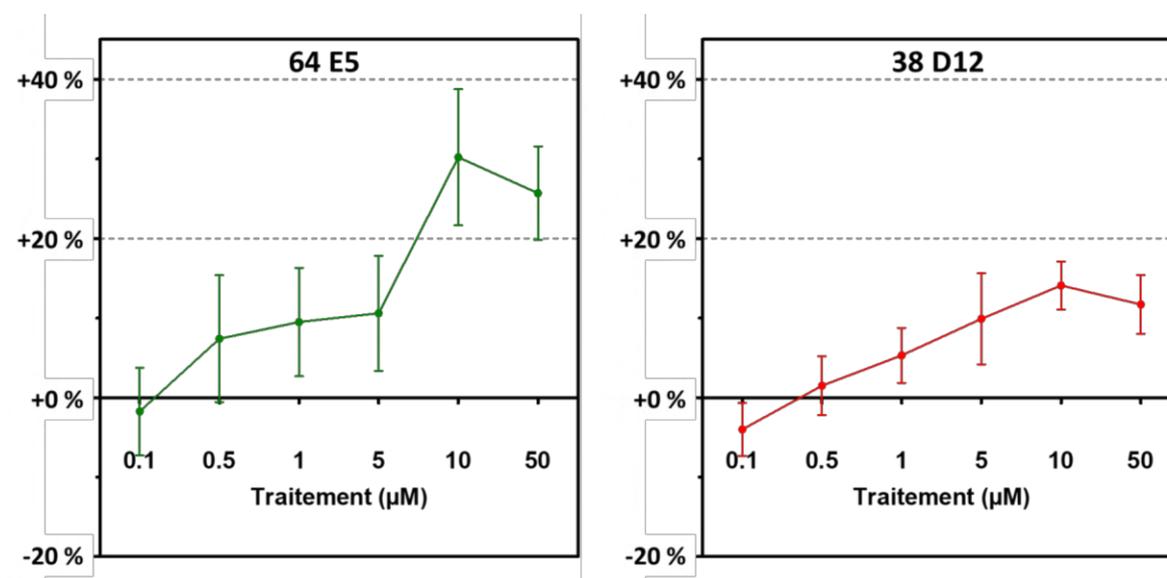
Une fois les molécules sélectionnées, nous avons cherché à décrire plus précisément leur effet sur le relâchement calcique, particulièrement en ce qui concerne des questions de dose et de cinétique.

En parallèle, nous nous sommes également interrogés sur le ou les mécanisme(s) responsable(s) de l'effet des molécules, en particulier en ce qui concerne l'implication de certains mécanismes liés aux flux calciques et l'expression de protéines qui y sont liées.

Sauf indication contraire, ces différentes étapes de caractérisation ont été réalisées sur les cellules MELA car elles sont le modèle sur lequel l'effet des molécules est le plus prononcé tout en évitant les difficultés liées aux cultures de cellules primaires murines.

### a. Relation dose-réponse

En premier lieu, nous avons déterminé la dose pour laquelle l'efficacité des molécules est maximale. Les cellules MELA ont été traitées avec les molécules 64E5 et 38D12 à différentes concentrations : 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M et 50  $\mu$ M. L'intensité de la fluorescence en réponse à la stimulation KCl (110 mM) a ensuite été mesurée avec le fluorimètre.



**Figure 59 :** Détermination de la relation dose-réponse pour les molécules 64E5 (à gauche) et 38D12 (à droite) sur les cellules MELA. Les cellules MELA ont été ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 38D12 et 64E5 à des concentrations de 0,1  $\mu$ M à 50  $\mu$ M pendant 48h. L'imagerie calcique a été réalisée avec le vidéomicroscope. Dans les deux cas, la dose optimale est 10  $\mu$ M. n = 12 puits (3 expériences indépendantes). Les données sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM.

Pour 64E5, une amélioration modeste est observée à partir de 0,5 $\mu$ M ; pour 38D12, cette amélioration est observée à partir de 1 $\mu$ M seulement. Pour les deux molécules, la concentration optimale est 10 $\mu$ M, avec une augmentation de la fluorescence de 30,2 +/- 8,5% pour 64E5 et de 14,1 +/- 3,0% pour 38D12 (figure 59). Dans les deux cas, l'efficacité baisse légèrement à 50 $\mu$ M mais reste conséquente : 25,7 +/- 5,9% pour 64E4 et 11,7 +/- 3,7% pour 38D12.

Ces résultats sont rassurants à deux égards. Dans les deux cas, la concentration optimale est celle qui a été utilisée lors du criblage, ce qui confirme qu'une telle concentration était pertinente. De plus, l'existence de plusieurs doses efficaces accroît la robustesse de l'effet de ces molécules.

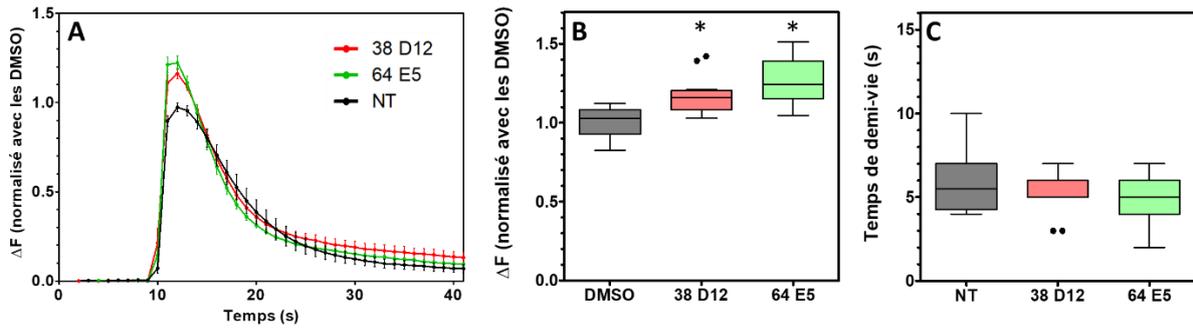
### *b. Cinétique du relâchement calcique*

Jusqu'ici, nous avons associé la mesure de fluorescence à l'amplitude du pic de relâchement calcique. En réalité, du fait de la durée de la mesure (4 secondes), cette valeur dépend à la fois de l'amplitude du pic et, dans une moindre mesure, de sa forme. Une valeur augmentée peut résulter de l'augmentation du pic maximum ou d'un délai avant la baisse.

Il est important de faire la différence entre ces deux composantes car elles correspondent à deux parties différentes du flux calcique. En effet, le relâchement de calcium du RS se fait en deux temps : l'ouverture de RyR1, et la libération de calcium vers le cytosol qui en découle, correspondent à la phase ascendante de la courbe. RyR1 est ensuite inactivé de manière calcium-dépendante en parallèle de la recapture du calcium dans le RS par SERCA, ce qui correspond à la phase descendante de la courbe.

De façon simplifiée, l'amplitude du pic de relâchement calcique reflète le débit du relâchement calcique pendant cette première phase. La largeur du pic, au contraire, dépend de l'inactivation de RyR1 et de la recapture du calcium pendant la seconde phase. L'association de ces deux paramètres détermine la quantité de calcium totale relâchée, qui est mesurée par le biais de l'aire sous la courbe.

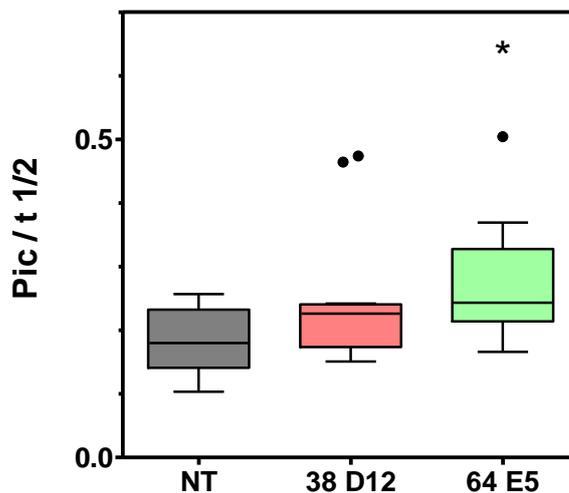
Nous avons donc mesuré le relâchement calcique des cellules MELA traitées avec 38D12 et 64E5 avec le vidéomicroscope afin de visualiser l'intégralité de la courbe de relâchement calcique et ainsi vérifier quelle composante du flux calcique est modifiée. L'évolution de la fluorescence en réponse à la stimulation KCl a cette fois-ci été mesurée avec le vidéomicroscope afin de quantifier l'amplitude du pic et le temps de demi-décroissance (figure 60).



**Figure 60 :** Les molécules 38D12 et 64E5 augmentent l’amplitude du relâchement calcique sans en modifier la demi-décroissance. Les cellules MELA ont été ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 38D12 et 64E5 à une concentration de 10 $\mu$ M pendant 48h. L’imagerie calcique a été réalisée avec le vidéomicroscope. A) Evolution de la fluorescence en réponse à la stimulation KCl à t = 10s. B) Amplitude du pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl. C) temps de demi-décroissance du pic de relâchement calcique. n = 12 à 15 puits. Les données de A sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM ; les données de B et C sont présentées en boîtes de Tukey ; les points représentent les *outliers*. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett ; (\*) p < 0,05.

Pour les deux molécules, on observe bien une augmentation de l’amplitude du pic : 17,3  $\pm$  0,3% pour 38D12 (p < 0,05) et 26,5  $\pm$  4,1% pour 64E5 (p < 0,05). Dans un cas comme dans l’autre, le temps de demi-décroissance du pic n’est pas significativement modifiée.

Nous observons cependant un affinement du pic de relâchement calcique, dont le temps de demi-décroissance (t  $\frac{1}{2}$ ) ne rend pas compte. Afin de le mettre en évidence, nous avons alors calculé le ratio pic / t  $\frac{1}{2}$  (figure 61).



**Figure 61 :** Représentation du ratio pic/t  $\frac{1}{2}$  du relâchement calcique des cellules MELA traitées avec 38D12 et 64E5 pendant 48h. n = 12 à 15 puits. Les données sont présentées en boîtes de Tukey ; les points représentent les *outliers*. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett ; (\*) p < 0,05.

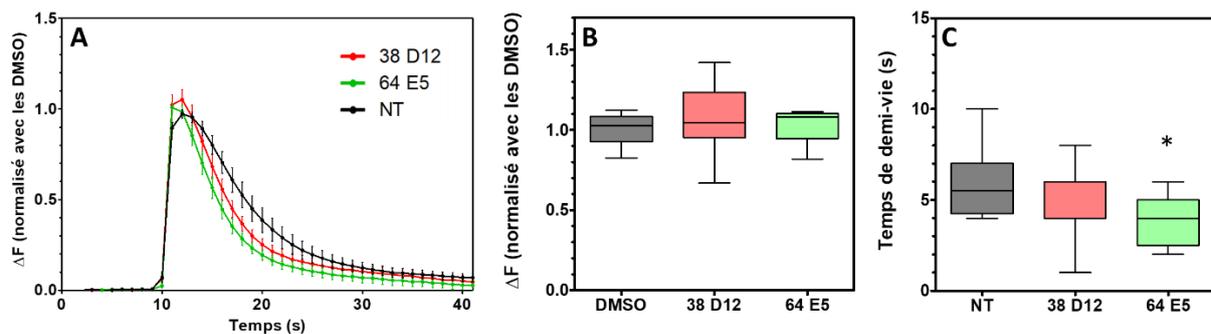
Le ratio pic/t  $\frac{1}{2}$  est de 0,18 +/- 0,01 s<sup>-1</sup> pour les cellules MELA non traitées. Il n'est pas significativement différent pour les cellules traitées avec 38D12 (0,24 +/- 0,03 s<sup>-1</sup> ; p = 0,07) mais est augmenté par le traitement avec 64E5 (0,30 +/- 0,04 s<sup>-1</sup> ; p < 0,05). Cela met donc bien en évidence une accélération de la recapture du calcium dans les cellules traitées avec 64E5, puisque plus de calcium est recapturé dans le même temps.

Les deux molécules augmentent donc le débit du flux calcique sortant du RS. Dans le cas de 64E5, cette augmentation du débit sortant est associée à une augmentation de la recapture du calcium vers le RS. L'augmentation de l'aire sous la courbe est associée à l'augmentation de la hauteur du pic. En conséquence, les deux molécules augmentent également la quantité totale de calcium relâchée, puisqu'une plus grande quantité de calcium est libérée dans le même temps. On peut en déduire que 38D12 agit plutôt sur la phase de libération du calcium, alors que 64E5 agit à la fois sur la phase de libération du calcium et sur la recapture vers le RS.

### c. Effet avec un traitement court

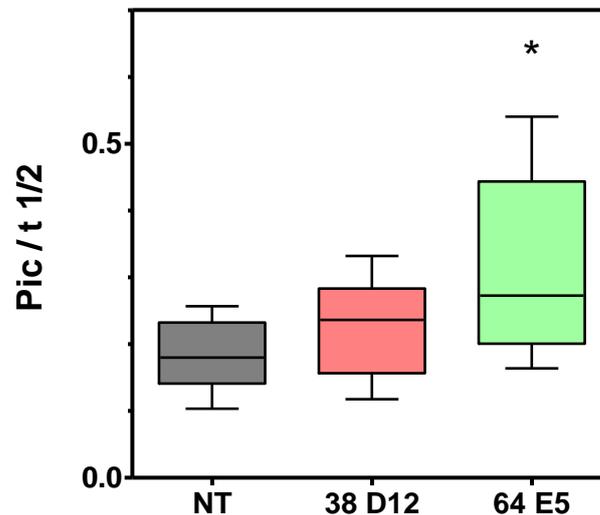
Dès le criblage préliminaire, nous avons décidé de traiter les cellules pendant 48 heures afin d'identifier à la fois des molécules dont l'effet serait rapide à se mettre en place, *a priori* grâce à une interaction directe avec une cible protéique, et des molécules ayant un effet plus indirect nécessitant un temps d'action plus long.

Afin de déterminer quel type de mécanisme est en jeu, nous avons vérifié si leur effet est conservé avec un traitement aigu. Nous avons choisi de traiter les cellules pendant 3h avant l'imagerie calcique (figure 62).



**Figure 62** : Les molécules 38D12 et 64E5 n'améliorent pas le relâchement calcique avec un traitement aigu de 3h. Les cellules MELA ont été ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 38D12 et 64E5 à une concentration de 10 $\mu$ M pendant 3h. L'imagerie calcique a été réalisée avec le vidéomicroscope. A : Evolution de la fluorescence en réponse à la stimulation KCl à t = 10s. B : Amplitude du pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl. C : temps de demi-décroissance du pic de relâchement calcique. n = 12 à 15 puits. Les données de A sont présentées en moyenne +/- SEM ; les données de B et C sont présentées en boîtes de Tukey ; les points représentent les *outliers*. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett ; (\*) p < 0,05.

Pour les deux molécules, l'augmentation du relâchement calcique disparaît avec le traitement court de 3h. De manière inattendue, la cinétique du relâchement calcique est raccourcie par le traitement aigu avec 64E5 ( $t_{1/2}$  NT : 5,88 +/- 0,50 s ;  $t_{1/2}$  64 E5 : 3,92 +/- 0,39 s,  $p < 0,05$ ), ce qui suggère une accélération de la recapture du calcium vers le RS. Comme précédemment, nous avons calculé le ratio pic /  $t_{1/2}$  pour nous en assurer (figure 63).



**Figure 63** : Représentation du ratio pic/ $t_{1/2}$  du relâchement calcique des cellules MELA traitées avec 38D12 et 64E5 pendant 3h.  $n = 12$  à 15 puits. Les données sont présentées en boîtes de Tukey ; les points représentent les *outliers*. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett ; (\*)  $p < 0,05$ .

De la même manière qu'avec le traitement de 48h, le traitement de 3h avec 38D12 ne modifie pas le *ratio* pic/ $t_{1/2}$  par rapport à la situation non traitée (NT : 0,18 +/- 0,01  $s^{-1}$  ; 38D12 : 0,22 +/- 0,02  $s^{-1}$  ;  $p = 0,13$ ). Cependant, le *ratio* est augmenté par le traitement de 3h avec 64E5 (0,31 +/- 0,04 ;  $p < 0,05$ ). Ces résultats confirment l'accélération de la recapture du calcium vers le RS par 64E5.

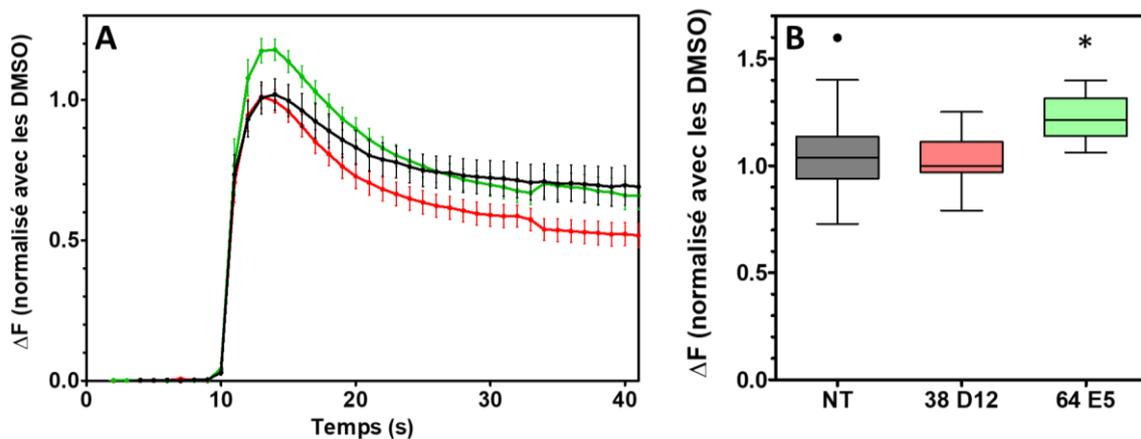
Le mécanisme responsable de l'amélioration du relâchement calcique par le traitement avec 38D12 et 64E5 nécessite plus de 3 heures, ce qui suggère un mécanisme indirect qui pourrait impliquer plusieurs cascades de signalisation qui devront être élucidées.

Dans le cas de 64E5, l'accélération de la recapture du calcium vers le RS est déjà présente avec un traitement court de 3h alors que l'augmentation du débit sortant du RS n'est présente qu'avec le traitement long : cela pourrait indiquer que cette molécule agit en réalité sur plusieurs voies.

#### d. Effet sur le couplage entre DHPR et RyR1

Dans le muscle squelettique, le couplage fonctionnel entre DHPR et RyR1 est indispensable au couplage excitation-contraction et au relâchement de calcium du RS vers le cytosol. Nous nous sommes donc demandé si les deux molécules pouvaient agir directement ou indirectement sur ce couplage, pour conduire à une libération de calcium plus efficace.

Dans le cas de cellules en culture, la stimulation avec le KCl provoque une dépolarisation de la membrane plasmique. De la même manière qu'en conditions physiologiques, cette dépolarisation active DHPR qui active à son tour RyR1, ce qui conduit à la libération de calcium vers le cytosol. Afin de répondre à notre question, nous avons quantifié la réponse à une stimulation directe de RyR1 avec du 4CMC (0,5mM), sans implication de DHPR ou du couplage DHPR/RyR1 (figure 64).

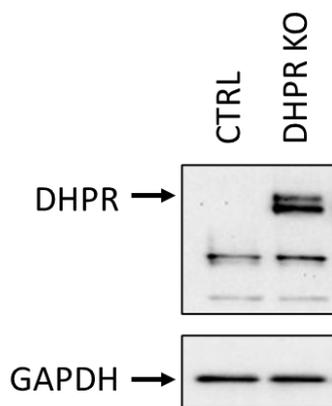


**Figure 64 :** L'effet de la molécule 64 E5 est maintenu avec une stimulation directe de RyR1. Les cellules MELA ont été ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 38 D12 et 34 E5 à une concentration de 10 $\mu$ M pendant 48h. L'imagerie calcique a été réalisée avec le vidéomicroscope. A : Evolution de la fluorescence des myotubes en réponse à la stimulation 4CMC à  $t = 10$ s. B : Amplitude du pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation 4CMC.  $n = 11$  à 15 puits. Les données de A sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM ; les données de B sont présentées en boîtes de Tukey ; les points représentent les *outliers*. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett ; (\*)  $p < 0,05$ .

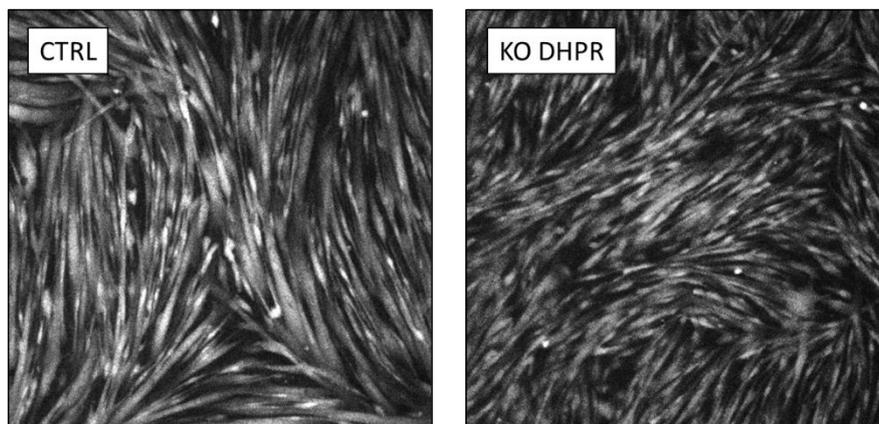
L'effet de 64E5 est maintenu avec la stimulation 4CMC : on observe une augmentation de l'amplitude du pic de relâchement calcique de 22,0  $\pm$  2,9% ( $p < 0,05$ ). En revanche, cette augmentation n'est pas retrouvée avec 38D12.

Cela suggère que 38D12 agit soit au niveau du couplage fonctionnel DHPR/RyR1, soit en amont de ce couplage (par exemple en modifiant la sensibilité de DHPR à la dépolarisation). 64E5 agit au contraire en aval de ce couplage, puisque l'activation de DHPR n'est pas nécessaire à son effet. Quelles que soient les voies impliquées, ces deux molécules ont donc des mécanismes d'action différents.

Nous nous sommes ensuite demandé si 64E5 pouvait augmenter le relâchement calcique en l'absence totale de DHPR. Pour cela, nous avons utilisé des cellules dont l'expression de DHPR a été abolie par CRISPR-Cas9. Dans ces cellules, issues de la lignée CTRL, une délétion de 325 paires de bases au niveau de l'exon 40 et de l'intron 40 de *CACNA1S* conduit à une absence totale d'expression de DHPR qui a été vérifiée par western blot (figure 65). Ces cellules n'ont cependant pas été caractérisées en détail.



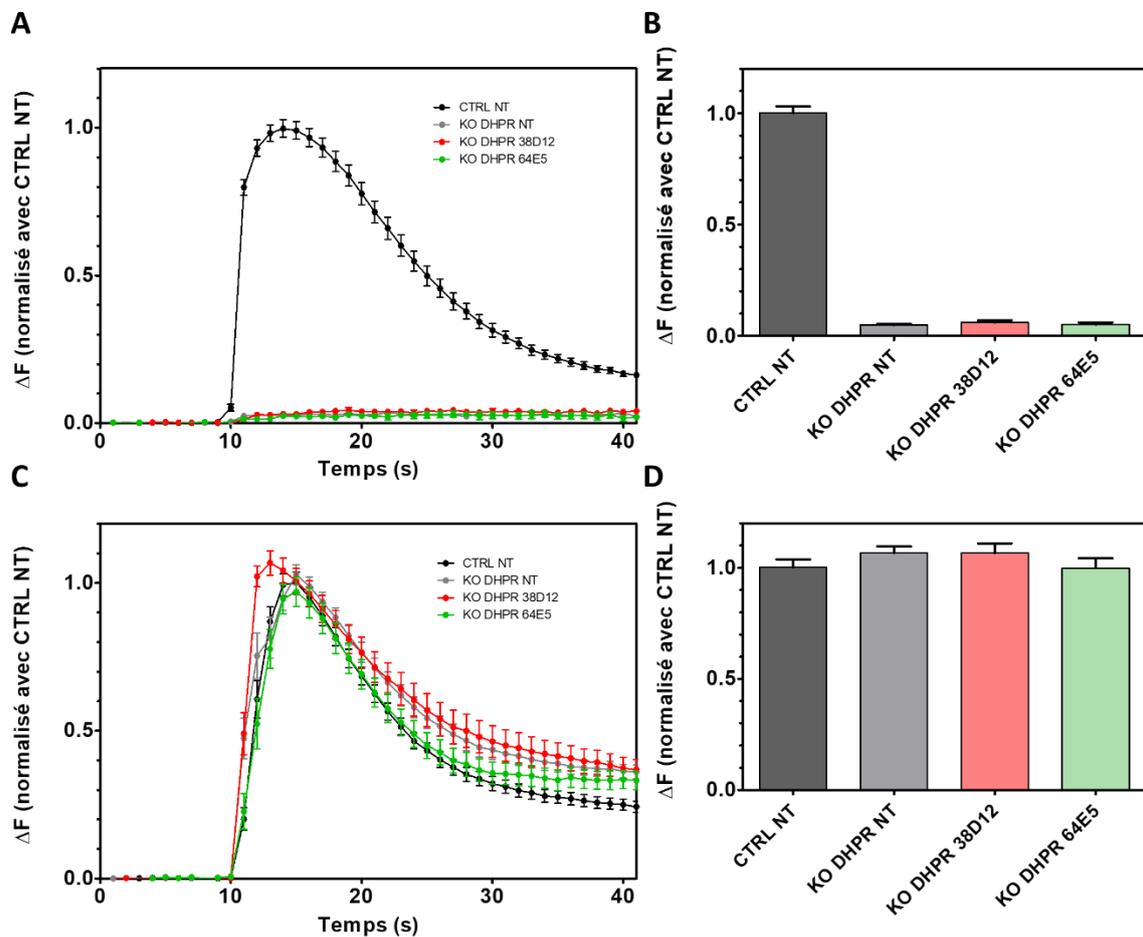
**Figure 65** : Confirmation de l'abolition de l'expression de DHPR dans les cellules DHPR KO après 6 jours de différenciation par western blot. L'expression a été normalisée sur l'expression de GAPDH. (Expérience réalisée par Mélanie Fourgeaud, stagiaire Master 2).



**Figure 66** : Comparaison de l'aspect morphologique des myotubes CTRL et DHPR KO après 6 jours de différenciation. Les cellules DHPR KO forment des myotubes fins et très courts.

Avant l'imagerie calcique, nous avons immédiatement remarqué une différence de morphologie entre les cellules CTRL et les cellules KO DHPR (figure 66). En effet, les cellules KO DHPR semblent à première vue peu différenciées et forment des myotubes très courts, avec peu de fusion des myoblastes. Cette morphologie n'a pas été modifiée par un allongement du temps de différenciation. Il est possible que l'absence de DHPR ou les modifications induites par CRISPR-Cas9 et par le processus de clonage provoquent des anomalies de la différenciation chez ces cellules.

Nous avons malgré tout analysé l'effet de nos molécules sur cette population KO DHPR (figure 67).



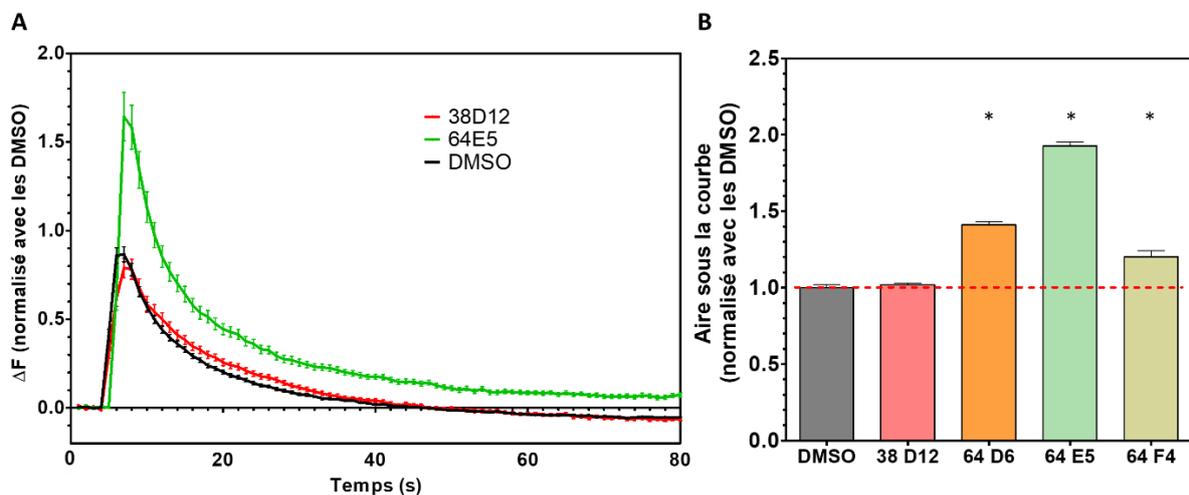
**Figure 67** : Les molécules ne permettent pas de restaurer le couplage excitation-contraction en absence de DHPR. Les cellules CTRL et DHPR KO ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 38D12 et 64E5 à une concentration de 10 $\mu$ M pendant 48h. L'imagerie calcique a été réalisée avec le vidéomicroscope. A : Evolution de la fluorescence des myotubes en réponse à la stimulation KCl (110mM) à t = 10s. B : Amplitude du pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl. C : Evolution de la fluorescence des myotubes en réponse à la stimulation 4CMC (0,5mM) à t = 10s. D : Amplitude du pic de relâchement calcique en réponse à la stimulation 4CMC. n = 45 à 51 myotubes (2 expériences indépendantes). Les données sont représentées en moyenne +/- SEM.

Comme cela était attendu, le relâchement calcique des cellules KO DHPR est proche de zéro en réponse à la stimulation KCl (0,04 +/- 0,01) et comparable à celui des cellules CTRL en réponse à la stimulation 4CMC (1,06 +/- 0,03). Le traitement n'a pas modifié le relâchement calcique de ces cellules, et ce pour les deux composés. Les deux molécules ne sont donc pas capables de restaurer le couplage excitation-contraction, et l'activation de RyR1 en réponse à la dépolarisation, en absence de DHPR.

e. Effet sur les stocks calciques du réticulum sarcoplasmique

Nous avons précédemment montré que 64E5 augmente le débit du flux calcique sortant du RS et agit fonctionnellement en aval du couplage DHPR/RyR1. Cela pourrait correspondre à un effet sur RyR1 lui-même : 64E5 provoquerait une hausse d'expression de RyR1, ou une modification du canal lui permettant de mieux laisser passer le calcium en réponse à la stimulation. Mais le mécanisme d'action pourrait aussi impliquer une augmentation des stocks calciques du RS : en effet, une telle augmentation accentuerait le gradient de concentration du calcium entre le RS et le cytosol et augmenterait le débit du flux calcique sortant du RS en conséquence.

Nous avons donc évalué la quantité totale de calcium libérable par le RS. Pour les besoins de cette expérience, les cellules MELA ont été mises en culture sur des plaques 24 puits. Après différenciation et traitement, l'imagerie calcique a été réalisée avec des paramètres permettant de limiter l'entrée de calcium extracellulaire et d'évaluer uniquement le flux de calcium du RS vers le cytosol. Les puits ont été rincés avec du milieu de Krebs sans calcium afin d'éviter une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire. Les cellules ont été stimulées avec une solution contenant à la fois de la thapsigargine, qui inhibe la recapture du calcium vers le RS par le biais de la pompe SERCA, et de la 4CMC, qui active RyR1 et permet de vider les stocks calciques. Le *readout* que nous avons choisi est l'aire sous la courbe, qui rend compte de la quantité totale de calcium relâchée (figure 68).



**Figure 68** : Mesure des stocks calciques du RS dans les cellules MELA après traitement avec 38D12 et 64E5. Les cellules CTRL et DHPR KO ont été ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 38D12 et 64E5 à une concentration de 10 $\mu$ M pendant 48h. A : Evolution de la fluorescence des myotubes lors de la vidange des stocks avec le 4CMC (0,5mM) et la thapsigargine (10 $\mu$ M). B : Aire sous la courbe. n = 57 à 100 myotubes (issus de 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett ; (\*) p < 0,05.

Le traitement avec 38D12 ne modifie pas la quantité de calcium pouvant être libérée du RS. Au contraire, les stocks calciques sont presque doublés dans les cellules traitées avec 64E5, avec une augmentation de 92,6 +/- 2,7% ( $p < 0,05$ ). Le mécanisme d'action de 64E5 implique donc bien une augmentation des stocks calciques mobilisables du RS.

Une augmentation des stocks calciques est également retrouvée après traitement avec deux autres molécules apparentées à 64E5, 64D6 (augmentation de 41,0 +/- 1,9% ;  $p < 0,05$ ) et 64F4 (augmentation de 20,2 +/- 3,9% ;  $p < 0,05$ ), bien que l'effet soit plus modeste avec ces deux molécules. Cela suggère que l'augmentation des stocks calciques est un mécanisme commun à cette famille de molécules.

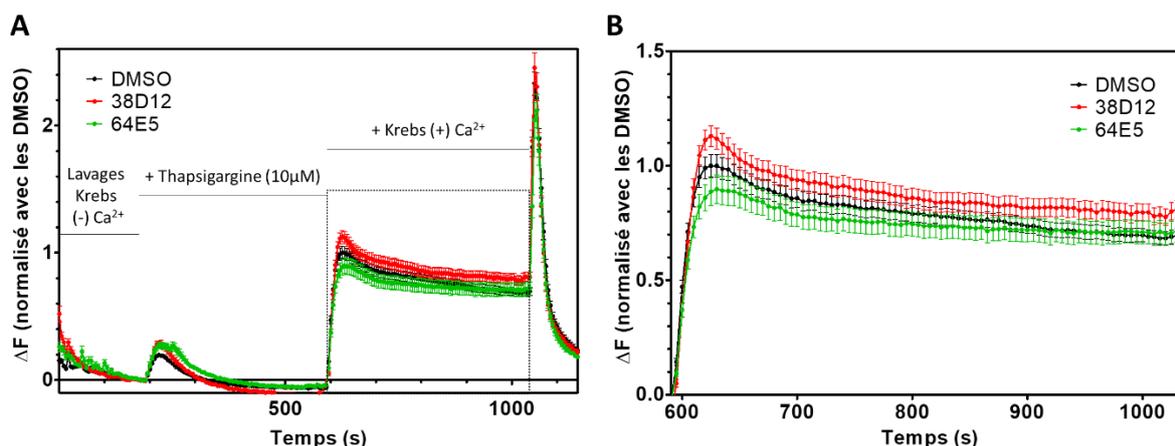
#### *f. Effet sur l'activation du SOCE*

Nous avons montré que l'effet de la molécule 64E5, ainsi que des molécules apparentées, implique une modification des stocks calciques. Le *store-operated calcium entry* (SOCE) est une voie d'entrée du calcium extracellulaire qui est activée par la déplétion des stocks calciques du RS.

Notre hypothèse était que l'augmentation des stocks calciques après traitement avec 64E5 pourrait passer par une altération du SOCE, qui impliquerait par exemple une entrée de calcium par STIM1/ORAI1.

La mesure des flux SOCE a été réalisée dans des conditions proches de celles précédemment appliquées pour la mesure des stocks calciques du RS, soit en absence de calcium extracellulaire. La différence majeure est que les stocks ont été vidés par l'ajout d'une solution de thapsigargine (10 $\mu$ M) sans stimulation avec le 4CMC. Il n'est en effet pas possible de mesurer l'activation du SOCE en même temps que la mesure des stocks calciques dans ces conditions car le 4CMC bloque l'entrée de calcium en inhibant l'activité des canaux ORAI de manière réversible (Zeng et al. 2014). En présence de 4CMC, l'entrée de calcium dans le cytosol à partir du milieu extracellulaire était bien plus faible qu'attendu et se déclenchait après un délai de plusieurs dizaines de secondes après l'ajout de calcium externe.

En absence de 4CMC, le flux calcique sortant du RS est donc uniquement causé par la fuite de calcium à travers RyR1, qui ne peut pas être compensé par SERCA puisqu'elle est bloquée par la thapsigargine. Une fois les stocks calciques du RS suffisamment déplétés, le mécanisme de SOCE s'active et son activité peut être évaluée en mesurant le flux calcique entrant au moment de l'ajout de calcium externe (figure 69)



**Figure 69** : Le traitement avec 38D12 et 64E5 ne modifie pas l'activité SOCE. Les cellules MELA ont été ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 38D12 et 64E5 à une concentration de 10µM pendant 48h. A : Déroulement de la mesure de l'activité SOCE par imagerie calcique. B : Agrandissement de la partie de l'expérience correspondant à la mesure du flux de calcium du milieu extracellulaire vers le cytosol (qui correspond également à l'encadré en pointillés en A). n = 120 à 182 myotubes (issus de 3 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett.

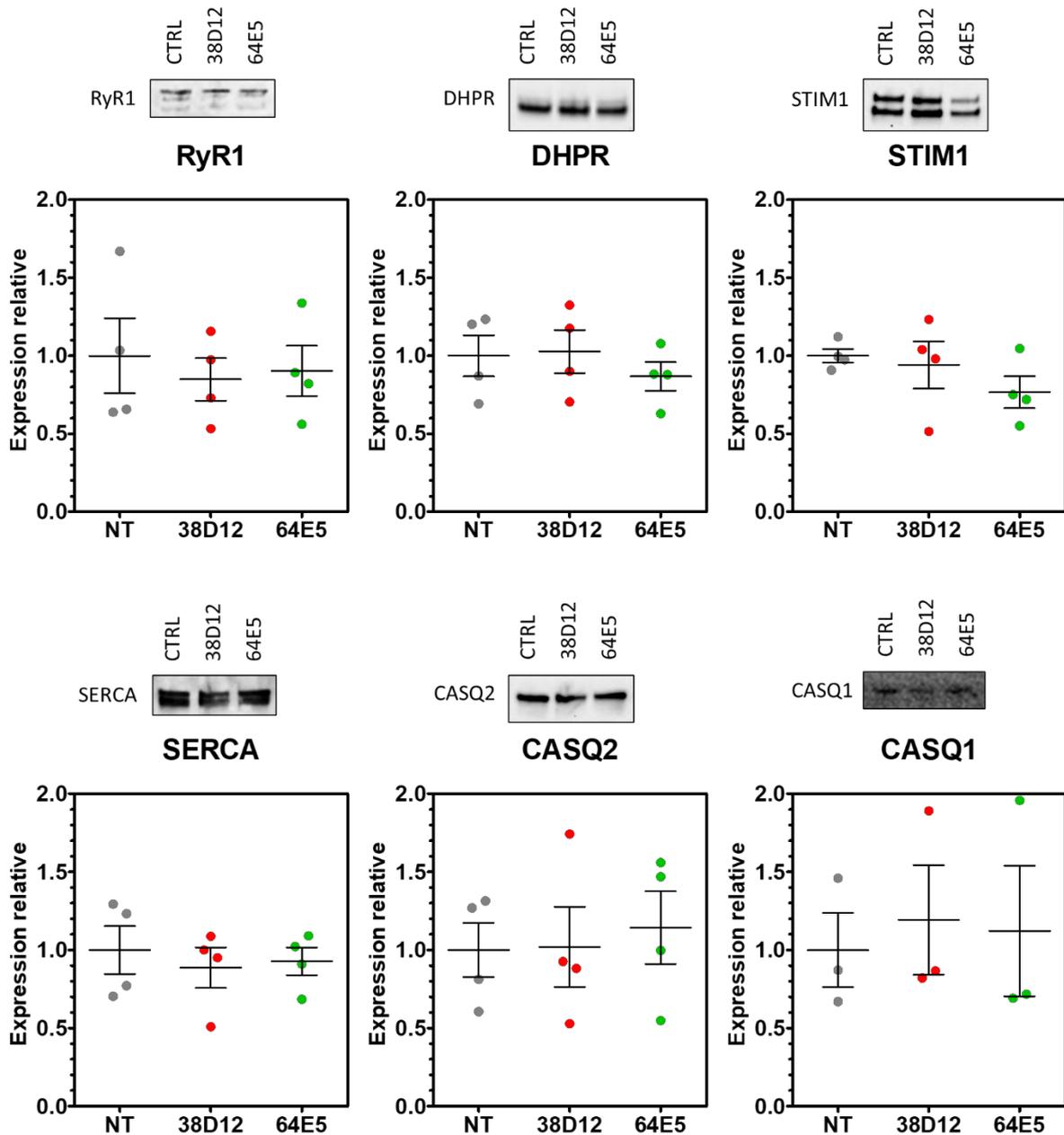
Finalement, aucune modification de l'activité SOCE n'a été observée après traitement avec 38D12 ou 64E5. L'augmentation des stocks calciques du RS après traitement avec 64E5 n'est donc pas causée par (ni associée à) un influx de calcium extracellulaire, mais est due à un mécanisme différent que nous n'avons pas encore identifié.

#### *g. Effet sur l'expression de protéines liées aux flux calciques*

Nous avons précédemment montré que l'effet des molécules 38D12 et 64E5 nécessitent un temps d'action supérieur à 3 heures. Un mécanisme d'action long serait compatible avec une modification de l'expression génique.

Nous avons donc quantifié l'expression de 6 protéines liées aux flux calciques : RyR1, DHPR, SERCA, STIM1, CASQ2 et CASQ1. Cette liste ne contient pas l'intégralité des protéines impliquées dans la régulation des flux calciques dans le muscle squelettique, qui sont très nombreuses comme cela a été décrit en introduction. Notre choix s'est porté sur ces protéines spécifiquement car 38D12 semble agir sur le couplage RyR1/DHPR alors que 64E5 modifie la recapture du calcium vers le RS et augmente les flux calciques, ce qui justifie notre intérêt pour SERCA, STIM1, CASQ2 et CASQ1.

L'expression de ces protéines a été quantifiée sur des lysats de myotubes MELA traités avec 38D12 et 64E5 (figure 70)



**Figure 70 :** Expression de RyR1, DHPR, STIM1, SERCA, CASQ2 et CASQ1 sur les cellules MELA traitées avec 38D12 et 64E5. Les cellules MELA ont étéensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 38D12 et 64E5 à une concentration de 10 $\mu$ M pendant 48h. Les myotubes ont été directement lysés par l’ajout de 15 $\mu$ l de tampon de dénaturation de Laemmli dans chaque puits. L’expression a été normalisée sur la quantité de protéine totale dans chaque bande. n = 3 à 4 puits (issus de 4 expériences indépendantes). Les données sont présentées en moyenne +/- écart-type. Les comparaisons ont été réalisées par ANOVA avec un test post-hoc de Dunnett.

L’expression de RyR1, SERCA, CASQ2 et CASQ1 n’est pas modifiée par le traitement avec les deux molécules. Avec le traitement avec 64E5, on observe cependant une tendance non-significative à la baisse pour DHPR (86,7 +/- 9,2% de la situation témoin, p = 0,44) et pour

STIM1 (76,7 +/- 10,3% de la situation témoin,  $p = 0,08$ ). Cette tendance pourrait être confirmée avec la répétition de l'expérience.

Une baisse d'expression de STIM1 résultant du traitement avec 64E5 serait étonnante car une augmentation des stocks calciques suggèrerait au contraire une augmentation de son expression (ou de ORAI1 dont nous n'avons pas pu quantifier l'expression en absence d'un anticorps spécifique). De plus, nous n'avons observé aucune altération significative de l'activité SOCE en conséquence du traitement.

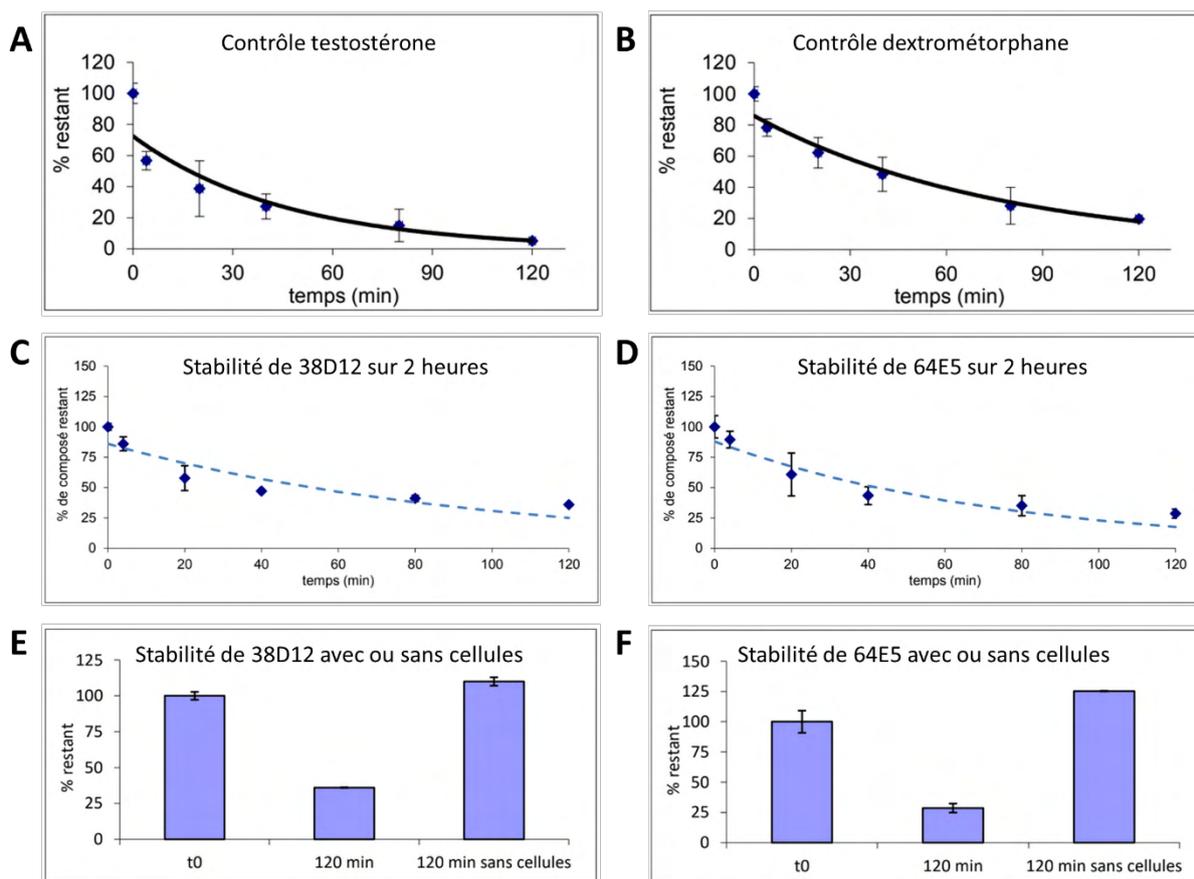
A l'heure actuelle, l'effet des molécules 38D12 et 64E5 ne peut donc pas être expliqué par une modification de l'expression de RyR1, DHPR, SERCA, STIM1, CASQ2 et CASQ1. Cela ne signifie cependant pas que ces protéines ne sont pas impliquées dans le mécanisme d'action, car leur activité pourrait être altérée sans que leur expression le soit. De la même manière, les molécules pourraient affecter l'expression de protéines qui n'ont pas été testées au cours de ces travaux.

## 7. Etude du métabolisme *in vitro*

En préparation pour l'étude préclinique chez la souris, nous avons besoin de plus d'informations concernant la manière dont les molécules sont métabolisées.

Notre objectif étant de développer une molécule qui pourrait être administrée par voie orale, elle devrait idéalement ne pas être métabolisée trop vite par le foie afin de ne pas être détruite lors du premier passage hépatique. Une métabolisation rapide serait problématique mais *a priori* pas bloquante à cette étape du projet, car il serait possible de retravailler la formule de la molécule par la suite afin de réduire la métabolisation.

Une prestation a été réalisée par le service d'analyse TechMed<sup>ILL</sup> de la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (PCBIS - UMS 3286) afin d'étudier la stabilité de 38D12 et 64E5 sur des hépatocytes de souris *in vitro* (figure 71). Cette stabilité a été comparée à celle de contrôles testostérone et dextrométorphane. La stabilité a également été évaluée en absence de cellules.



**Figure 71** : Etude de la stabilité de 38D12 et 64E5 sur des hépatocytes de souris *in vitro*. Une suspension de  $10^6$  hépatocytes et de  $1\mu\text{M}$  de molécule a été incubée pendant  $37^\circ\text{C}$  pendant 2 heures au total. La quantité de molécule restante a été dosée à 0, 5, 20, 40, 80 et 120 minutes. A, B : stabilité des contrôles testostérone (A) et dextrométorphane (B). C, D : stabilité des molécules 38D12 (C) et 64E5 (D). E, F : Stabilité de 38D12 € et 64E5 (F) en absence d'hépatocytes.  $n = 3$  expériences indépendantes.

Molécule	Testostérone	Dextrométorphane	38D12	64E5
$t_{1/2}$ (min)	32 +/- 5	53 +/- 5	67 +/- 11	52 +/- 9
Cl ( $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ )	/	/	10 +/- 2	13 +/- 2

**Tableau 10** : Synthèse des résultats de l'étude de stabilité de 38D12 et 64E5 sur des hépatocytes de souris *in vitro*. Cl : clairance.

En présence d'hépatocytes, la demi-vie est de 67 +/- 11 minutes pour 38D12 et 52 +/- 9 minutes pour 64E5. La stabilité *in vitro* de ces molécules est donc de même ordre que celle du contrôle dexamétorphane (53 +/- 5 minutes) et supérieure à celle du contrôle testostérone (32 +/- 5 minutes). Ces temps correspondent à une clairance de 10 +/- 2  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  pour 38D12 et 13 +/- 2  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  pour 64E5, la clairance étant la capacité d'un organisme (en l'occurrence, les hépatocytes) à purger un liquide d'une substance donnée.

En l'absence de cellules, aucune dégradation n'est observée pour les deux molécules : la disparition des molécules est donc entièrement due à leur métabolisation par les hépatocytes.

La stabilité des deux molécules est donc satisfaisante. Cependant, on peut remarquer qu'elles ne sont pas complètement métabolisées après 2 heures et atteignent un plateau autour de 30%. Cela suggère que la métabolisation s'arrête après deux heures, ce qui pourrait correspondre à une mortalité des hépatocytes (donc une hépatotoxicité) ou à une inhibition des enzymes hépatocytaires telles que les cytochromes P450 que nous devons garder en tête pour la suite du projet.

## 8. Pharmacocinétique sur la souris

En amont de l'étude préclinique chez la souris, il était également nécessaire de déterminer le mode d'administration de nos molécules. Plus précisément, nous avons besoin de vérifier qu'une administration par voie orale était effectivement possible.

Les deux molécules ayant une stabilité comparable, nous avons choisi de réaliser l'étude pharmacocinétique *in vivo* sur la souris avec 64E5 du fait de sa meilleure efficacité sur le relâchement calcique *in vitro*.

Une seconde analyse a donc été réalisée par le même prestataire. Avant de traiter les souris, il a fallu préalablement déterminer la solubilité de 64E5 dans différentes conditions (tableau 11).

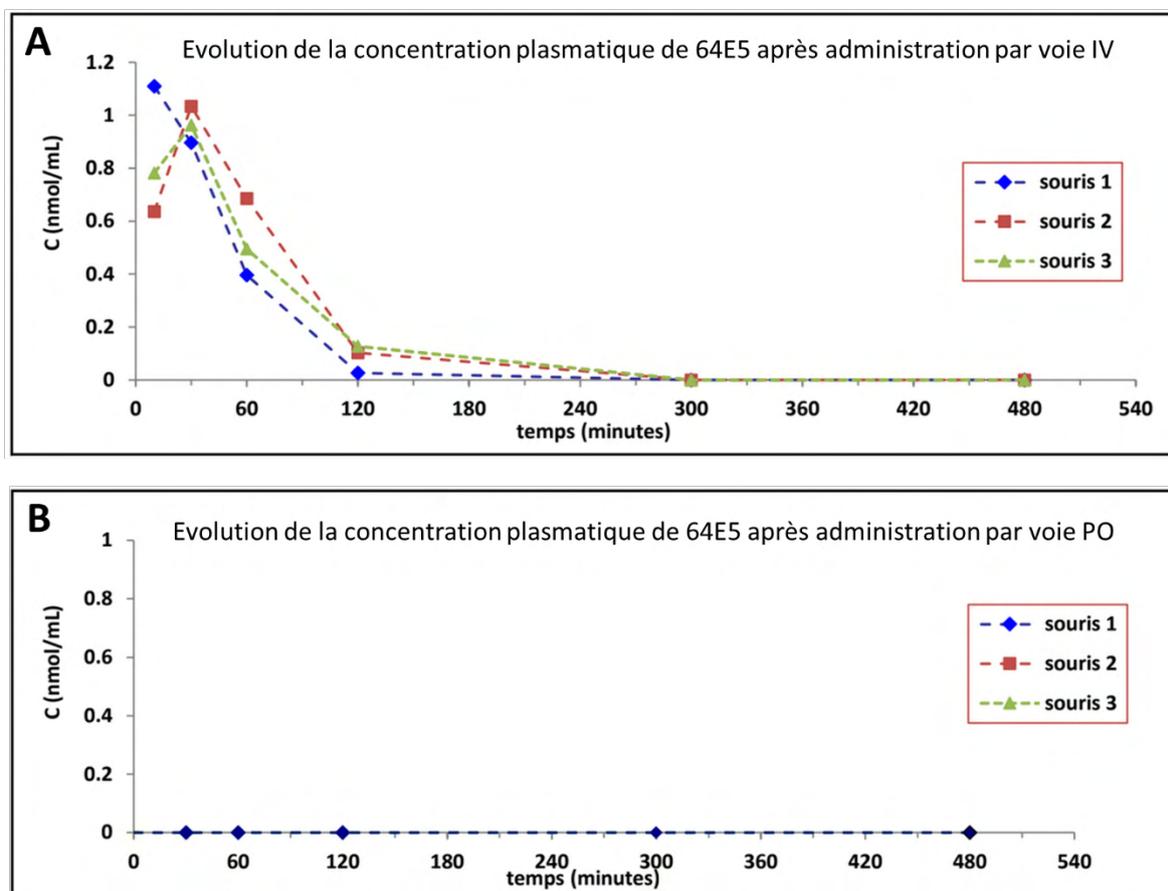
Conditions	Solubilité (mM)
Saline	0,1 +/- 0,0
Saline, 10% Kolliphor EL	2,6 +/- 0,1
Saline, 15% Kolliphor HS15, 10% PEG400, 5% éthanol	4,0 +/- 0,7

**Tableau 11** : Détermination de la solubilité de la molécule 64E5 en présence de différents excipients. n = 2 expériences.

La molécule 64E5 a une solubilité de 0,1 +/- 0,0 mM dans la solution saline, 2,6 +/- 0,1 mM dans la solution saline contenant 10% de Kolliphor EL et 4,0 +/- 0,7 mM dans la solution saline contenant 15% de Kolliphor HS15, 10% de PEG400, et 5% d'éthanol. Une solubilité d'environ 100µM dans la solution saline est considérée comme mauvaise. Bien que les différents excipients permettent d'améliorer cette solubilité, elle reste néanmoins faible.

L'étude de la pharmacocinétique a ensuite été réalisée sur des souris Swiss traitées par voie intraveineuse (IV) ou *per os* (PO). Les paramètres pharmacocinétiques ont été déterminés par une analyse non-compartmentale (figure 72). Pour le traitement des souris par voie IV, la molécule a été solubilisée dans la solution saline contenant 10% de Kolliphor EL. Pour le

traitement PO, elle a été solubilisée dans la solution saline contenant 15% de Kolliphor HS15 et 5% d'éthanol.



**Figure 72** : Etude des propriétés pharmacocinétiques de 64E5 chez des souris Swiss *in vivo*. La molécule a été administrée par voie IV à une dose de 1,6 mg/kg ou PO à une dose de 10 mg/kg et la concentration plasmatique de 64E5 a été mesurée après 5 minutes, 30 minutes, 1h, 2h, 5h ou 8h. A : évolution de la concentration plasmatique après administration par voie IV. B : évolution de la concentration plasmatique après administration PO. n = 3 souris par temps.

Voie d'administration	Intraveineuse	Per os
Dose (mg/kg)	1,6	10
t <sub>1/2</sub> (min)	25 +/- 6	/
Cl (ml/min/kg)	75 +/- 10	/
AUC (min.µg/ml)	21,2 +/- 2,8	/

**Tableau 12** : Synthèse des résultats de l'étude des propriétés pharmacocinétique de 64E5 chez des souris Swiss *in vivo*. Cl : clairance ; AUC : aire sous la courbe.

La concentration maximale est atteinte à 30 minutes après administration par voie IV et le temps de demi-vie est de 25 +/- 6 minutes. Le produit n'est plus détecté après 5 heures. L'exposition

de l'animal au composé, qui est estimée à partir de l'aire sous la courbe (21,2 +/- 2,8 min.µg/ml).

Avec l'administration PO, le composé n'est pas détecté dans le plasma. En l'état, il est donc impossible d'étudier la toxicité ou l'efficacité *in vivo* de 64E5 sur des souris traitées par voie orale.

## 9. Conclusion

A partir d'une chimiothèque de 9 252 molécules, nous avons identifié plusieurs hits efficaces à la fois sur plusieurs lignées humaines immortalisées à partir de biopsies de patients porteurs de mutations différentes et sur des cellules murines primaires issues du modèle RyR1-Rec.

Nous avons choisi deux molécules candidates non apparentées qui agissent selon deux modes d'action différents. La première, 38D12, semble agir sur le couplage entre RyR1 et DHPR. La seconde, 64E5, accélère la recapture du calcium dans le RS dès 3h de traitement et améliore le relâchement calcique par le biais d'une augmentation des stocks calciques avec 48h de traitement.

La stabilité de ces molécules, mesurée *in vitro* sur des hépatocytes murins, ne pose pas de problème. Cependant, l'étude de la pharmacocinétique de 64E5 a mis en évidence une faible exposition à la molécule avec une administration par voie IV et une biodisponibilité nulle après administration PO.



# Discussion



Les *RYR1*-RM sont des maladies orphelines à double titre : ce sont des maladies à la fois rares, et pour lesquelles nous ne disposons pas de thérapies.

L'objectif de ma thèse était d'ouvrir la voie à une nouvelle approche thérapeutique. A l'issue de la thèse, ces travaux devaient être valorisables au niveau industriel afin de permettre le développement thérapeutique pour les *RYR1*-RM à plus long terme. Notre stratégie a été de rechercher des molécules capables d'augmenter les relâchements calciques dans les cellules musculaires qui sont altérés en conséquence de la plupart (si non de toutes) les mutations de *RYR1*.

Ce travail a été réalisé en deux volets : l'étude des effets d'un modulateur des estrogènes, le fulvestrant, et le criblage de molécules chimiques à partir d'une chimiothèque de plusieurs milliers de composés.

## I. Evaluation de l'intérêt thérapeutique du fulvestrant pour les *RYR1*-RM

La littérature est assez pauvre concernant le rôle des estrogènes dans le muscle squelettique. Cependant, il a été montré qu'un déficit d'estrogènes induit par ovariectomie est associé à un défaut de force musculaire et de régénération musculaire chez la souris (Kitajima et al. 2016). Les estrogènes sont également impliqués dans d'autres fonctions qui pourraient modifier la force musculaire en affectant directement ou indirectement le muscle squelettique. Ils favorisent par exemple la croissance et la régénération du muscle (Velders et al. 2012, Parr et al. 2014), améliorent la vascularisation (Messina et al. 2007, Shimizu-Motohashi et al. 2014) et sont des régulateurs majeurs de l'homéostasie énergétique (Barros et al. 2011). Nous nous sommes donc intéressés à la modulation de la signalisation estrogénique comme approche thérapeutique pour le traitement des *RYR1*-RM.

Au cours de ce projet, nous avons tout d'abord évalué l'effet d'un anti-estrogène, le fulvestrant, sur différents modèles de *RYR1*-RM *in vivo* et *in vitro*.

Nous avons montré un effet positif mais faible de cette molécule *in vivo* chez les souris *RyR1*-Rec mâles, avec un retard significatif de la progression pathologique chez ces animaux. Cet effet n'a pas été retrouvé chez les souris *RyR1*-Rec femelles.

L'effet observé est donc sexe-dépendant. Cela pourrait être mis en relation avec les fortes différences de quantités d'hormones entre les mâles et les femelles. La voie estrogénique étant beaucoup plus faiblement activée chez les mâles que chez les femelles en raison d'une imprégnation estrogénique nettement plus faible, il est plus facile de l'inhiber chez les mâles. Pourtant, le traitement inhibe bien la voie estrogénique chez les souris femelles puisque la taille et le poids de l'utérus sont réduits chez les souris traitées.

Cette observation nous permet également d'exclure une absence de diffusion ou de disponibilité du fulvestrant, ou l'administration d'une quantité insuffisante chez les femelles.

Les récepteurs des estrogènes sont des facteurs de transcription, qui modifient l'expression de différents gènes notamment dans le muscle squelettique (Baltgalvis et al. 2010, Velez et al. 2022). Il est probable que le traitement avec le fulvestrant affecte l'expression de plusieurs de ces gènes. Cette modification de l'expression pourrait être en partie responsable de l'effet observé chez les souris RyR1-Rec mâles ; l'étude de l'expression de gènes dépendants des estrogènes dans le muscle est actuellement en cours au sein du laboratoire et nous permettra de déterminer si le fulvestrant modifie directement ou non l'expression génique dans les cellules musculaire, et donc si l'effet est direct ou systémique.

*In vitro*, le fulvestrant améliore significativement le relâchement calcique des cellules musculaires murines issues du modèle RyR1-Rec. Ces résultats suggèrent qu'au moins une partie de l'effet du fulvestrant pourrait provenir d'un effet direct sur le muscle.

Cet effet n'est cependant pas retrouvé dans les cellules musculaires humaines CTRL ou MELA. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer cette différence :

- L'effet du fulvestrant étant dépendant du sexe *in vivo*, nous avons d'abord pensé que ce facteur pouvait expliquer l'absence d'effet sur les cellules humaines. Cependant, si les cellules murines primaires sont des lots issus de plusieurs souris nouveau-nées mâles et femelles, les deux personnes dont sont issues les cellules CTRL et MELA sont de sexe masculin.
- Le milieu de culture, principalement grâce au sérum qu'il contient, représente le principal apport d'estrogènes aux cellules en culture. Or les mêmes milieux de prolifération et de différenciation ont été utilisés pour les cellules murines et humaines.
- L'effet du fulvestrant pourrait être spécifique à l'espèce. Il pourrait soit affecter des voies métaboliques qui sont régulées différemment chez l'homme et la souris, soit nécessiter des doses différentes pour les deux espèces pour avoir le même effet. Cette seconde hypothèse pourrait être évaluée en testant une gamme de concentrations de fulvestrant sur les cellules humaines.
- L'effet pourrait dépendre de la sévérité du défaut de relâchement calcique. En effet, les cellules murines utilisées pour cette partie de l'étude présentaient une baisse de relâchement calcique d'environ 75%. En revanche, les cellules MELA présentent une baisse d'environ 50%, et le relâchement calcique des cellules CTRL est normal. Il est envisageable que certains mécanismes (que nous n'avons actuellement pas identifiés) puissent être affectés par le fulvestrant et produire une amélioration significative dans le contexte d'un défaut sévère, mais pas dans une situation modérée. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait vérifier que l'effet du fulvestrant est toujours présent sur des cellules murines dans lesquelles la baisse de relâchement calcique serait moins sévère, en induisant la recombinaison de ces cellules avec une dose d'ADV Cre plus faible.
- Enfin, une autre possibilité est que l'absence d'effet dans les cellules humaines est due à la composition des populations cellulaires. En effet, les cultures murines primaires

contiennent des cellules mésenchymateuses. Au contraire, les cellules humaines immortalisées sont des clones de cellules souches musculaires uniquement. Il est possible que le fulvestrant agisse indirectement sur les cellules musculaires, par le biais des fibroblastes. Deux possibilités existent pour tester cette hypothèse : les cellules humaines immortalisées pourraient être co-cultivées avec des fibroblastes humains, ou bien une sélection pourrait être opérée sur les cellules primaires murines afin d'éliminer les cellules non-musculaires telles que les fibroblastes.

En conclusion, nous avons obtenu des résultats *in vitro* discordants en fonction de l'espèce : le fulvestrant améliore le relâchement calcique des cellules murines, mais pas des cellules humaines. *In vivo*, nous avons observé un effet faible chez les souris mâles uniquement, avec un ralentissement de la progression de la perte de force musculaire dans un modèle lentement progressif de myopathie. Cet effet nécessite d'être vérifié, notamment sur un autre modèle de *RYR1*-RM et avec une dose supérieure à celle utilisée dans ces travaux.

## II. Rétrospective sur le criblage

Bien que positifs, les résultats obtenus avec le fulvestrant suggèrent un potentiel thérapeutique pour les *RYR1*-RM plus faible que nous l'avions espéré.

La littérature recense plusieurs autres molécules candidates pour le traitement des *RYR1*-RM, cependant elles sont peu nombreuses et ciblent généralement une sous-catégorie de patients *RYR1*-RM uniquement. Nous nous sommes donc engagés dans un criblage de molécules sans *a priori*.

### 1. Choix des conditions de criblage

#### a. Choix de l'approche

Comme cela a été exposé en introduction, les *RYR1*-RM sont des pathologies complexes qui peuvent résulter de plusieurs centaines de mutations pathologiques du gène RyR1 affectant l'expression ou la fonction de la protéine correspondante. Notre objectif était d'identifier des molécules efficaces sur plusieurs patients indépendamment de la ou des mutations pathogène(s).

De façon directe ou indirecte, le relâchement calcique est généralement impacté par ces mutations. Cela fait donc des défauts de relâchement calcique une cible globale pour le traitement des *RYR1*-RM,

Pour cette raison, nous nous sommes dirigés dès le début vers un criblage *phenotype-based*.

Actuellement, quatre criblages en relation avec les *RYR1*-RM sont rapportés dans la littérature (Rebbeck et al. 2017, Murayama et al. 2018, Volpatti et al. 2020, Zhang et al. 2022). Trois de

ces criblages sont *target-based* et ciblent RyR1 ou RyR2 (Rebbeck et al. 2017, Murayama et al. 2018, Zhang et al. 2022) alors que le quatrième est *phenotype-based* et utilise des modèles animaux (Volpatti et al. 2020).

Cependant, trois de ces criblages utilisent un *readout* qui ne rend pas directement compte de la fonction de RyR1 ou de la fonction musculaire. Les criblages de Rebbeck et Volpatti sont basés sur des techniques de FRET, qui permettent de mesurer des changements de conformation ou des interactions protéiques : ces modifications conformationnelles ne correspondent pas toujours aux modifications fonctionnelles attendues. Cela est illustré par le cas de la chloroxine, une molécule identifiée lors du criblage de Rebbeck et collègues comme inhibiteur potentiel de RyR1. Cette molécule a été testée dans un second criblage, celui de Murayama et collègues, basé sur une mesure de la fuite de calcium par RyR1 par imagerie calcique : cette méthode a montré que la chloroxine a au contraire un effet activateur sur RyR1. De manière similaire, le criblage de Volpatti et collègues se base sur une propriété du modèle *C. elegans unc-68* n'ayant pas de lien direct avec la fonction de RyR1, à savoir un arrêt de croissance de ces animaux après inhibition de DHPR. Or, aucun des composés identifiés de cette manière n'a permis une amélioration fonctionnelle dans d'autres modèles (poisson-zèbre, cellules musculaires en culture).

La force de notre approche est d'être basée sur un « phénotype », le relâchement calcique, en lien direct avec les mécanismes physiopathologiques.

Dès la conception du projet, nous nous sommes demandé si améliorer le relâchement calcique *in vitro* se traduirait bien par une augmentation de la force musculaire *in vivo* et, si oui, quel degré d'amélioration serait obtenu avec 20% d'augmentation du relâchement calcique.

Actuellement, il n'existe aucune preuve dans la littérature qu'augmenter le relâchement calcique augmente la force musculaire. L'inverse a par contre été démontré : une baisse de relâchement calcique conduit à une baisse de force suite à une administration de dantrolène (Ward et al. 1986). La même observation a été faite sur des souris traitées avec l'inhibiteur de RyR1 identifié par Murayama et collègues (Yamazawa et al. 2022). Dans les deux cas, cette baisse de force est transitoire et réversible.

Notre étude ne permet pas de répondre à cette question. La seule manière de nous assurer qu'améliorer le relâchement calcique augmente bien la force musculaire serait de tester nos molécules *in vivo*, par exemple sur la souris RyR1-Rec.

De façon intermédiaire, nous pourrions mesurer la contraction de fibres musculaires isolées à partir de ces souris. Cependant, l'effet des molécules nécessite un traitement long alors qu'il n'est possible de conserver les fibres isolées que pendant 24h environ.

Nous avons utilisé plusieurs modèles cellulaires présentant tous un défaut de relâchement calcique en dépit de mutations différentes du gène *RYR1*. Ces cultures ont permis de reproduire cette manifestation courante des mutations dans ce gène. Mais ce défaut est également observé en conséquence de mutations affectant d'autres gènes dont les produits sont plus ou moins étroitement liés au couplage excitation-contraction.

C'est le cas dans d'autres pathologies telles que la DMD, la XLMTM, la LGMD2A ou encore des myopathies causées par des mutations de DHPR ou STAC3. L'efficacité de nos molécules candidates devrait être évaluée dans des modèles cellulaires de ces pathologies. Cela permettrait de confirmer que notre stratégie basée sur l'emploi de la modélisation d'un défaut commun peut donner lieu à une application large de la stratégie mise place.

#### *b. Choix des modèles cellulaires*

L'équipe Marty « CMyPath » dans son environnement, c'est-à-dire associée au laboratoire de génétique moléculaire dirigée par Pr Julien FAURE, est un centre de référence de l'étude des *RYR1*-RM en France. Nous avons la chance d'associer une forte proximité des patients à des outils de recherche uniques et maîtrisés : certains cas de patients ont particulièrement été étudiés pour caractériser l'impact fonctionnel de leurs mutations. Nos lignées cellulaires, qui ont été caractérisées et publiées il y a plusieurs années, sont issues de ces cas (Monnier et al. 2000, Rendu et al. 2013, Cacheux et al. 2015).

Nous disposons ainsi de 4 lignées de cellules musculaires humaines immortalisées : une lignée issue d'un sujet sain, que nous avons utilisée comme référence, et trois lignées issues de différents patients myopathes. Les trois lignées issues de patients présentent une baisse d'expression de RyR1 qui résulte en une baisse de relâchement calcique, ces deux altérations étant de sévérité variable. Dans le cas d'une des lignées, MELA, aucune autre altération (notamment) fonctionnelle n'a été identifiée en plus du défaut d'expression de RyR1. Dans le cas de deux des lignées, PLA et VANY, notre équipe a montré que la baisse d'expression de RyR1 est également associée à une fuite de calcium qui est sans doute elle aussi partiellement responsable du défaut de relâchement calcique (Monnier et al. 2000, Cacheux et al. 2015). Ces trois lignées rendent aussi bien compte que possible de la complexité des situations de patients qui partagent pourtant un point commun : la baisse d'expression de RyR1.

En parallèle, nous disposons de cellules primaires issues du modèle murin RyR1-Rec. Dans ce modèle, l'expression de RyR1 peut être finement contrôlée afin d'obtenir une baisse d'expression dont la sévérité est modulable. Nous avons étudié dans ce modèle la relation entre l'expression de RyR1, à la fois au niveau transcriptionnel et protéique, et sa fonction : cette relation avait précédemment été suggérée dans la littérature mais jamais démontrée. Nous avons ainsi pu montrer que toute baisse d'expression résulte en une réduction du relâchement calcique dans ce modèle. Le modèle RyR1-Rec est moins représentatif de la situation des patients que les lignées humaines car moins complexe. Cependant, il nous a permis d'étudier l'effet de molécules dans une situation simple d'une pure baisse de l'expression de RyR1, donc en ne conservant que le mécanisme commun aux trois patients. De manière globale, une molécule qui augmente le relâchement calcique à la fois dans les deux lignées humaines en provenance de patients et dans les cellules murines agit donc forcément sur le mécanisme de relâchement calcique lui-même, et non sur la fuite de calcium à travers RyR1.

Notre premier choix était de cribler les molécules sur les trois lignées de patients (MELA, PLA et VANY) en parallèle afin de sélectionner les molécules efficaces sur au moins deux lignées, ce qui garantirait un effet indépendant de la mutation. Cependant, nous avons rapidement rencontré des difficultés : les lignées avaient été caractérisées, utilisées, mais jamais dans des conditions proches de celles requises pour un criblage. Les deux lignées PLA et VANY étaient éligibles pour des études à petite échelle mais se sont révélées inexploitable pour le criblage. Les myotubes VANY présentent un fort décollement pendant et après la stimulation qui résulte en une forte variabilité qui n'a pas pu être corrigée en adaptant l'analyse du signal de fluorescence : cette variabilité ne peut être compensée que par une grande taille d'échantillonnage. La croissance des cellules PLA était trop lente par rapport à celle des autres lignées. Seule MELA associait une rapidité de production satisfaisante (plusieurs dizaines de millions de cellules par semaine) à une bonne reproductibilité du signal.

Du fait de ces adaptations, nous avons réalisé les criblages préliminaire et primaire sur MELA uniquement et réduit nos modèles de criblages de trois lignées à une seule. Nous avons donc réalisé le criblage sur les différentes cultures de façon séquentielle plutôt qu'en parallèle. Cela a affecté nos critères de sélection des molécules en conséquence, puisque nous ne pouvions plus sélectionner les molécules ayant un effet sur plusieurs mutations dès le criblage primaire. Cette sélection a alors été reportée et nous avons testé les molécules sur les cellules PLA à l'issue du criblage secondaire, à une étape où le nombre de molécules était déjà nettement réduit et nécessitait donc un nombre de cellules plus faible.

## 2. Retour sur les objectifs techniques

Un criblage doit satisfaire des critères de rapidité, de reproductibilité et de coût financier qui sont en partie interdépendants.

Dans notre cas, la rapidité n'a pas pu être complètement maîtrisée : elle est le fruit de la complexité du processus que nous étudions, le relâchement calcique, et de nos conditions de criblage, notamment en ce qui concerne le modèle. Nous travaillons sur un modèle cellulaire avec une cinétique longue, comprenant une durée incompressible de 6 jours de différenciation. De plus, les cellules se différencient en proportions variables, ce qui nécessite une analyse d'image complexe qui a un coût en temps. Ces différents facteurs résultent en un criblage lourd.

Le criblage a duré environ un an sur les trois ans de ma thèse : nous avons fait le choix de garder du temps pour travailler sur les *hits* plus en profondeur. Sur cette année de criblage, 6 mois ont en réalité été dédiés à la mise au point. Bien que cette mise au point semble longue, c'est ce travail qui a permis le succès du criblage car une fois les paramètres techniques fixés, il a été très peu nécessaire de les remettre en question.

Au début de la mise au point, les principaux facteurs qui limitaient la vitesse de criblage étaient la lecture et l'analyse : c'est pour cette raison que ces deux paramètres représentent l'essentiel du temps de mise au point. La technique d'imagerie calcique habituellement utilisée dans l'équipe, avec le vidéomicroscope, est très longue et nécessite plusieurs heures de lecture et

d'analyse pour chaque plaque 96 puits (correspondant à 88 molécules). L'adaptation et l'automatisation de la lecture, avec l'utilisation du fluorimètre en configuration standard puis en *well-scanning*, a permis de réduire considérablement le temps de lecture pour arriver à environ 15 minutes par plaque 96 puits. A cette accélération de la lecture a été ajoutée celle de l'analyse, principalement grâce au développement d'une macro qui a permis d'automatiser ce processus. A l'issue de la mise au point, ni la lecture ni l'analyse n'étaient des facteurs limitants du débit.

La manipulation des cellules et des molécules, en incluant les changements de milieux et la préparation des traitements, demandaient également un temps conséquent (environ une heure par plaque 96 puits) mais n'a jamais été limitante.

Au moment du criblage préliminaire, le facteur limitant était la production des cellules MELA. J'ai été capable de produire plusieurs dizaines de millions de cellules par semaine, ce qui a permis d'ensemencer 6 à 12 plaques 96 puits par semaine (soit environ 250 à 500 molécules par semaine dans les conditions du criblage préliminaire). Produire des cellules en plus grand nombre aurait nécessité de dédier un temps beaucoup plus grand à la culture, synonyme de l'implication d'une personne supplémentaire sur le projet. Nous avons cependant mitigé cette difficulté en ajustant les conditions de traitement lors du criblage primaire. En effet, traiter les cellules avec une combinaison de 2 molécules pour chaque condition de traitement nous a permis de cribler de 500 à 1000 molécules par semaine sans augmenter la production de cellules.

La reproductibilité est le second critère technique qui a nécessité beaucoup de mise au point. Dans notre cas, elle est intrinsèquement liée à la vitesse de criblage : en effet, notre première adaptation de la lecture avec l'utilisation du fluorimètre en configuration standard a introduit une forte variabilité du signal. Dans de précédents travaux de l'équipe, cette variabilité avait été compensée avec un grand nombre de réplicats techniques, ce qui permettait malgré tout de mettre en évidence des variations même faibles du relâchement calcique. Ce n'était cependant pas compatible avec notre criblage, car le nombre de réplicats techniques devait être très réduit dans un souci de rapidité (duplicats).

Nous avons alors dû adapter la lecture aux propriétés de la culture. En effet, seule une fraction des myoblastes se différencie : le résultat est que la différenciation (dont la répartition des myotubes) est hétérogène au sein d'un même puits. Cette hétérogénéité de répartition est l'objet de l'analyse. La principale amélioration a été apportée par l'utilisation de la configuration *well-scanning*, qui mesure la fluorescence sur le puits entier : elle permet ainsi de distinguer les zones qui contiennent des myotubes (capables de relâcher du calcium) et les zones qui n'en contiennent pas. Cette nouvelle configuration qui améliore fortement la résolution spatiale du signal s'est cependant accompagnée d'une perte de résolution temporelle car elle ne permet pas une lecture en continu. Afin d'obtenir une mesure de l'amplitude du pic de relâchement calcique malgré cette contrainte, nous avons réalisé 2 lectures : une première lecture est réalisée sans stimulation et correspond à la fluorescence de base ; La seconde lecture est réalisée une seconde après la stimulation KCl et correspond à un temps encadrant le pic de relâchement calcique. Du fait de la durée de la lecture (4 secondes), le signal résulte en réalité à la fois de l'amplitude du pic et du profil (plus ou moins grande vitesse de retour au niveau de base).

En lien avec cette nouvelle configuration, une seconde amélioration de la reproductibilité a été apportée par la macro d'analyse, qui permet la sélection de régions d'intérêt correspondant uniquement aux zones contenant des myotubes. Finalement, ces mises au point nous ont permis de réduire la variabilité de manière à atteindre un seuil de détection théorique de 50% pour une molécule ayant 20% d'effet, et de 97,4% pour une molécule ayant 40% d'effet.

De manière globale, la démarche que nous avons mise en place avec le fluorimètre est finalement la même que celle utilisée avec le microscope, dont nous nous étions éloignés au départ, avec une sélection de ROI permettant de mesurer le différentiel de fluorescence des myotubes entre un état au repos et un état stimulé. L'ajout de l'automatisation, avec l'injection de l'agent stimulant et la lecture réalisés par le fluorimètre de façon autonome, offre cependant une rapidité de lecture bien supérieure. Cette démarche associe donc la qualité d'analyse à la rapidité.

Le troisième critère technique est le coût financier. Il dépend de l'envergure du projet et des moyens disponibles. Notre budget étant celui d'un laboratoire académique, il est évident que nous n'avons pas les moyens de réaliser un criblage d'échelle industrielle. Cela a également conditionné la rapidité et la reproductibilité. Une fois la mise au point achevée, il aurait été théoriquement possible d'améliorer ces deux paramètres en nous tournant vers plus d'automatisation concernant la culture cellulaire (ensemencement, changements de milieux, traitement des cultures), ce qui nous aurait permis d'accélérer le criblage tout en ajoutant des réplicats techniques. Tôt dans la réalisation du projet, nous avons justement étudié la possibilité de travailler en collaboration avec une plateforme de criblage. Cependant, le surcoût financier et le temps de mise au point supplémentaire (adaptation, dont le temps est difficile à évaluer) ont rendu incertain l'intérêt d'une telle démarche.

### 3. Effet des molécules sur le relâchement calcique

#### a. Paramètres d'amélioration du relâchement calcique

Notre objectif était d'identifier des *hits* augmentant le relâchement calcique dans les cellules musculaires. Il a d'abord fallu définir l'amélioration recherchée.

Comme cela a été expliqué dans la partie résultats, l'amplitude du pic de relâchement calcique rend compte du débit du relâchement calcique pendant cette première phase. La largeur du pic, au contraire, dépend de la cinétique d'inactivation de RyR1 et de la recapture du calcium pendant la seconde phase. La quantité de calcium totale relâchée est mesurée par le biais de l'aire sous la courbe, qui dépend à la fois de l'amplitude et de la largeur du pic.

La littérature ne permet pas de déterminer quel si un critère est prépondérant dans le déclenchement de la contraction.

Dans des fibres musculaires issues d'un modèle murin de myopathie myotubulaire, l'amplitude du pic de relâchement calcique est réduite mais sa cinétique est plus longue (Kutchukian et al. 2019). Ces souris présentent un défaut de force et meurent prématurément (Buj-bello et al.

2002). Cela suggère donc que le débit du relâchement calcique a une importance particulière pour la fonction musculaire.

Mais la littérature suggère également une importance de la cinétique du relâchement calcique. Deux molécules, le tirasemtiv (Russell et al. 2012) et le reldesemtiv (Collibee et al. 2021), ralentissent la dissociation du calcium à la troponine C dans les fibres musculaires rapides. Ce ralentissement prolonge l'exposition des filaments d'actine au calcium et améliore la production de force dans des modèles de plusieurs maladies neuromusculaires, notamment la myopathie à némaline (de Winter et al. 2021). Or, une telle modification pourrait être apparentée à un élargissement du pic de relâchement calcique.

Même si la littérature est très pauvre sur ce sujet, l'amplitude et la largeur du pic de relâchement calcique semblent donc tous les deux importants pour la fonction musculaire. En conséquence, nous avons choisi de ne pas prioriser un type d'amélioration par rapport à l'autre. C'est la raison pour laquelle l'utilisation du fluorimètre en *well-scanning* qui ne permet pas de distinguer les 2 paramètres n'induit pas de dégradation dans la réalisation du projet.

Toutefois, afin de déterminer les deux composantes de l'augmentation du signal (amplitude et largeur du pic), l'étude de la cinétique du relâchement calcique a été réalisée lors d'une étape ultérieure avec le vidéomicroscope.

Les deux molécules que nous avons sélectionnées, 38D12 et 64E5, accroissent le pic de relâchement calcique, donc le débit du flux calcique sortant du RS. Cette caractéristique est partagée par la plupart des 11 molécules qui ont été sélectionnées sur leur efficacité sur MELA et PLA (résultats inclus en annexe 1). Sur ces 11 molécules, seules 3 augmentent la largeur du pic plutôt que son amplitude : 2C12, 15E8 et 34B7. Cependant, ces 3 molécules ont été écartées car cet effet n'était pas retrouvé sur les cellules murines. Il est possible que le mécanisme responsable de l'élargissement du pic dépende de l'espèce et ne soit pas conservé chez la souris.

#### *b. Intensité de l'amélioration du relâchement calcique*

Nous avons fixé le seuil de détection des *hits* à 20% d'augmentation du relâchement calcique sur les cellules MELA. A l'issue du criblage secondaire, nous avons identifié des molécules dont l'intensité de l'effet était variable : de 15% à 65%, avec une majorité de molécules autour de 20% d'effet. Sur les cellules PLA, l'effet des molécules (lorsqu'il est conservé) est bien plus faible : environ la moitié de l'effet observé sur les cellules MELA avec une augmentation maximale de 13%.

Deux hypothèses pourraient expliquer cette différence d'effet. L'une a déjà été exposée dans le cas du fulvestrant : il est possible que l'effet des molécules dépende de la sévérité de l'altération du relâchement calcique. La baisse de relâchement calcique est plus sévère dans les cellules MELA (avec une baisse de 45% mesurée avec le vidéomicroscope, 60% avec le fluorimètre) que dans les cellules PLA (35% avec le vidéomicroscope, 38% avec le fluorimètre). Les possibilités d'amélioration seraient d'autant plus faibles que le défaut est faible. Cette hypothèse est supportée par les résultats obtenus par les cellules murines : dans ces

cellules, nous avons induit une baisse de relâchement calcique d'environ 50%, proche de la situation des cellules MELA. Or, l'effet des molécules sur ces cellules est proche de celui observé sur les MELA, allant de 12% à 38%. Il serait possible de tester cette hypothèse en évaluant de nouveau l'effet des molécules sur les cellules murines dans lesquelles nous induirions un défaut de relâchement calcique moins sévère, donc plus proche de la situation des cellules PLA, ou au contraire plus sévère.

Une seconde hypothèse repose sur la différence entre les mécanismes physiopathologiques des cellules MELA et PLA. En effet, en plus du défaut d'expression de RyR1, les cellules PLA présentent une fuite de calcium à travers RyR1 qui n'a pas été observée dans les cellules MELA. Il est possible que les molécules ne permettent pas de compenser cette fuite calcique : l'amélioration du relâchement calcique serait alors moindre. Tester les molécules sur d'autres lignées cellulaires présentant une fuite de calcium permettrait de vérifier cette hypothèse.

En plus des *hits* qui améliorent le relâchement calcique, le criblage a permis d'identifier de nombreuses molécules qui, au contraire, diminuent l'intensité de celui-ci. Bien que nous n'ayons pas exploité ces molécules pendant cette étude, elles ne sont pas dénuées d'intérêt. En particulier, les inhibiteurs de RyR1 sont très étudiés dans le contexte de l'HM et des *RYR1*-RM avec une fuite de calcium, et s'appliqueraient également dans la situation des cellules PLA et VANY (Rebbeck et al. 2017, Murayama et al. 2018, Zhang et al. 2022). Plus généralement, le développement d'inhibiteurs du relâchement calcique permettrait de mieux comprendre le mécanisme normal de la contraction musculaire dans le contexte de la recherche fondamentale. Ces molécules pourraient donc être exploitées au cours d'un futur projet.

### c. *Relation structure/activité*

Parmi les molécules que nous avons identifiées, plusieurs présentaient des similitudes de structure plus ou moins fortes. Nous avons rassemblé ces molécules en familles structurales.

Malgré leur ressemblance, nous avons constaté que l'efficacité des molécules d'une même famille pouvait être très sensiblement variable, notamment lors du passage d'une lignée à l'autre. En particulier, les molécules la famille « verte » (64H2, 64E5, 64D6, 64F5, 64G5, 64F4, 64E9) sont structurellement très proches. Pourtant, 64G5 et 64E9 ne sont efficaces que sur MELA et 64F4 n'a pas d'effet sur CTRL, alors que les autres molécules de cette famille améliorent le relâchement calcique sur les trois lignées humaines.

Ces résultats sont très intéressants du point de vue de la relation structure/activité des molécules, car ils nous permettent déjà de commencer à identifier les parties de la structure qui sont responsables de l'effet. Cependant, ils ne peuvent pas se substituer à une véritable étude de la relation structure/activité, qui nécessitera la production et l'étude de nombreux analogues des molécules et sera nécessaire plus tard dans le projet.

#### d. *Instabilité chimique des molécules*

Lorsque nous avons évalué l'effet des molécules sur les lignées CTRL et PLA après le criblage secondaire, des cellules MELA ont été incluses à l'expérience comme contrôle positif. Pour plusieurs molécules, telles que 3C9, un effet très faible voire nul a parfois été retrouvé sur les cellules MELA à cette étape. Pour certaines molécules, ce problème a été résolu avec la décongélation d'un nouvel aliquot : nous avons donc conclu à une instabilité chimique de ces molécules. Nous les avons alors écartées de l'étude.

Lorsque nous avons sélectionné nos deux principales molécules d'intérêt, 38D12 et 64E5, nous avons également considéré la possibilité d'une dégradation car la chimiothèque a été constituée il y a plusieurs années. Nous avons donc acheté un nouveau lot de ces molécules. Afin de nous assurer de la conformité de ces nouveaux lots, nous avons vérifié leur effet sur les cellules MELA. L'efficacité du nouveau lot de 38D12 était comparable à celle de l'ancien lot. Le nouveau lot de 64E5 était plus de deux fois plus efficace que l'ancien. Il est donc probable que certaines des molécules que nous avons identifiées, notamment des molécules de la famille « verte », aient été partiellement dégradées et n'aient pas été évaluées de la façon la plus juste au moment du criblage.

#### e. *38D12 et 64E5 : deux mécanismes d'action différents*

Les études de caractérisation de l'effet de nos molécules ont mis en évidence deux mécanismes d'action différents pour 38D12 et 64E5.

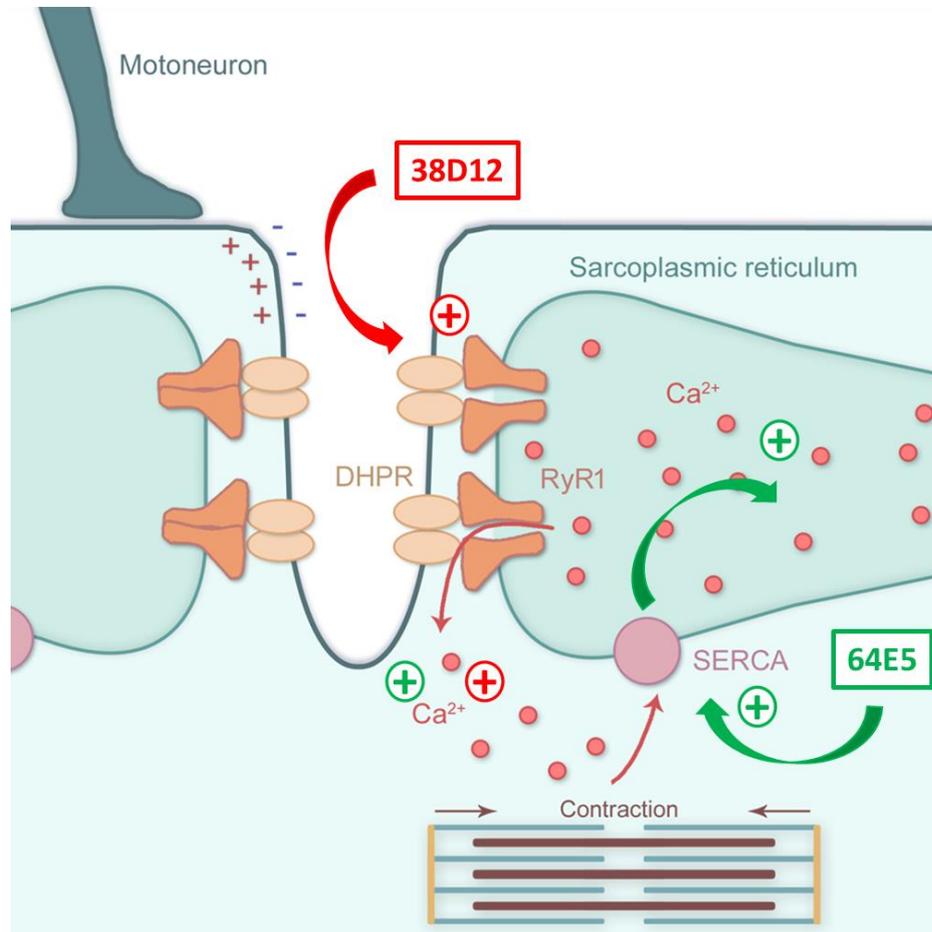
38D12 améliore le relâchement calcique résultant d'une dépolarisation (stimulation KCl), mais pas avec une activation directe de RyR1 (stimulation 4CMC). Cet effet nécessite un temps d'action long (48h) et est absent avec un traitement court de 3h.

38D12 agit donc soit au niveau du couplage DHPR/RyR1, soit en amont de ce couplage. Cela ouvre plusieurs possibilités. 38D12 pourrait modifier directement ou indirectement l'interaction physique entre DHPR et RyR1 : cela pourrait être vérifié en étudiant cette interaction par FRET. Elle pourrait aussi, par exemple, provoquer une modification de la sensibilité au voltage de DHPR. Une mesure de l'activité de DHPR en fonction du voltage par *patch-clamp* permettrait de répondre à cette interrogation. Dans tous les cas, l'effet semble nécessiter la présence de DHPR, puisqu'il n'est pas retrouvé dans la lignée KO pour DHPR. L'absence totale d'expression de ce gène pourrait avoir de effets tels qu'ils ne sont pas compensables. Il serait donc intéressant de réaliser la même étude avec un simple modèle de *knock-down* de DHPR.

L'effet de 64E5 peut être décomposé en deux temps. Avec un traitement court, il améliore la recapture du calcium vers le RS. Avec un traitement long, est associée une amélioration du relâchement calcique ainsi qu'une augmentation des stocks calciques libérables du RS.

Notre hypothèse est que ces différents mécanismes sont liés. 64E5 augmenterait d'abord la recapture du calcium vers le RS, ce qui provoquerait une augmentation des stocks dont la mise

en place est plus tardive. L'augmentation des stocks résulterait en un gradient de calcium plus fort entre la lumière du RS et le cytosol, ce qui constituerait une condition suffisante à la libération plus rapide de calcium dès l'ouverture de RyR1.



**Figure 73 :** Mécanisme d'action supposé des molécules 38D12 et 64E5. 38D12 modifierait le couplage DHPR/RyR1 ou un mécanisme en amont de ce couplage, tel que la sensibilité de DHPR à la dépolarisation. 64E5 augmenterait l'activité de SERCA ; à plus long terme, cela provoquerait une augmentation des stocks calciques libérables du RS. Dans les deux cas, le résultat est une augmentation du débit de calcium relâché en réponse à une stimulation.

L'amélioration de la recapture du calcium pourrait s'opérer par un effet sur SERCA. Nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de SERCA, mais son activité pourrait l'être. Puisque nous ignorons si l'effet est direct ou indirect, l'activité de SERCA devrait être mesurée, par exemple par FRET (Jing et al. 2015) ou en mesurant le flux calcique entrant (Bovo et al. 2019).

Nous n'avons actuellement pas confirmé que l'augmentation des stocks est absente avec un traitement court, bien que nous puissions le supposer du fait de la cinétique de l'augmentation du relâchement calcique. Cette confirmation devra être établie afin d'établir un lien direct entre l'augmentation des stocks et du débit. L'augmentation des stocks calciques pourrait être due à

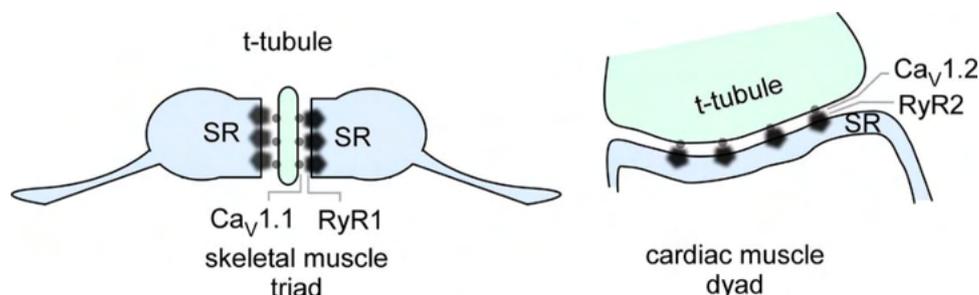
un remodelage ou une modification de la capacité à chélater le calcium de la calséquestrine, sans augmentation de son expression, ou à un remodelage du RS. Ces hypothèses pourraient être vérifiées en analysant la morphologie du RS en mettant en évidence la calséquestrine ou des marqueurs du RS tels que la calnexine en immunofluorescence.

Dans les deux cas, la cible des molécules est encore inconnue. L'identification de la cible nous permettrait de confirmer leur mécanisme. Cela pourrait être effectué par chromatographie d'affinité : nos molécules seraient fixées sur une colonne pour purifier leurs cibles moléculaires à partir de lysat de cellules musculaires. Cependant, la petite taille de nos molécules pourrait rendre difficile leur fixation sans modifier leur affinité avec leurs cibles.

#### f. Relâchement calcique et toxicité cardiaque

De manière similaire au muscle squelettique, le relâchement calcique est un mécanisme indispensable au bon fonctionnement du muscle cardiaque.

Dans le cœur, la jonction entre le tubule T et le RS n'est pas organisée en triade mais en dyade (figure 75). Cependant, de nombreuses similitudes existent entre le CRC du muscle cardiaque et celui du muscle squelettique. On y retrouve notamment une isoforme de DHPR, dont la sous-unité  $\alpha 1s$  ( $Ca_v1.1$ ) est remplacée par  $\alpha 1c$  ( $Ca_v1.2$ ) et l'isoforme de cardiaque de RyR1, c'est-à-dire RyR2.



**Figure 74 :** Comparaison de la structure de la triade du muscle squelettique et de la dyade du muscle cardiaque (modifié de Mahling et al. 2022)

Les altérations du relâchement calcique du muscle cardiaque peuvent conduire à des arythmies qui peuvent aller jusqu'au décès. Or, l'homologie de structure entre RyR1 et RyR2 fait que de nombreuses molécules qui agissent sur RyR1 affectent également RyR2 (Murayama et al. 2018, Rebbeck et al. 2020). Lorsqu'on modifie le relâchement calcique du muscle squelettique, il est donc important de considérer la possibilité d'une toxicité cardiaque : celle-ci devra être restée sur la souris en amont des études précliniques d'efficacité.

L'augmentation des stocks calciques induite par 64E5 pourrait justement être un problème. Dans le muscle cardiaque, la surcharge calcique du RS est impliquée dans certaines pathologies et peut être la cause d'arythmies (Hutchings et al. 2022). Dans le muscle cardiaque et

squelettique, elle provoque des relâchements de calcium spontanés, appelés *Store Overload-Induced Calcium Release* (SOICR), dont le rôle est encore mal connu dans le muscle squelettique (Wakizaka et al. 2017). Lors de nos expériences d'imagerie calcique, nous n'avons pas observé de relâchement calcique spontané dans les myotubes traités, cependant il est possible qu'ils ne soient pas assez différenciés pour que ce mécanisme se mette en place.

#### 4. Etudes du métabolisme de 38D12 et 64E5

##### a. *Choix du mode d'administration*

Contrairement au fulvestrant, 38D12 et 64E5 ne sont pas utilisées en clinique : nous n'avons donc aucune information sur les voies d'administration possibles. C'est une étape préalable à l'évaluation de l'efficacité de nos molécules *in vivo* chez la souris.

Nous avons une préférence pour la voie orale, car celle-ci est relativement simple à mettre en place et est directement transposable de la souris à l'homme. La voie intrapéritonéale (IP) est également facile à réaliser chez la souris, mais n'est pas utilisée chez l'homme. Nos deux autres options étaient les voies intraveineuse (IV) et sous-cutanée (SC), qui sont également directement transposables de la souris à l'homme, mais nous avons choisi de ne pas utiliser ces voies.

Dans notre modèle, la souris RyR1-Rec, l'évolution de la force musculaire est mesurée pendant 75 jours après l'induction de la recombinaison. Les animaux sont peu malades au début de cette période. Après 40 à 60 jours, leur force est faible mais stable. Le traitement le pourrait s'accompagner d'un ralentissement de la progression de la pathologie (comme pour le fulvestrant) et/ou d'augmentation de la force musculaire résiduelle.

A ce jour, il n'existe pas de molécule efficace sur notre modèle à l'exception du fulvestrant, dont l'effet est très faible et ne concerne que les souris mâles. En absence d'une telle condition de référence, nous devons traiter ces animaux pendant toute la durée de l'expérience afin de ne pas manquer la fenêtre thérapeutique. Les bornes et la durée de cette fenêtre thérapeutique ne pourront être déterminés qu'une fois un traitement identifié. De plus, la fréquence d'administration dépend de la stabilité de la molécule : si la molécule est instable et dégradée rapidement, un traitement quotidien peut être nécessaire. Si la molécule est stable et reste dans la circulation systémique pendant plusieurs jours, au contraire, cela offre la possibilité de traiter les animaux moins souvent, par exemple de façon hebdomadaire. Or, il existe des contraintes techniques et éthiques pour chacune des voies d'administration. Par exemple, l'administration par voies IV et SC est douloureuse pour l'animal, et un traitement quotidien pendant une durée prolongée n'est pas envisageable : nous préférons donc privilégier une voie comparativement indolore.

Le mode et la fréquence d'administration des molécules restent donc à définir.

b. Métabolisation et propriétés pharmacocinétiques de 38D12 et 64E5

Quelle que soit la voie d'administration, les molécules ne doivent pas être métabolisées trop rapidement afin d'avoir le temps d'atteindre les organes cibles en quantité suffisante (dans notre cas, les muscles squelettiques).

Dans le cas d'une administration par voie orale, la molécule passe obligatoirement par le foie avant d'atteindre la circulation systémique et y est plus ou moins métabolisée : on parle alors d'effet de premier passage hépatique. L'étude *in vitro* sur des hépatocytes de souris a montré que la métabolisation de 38D12 et 64E5 par le foie est comparable à celle de la testostérone et du dextrométorphane, qui ont été utilisés comme contrôles. La métabolisation de ces molécules par le foie n'est *a priori* pas excessive. Cependant, elles ne sont pas entièrement métabolisées et on observe un plateau autour de 30% à 40% de molécule restante : cela peut correspondre à une hépatotoxicité, hypothèse que l'on ne peut pas écarter car la viabilité des hépatocytes au terme de l'expérience n'a pas été vérifiée par le prestataire. Ce plateau pourrait également correspondre à l'inhibition d'enzymes hépatocytaires, telles que les cytochromes P450. Ce mécanisme est souvent responsable d'interactions médicamenteuses : il serait donc préférable de mesurer l'activité des cytochromes P450 lors d'étapes ultérieures.

Préalablement à l'étude des propriétés pharmacocinétiques *in vivo*, la solubilité de 64E5 a été mesurée. Malgré l'ajout d'excipients tels que le Kolliphor, elle s'est avérée très faible. Cette faible solubilité réduit d'autant les capacités d'administration de l'agent. En considérant la solubilité de la molécule, le volume administrable par cette voie (d'environ 0,2ml), la dose maximale est très proche de 10mg/kg, soit la dose qui a été utilisée lors de l'étude des propriétés pharmacocinétiques. Lors de cette analyse, cet agent a donc été administré à la dose maximale envisageable. Or il est évident, puisque la molécule n'a pas été retrouvée dans le sang, que cette dose était insuffisante. Il faut noter que la molécule est au contraire détectée après IV, malgré une dose 6,25 fois inférieure injectée. Les pistes concernant l'administration *per os* de 64E5 seraient donc d'améliorer la solubilité ou l'absorption.

Ce résultat peut avoir plusieurs explications. 64E5 est dégradée avant de pénétrer dans la circulation systémique, par exemple par l'acidité de l'estomac, ce qui pourrait être vérifié par une cinétique en milieu acide. Alternativement, elle pourrait être trop lipophile et être piégée par les graisses. Un travail sur la galénique pourrait apporter une solution à certains de ces problèmes, en empêchant par exemple la dégradation de la molécule par les sucs gastriques jusqu'à son absorption par l'intestin.

Si nous souhaitons continuer à développer 64E5, un travail de chimie médicinale est actuellement nécessaire. Cela nous permettrait de modifier les propriétés de la molécule de manière à obtenir une molécule compatible avec une administration par voie orale. Cependant, il sera nécessaire de vérifier que l'efficacité de la molécule sur le relâchement calcique *in vitro* est conservée. Ce travail sera donc itératif : chaque nouvelle molécule synthétisée devra à nouveau être testée sur les cellules musculaires humaines et murines pour confirmer leur efficacité, puis sur les souris *in vivo* pour déterminer leurs propriétés pharmacocinétiques. Un tel procédé est très lent et coûteux et ne peut pas être entrepris sans financement dédié. Cette

étape marque l'entrée dans une démarche industrielle, qui nécessite donc des moyens et un travail qui vont au-delà des travaux de thèse.

Il est donc important de s'engager dans cette étape seulement après s'être assuré que la molécule initiale améliore la force musculaire *in vivo*. Cette expérience a pour seul objectif de vérifier l'efficacité *in vivo*, indépendamment de toute autre considération : La transposabilité de la voie et de la présentation des molécules sont tout à fait secondaires. Par exemple, nous pourrions considérer la voie IP.

Une alternative serait de tester les propriétés de solubilité et pharmacocinétiques de notre autre candidat, 38D12 : ces propriétés sont peut-être plus favorables à une administration PO.

Dans le cas contraire, nous avons identifié d'autres molécules efficaces sur les cellules humaines et murines à l'issue du criblage, bien que leur efficacité soit moindre. Nous pouvons donc également nous tourner vers ces autres molécules s'il s'avérait que nos deux candidats principaux sont difficilement exploitables. Même si la majorité de ces autres molécules appartenaient à la famille structurale « verte », et partagent donc vraisemblablement les défauts de 64E5, ce n'est peut-être pas le cas de toutes.

### III. Perspectives et valorisation des résultats

La thématique de ma thèse s'inscrit pleinement dans celles de l'équipe « Cellular myology and Pathologies » consacrée à l'étude du fonctionnement normal et pathologique du muscle et principalement de l'étape de couplage excitation-contraction. Depuis de nombreuses années, cette équipe a ainsi participé à la description fondamentale de l'organisation et du fonctionnement des cellules musculaires. Elle a également contribué, en association avec le service de génétique moléculaire dirigé par le Pr J. Lunardi et aujourd'hui par le Pr J. Fauré, à établir des mécanismes moléculaires faisant le lien entre les mutations retrouvées chez certains patients et leurs déficits musculaires. Mon travail de thèse est un des éléments qui illustrent l'évolution de cette équipe du fondamental vers la génétique fonctionnelle puis vers la thérapie. Mon travail de thèse a en plus bénéficié d'un environnement industriel grâce à un partenariat avec la biotech grenobloise Ecrins Therapeutics, validé par une convention permettant de déboucher sur un financement CIFRE.

Au-delà du fait que mon objectif était d'identifier de nouvelles pistes pour améliorer le relâchement calcique déficitaire dans les cellules musculaires dérivées de patients myopathes, ces pistes devaient donc être valorisables d'un point de vue industriel.

Les résultats obtenus sur le fulvestrant, en particulier son efficacité sur la force musculaire des souris RyR1-Rec mâles et le relâchement calcique dans les cellules murines RyR1-Rec, a fait l'objet d'un dépôt de brevet à l'issue de ma seconde année de Master en 2018. Des expériences *in vivo* complémentaires sont en cours depuis plusieurs mois afin d'étudier son effet à des doses différentes de celles utilisées précédemment, ainsi que sur un second modèle murin de RYR1-RM, la souris I4895T.

A l'issue d'un criblage que nous avons mis au point et réalisé, nous avons identifié un certain nombre de molécules qui augmentent le relâchement calcique in vitro. Ces molécules sont susceptibles d'être l'objet d'un développement thérapeutique. En ce qui concerne deux d'entre-elles, 38D12 et 64E5, une déclaration d'invention a été déposée concernant leur utilisation pour l'amélioration du relâchement calcique dans les RYR1-RM. Un brevet d'utilisation sur ces deux molécules sera rédigé et déposé dans les mois suivant ma soutenance de thèse.

Ces résultats en ligne avec nos objectifs découlent de la qualité de la préparation du projet, et notamment le choix des modèles, le dimensionnement du criblage ou encore l'optimisation du débit de lecture et de l'analyse.

Non seulement le travail préparatoire a permis d'aller jusqu'à l'identification de molécules candidates, mais il assure la pertinence des hits avec les objectifs thérapeutiques

L'efficacité des deux molécules a été validée sur trois lignées cellulaires humaines et les cellules murines RyR1-Rec : ces résultats sont donc très robustes et encourageants. Nous avons également défini en partie les propriétés et le mécanisme d'action de ces molécules. Bien qu'elle soit incomplète, une telle description mécanistique n'était possible que dans le contexte d'un laboratoire tel que le nôtre qui possède une grande expertise dans le domaine du muscle et des mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaire qui s'y rapportent.

Aujourd'hui, forts de ces résultats, et malgré des difficultés, nous nous dirigeons vers la validation préclinique pour laquelle nous disposons à la fois des modèles et du savoir-faire, comme c'était le cas pour la première phase in vitro.

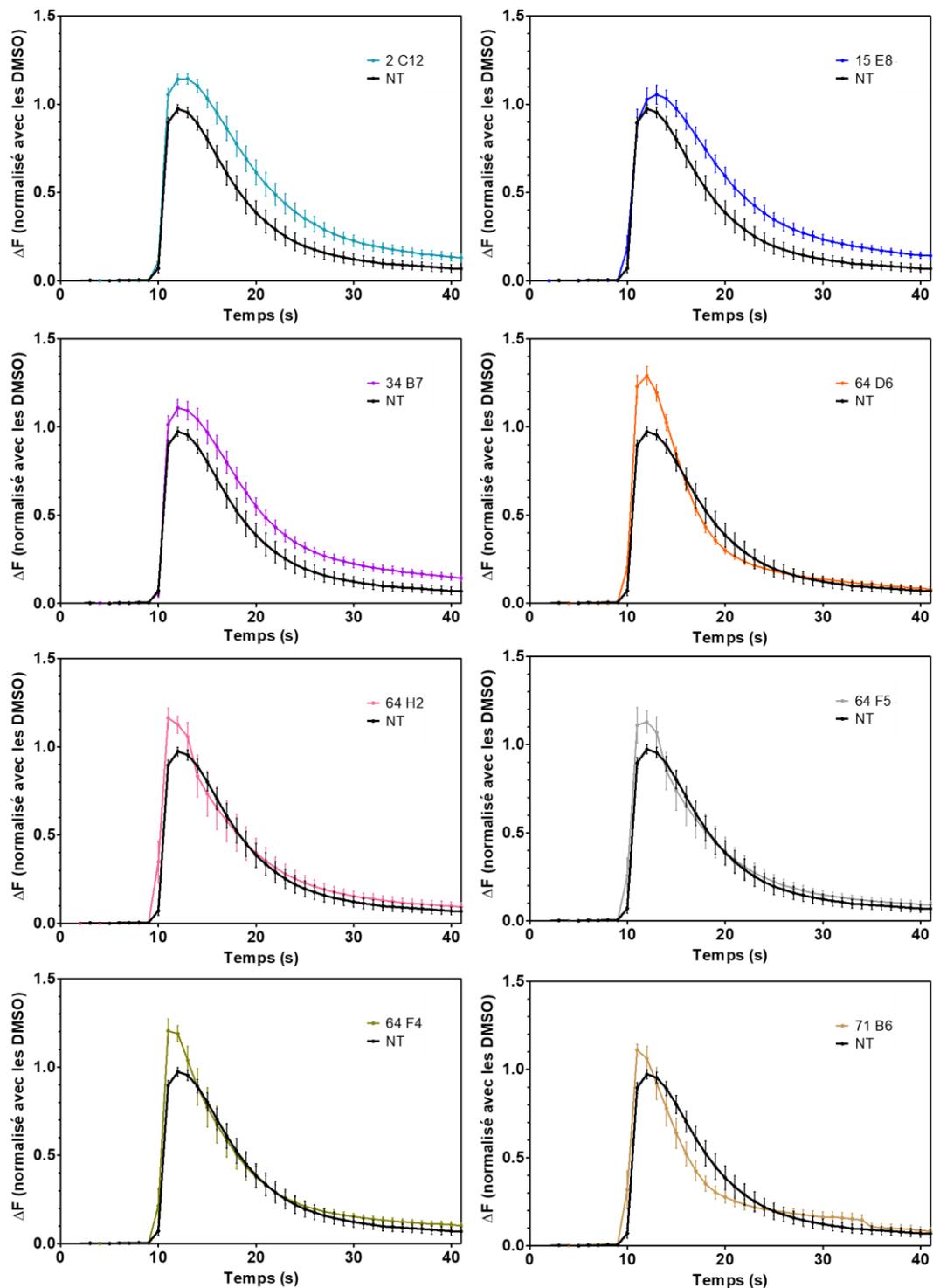
Mon travail de thèse ne constitue que la première étape d'un projet dont l'objectif final est le développement clinique de molécules dans le but de traiter les RYR1-RM et, plus généralement, les pathologies musculaires impliquant un défaut de relâchement calcique. L'étape suivante, industrielle, nécessitera une structure dédiée. Dans un second temps, nous envisageons une phase de maturation au cours de laquelle sera réalisé un travail de chimie médicinale pour générer de nouvelles molécules, basées sur 38D12, 64E5 et/ou l'une des autres molécules identifiées lors du criblage. Ces nouvelles molécules pourront alors être protégées par un brevet de composition. La dernière étape sera celle de la création d'une start-up chargée de faire la preuve de concept clinique en se basant sur des molécules propriétaires.



# Annexes



## Annexe 1



**Figure 75 :** Cinétique du relâchement calcique en réponse à la stimulation KCl à  $t = 10$ s Les cellules MELA ont été ensemencées à une densité de 50 000 cellules/puits, mises en différenciation et traitées avec 2C12, 15E8, 34B7, 64D6, 64H2, 64F5, 64F4 et 71B6 à une concentration de  $10\mu\text{M}$  pendant 48h. L'imagerie calcique a été réalisée avec le vidéomicroscope.  $n = 12$  à 15 puits. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM.



Annexe 2 : Utilisation du fulvestrant pour la prise en charge thérapeutique de la myopathie à cores

## **Utilisation du fulvestrant pour la prise en charge thérapeutique de la myopathie à cores**

**Lauriane Travard**, Laurent Pelletier, Isabelle Marty

Brevet N° EP19315023.2. du 16/04/2019 et PCT/IB2020/053549 du 15/04/2020

(19)



(11)

**EP 3 725 316 A1**

(12)

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(43) Date de publication:  
**21.10.2020 Bulletin 2020/43**

(51) Int Cl.:  
**A61K 31/565 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)**

(21) Numéro de dépôt: **19315023.2**

(22) Date de dépôt: **16.04.2019**

(84) Etats contractants désignés:  
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR**  
Etats d'extension désignés:  
**BA ME**  
Etats de validation désignés:  
**KH MA MD TN**

• **Association Française contre les Myopathies**  
**75651 Paris Cedex 13 (FR)**

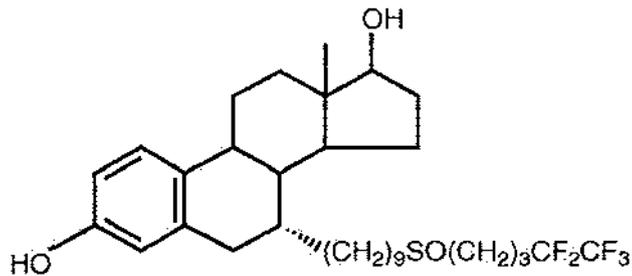
(72) Inventeurs:  
• **MARTY, Isabelle**  
**38113 Veurey (FR)**  
• **PELLETIER, Laurent**  
**38240 Meylan (FR)**  
• **TRAVARD, Lauriane**  
**38690 Colombe (FR)**

(71) Demandeurs:  
• **Université Grenoble Alpes**  
**38400 Saint-Martin-d'Hères (FR)**  
• **Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale**  
**75013 Paris (FR)**  
• **Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes**  
**38700 La Tronche (FR)**

(74) Mandataire: **Cabinet Chaillot**  
**16/20, avenue de l'Agent Sarre**  
**B.P. 74**  
**92703 Colombes Cedex (FR)**

(54) **UTILISATION DU FULVESTRANT POUR LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DE LA MYOPATHIE A CORES**

(57) L'invention concerne un antagoniste du récepteur des oestrogènes de formule :



pour l'utilisation dans le traitement d'une maladie ou d'un trouble lié(e) à une baisse de la libération de calcium entre le réticulum sarcoplasmique et le cytosol, en particulier la maladie ou le trouble est une myopathie liée à une ou plusieurs mutations du gène RyR1 ou une myopathie liée à une baisse de la libération de calcium, plus particulièrement la myopathie à cores.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant au moins l'antagoniste du récepteur des oestrogènes de l'invention et au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

**EP 3 725 316 A1**

## Description

## ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION

5 **[0001]** La présente invention concerne le domaine du traitement de pathologies liées à une baisse du relâchement de calcium, et porte en particulier sur l'utilisation du fulvestrant pour la prise en charge thérapeutique de la myopathie à cores.

**[0002]** La myopathie à cores est une maladie génétique caractérisée par un déficit de force musculaire et un retard du développement musculaire. Elle est principalement associée à des mutations dans le gène du récepteur de la ryanodine de type I (RyR1). RyR1 est en réalité un canal calcique permettant la sortie du calcium du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol. Dans le cytosol, le calcium induit le glissement des myofibrilles à l'origine de la contraction musculaire.

10 **[0003]** L'importance de RyR1 dans la cascade d'événements menant de la stimulation de la fibre musculaire par le motoneurone à sa contraction explique parfaitement qu'une mutation du gène correspondant, altérant son expression ou sa fonction, induise un défaut de force musculaire.

**[0004]** En effet, la contraction du muscle squelettique comprend plusieurs étapes. Une stimulation provenant du motoneurone provoque d'abord la dépolarisation de la membrane plasmique de la fibre musculaire. Cette dépolarisation se propage jusqu'aux triades, des structures constituées d'une invagination de la membrane plasmique, le tubule T, associé à deux citernes terminales de réticulum sarcoplasmique. Là, elle active le récepteur des dihydropyridines (DHPR) situé dans la membrane du tubule T, qui active à son tour le récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1), auquel il est couplé mécaniquement. Ce second canal calcique situé dans la membrane du réticulum sarcoplasmique est responsable de la libération (ou relâchement) de calcium du réticulum vers le cytosol. Ce relâchement calcique hors des stocks intracellulaires permet enfin le glissement des filaments de myosine sur les filaments d'actine, et donc la contraction musculaire. Le calcium est ensuite repompé vers le réticulum.

20 **[0005]** A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique pour la prise en charge des patients atteints de la myopathie à cores. Les seuls soins apportés aux malades sont de la kinésithérapie et des corticoïdes pour améliorer l'état général, mais il n'existe en effet aucun traitement curatif.

**[0006]** Les recherches actuelles portent principalement sur la mise au point de thérapies géniques visant à corriger la mutation ou ses conséquences immédiates. Le problème réside principalement dans le fait qu'il existe de nombreuses mutations de RyR1 liées à la myopathie à cores, par conséquent, chaque stratégie de thérapie génique ne peut donc s'adresser qu'à un patient particulier ou un petit nombre de patients.

30 **[0007]** Des travaux publiés en 2013 (Dorchies et al., 2013) mettaient en évidence les propriétés thérapeutiques du tamoxifène chez des souris représentant un modèle de la dystrophie de Duchenne. Outre l'amélioration de la force de ces souris une fois traitées, les auteurs ont noté de nombreuses modifications histologiques et fonctionnelles sans toutefois être en mesure d'expliquer l'efficacité de cet agent. Ce même groupe de recherche a également abordé l'effet thérapeutique du tamoxifène sur une autre maladie musculaire, la myopathie myotubulaire.

35 **[0008]** La dystrophie de Duchenne et la myopathie myotubulaire ne sont pas étroitement apparentées, mais dans les deux cas, des altérations du relâchement du calcium ont été observées (De Luca et al., 2001, Plant et al., 2003, Dowling et al. 2009 et 2010). La piste mécanistique n'est pas abordée expérimentalement ni même évoquée dans la publication de Dorchies et al.

40 **[0009]** Les présents inventeurs ont alors développé une nouvelle stratégie thérapeutique pour leur pathologie d'intérêt, la myopathie à cores, partant du principe que le tamoxifène est un régulateur spécifique des récepteurs des oestrogènes. A ce titre, il module l'effet que les oestrogènes ont sur de nombreux tissus. Cependant, l'effet du tamoxifène est complexe car il exerce parfois un effet antagoniste sur les tissus (sein) et parfois agoniste (utérus, os). Son effet n'est pas caractérisé au niveau musculaire.

45 **[0010]** Pour surmonter l'incertitude de l'effet agoniste/antagoniste du tamoxifène sur le tissu musculaire, les inventeurs ont porté leur attention sur le fulvestrant, un antagoniste pur des récepteurs des oestrogènes.

**[0011]** Le fulvestrant est une molécule connue, à l'heure actuelle prescrite dans le cadre de la prise en charge des cancers du sein hormono-dépendants. Il possède dans ce cadre la même activité que le tamoxifène.

50 **[0012]** Dans la présente invention, la stratégie thérapeutique consiste en la recherche de l'amélioration du relâchement calcique du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol qui est une étape déterminante pour la contraction musculaire. L'utilisation du fulvestrant dans la prise en charge thérapeutique de la myopathie à cores constitue la solution identifiée par les inventeurs pour pallier l'absence de traitement spécifique de cette myopathie.

## 55 BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

**[0013]** Les inventeurs disposent d'un modèle murin de la myopathie à cores qu'ils ont développé au laboratoire et caractérisé. Ce modèle est à la base d'une recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques à large spectre, en oppo-

sition aux thérapies géniques basées sur la correction des mutations qui sont si nombreuses qu'elles sont quasiment spécifiques à chaque patient atteint de myopathie à cores.

**[0014]** L'intérêt de la stratégie thérapeutique de la présente invention permet de s'adresser à une large population de malades, l'agent devant cibler un mécanisme commun, indépendamment de la mutation responsable de la baisse de RyR1.

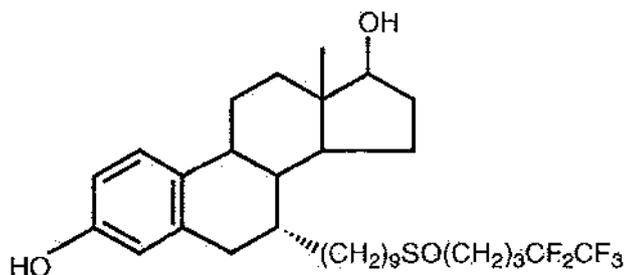
**[0015]** Les inventeurs ont relevé que la littérature fait mention du tamoxifène, un modulateur des récepteurs aux oestrogènes qui améliore les symptômes de deux pathologies musculaires, à savoir la dystrophie de Duchenne et la myopathie myotubulaire, sans pour autant que les auteurs aient pu élucider les mécanismes responsables de ces améliorations. Ces pathologies présentant quelques caractéristiques que partage la myopathie à cores, les inventeurs ont évalué ce traitement.

**[0016]** Les récepteurs des oestrogènes sont des protéines intracellulaires de la famille des récepteurs des stéroïdes qui possèdent donc une fonction de facteur de transcription. Il existe deux types de récepteurs des oestrogènes, ER $\alpha$  et ER $\beta$ , codés par deux gènes différents : *ESR1* et *ESR2*, respectivement. L'épissage alternatif des ARNm est à l'origine de plusieurs isoformes pour chaque type de récepteur. Leur profil d'expression dépend du tissu. L'expression relative variable des isoformes, celle des facteurs partenaires participant l'activation ou l'inhibition de la transcription, ainsi que l'existence d'effets indépendant des récepteurs, rendent la signalisation des oestrogènes particulièrement complexe (Kulkoyluoglu et al., 2016). L'action du tamoxifène est complexe : celui-ci agit comme agoniste ou antagoniste des récepteurs aux oestrogènes de façon tissu-dépendante (Berry et al., 1990), dépendant notamment des proportions dans lesquelles sont exprimés les deux récepteurs. Il a en effet une action agoniste à travers ER $\alpha$ , et antagoniste à travers ER $\beta$  (Salvatori et al., 2003).

**[0017]** L'action du tamoxifène étant complexe, les inventeurs ont décidé de porter leur attention sur un agent ayant une modalité d'action plus simple. Ils se sont donc concentrés sur un antagoniste pur des récepteurs aux oestrogènes ER $\alpha$  et ER $\beta$ , le fulvestrant. Ils ont alors administré le fulvestrant à des souris chez lesquelles ils ont induit une myopathie à cores et observé que malgré la perte de poids associée au développement de la maladie, les souris ne perdaient pas de force sur toute la durée du traitement (75 jours). Ils ont également effectué des études in vitro sur des cellules satellites murines primaires de muscles squelettiques, ainsi que sur des cellules humaines immortalisées issues d'une biopsie d'un patient atteint de myopathie à cores.

#### DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

**[0018]** La présente invention concerne l'antagoniste du récepteur des oestrogènes de formule :



pour l'utilisation dans le traitement d'une maladie ou d'un trouble lié(e) à une baisse de la libération de calcium entre le réticulum sarcoplasmique et le cytosol.

**[0019]** Cet antagoniste est en particulier connu sous le nom de fulvestrant.

**[0020]** Dans un mode de réalisation, la maladie ou le trouble peut être une myopathie liée à une ou plusieurs mutations du gène RyR1 ou une myopathie liée à une baisse de la libération de calcium.

**[0021]** Dans un mode de réalisation particulier, la maladie ou le trouble peut être la myopathie à cores.

**[0022]** La myopathie à cores est une affection neuromusculaire caractérisée par des lésions rondes au centre de la fibre musculaire, visibles sur la biopsie musculaire, et par les manifestations cliniques d'une myopathie congénitale.

**[0023]** Selon un aspect, l'antagoniste est destiné à être administré à un sujet selon une quantité thérapeutiquement efficace.

**[0024]** L'expression « quantité thérapeutiquement efficace » signifie le taux ou la quantité de composé nécessaire et suffisante pour ralentir ou stopper la progression, l'aggravation ou la détérioration d'un ou plusieurs symptômes de la maladie ou du trouble, en particulier une maladie ou un trouble lié(e) à une baisse de la libération de calcium, en particulier une myopathie liée à une ou plusieurs mutations du gène RyR1, plus particulièrement la myopathie à cores; soulager les symptômes de la maladie ou du trouble, en particulier une myopathie liée à une ou plusieurs mutations du gène RyR1, plus particulièrement la myopathie à cores.

## EP 3 725 316 A1

**[0025]** La « quantité thérapeutiquement efficace » dépend du sujet, du stade de la maladie à traiter et du mode d'administration, et peut être déterminée par des opérations de routine par l'homme du métier. Cette quantité peut varier avec l'âge et le sexe du sujet.

**[0026]** Avantageusement, une quantité thérapeutiquement efficace peut varier entre 0,01 et 100 mg/kg de masse corporelle, de préférence entre 0,1 et 20 mg/kg, et de façon davantage préférée entre 1 et 10 mg/kg, par exemple en

une ou plusieurs administrations hebdomadaires, pendant un ou plusieurs mois.

**[0027]** En particulier, la quantité humaine thérapeutiquement efficace peut être comprise entre 50 mg/mois et 500 mg/mois pour une femme de 60 kg, de manière préférée la quantité humaine thérapeutiquement efficace est de 250 mg/mois pour une femme de 60 kg, soit de l'ordre de 4,17 mg/kg/mois.

**[0028]** A titre d'exemple, pour les souris, la quantité thérapeutiquement efficace a été adaptée selon la préconisation de la FDA des Etats-Unis (Food and Drug Administration), à savoir par multiplication de la quantité humaine thérapeutiquement efficace par un facteur 12,3 pour obtenir la quantité murine efficace. Ainsi, la dose murine préférée est de 51 mg/kg/mois, soit pour une souris de 20 g, une dose de 1 mg/mois. Dans le cadre de la présente invention et pour les tests réalisés sur les souris, une quantité d'environ 0,25 mg/semaine a été administrée par injection intramusculaire.

**[0029]** En outre, la quantité thérapeutiquement efficace spécifique pour n'importe quel patient dépendra d'une diversité de facteurs comprenant le trouble traité et la gravité du trouble ; l'activité du composé spécifique utilisé ; la composition spécifique utilisée, l'âge, la masse corporelle, l'état de santé général, le sexe et le régime du patient ; la durée d'administration, la voie d'administration, et le taux d'excrétion du composé spécifique utilisé ; la durée du traitement ; les médicaments utilisés en combinaison ou simultanément avec le composé spécifique utilisé ; et les facteurs similaires bien connus dans la technique médicale. Par exemple, il est bien dans les compétences de l'homme du métier de commencer des doses du composé à des taux inférieurs à ceux requis pour obtenir l'effet thérapeutique désiré et d'augmenter progressivement le dosage jusqu'à ce que l'effet désiré soit obtenu.

**[0030]** Selon un autre aspect, l'antagoniste de la présente invention est destiné à une utilisation en tant que médicament.

**[0031]** L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant :

- au moins l'antagoniste du récepteur des oestrogènes de la présente invention ;
- au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

**[0032]** L'expression "excipient pharmaceutiquement acceptable" se réfère à un matériel non toxique qui est compatible avec un système biologique tel qu'une cellule, une culture cellulaire, un tissu ou un organisme. Cet excipient pharmaceutiquement acceptable ne produit pas de réaction indésirable, allergique ou autre lorsqu'il est administré à un animal, en particulier un être humain. Les caractéristiques de l'excipient dépendront du mode d'administration utilisé.

**[0033]** Ceci comprend n'importe quel solvant, diluant, milieu de dispersion, agglutinant, liant, lubrifiant, délitant, revêtement, agent antibactérien et antifongique, agent isotonique et agent retardateur d'absorption, et adjuvants similaires. Un excipient pharmaceutiquement acceptable se réfère à une charge solide, semi-solide ou liquide non-toxique, un diluant, une matière d'encapsulation ou une formulation accessoire de tout type. Pour l'administration humaine, les préparations devront satisfaire les exigences de stérilité, pyrogénicité, de sûreté générale et de pureté telles que requises par les Bonnes pratiques de fabrication des substances actives à usage humain et vétérinaire.

**[0034]** Selon un aspect, la composition pharmaceutique est destinée à être administrée à un sujet selon une quantité thérapeutiquement efficace.

**[0035]** Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention, le principe actif, seul ou en combinaison avec un autre principe actif, peut être administré sous une forme d'administration unitaire, sous la forme d'un mélange avec des supports pharmaceutiques classiques, à des animaux et des êtres humains. Les formes d'administration unitaires appropriées comprennent les formes adaptées à la voie orale telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les suspensions ou solutions pour voie orale, les formes d'administration sublinguale et buccale, les aérosols, les implants, les formes d'administration sous-cutanée, transdermique, topique, intrapéritonéale, intramusculaire, intraveineuse, sous-dermique, transdermique, intrathécale et intranasale et les formes d'administration rectale.

**[0036]** Selon un autre aspect, la composition pharmaceutique est destinée à une utilisation en tant que médicament.

**[0037]** A cet effet, la composition pharmaceutique ou le médicament contient des véhicules qui sont pharmaceutiquement acceptables pour une formulation adaptée pour l'administration par voie orale.

**[0038]** Des exemples de formes adaptées pour l'administration par voie orale comprennent, mais sans y être limitées, des comprimés, des comprimés à orodispersion, des comprimés effervescents, des poudres, des granules, des pilules (comprenant des pilules édulcorées), des dragées, des gélules (comprenant des gélules de gélatine molle), des sirops, des liquides, des gels ou d'autres solutions, des suspensions, des bouillies, des formes liposomales et similaires.

**[0039]** Dans un mode de réalisation, la composition pharmaceutique ou le médicament contient des véhicules qui sont pharmaceutiquement acceptables pour une formulation apte à être injectée.

**[0040]** Des exemples de formes adaptées à l'injection comprennent, mais sans y être limitées, des solutions, telles

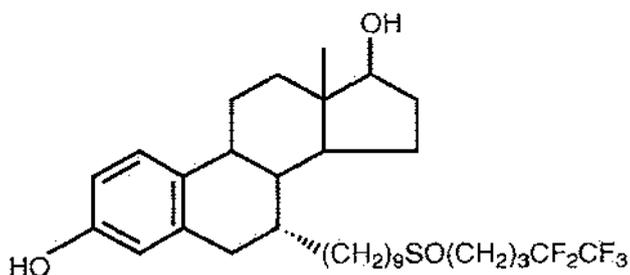
que, par exemple, des solutions aqueuses stériles, des dispersion, des émulsions, des suspensions, des formes solides appropriées pour l'utilisation pour préparer des solutions ou suspensions par l'ajout d'un liquide avant l'utilisation, par exemple, une poudre, des formes liposomales ou similaires.

**[0041]** Le mode d'administration peut être par injection ou par perfusion graduelle. L'injection peut être intraveineuse, intra-péritonéale, intramusculaire, sous-cutanée ou transdermale.

**[0042]** Les préparations pour une administration parentérale peuvent inclure des solutions aqueuses ou non-aqueuses stériles, des suspension ou des émulsions. Des exemples de solvants non-aqueux sont l'alcool benzylique, l'éthanol, le propylène glycol, le polyéthylène glycol, des huiles végétales ou des esters organiques injectables tels que l'éthyl oléate. Des véhicules aqueux comprennent l'eau, des solutions alcool/eau, des émulsions ou des suspensions.

**[0043]** L'invention concerne également une méthode de traitement d'une maladie ou d'un trouble lié(e) à une baisse de la libération de calcium entre le réticulum sarcoplasmique et le cytosol, en particulier une myopathie liée à une ou plusieurs mutations du gène RyR1 ou une myopathie liée à une baisse de la libération de calcium, plus particulièrement la myopathie à cores.

**[0044]** La méthode de traitement de la présente invention comprend l'administration à un sujet en ayant besoin d'une quantité thérapeutiquement efficace de l'agoniste du récepteur des oestrogènes de formule :



**[0045]** Dans un autre mode de réalisation, la méthode de traitement de la présente invention comprend l'administration à un sujet en ayant besoin d'une quantité thérapeutiquement efficace de la composition pharmaceutique de l'invention.

**[0046]** L'invention concerne ainsi une méthode de traitement d'un patient souffrant d'une maladie ou d'un trouble lié(e) à une baisse de la libération de calcium entre le réticulum sarcoplasmique et le cytosol, en particulier une myopathie liée à une ou plusieurs mutations du gène RyR1 ou une myopathie liée à une baisse de la libération de calcium, plus particulièrement la myopathie à cores, comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace de l'agoniste du récepteur des oestrogènes de l'invention ou de la composition pharmaceutique de l'invention.

**[0047]** L'administration de l'agoniste du récepteur des oestrogènes ou de la composition pharmaceutique de l'invention peut se faire par toute voie d'administration mentionnée plus haut.

**[0048]** Pour mieux illustrer l'objet de la présente invention, on va maintenant en décrire ci-dessous, à titre illustratif et non limitatif, les exemples ci-après en liaison avec les dessins annexés.

**[0049]** Sur ces dessins :

La Figure 1 est un schéma de la construction du modèle de souris KO inducible RyR1.

La Figure 2 est une représentation graphique des mesures de fluorescence en imagerie calcique sur cellules murines.

La Figure 3A est une représentation graphique des mesures de fluorescence en imagerie calcique sur cellules murines, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 100 nM.

La Figure 3B est un graphique à barres représentant l'amplitude du pic de fluorescence en imagerie calcique, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 100 nM.

La Figure 4A est une représentation graphique des mesures de fluorescence en imagerie calcique sur cellules humaines témoins CTRL, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 100 nM.

La Figure 4B est une représentation graphique des mesures de fluorescence en imagerie calcique sur cellules humaines témoins CTRL, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 250 nM.

La Figure 4C est une représentation graphique des mesures de fluorescence en imagerie calcique sur cellules humaines immortalisées MELA issues d'une biopsie d'un patient atteint de myopathie à cores, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 100 nM.

La Figure 4D est une représentation graphique des mesures de fluorescence en imagerie calcique sur cellules humaines immortalisées MELA issues d'une biopsie d'un patient atteint de myopathie à cores, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 250 nM.

La Figure 4E est un graphique à barres représentant l'amplitude du pic de fluorescence en imagerie calcique sur cellules humaines témoins CTRL, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 100 nM ou 250 nM.

La Figure 4F est un graphique à barres représentant l'amplitude du pic de fluorescence en imagerie calcique sur

## EP 3 725 316 A1

cellules humaines MELA, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 100 nM ou 250 nM.

La Figure 5 est un graphique représentant la force des souris post-induction de la myopathie à cores mesurée en durée d'agrippement au cours du temps, en présence ou en absence de traitement avec le fulvestrant 100 nM.

5 **[0050]** Sur la Figure 1, on peut voir la schématisation de la construction génétique du modèle de souris KO inducible RyR1 développé par les inventeurs. Les exons 9-11 du gène RYR1 sont flanqués de sites LoxP, sur les deux allèles du gène. Les souris possèdent également un transgène HSA-Cre/ERT2 codant pour la Cre recombinase. L'inactivation du gène par KO est induite par des injections intrapéritonéales de tamoxifène. Ainsi, en présence de tamoxifène, la Cre recombinase est transloquée vers le noyau et le système de recombinaison Cre-Lox permet de réaliser une délétion des exons 9-11 du gène RYR1. Ce modèle de souris KO inducible développé au laboratoire est non létal et constitue un modèle d'étude de la myopathie à cores.

10 **[0051]** Si l'on se réfère à la Figure 2, en imagerie calcique, les cellules sont chargées pendant 30 minutes avec la sonde Fluo-4 qui, en fixant les ions  $Ca^{2+}$ , émet une fluorescence proportionnelle à la concentration cytoplasmique de calcium. Les relâchements calciques du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol sont donc suivis en direct sur des cellules vivantes par vidéo-microscopie après une stimulation par du KCl à 140 mM (mime une dépolarisation membranaire). On visualise ainsi, sur des cellules murines en culture primaire, que l'induction de l'inactivation du KO du gène RYR1 (cellules RyR1 recombinées) entraîne une réduction significative du pic de relâchement de calcium, réduction qui a été chiffrée à 73% par rapport au relâchement de calcium dans les cellules murines témoins (Ctrl).

15 **[0052]** D'une manière similaire, des études complémentaires en imagerie calcique ont été conduites sur ces cellules murines en culture primaire, après induction de la recombinaison par transduction par AdV-Cre (cellules RyR1 recombinantes). Ainsi, on peut observer sur la Figure 3A que le fulvestrant à 100 nM améliore le relâchement calcique par rapport aux cellules non traitées (NT). La Figure 3B montre l'amplitude du pic de relâchement calcique, lequel passe de 0,31 +/- 0,02 à 0,40 +/- 0,04, soit une augmentation de 28% (Test de Student,  $p < 0,05$ ). Le nombre de myotubes analysés dans chaque condition est indiqué dans les barres du graphique.

20 **[0053]** Les mêmes expériences ont été réalisées sur des cellules musculaires humaines témoins CTRL et sur des cellules MELA, qui sont des cellules humaines immortalisées issues d'une biopsie de patient atteint de myopathie à cores.

25 **[0054]** Si l'on se réfère à la Figure 4A, on peut y voir que le traitement par le fulvestrant 100 nM n'a pas d'effet sur les cellules témoins. De manière similaire, le traitement par le fulvestrant 250 nM n'a pas non plus d'effet sur les cellules témoins (Figure 4B).

30 **[0055]** En revanche, on peut visualiser sur la Figure 4C que le pic de relâchement de calcium des cellules humaines MELA est réduit de manière importante par rapport aux cellules témoins, que les cellules soient traitées ou non par le fulvestrant 100 nM. On peut noter que le traitement par le fulvestrant 100 nM tend à augmenter le relâchement de calcium, mais de manière non statistiquement significative. La même observation peut être faite de la Figure 4D : le relâchement de calcium s'est effondré dans les cellules humaines MELA et le traitement avec le fulvestrant 250 nM tend également à augmenter le relâchement de calcium par rapport aux cellules non traitées, mais les données statistiques ne se sont pas révélées significatives.

35 **[0056]** Si l'on se réfère à la Figure 4E, le graphique montre que le traitement par le fulvestrant, que ce soit à une concentration de 100 nM ou 250 nM, n'a pas d'effet sur les cellules musculaires humaines témoins. Le nombre de puits analysés dans chaque condition est indiqué dans les barres du graphique.

40 **[0057]** En revanche, si l'on se réfère à la Figure 4F, le graphique permet de visualiser la tendance à l'amélioration du relâchement de calcium des cellules humaines MELA en réponse à un traitement par le fulvestrant 100 nM et plus encore par le fulvestrant 250 nM. On note également que le pic de relâchement de calcium est passé d'environ 0,28 chez des cellules musculaires humaines témoins à environ 0,15 chez les cellules immortalisées issues d'une biopsie de patient atteint de myopathie à cores.

45 **[0058]** Pour finir, si l'on se réfère à la Figure 5, on peut y voir que la durée d'agrippement des souris chez qui on a induit la myopathie à cores (RyR1<sup>Rec</sup>) traitées avec le fulvestrant 100 nM est améliorée par rapport aux souris non traitées (NT). La force des souris traitées au fulvestrant est nettement améliorée par rapport aux souris non traitées.

### EXEMPLES

50 **[0059]** Les exemples suivants illustrent l'invention.

### Matériels et Méthodes

#### 55 Modèle animal

**[0060]** Pour cette étude, un modèle inducible et non-létal de souris KO pour RyR1 développé au laboratoire a été utilisé. Chez ces souris, les exons 9 à 11 du gène RYR1 sont flanqués de sites LoxP sur les deux allèles (RYR1 fl/fl).

## EP 3 725 316 A1

Ces souris possèdent également un transgène HSA-Cre/ERT2 (RyR1<sup>Rec</sup>) codant pour la Cre recombinase, alors que cette construction est absente chez les souris témoins (RyR1<sup>Ctrl</sup>). Le KO a été induit par des injections intrapéritonéales de tamoxifène (Sigma) huit semaines après la naissance, à raison de 1 mg/jour pendant cinq jours. Il est important de noter que tous les animaux ont reçu ces injections, qu'ils possèdent ou non l'allèle HSA-Cre.

**[0061]** De façon exclusive chez les animaux possédant l'allèle HSA-Cre, le tamoxifène (TAM) provoque la translocation de la Cre recombinase vers le noyau, permettant ainsi la recombinaison des sites LoxP et la délétion des exons 9-11 du gène RYR1 (Figure 1). Afin d'améliorer la compréhension, les souris chez lesquelles la recombinaison ne peut pas s'opérer seront dénommées souris RyR1<sup>Ctrl</sup> dans la suite du document. Les souris recombinées après l'administration intrapéritonéale de TAM seront dénommées souris RyR1<sup>Rec</sup>.

### *Traitements des animaux*

**[0062]** Pour le traitement des animaux, le fulvestrant a été préparé à partir d'une solution commerciale de Faslodex 250 mg (AstraZeneca). Cette solution a été diluée dans du sérum physiologique et 0,27 mg de fulvestrant a été injecté à chaque souris (poids de 20 g) dans 50 µl de volume. Les injections ont été réalisées par voie intramusculaire dans le quadriceps une fois par semaine.

**[0063]** Le choix de la dose injectée a été fait conformément à la préconisation de la FDA indiquant d'utiliser une dose 12,3 fois supérieure à celle de la dose recommandée chez l'homme. Ici, pour une dose humaine de 250 mg/mois chez une femme de 60 kg, la dose rapportée au poids chez la souris est de 51 mg/kg/mois, soit 1 mg/mois pour une souris de 20 g, réparti en 4 injections, par conséquent environ 0,25 mg/semaine.

### *Test d'agrippement sur les animaux*

**[0064]** Afin d'évaluer la force musculaire des animaux, les souris ont été placées sur une grille qui a ensuite été retournée. Le durée pendant laquelle les souris restent agrippées à la grille a été chronométrée dans une limite de 300 secondes. Cette mesure a été réalisée de façon hebdomadaire sur l'ensemble des souris de l'étude.

### Cultures cellulaires

#### *Cellules satellites murines primaires*

**[0065]** Les cellules satellites ont été isolées à partir des muscles squelettiques des membres inférieurs de souris nouveau-nées RyR1<sup>Ctrl</sup> selon la procédure décrite dans Marty et al., 2000.

**[0066]** Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (75 000 cellules/puits) préalablement recouvertes de laminine. Les cellules ont d'abord été cultivées dans du milieu de prolifération composé de *Ham's F-10 Nutrient Mix* (Life Technologies), 20% de sérum de veau foetal (Life technologies), 2% d'Ultrosor G (PALL) et 2% de Pénicilline-Streptomycine (Life Technologies).

**[0067]** Les cellules RyR1<sup>Ctrl</sup> ainsi produites n'expriment pas la Cre recombinase. Pour induire la recombinaison du gène RyR1 floxé, les cellules ont donc été transduites 12 heures après ensemencement avec des adénovirus permettant l'expression de la Cre recombinase, AdV-Cre (Utah University), à une multiplicité d'infection (*multiplicity of infection*, ou MOI) de 64.

**[0068]** 24 heures après l'ensemencement, les cellules ont été placées dans du milieu de différenciation composé de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Life Technologies), 2% de sérum de cheval (Life Technologies) et 1% de Pénicilline-Streptomycine (Life Technologies) pendant 3 jours.

#### *Cellules humaines*

**[0069]** Les cellules CTRL sont des cellules humaines immortalisées issues d'une biopsie d'un sujet sain ne présentant pas d'anomalie de relâchement calcique.

**[0070]** Les cellules MELA sont des cellules humaines immortalisées issues d'une biopsie d'un patient atteint de myopathie à cores, présentant notamment un défaut quantitatif de RyR1 ainsi qu'un défaut de relâchement calcique (Rendu et al., 2013). Ces cellules ont été immortalisées par l'équipe de Vincent Mouly (Institut de Myologie, Paris).

**[0071]** Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (50 000 cellules/puits) dans du milieu de prolifération de composition identique à celui des cellules murines primaires.

**[0072]** 24 heures après l'ensemencement, les cellules ont été placées dans du milieu de différenciation pendant 7 jours. Le milieu a été renouvelé 4 jours après la mise en différenciation.

*Traitement des cultures*

**[0073]** Le fulvestrant (Tocris) a été solubilisé dans du diméthylsulfoxyde à une concentration de 10 mg/ml. Cette solution stock a été conservée à -20°C et utilisée pour les tests cellulaires après dilution dans le milieu de différenciation des cellules à la concentration souhaitée. Les cellules ont été traitées pendant toute la durée de la différenciation.

*Imagerie calcique*

**[0074]** Les cellules ont été chargées pendant 30 minutes avec du Fluo-4 Direct (ThermoFisher). Les relâchements calciques sont suivis avec un vidéo-microscope Leica DMI6000 FRAP (Leica Microsystems) pendant une durée de 40 secondes, avec une stimulation par du KCl à 140 mM.

**[0075]** Les films ont été analysés grâce aux logiciels Fiji (Schindelin et al., 2012) et Prism (GraphPad).

**[0076]** Pour les cellules murines, les mesures de fluorescence ont été réalisées sur des régions d'intérêt correspondant chacune à un myotube, avec plusieurs dizaines de myotubes mesurés pour chaque répétition de l'expérience.

**[0077]** Pour les cellules humaines, la forme des cellules ne permettant pas de les distinguer individuellement de manière précise, les mesures ont été réalisées sur une seule région d'intérêt par puits correspondant à la surface totale couverte par les myotubes. 4 à 6 puits ont été mesurés pour chaque répétition de l'expérience.

*Analyses statistiques*

**[0078]** Les comparaisons ont été réalisées avec le test de Student en utilisant le logiciel Prism (GraphPad). Les différences sont considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ .

Exemple 1 : Etude de la libération (ou relâchement) calcique *in vitro* sur cellules murines primaires

**[0079]** Les cellules RyR<sup>Ctrl</sup> transduites ou non par la Cre recombinase AdV-Cre ont été traitées avec les différents agents, depuis la mise en différenciation jusqu'au moment de l'analyse fonctionnelle. L'intensité du relâchement calcique a été évaluée en réponse à une stimulation par le KCl 140 mM (mimant une dépolarisation à ~0mV).

**[0080]** Comme attendu, l'expression de la Cre-recombinase s'accompagne de la baisse des capacités de relâchement calcique des myotubes. En effet, comme le montre la Figure 2, l'induction de l'inactivation par KO du gène RyR1 s'accompagne d'une réduction de 73% de l'amplitude du pic de relâchement de calcium ( $p < 0,01$ ).

**[0081]** Les cellules murines RyR<sup>CTRL</sup> après induction de la recombinaison par transduction par AdV-Cre (cellules RyR1-Rec) sont placées en milieu de différenciation en absence (NT) ou en présence de fulvestrant 100 nM (Ful 100nM). Après 3 jours de différenciation, les relâchements de calcium ont été étudiés en imagerie calcique (Figure 3A). Le fulvestrant à 100 nM améliore le relâchement calcique, le pic passe de 0,31 +/- 0,02 à 0,40 +/- 0,04, soit une augmentation de 28% ( $p < 0,05$ ) (Figure 3B).

Exemple 2 : Etude de la libération (ou relâchement) calcique *in vitro* sur cellules humaines

**[0082]** Le fulvestrant a été testé sur des cellules musculaires humaines présentant ou non un défaut de relâchement calcique (cellules humaines CTRL ou MELA), par une incubation de 7 jours en milieu de différenciation.

**[0083]** Comme le montrent les Figures 4A et 4B, le fulvestrant n'a pas d'effet sur les cellules témoins CTRL. Dans les cellules MELA, dont les relâchements de calcium sont effondrés, il tend à augmenter les relâchements de calcium aussi bien à une concentration de 100 nM qu'à 250 nM (Figures 4C-4E). Cependant, la quantification étant faite non plus sur chaque myotube mais sur chaque puits de la plaque de culture, le nombre d'échantillons est plus faible et la différence n'atteint pas la significativité statistique.

Exemple 3 : Mesure de la force *in vivo* chez les souris traitées avec le fulvestrant

**[0084]** Les souris femelles (souris RyR1<sup>CTRL</sup> ou souris RyR1<sup>Rec</sup>) ont été traitées soit par le fulvestrant 100 nM (Ful) soit par du sérum physiologique (NT) en injection intramusculaire une fois par semaine pendant toute la durée de l'expérience.

**[0085]** La force des animaux est suivie par un grip test (test d'agrippement) une fois par semaine, juste avant les injections. Les résultats de la mesure de force au cours du temps sont présentés sur la Figure 5.

**[0086]** Les résultats obtenus sur ce petit groupe de souris femelles traitées au fulvestrant montrent une amélioration très nette de la force des souris par rapport aux souris non traitées. Les analyses statistiques pourront être réalisées sur un nombre d'animaux plus important, englobant également des individus mâles.



## EP 3 725 316 A1

myopathie liée à une ou plusieurs mutations du gène RyR1 ou une myopathie liée à une baisse de la libération de calcium.

- 5
3. Antagoniste du récepteur des oestrogènes selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel la maladie ou le trouble est la myopathie à cores.
- 10
4. Antagoniste du récepteur des oestrogènes, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, **caractérisé par le fait que** l'antagoniste est destiné à être administré à un sujet selon une quantité thérapeutiquement efficace.
- 10
5. Antagoniste du récepteur des oestrogènes, selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, **caractérisé par le fait que** l'antagoniste est destiné à une utilisation en tant que médicament.
6. Composition pharmaceutique comprenant :
- 15
- au moins l'antagoniste du récepteur des oestrogènes selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ;
  - au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.
- 20
7. Composition pharmaceutique selon la revendication 6, **caractérisée par le fait que** la composition pharmaceutique est destinée à être administrée à un sujet selon une quantité thérapeutiquement efficace.
- 20
8. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, **caractérisée par le fait que** la composition pharmaceutique est destinée à une utilisation en tant que médicament.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

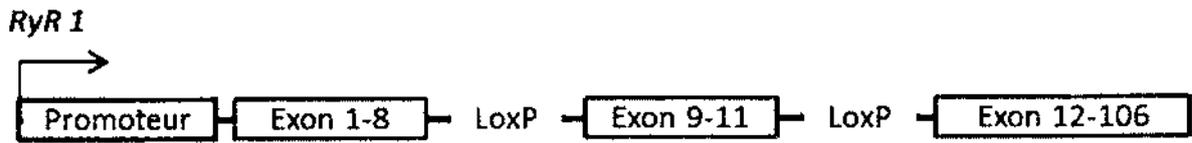


Figure 1

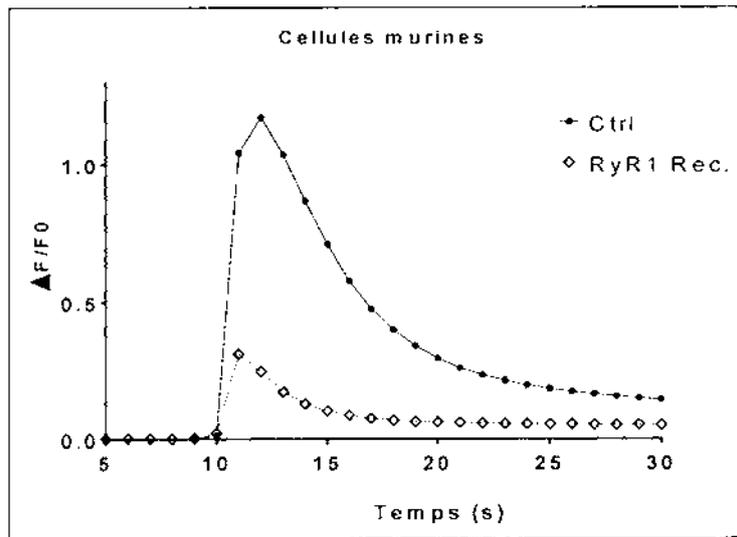


Figure 2

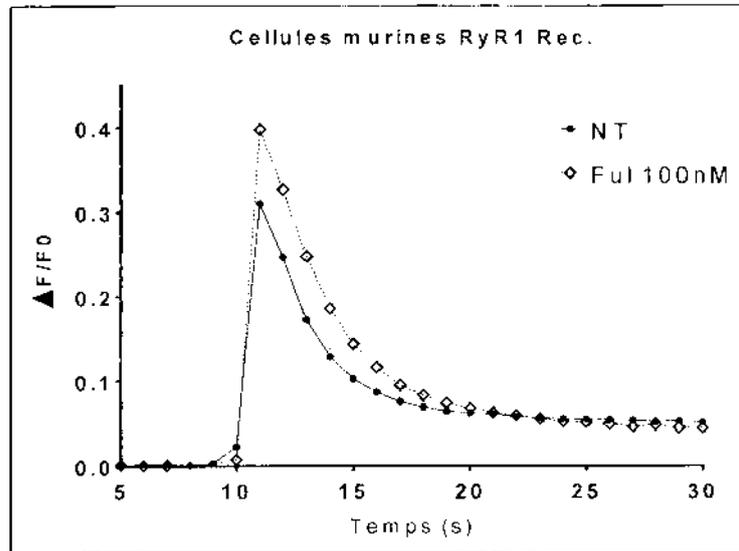


Figure 3A

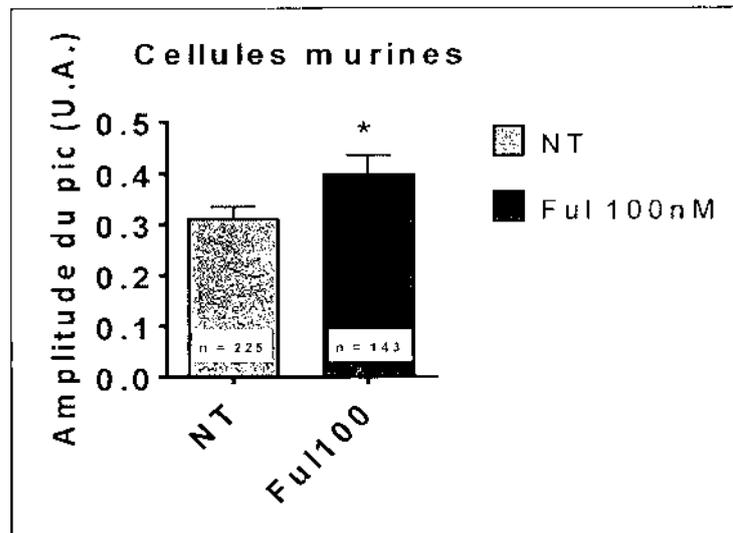


Figure 3B

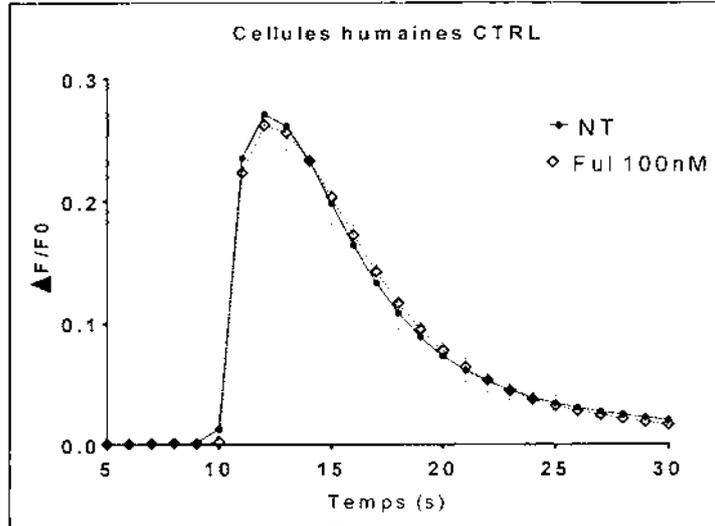


Figure 4A

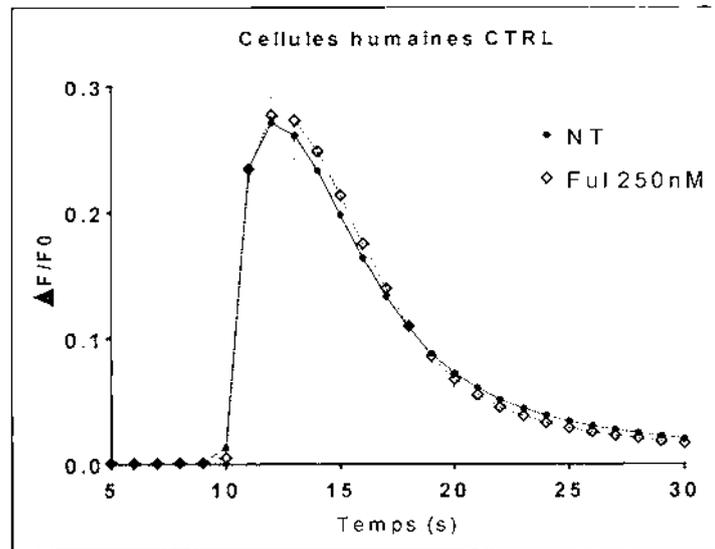


Figure 4B

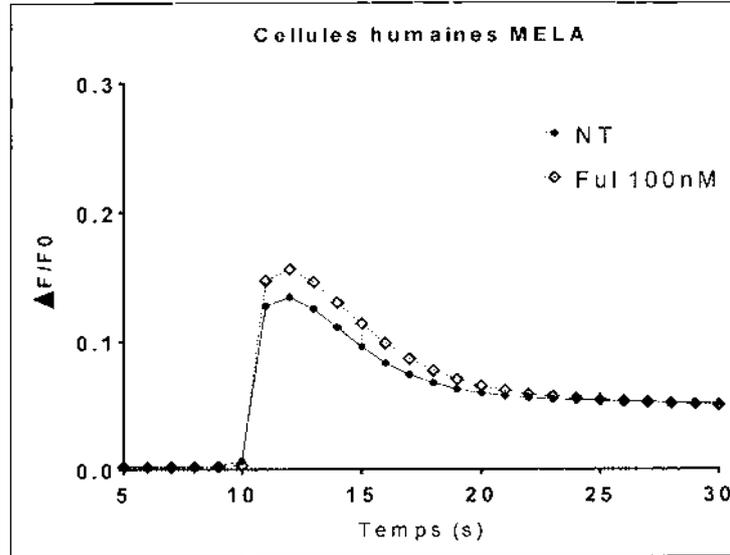


Figure 4C

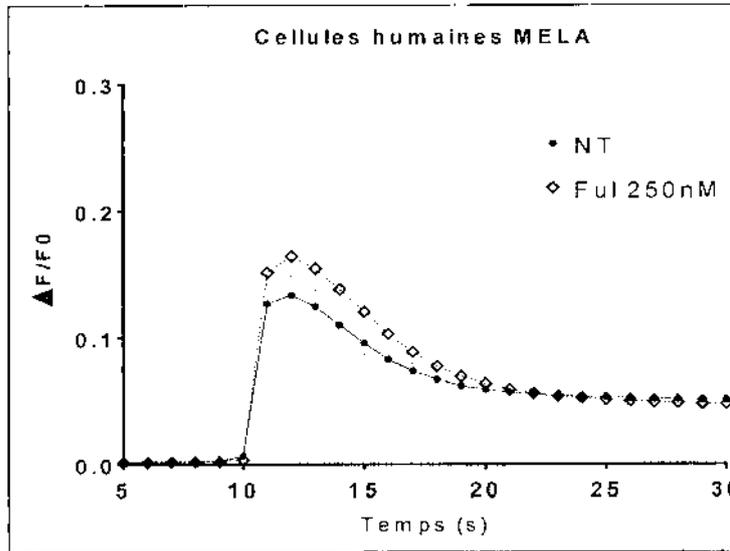


Figure 4D

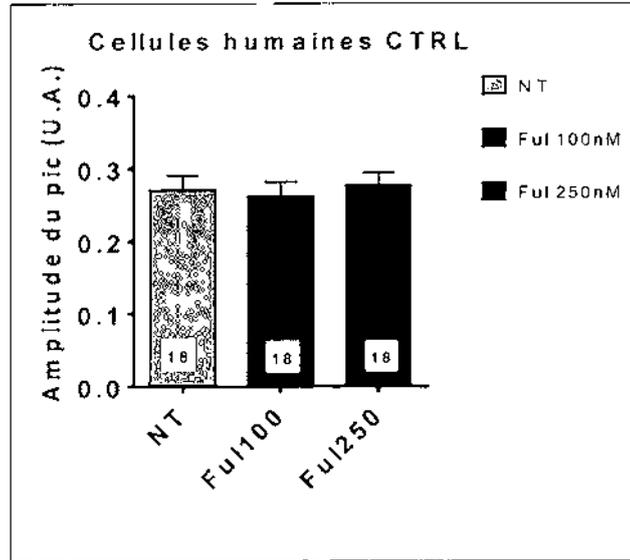


Figure 4E

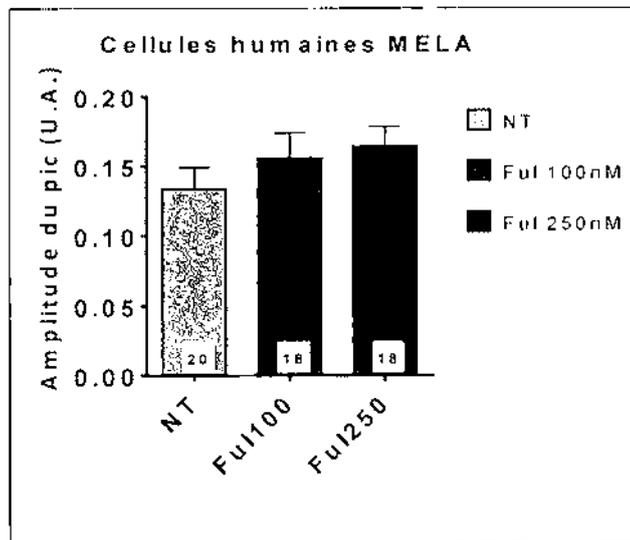


Figure 4F

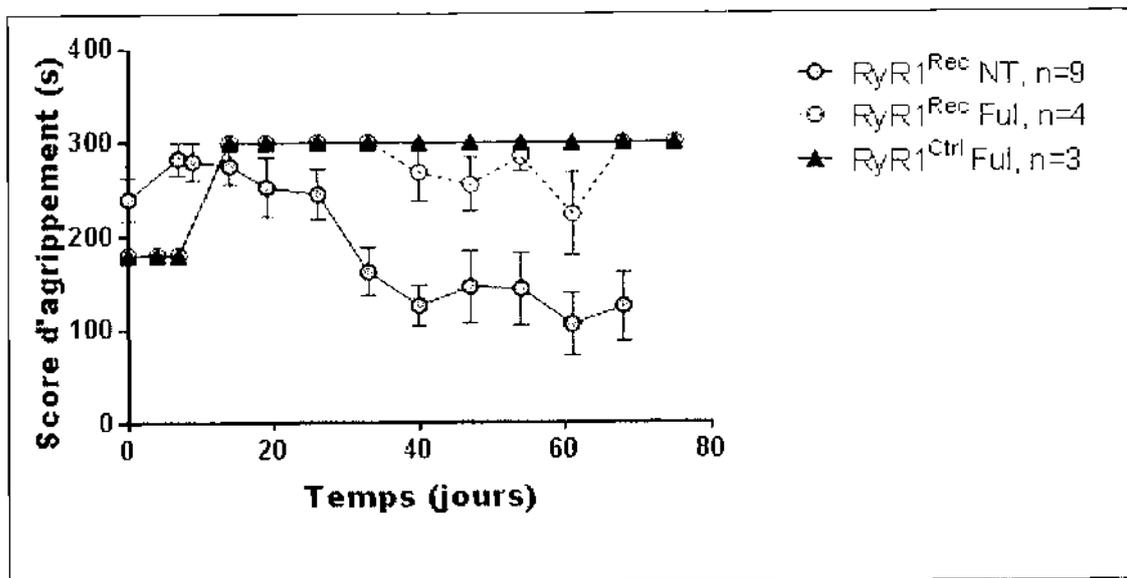


Figure 5



## RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 19 31 5023

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	DORCHIES O ET AL: "Preclinical evaluation of tamoxifen and other selective estrogen receptor modulators in mdx5Cv dystrophic mice", JOURNAL OF NEUROMUSCULAR DISEASES 2014 IOS PRESS NLD, vol. 1, no. Supplement 1, 2014, XP002794499, ISSN: 2214-3602 * le document en entier *	1,2,4-8	INV. A61K31/565 A61P21/00
X	WO 2015/108988 A2 (LIGAND PHARM INC [US]; ZHI LIN [US]) 23 juillet 2015 (2015-07-23) * page 32, ligne 14 - page 35, ligne 16 * * page 44, ligne 9 - ligne 17 *	1,2,4-8	
A	ERICK O. HERNÁNDEZ-OCHOA ET AL: "Critical Role of Intracellular RyR1 Calcium Release Channels in Skeletal Muscle Function and Disease", FRONTIERS IN PHYSIOLOGY, vol. 6, 12 janvier 2016 (2016-01-12), XP55625260, DOI: 10.3389/fphys.2015.00420 * le document en entier *	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC) A61K A61P
X	LERNER A ET AL: "Evaluation of the Efficacy of Fulvestrant in Locally Advanced and Metastatic Breast Cancer in a Single Breast Unit", CLINICAL ONCOLOGY, vol. 29, no. 6, 2017, XP029990791, ISSN: 0936-6555, DOI: 10.1016/J.CLON.2017.01.025 * le document en entier *	6-8	
----- -/--			
2 Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche La Haye		Date d'achèvement de la recherche 24 septembre 2019	Examinateur Hoff, Philippe
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 03 02 (POURC02)



## RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 19 31 5023

5

10

15

20

25

30

35

40

45

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
A,D	<p>OLIVIER M. DORCHIES ET AL: "The Anticancer Drug Tamoxifen Counteracts the Pathology in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY., vol. 182, no. 2, 1 février 2013 (2013-02-01), pages 485-504, XP55428453, US ISSN: 0002-9440, DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.10.018 * le document en entier *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-8	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche		Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
La Haye		24 septembre 2019	Hoff, Philippe
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

2

EPO FORM 1505 08 02 (PUBIC02)

50

55

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET EUROPEEN NO.**

EP 19 31 5023

5 La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche européenne visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

24-09-2019

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2015108988 A2	23-07-2015	EP 3094323 A2	23-11-2016
		US 2016338995 A1	24-11-2016
		WO 2015108988 A2	23-07-2015
-----			

EPO FORM P0450

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

## RÉFÉRENCES CITÉES DANS LA DESCRIPTION

Cette liste de références citées par le demandeur vise uniquement à aider le lecteur et ne fait pas partie du document de brevet européen. Même si le plus grand soin a été accordé à sa conception, des erreurs ou des omissions ne peuvent être exclues et l'OEB décline toute responsabilité à cet égard.

## Littérature non-brevet citée dans la description

- **BERRY M ; METZGER D ; CHAMBON P.** Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the antioestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.*, Septembre 1990, vol. 9 (9), 2811-2818 [0087]
- **DE LUCA A ; PIERNO S ; LIANTONIO A ; CETRO-NE M ; CAMERINO C ; SIMONETTI S ; PAPANIA F ; CAMERINO DC.** Alteration of excitation-contraction coupling mechanism in extensor digitorum longus muscle fibres of dystrophic mdx mouse and potential efficacy of taurine. *Br J Pharmacol.*, Mars 2001, vol. 132 (5), 1047-54 [0087]
- **DORCHIES OM ; REUTENAUER-PATTE J ; DAHMANE E ; ISMAIL HM ; PETERMANN O ; PATTHEY-VUADENS O ; COMYN SA ; GAYI E ; PIANCENZA T ; HANDA RJ.** The anticancer drug tamoxifen counteracts the pathology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol.*, Février 2013, vol. 182 (2), 485-504 [0087]
- **DOWLING JJ ; LOW SE ; BUSTA AS ; FELDMAN EL.** Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Hum Mol Genet.*, 01 Juillet 2010, vol. 19 (13), 2668-81 [0087]
- **DOWLING JJ ; VREEDE AP ; LOW SE ; GIBBS EM ; KUWADA JY ; BONNEMANN CG ; FELDMAN EL.** Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.*, Février 2009, vol. 5 (2), e1000372 [0087]
- **KULKOYLUOGLU E ; MADAK-ERDOGAN Z.** Nuclear and extranuclear-initiated estrogen receptor signaling crosstalk and endocrine resistance in breast cancer. *Steroids*, Octobre 2016, vol. 114, 41-47 [0087]
- **PLANT DR ; LYNCH GS.** Depolarization-induced contraction and SR function in mechanically skinned muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol.*, Septembre 2003, vol. 285 (3), C522-8 [0087]
- **RENDU J ; BROCARD J ; DENARIER E ; MONNIER N ; PIÉTRI-ROUXEL F ; BELEY C ; ROUX-BUISSON N ; GILBERT-DUSSARDIER B ; PEREZ MJ ; ROMERO N.** Exon skipping as a therapeutic strategy applied to an RYR1 mutation with pseudo-exon inclusion causing a severe core myopathy. *Hum Gene Ther.*, Juillet 2013, vol. 24 (7), 702-13 [0087]
- **SALVATORI L ; PALLANTE P ; RAVENNA L ; CHINZARI P ; FRATI L ; RUSSO MA ; PETRANGELI E.** Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. *Oncogene*, 31 Juillet 2003, vol. 22 (31), 4875-81 [0087]
- **SCHINDELIN, J. ; ARGANDA-CARRERAS, I. ; FRISE, E. et al.** Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 2012, vol. 9 (7), 676-682 [0087]



Annexe 3 : In vivo RyR1 reduction in muscle triggers a core-like myopathy

## **In vivo RyR1 reduction in muscle triggers a core-like myopathy**

Laurent Pelletier, Anne Petiot, Julie Brocard, Benoit Giannesini, Diane Giovannini, Colline Sanchez, **Lauriane Travard**, Mathilde Chivet, Mathilde Beaufils, Candice Kutchukian, David Bendahan, Daniel Metzger, Clara Franzini Armstrong, Norma B Romero, John Rendu, Vincent Jacquemond, Julien Fauré, Isabelle Marty

Acta Neuropathol Commun. 2020 Nov 11;8(1):192.  
doi: 10.1186/s40478-020-01068-4.

RESEARCH

Open Access



# In vivo RyR1 reduction in muscle triggers a core-like myopathy

Laurent Pelletier<sup>1†</sup>, Anne Petiot<sup>1†</sup>, Julie Brocard<sup>1</sup>, Benoit Giannesini<sup>2†</sup>, Diane Giovannini<sup>1†</sup>, Colline Sanchez<sup>3</sup>, Lauriane Travard<sup>1</sup>, Mathilde Chivet<sup>1</sup>, Mathilde Beauflis<sup>1</sup>, Candice Kutchukian<sup>3</sup>, David Bendahan<sup>2</sup>, Daniel Metzger<sup>4</sup>, Clara Franzini Armstrong<sup>5</sup>, Norma B. Romero<sup>6</sup>, John Rendu<sup>1</sup>, Vincent Jacquemond<sup>3</sup>, Julien Fauré<sup>1</sup> and Isabelle Marty<sup>1\*</sup> 

## Abstract

Mutations in the *RYR1* gene, encoding the skeletal muscle calcium channel RyR1, lead to congenital myopathies, through expression of a channel with abnormal permeability and/or in reduced amount, but the direct functional whole organism consequences of exclusive reduction in RyR1 amount have never been studied. We have developed and characterized a mouse model with inducible muscle specific *RYR1* deletion. Tamoxifen-induced recombination in the *RYR1* gene at adult age resulted in a progressive reduction in the protein amount reaching a stable level of 50% of the initial amount, and was associated with a progressive muscle weakness and atrophy. Measurement of calcium fluxes in isolated muscle fibers demonstrated a reduction in the amplitude of RyR1-related calcium release mirroring the reduction in the protein amount. Alterations in the muscle structure were observed, with fibers atrophy, abnormal mitochondria distribution and membrane remodeling. An increase in the expression level of many proteins was observed, as well as an inhibition of the autophagy process. This model demonstrates that RyR1 reduction is sufficient to recapitulate most features of Central Core Disease, and accordingly similar alterations were observed in muscle biopsies from Dusty Core Disease patients (a subtype of Central Core Disease), pointing to common pathophysiological mechanisms related to RyR1 reduction.

**Keywords:** Ryanodine receptor, Calcium, Skeletal muscle, Excitation–contraction coupling, Congenital myopathies, Central core disease, Dusty core disease, Mouse model

## Introduction

One key step for skeletal muscle contraction is the intracellular calcium release performed by the sarcoplasmic reticulum calcium channel ryanodine receptor (RyR1)

during the excitation–contraction coupling process. RyR1 is the core of the Calcium Release Complex (CRC), anchored both in the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane and the T-tubule membrane, in a specific region of the muscle called the triad where these two membranes are in close apposition. Additional proteins are associated with RyR1 to form the CRC, including the voltage-activated plasma membrane calcium channel dihydropyridine receptor (DHPR) [1], and regulatory proteins like the sarcoplasmic reticulum calcium binding protein calsequestrin (CSQ), or the sarcoplasmic reticulum membrane proteins triadin and junctin [2]. Numerous mutations in the *RYR1* gene encoding the ryanodine receptor result in genetic diseases among which two core myopathies:

\*Correspondence: isabelle.marty@univ-grenoble-alpes.fr

<sup>†</sup>Laurent Pelletier and Anne Petiot have contributed equally.

<sup>‡</sup>Benoit Giannesini, Diane Giovannini, and Colline Sanchez have contributed equally.

<sup>1</sup>INSERM, GIN-U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, University Grenoble Alpes, Bat EJ Safra, Chemin Fortuné Ferrini, La Tronche, Grenoble, France

Full list of author information is available at the end of the article



Central Core Disease (CCD, OMIM#117000) and Multiminicore disease (MmD, OMIM#255320). The impact of *RYR1* mutations are either an alteration of the RyR1 calcium channel function (gain- or loss-of-function), a modification of the RyR1-DHPR coupling, or the reduction in the amount of RyR1 protein. In all cases, the consequence is a reduction in the amplitude of calcium release upon stimulation, resulting in muscle weakness [3–8]. To explore the various pathophysiology mechanisms associated with *RYR1* mutations, different mouse models have been created. They mostly reproduce amino acid substitutions in the RyR1 protein associated with mutations identified in patients in dominant (Y522S, I4898T) [9, 10] or recessive pathologies (T4706M + del; Q1970fsX16 + A4329D) [11–13]. These models have been useful to better understand some aspects of RyR1 physiology and to confirm the pathogenicity of patients' mutations, but reveal mechanisms that are specific to individual or to a combination of RyR1 mutations. The recently developed recessive models combined an hypomorphic allele with a point mutation [11, 12], and therefore, on a mechanistic point of view, presented with both important reduction in RyR1 amount and expression of a mutant channel with altered calcium permeability.

In the present work we focused on the pathophysiology of the exclusive reduction in RyR1 protein expression in muscle, as this situation is frequently observed in patients affected with recessive congenital myopathy. To dissect the mechanisms related to a reduction in RyR1 amount we have developed and characterized a mouse model with a conditional and inducible *RYR1* knock out. In mice, the full deletion of the *RYR1* gene is lethal at birth [14], and heterozygous deletion of a single *RYR1* allele results only in a modest 15% reduction in RyR1 protein, with no functional consequences [15]. In order to obtain a model with reduced amount of RyR1 specifically in skeletal muscles, we have developed a new mouse line *RyR1<sup>Flox/Flox</sup>::HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>* in which a decreased *RYR1* expression is induced by tamoxifen injection. We show that few weeks after induction, the amount of RyR1 protein reached 50% of initial level, and the mice developed a progressive myopathy, which recapitulates the main features observed in patients affected with Dusty Core Disease and with a similar RyR1 reduction [16]. Dusty Core Disease has been recently described as a subgroup of recessive Central Core Disease characterized by severe phenotype, early onset, low RyR1 expression, and histological lesions so-called dusty cores which differ from the classical central cores (well delimited region depleted in mitochondrial enzymatic activity) by the presence of regions within the same fiber of blended increase/decrease enzymatic activity (dusty cores) [16]. This model which presents the same molecular and

structural modifications as patients could therefore be a valuable tool for further pathophysiological mechanisms dissection and for therapeutic development.

## Materials and methods

### Engineering of the mouse model

The RyR1-flox mouse line has been established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute, Illkirch, France; <http://www-mci.u-strasbg.fr>). LoxP sites were introduced by homologous recombination in ES cells on both sides of exons 9–11 of the *RYR1* gene. The HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> mouse line, in which the expression of the tamoxifen dependent Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase is under the control of the human skeletal muscle  $\alpha$ -actin gene, has been described previously [17]. In this transgenic line Cre-ER<sup>T2</sup> is selectively expressed in skeletal muscles fibers and activated upon tamoxifen injection, and Cre-ER<sup>T2</sup>-mediated alteration of LoxP (floxed) target genes is skeletal muscle-specific and strictly tamoxifen dependent. The two mouse lines were on a C57BL/6 J background and intercrossed to create the *RyR1<sup>Flox/Flox</sup>::HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>* mouse line. Mice were given ad libitum access to food and water, food pellets were provided directly in the cage to ensure a correct feeding.

### Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibody against RyR1, Trisk 95 and Trisk 51 and guinea pig anti-RyR1 C-terminal peptide have been previously described [1, 18, 19], as well as antibodies against SERCA (kindly provided by Moutin [20]), and antibody against the FoF1-ATPase (kindly provided by Lunardi [21]). Antibody against the alpha subunit of DHPR was from Abcam (ref ab2862), antibody against STIM1 from Merck Millipore (ref AB9870), antibody against CSQ1 was ThermoFisher (ref MA3-913), antibody against CLIMP63 from Bethyl (Rabbit anti-CKAP4 antibody, ref A302-257A), antibody against Orail from Alomone labs (ref ACC-062), antibody against desmin from Dako (ref M0724), polyclonal antibody against alpha-actinin from Sigma Aldrich (ref SAB4503474), antibody against p62 from Abnova (SQSTM1 monoclonal antibody clone 2C11 ref H00008878-M01), antibody against LC3A/B from Cell Signaling Technology (ref 4108), as well as antibody against mTOR and P-mTOR (ref 2972 and 2971 respectively), antibody against S6 and P-S6 (ref 2217 and 2215 respectively), rabbit mAb against GAPDH (14C10, ref 2128S). Secondary antibodies used for Western blot were labelled with HRP (Jackson Immuno Research), and the antibodies used for immunofluorescent staining were labelled with Alexa fluor 488, Cy-3 or Cy-5 (Jackson Immuno Research). Tamoxifen was from Sigma Aldrich.

### Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)

Target gene transcript expression was measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Total RNA was isolated from muscle tissue using NucleoSpin RNA Set for NucleoZOL (Macherey–Nagel). RNA was quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA). RNA was reverse transcribed using iScript Reverse Transcription Supermix for RT-PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Then RT-qPCR was conducted using SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), and 1 µl cDNA was used to detect the transcript of interest. All reactions were run in duplicate. RT-qPCR reactions were run on an CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The primer sequences were designed using Vector NTI software (Thermo-Fischer). The amplification steps were the following: 50 °C–2 min; 95 °C–10 min; 40 cycles composed of 95 °C–15 s, 60 °C–30 s, 72 °C–30 s; 72 °C–10 min. A threefold RNA dilution series was used to determine efficiency of each qPCR assay. Efficiency of all qPCRs was between 95 and 105%. Amplification data were analyzed with CFX manager software (Bio-Rad). Expression was normalized to three endogenous controls (beta-actin, HPRT and GAPDH) using the  $\Delta\Delta C_t$  method. The primers (forward and reverse) used for PCR amplification are listed in Table 1.

### Western blot analysis and quantification

Western blot analysis was performed on muscle homogenates as previously described [16]. Briefly, after electrophoretic separation on a 4–20% gradient acrylamide gel (Stain-free precast gel, Biorad, France) and electrotransfer to Immobilon P (Biorad, France), the membrane was incubated with primary antibodies and then HRP-labelled secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Signal quantification was performed using a ChemiDoc Touch apparatus (Biorad, France) and the Image Lab software (Biorad). The amount of the chosen protein in each sample was corrected for differences in loading using either the amount of myosin, GAPDH or the total amount of proteins using the stain free system from Biorad, and

normalized to the amount of the same protein present in the control, set to 100% as described previously [15]. Ten human controls (muscle biopsy from individuals non-affected by neuromuscular disease) of different age have been used, from 3.5 to 64 years. For each sample (mouse and human), 2–3 Western blots have been performed, and the value for each sample corresponds to the mean  $\pm$  SEM of the different Western blots.

### Grip test

The animals were trained 3 times on 3 different days over the week before tamoxifen injection, and they were subsequently tested once a week until muscle collection. The animals were positioned on a cross-wired surface where they could hold on with all four paws. The grid was then turned upside down, and the time during which each animal was able to stay on wires before falling was recorded, up to a maximum of 300 s (5 min). Three falls were allowed.

### Noninvasive investigation of gastrocnemius muscle function and bioenergetics

*Gastrocnemius* muscle anatomy and mechanical performance were investigated noninvasively and longitudinally using MR measurements in 8 controls and 6 RyR1-Rec littermates every month at D30, D60 and D90 after tamoxifen injection. Additionally, muscle energy metabolism was assessed at D60 simultaneously to mechanical performance acquisition. Anesthetized mice were placed into a home-built cradle allowing the MR investigation of the left gastrocnemius muscle function and bioenergetics in a preclinical 47/30 Biospec Avance MR scanner (Bruker, Karlsruhe, Germany) as described previously [22, 23]. Ten axial anatomic images (1-mm thickness; 0.5-mm spaced;  $0.117 \times 0.117$  mm<sup>2</sup> spatial resolution) covering the region from the knee to the ankle were acquired at rest. Mechanical performance was recorded using a dedicated ergometer during a fatiguing bout of exercise electrically induced by square-wave pulses (1 ms duration) with transcutaneous surface electrodes and consisting in 6 min of maximal isometric contractions repeated at a frequency of 1.7 Hz. At D60, concentrations of high-energy phosphorylated compounds and pH were

**Table 1 Primers for RT-qPCR**

Target gene	Forward	Reverse
ACTB	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	ACCAGAGGCATACAGGGACA
GAPDH	CGTGCCGCCTGGAGAAAC	TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG
HPRT	CCTAATCATTATGCCGAGGATTTGG	CCCATCTCCTTCATGACATCTCGAG
RYR-1	GGTCTGATTATTGATGCTTTTGGGG	TGGTCTCCATGCTTCTTCACTTG

continuously measured using dynamic  $^{31}\text{P}$ -MR spectroscopy during rest (6 min), exercise (6 min) and post-exercise recovery period (16 min). MR data were processed using custom-written analysis programs developed on the IDL software (Research System, Boulder, CO).

### Histological staining

Ten  $\mu\text{m}$  thick cryostat *Tibialis anterior* (TA) sections (Cryostar Nx70, Thermo Scientific) were stained with haematoxylin and eosin (HE), modified Gomori trichrome (GT) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase-tetrazolium reductase (NADH-TR), and observed using a Leica ICC 50 microscope.

### Electron microscopy

EDL muscles of RyR1-Rec male mice 75 days after tamoxifen injection (4.5 months old) were excised, cut into small pieces and prepared as described before [22]. The sections were observed with a Jeol JEM 1200EX II at 60 kV.

### Immunofluorescent labelling

EDL muscles were collected from CTRL and RyR1-Rec littermates 75 days after tamoxifen injection. After 15 min fixation at RT in 4% PFA diluted in PBS, the fibers were manually dissociated using needles to comb the fibers, and the triple labelling was performed as described previously [22] using primary antibodies developed in guinea pig, rabbit or mouse, and anti-species secondary antibodies labelled with either Alexa fluor 488, Cy 3 or Cy 5. The images are representative of at least 3 animals in each group.

### Electrophysiology and confocal fluorescence imaging in isolated muscle fibers

Single fibers were isolated from the *flexor digitorum brevis* (FDB) and *interosseus* muscles following previously described procedures [24–26]. In brief, muscles were digested by incubation with collagenase followed by trituration to produce dissociated fibers. All experiments were performed at room temperature (20–22 °C). Membrane depolarizing steps of 0.5 s duration were applied from a holding potential of  $-80$  mV to the single fibers partly insulated with silicone grease, and the resulting voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  transients was measured using the dye rhod-2 introduced into the fiber by the patch pipette. The detailed electrophysiological procedures are described in Additional file 1: Supplementary method.

### Statistics

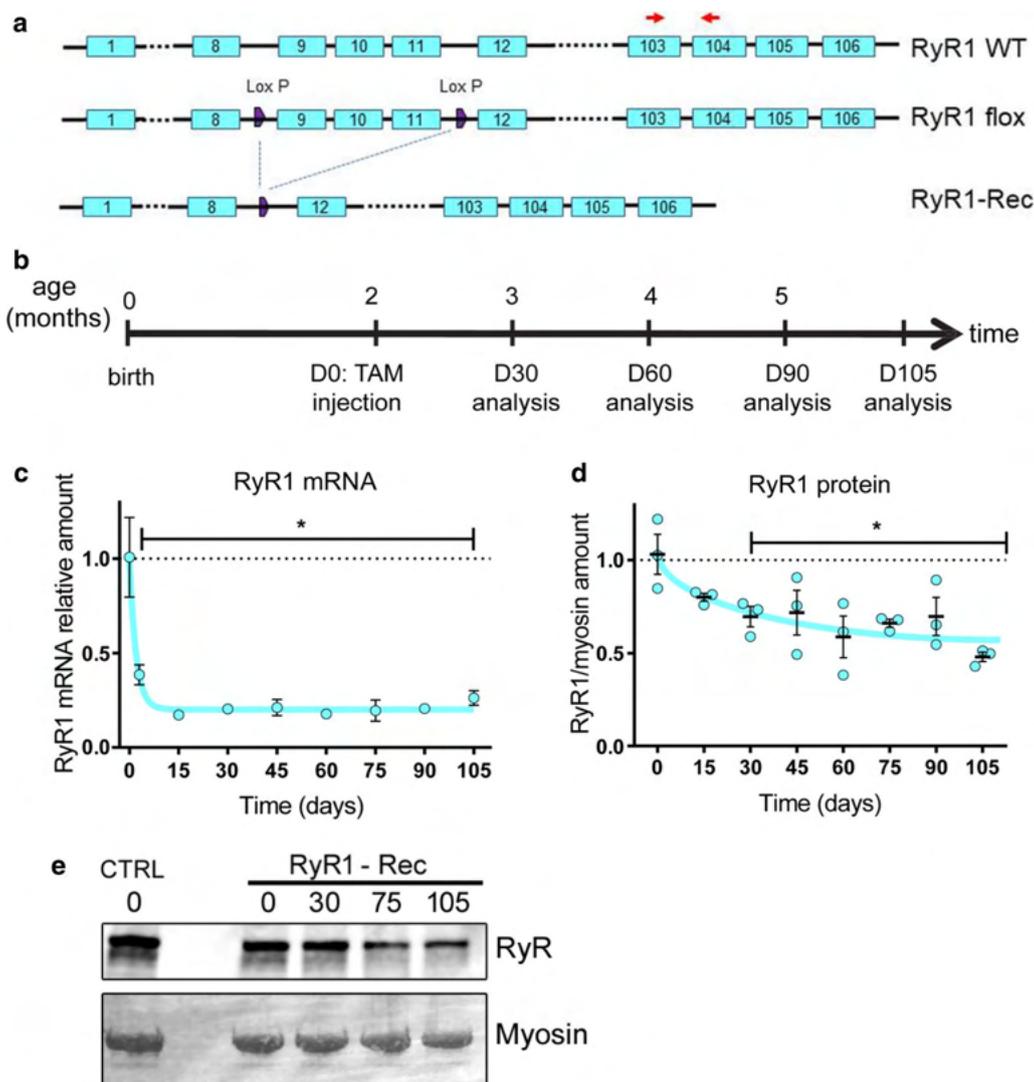
The statistical analysis has been done with GraphPad Prism 6.0 software. The number of samples and the name

of the parametric test applied are indicated in each figure legend. Results are considered as significant when  $p < 0.05$ , the exact value for  $p$  being indicated in the text or figure legends, and significant results are labeled \* on the graphs whatever the exact  $p$  value. All data are shown as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### Generation of the RyR1<sup>Flox/Flox</sup>::HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> mouse model

A mouse line with loxP sites inserted on both side of exons 9–11 of the *RYR1* gene (so called RyR1<sup>Flox/Flox</sup>) was mated with the mouse line HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> expressing the tamoxifen dependent Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase under the control of the human skeletal muscle  $\alpha$ -actin gene [17], to create RyR1<sup>Flox/Flox</sup>::HSA-Cre-ER<sup>T2</sup>. Tamoxifen injection induces activation of the Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase selectively in skeletal muscle, which results in the deletion of exons 9–11 and disruption of the *RYR1* gene in skeletal muscle with a strict tamoxifen dependence (Fig. 1a). At birth, RyR1<sup>Flox/Flox</sup>::HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> mice were normal, and at 2 months of age, once young adults, the recombination was induced by tamoxifen injection (from this time point, the recombined animals were called RyR1-Rec). Molecular and physiological consequences were further studied as a function of time, up to 105 days after induction of recombination (Fig. 1b). Control animals (CTRL) are littermates RyR1<sup>Flox/Flox</sup> (without the HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> transgene) injected with tamoxifen. The overall phenotype of the recombined mice at 75 days is characterized by a kyphosis associated with an abnormal mobility of the hind limbs and a waddling walking. The animals are still able to stand on their rear feet to feed, but food pellets had been systematically given directly in the cage as the disease progressed. At 105 days, the animals are still mobile in their cages and no increased death rate observed compared to CTRL. Both males and females were affected. The relative amount of RyR1 at the mRNA level was analyzed in quadriceps muscle every 15 days after recombination using RT-q-PCR in CTRL and in RyR1-Rec animals (Fig. 1c). A rapid drop in RyR1 mRNA was observed, with a low and stable level of  $21\% \pm 4\%$  of the initial value reached as soon as 3 days after tamoxifen injection. A reduction was observed in all of the tested muscles 75 days after recombination induction (*Quadriceps*, *tibialis anterior*, *EDL*, *soleus*, Additional file 1: Fig. S1A). The amount of RyR1 protein was further analyzed, using quantitative Western blot in quadriceps muscle homogenates (Fig. 1d, e). This amount was progressively reduced and reached about 50% of initial value after 105 days. No further reduction in RyR1 protein was observed on longer times (data not shown). The amount of RyR1 protein was quantified in different muscle homogenates 75 days after recombination. A reduction

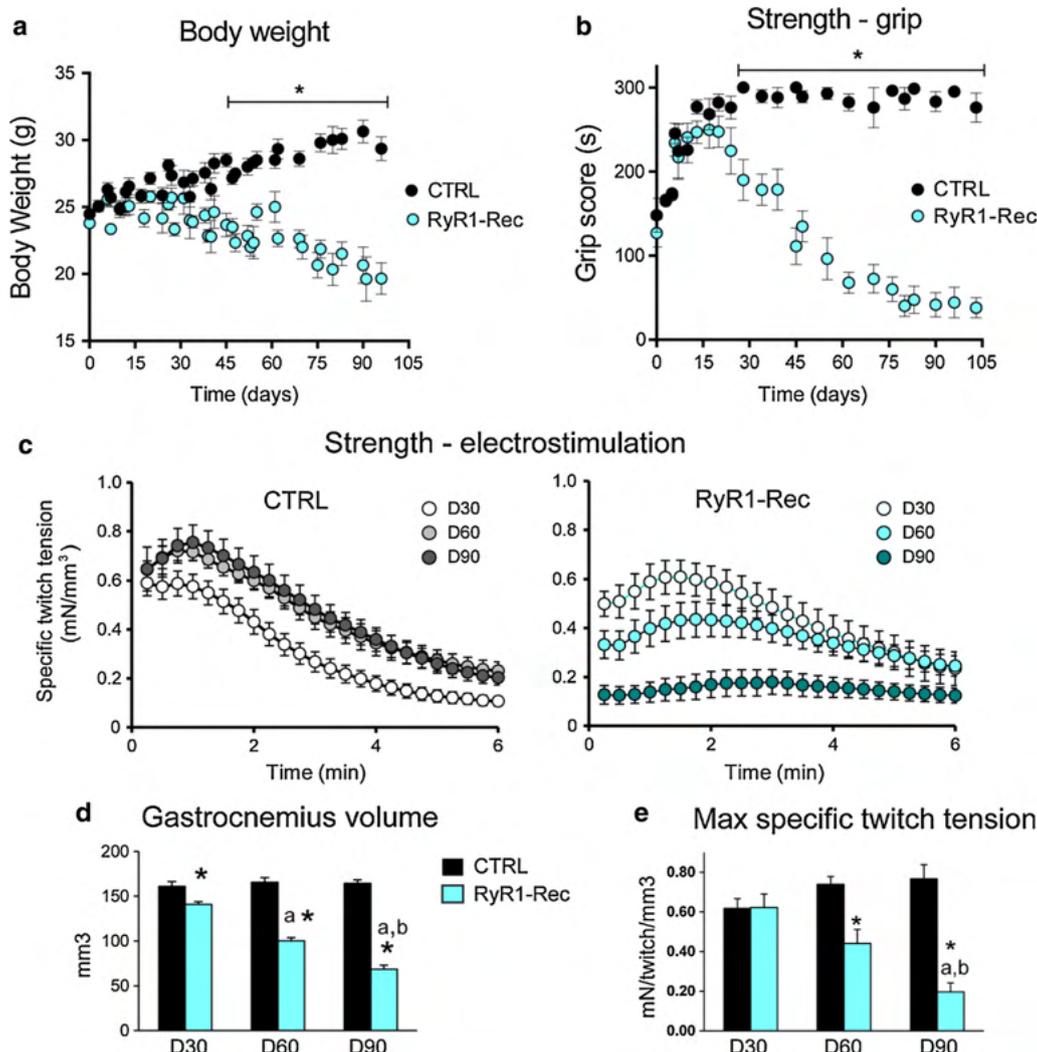


**Fig. 1** RyR1 mRNA and protein decrease after tamoxifen injection in the RyR1<sup>Fllox/Fllox</sup>;;HSA-Cre-ER<sup>T2</sup> mouse model. **a** LoxP sites were inserted on both sides of exons 9-11 in the RyR1 WT allele to create the RyR1-flox allele. After recombination, the RyR1-Rec allele is deleted with exons 9-11. The primers used for the RT-q-PCR amplification of RyR1 transcript of panel care represented by the red arrows respectively in exon 103 and 104. **b** The animals were injected with tamoxifen to induce the recombination at 2 months of age (D0), and were analyzed at variable times thereafter. **c** The relative amount of mRNA compared to beta-actin, HPRT and GAPDH as reference genes were evaluated using RT-q-PCR in quadriceps muscles of n = 3–6 different mice at each time point, and is presented as mean ± SEM for each time. The amount in CTRL littermate was set to 1. The quantification was performed using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Statistical analysis: One way ANOVA with Holm–Sidack’s test for multiple comparisons. **d** The relative amount of RyR1 compared to myosin heavy chain was evaluated using quantitative Western blot in quadriceps homogenates of n = 3–6 different mice at each time point. The initial amount was set to 1. **e** Representative Western blot of RyR1 on CTRL and RyR1-Rec quadriceps homogenates at different time points, using myosin heavy chain as a control of protein amount. Statistical analysis: One way ANOVA with Holm–Sidack’s test for multiple comparisons

was observed in all the assayed muscles, although the remaining amount slightly differed between the muscles, the highest being in *interosseous* (64% ± 5%) and the lowest in *soleus* (33% ± 5%) (Additional file 1: Fig. S1B).

**RyR1-Rec mice show progressive reduction in muscle and body weights and in muscle strength**

The consequences of RyR1 reduction were first studied at the whole animal level. Initially at the same weight, the



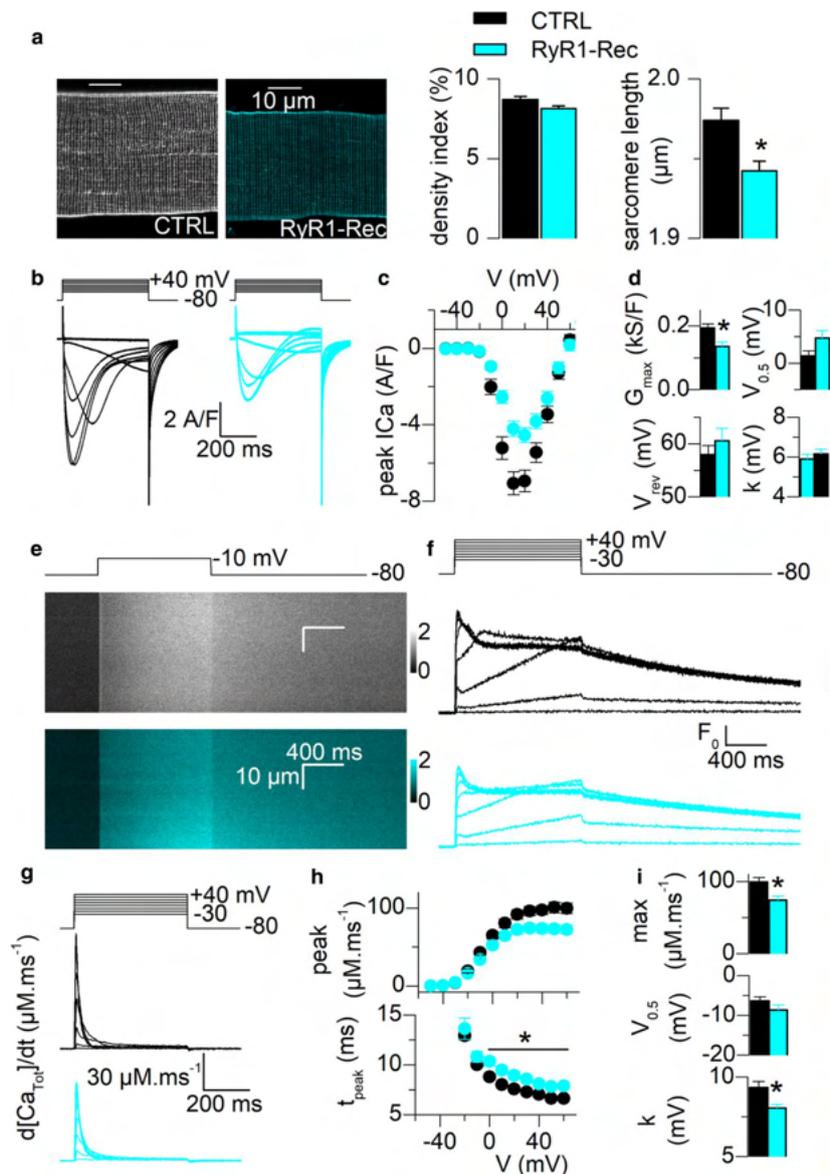
**Fig. 2** RyR1-Rec mice show progressive reduction in muscle and body weights and in muscle strength. **a** Body weight and **b** Muscle strength estimated as a function of time after recombination using a grip test in which the time the animals can hang upside down on a grid up to 5 min (300 s). Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 10-15$  animals in each group, \* $p < 0.05$  Student's *t* test with Holm-Sidak's correction for multiple comparisons. **c** Recording of the tension developed by gastrocnemius during a 6 min electrostimulation protocol at 2 Hz. Longitudinal study of the same animals (CTRL, left panel, and RyR1-Rec, right panel) at different times after recombination, 30 days (D30), 60 days (D60) and 90 days (D90). Data are mean  $\pm$  SEM of  $n = 8$  CTRL and  $n = 6$  RyR1-Rec animals. **d** Gastrocnemius muscle volume for CTRL ( $n = 8$ ) and RyR1-Rec ( $n = 6$ ) mice at 30, 60 and 90 days after recombination. Data are mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis: post hoc LSD Fisher test following two-way repeated measures ANOVA, \*significantly different from CTRL at the same time, <sup>a</sup>significantly different from D30 in the same group, <sup>b</sup>significantly different from D60 in the same group. **e** Maximal specific twitch tension (maximal twitch tension normalized to the gastrocnemius volume). Statistical analysis: post hoc LSD Fisher test following two-way repeated measures ANOVA \*significantly different from CTRL at the same time, <sup>a</sup>significantly different from D30 in the same group, <sup>b</sup>significantly different from D60 in the same group

CTRL animals slowly gained weight from  $24.4 \pm 0.4$  to  $30.6 \pm 0.8$  g at D90 whereas the RyR1-Rec animals progressively lost weight to  $20.6 \pm 1.3$  g at D90 (Fig. 2a). Both males and females were affected and lost about 13% of their initial body weight after 75 days (Additional file 1: Fig. S1C). This is the result of a weight loss observed in all the muscles (Additional file 1: Fig. S1D). To test the overall muscle performance after RyR1 reduction, the animals

were subjected to two different strength tests. They were first allowed to hang gripping a cross-wired surface with all four paws up to 5 min, the latency to fall reflecting the muscle force. The grip test performed every week during 105 days (Fig. 2b) showed that RyR1-Rec animals started losing strength 20–30 days after tamoxifen injection, when the amount of RyR1 was about 75–80% of its initial value, and were unable to hang on the grid about 75 days

after tamoxifen injection, as RyR1 amount had reached the level of about 60%. Muscle strength was also assessed by a 6 min noninvasive electrostimulation protocol of the *gastrocnemius* muscle coupled to anatomic magnetic

resonance imaging (MRI) under general anesthesia. During the electrostimulation protocol of CTRL animals 30 days after tamoxifen injection (Fig. 2c, D30) a typical exercise profile was recorded, with a stable initial muscle



**Fig. 3** Excitation-contraction coupling in single isolated muscle fibers is altered. All values are mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined using a Student's t-test. **a** Representative confocal images of T-tubule network stained with di-8-anepss from a CTRL and a RyR1-Rec fiber, allowing evaluation of T-tubule density and sarcomere length, performed in 42 CTRL fibers and 41 RyR1-Rec fibers (4 mice in each group). **b** Representative DHPR  $\text{Ca}^{2+}$  current from a CTRL and a RyR1-Rec fiber in response to 0.5 s-long depolarizing steps to the indicated levels (10 mV increment). **c** Voltage-dependence of the peak DHPR  $\text{Ca}^{2+}$  current density. **d** Parameters obtained from the fit of curves **c** in 29 CTRL fibers and 30 RyR1-Rec fibers (5 mice in each group), (cf Additional file 1: Supp. Method). **e** Representative  $x,t$  images of rhod-2 fluorescence (a.u.) from a CTRL and a RyR1-Rec fiber stimulated by a voltage-clamp depolarizing pulse to  $-10$  mV. **f** Representative line-averaged rhod-2  $\text{Ca}^{2+}$  transients from a CTRL and from a RyR1-Rec fiber in response to voltage-clamp pulses to the indicated levels. **g** Rate of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release calculated from the curves shown in **f**. **h** Voltage-dependence of the peak rate of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release (top) and of the time-to-peak rate of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release (bottom). **i** Parameters obtained from fitting the peak rate of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release vs voltage relationship with a Boltzmann function in each fiber (cf Additional file 1: Supplementary Method). Data are from the same fibers as in **b-d**.

strength which slowly declined as muscle fatigued. In the CTRL group at D60 and D90 the exercise profile showed improved muscle force when the animals got older (Fig. 2c). In contrast, the performance of RyR1-Rec animals, similar to CTRL at D30, deteriorated with age. RyR1-Rec animals were unable to perform the exercise anymore at D90 (Fig. 2c, RyR1-Rec D90). *Gastrocnemius* volume measured using MR images (Fig. 2d) remained stable in CTRL animals from D30 ( $161 \pm 5 \text{ mm}^3$ ) to D90 ( $164 \pm 4 \text{ mm}^3$ ). In contrast, in RyR1-Rec mice, *gastrocnemius* volume was significantly smaller than in CTRL mice since D30 ( $141 \pm 3 \text{ mm}^3$ ,  $p=0.003$ ), and was further reduced down to  $100 \pm 3 \text{ mm}^3$  at D60 ( $p<0.001$  compared to CTRL at the same age) and  $69 \pm 4 \text{ mm}^3$  at D90 ( $p<0.001$  compared to CTRL at the same age). The maximal specific twitch tension (absolute twitch tension normalized to muscle volume) confirms that both groups presented similar muscle strength at D30 (Fig. 2e), but RyR1-Rec animals' strength dramatically declined whereas it increased in CTRL animals as they got older. Additionally, the changes in *gastrocnemius* muscle bioenergetics during the electrostimulation were assessed noninvasively at D60 using in vivo 31-phosphorus ( $^{31}\text{P}$ ) MR spectroscopy. Whereas the basal intramyofibrillar pH did not differ between both groups (Additional file 1: Fig. S2A), the extent of acidosis at the end of the exercise was lower ( $p=0.016$ ) in RyR1 Rec animals (Additional file 1: Fig. S2B), thereby suggesting that glycolytic flux in exercising muscle was reduced in these animals. Moreover, the time constant of post-exercise phosphocreatine resynthesis ( $\tau\text{PCr}$ ) was significantly shorter ( $p=0.047$ ) in RyR1-Rec mice (Additional file 1: Fig. S2C, D), reflecting an improved in vivo mitochondrial function. Indeed, PCr synthesis during the post-exercise recovery period relies exclusively on oxidative ATP synthesis, thus  $\tau\text{PCr}$  is considered as an index of the oxidative phosphorylation capacity [27]. Overall, these results indicate that RyR1 progressive reduction is associated with a progressive loss of weight and a drop in muscle strength.

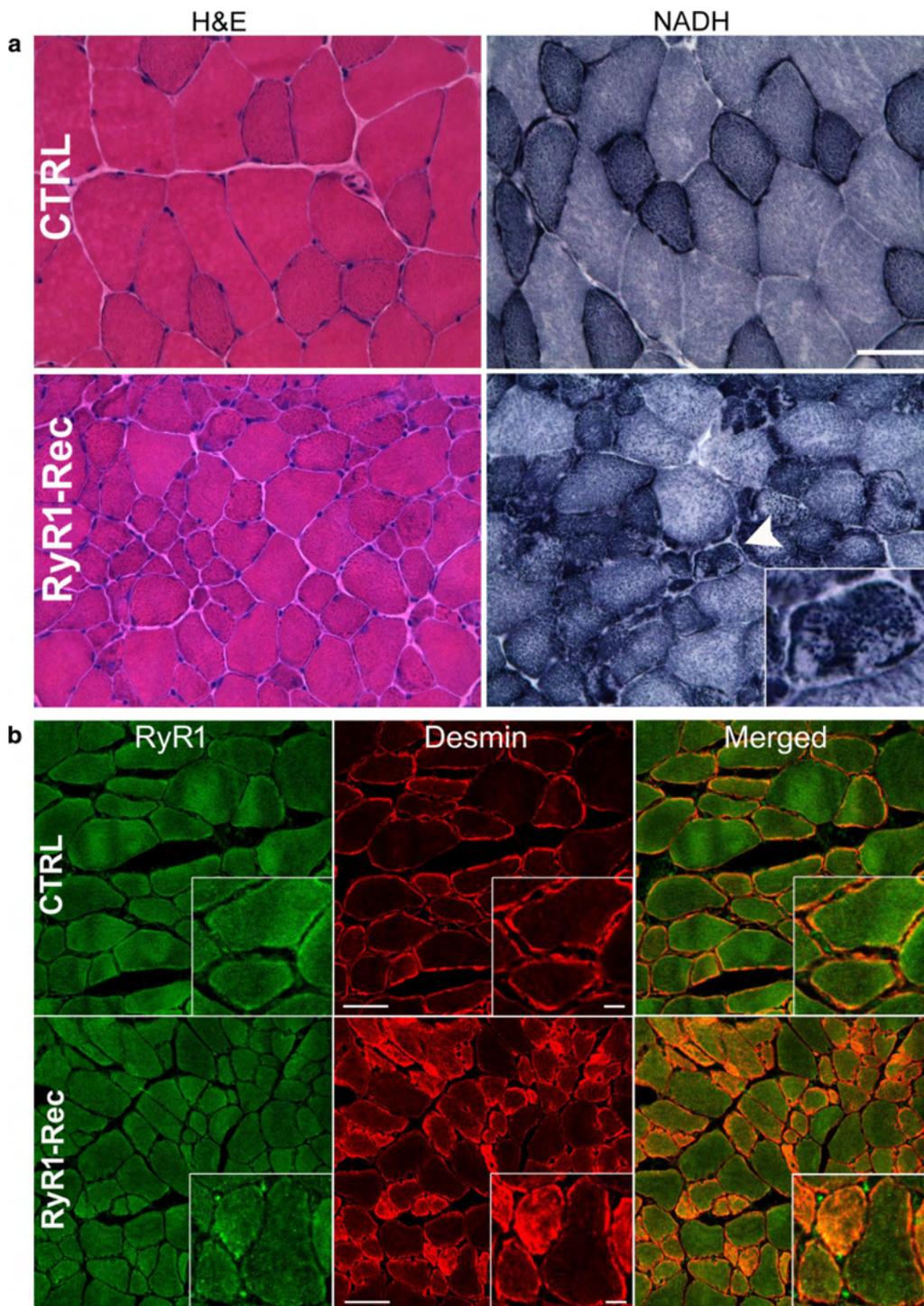
#### The physiological properties of isolated fibers are compromised in RyR1-Rec mice

The alteration of muscle function was further characterized at the single muscle fiber level using a combination of whole-cell voltage-clamp and confocal imaging [24, 25]. The T-tubule network was imaged by staining the plasma membrane with di-8-anepss. No qualitative difference in the network (Fig. 3a, left) or quantitative difference in the mean T-tubule density between CTRL and RyR1-Rec fibers were observed, beside a slight but significant shortening of the mean resting sarcomere length (Fig. 3a, graphs on the right). The voltage-activated  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the DHPR (Fig. 3b–d) and of the  $\text{Ca}^{2+}$

release flux through RyR1 (Fig. 3e–i) were simultaneously assessed. As compared to CTRL fibers, RyR1-Rec fibers exhibited voltage-activated DHPR  $\text{Ca}^{2+}$  currents of similar time course (Fig. 3b) but reduced density, as shown by the peak current density vs voltage in the two groups (Fig. 3c), which translated into a 30% reduction in maximum conductance ( $G_{\text{max}}$ ) with no associated change in the other parameters of the current vs. voltage relationship (Fig. 3d). The voltage dependence of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release was assessed from line-scan imaging of the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye rhod-2. Line-scan images from the RyR1-Rec fibers were qualitatively similar to those from CTRL fibers (Fig. 3e), showing a rapid rise in fluorescence upon T-tubule membrane depolarization, spatially homogeneous along the scanned line. The rate of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release (Fig. 3g), calculated from the changes in rhod-2 fluorescence elicited by depolarizing pulses of increasing amplitude (Fig. 3f), exhibited a similar time course in RyR1-Rec fiber as in CTRL fibers, but importantly, peak values were reduced in RyR1-Rec. Fitting of the peak rate of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release vs voltage (Fig. 3h-top graph) indicated that the maximum rate of  $\text{Ca}^{2+}$  release was reduced by 25% in the RyR1-Rec group (Fig. 3i, Max), the slope factor ( $k$ ) was also slightly but significantly reduced, whereas the voltage of mid-activation ( $V_{0.5}$ ) was unchanged. A slight (1.3 ms in average) but significant increase in the time-to-peak rate of SR  $\text{Ca}^{2+}$  release in the RyR1-Rec fibers (Fig. 3h, bottom graph) was observed. No modifications were observed in the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  removal capabilities of the fibers (SERCA pump function), measured with the low-affinity  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye fluo-4 FF in non-EGTA-buffering conditions (Additional file 1: Fig. S3). Overall, these results demonstrate that the 35% reduction in RyR1 amount in *interosseous* is associated with a 30% reduction in calcium current through DHPR and a 25% reduction in calcium flux through RyR1.

#### RyR1 reduction affects the skeletal muscle structure

To better understand the basis of these functional alterations associated with a decrease in RyR1, muscle structure was studied on RyR1-Rec animals at D75 after recombination, and compared to CTRL animals. *Extensor digitorum longus* (EDL), a fast twitch muscle, *soleus*, a slow twitch muscle and *tibialis anterior* (TA), a mixed muscle were analyzed using hematoxylin–eosin, NADH and Gomori trichrome stainings. Stainings of TA, presented in Fig. 4a, show abnormal muscle structure in RyR1-Rec animals, without fibrosis or central nuclei, but with fiber atrophy, affecting both type I and type II fibers (Table 2). A mitochondria disorganization characterized by local accumulation/depletion in adjacent regions of the same fiber (arrowhead and inset Fig. 4a) and red staining accumulation observed with Gomori trichrome



**Fig. 4** Histological and immunofluorescent analyses show major defects in muscles. **a** TA Transversal section from CTRL and RyR1-Rec mice at D75 were stained with hematoxylin/eosin (H&E) and NADH. The mitochondria localization (NADH staining) is inhomogeneous in RyR1-Rec fibers, specifically in the small dark type I (slow) fibers with high mitochondria content (arrow head and inset). The nuclei (blue dots with H&E staining) are at the periphery of the fibers, and no evidence of regenerative fiber can be seen. Bar 50 μm. **b** Transversal TA sections from D75 CTRL and RyR1-Rec mice were stained with antibodies against RyR1 (green) and desmin (red). Bar 50 μm, and 10 μm in inset

(Additional file 1: Fig. S4) was also observed, resembling the dusty cores recently described in patients [16]. Fiber atrophy was observed in both fiber types in EDL, although the reduction was slightly more important in type I fibers (Table 2). Transversal TA section of CTRL and RyR1-Rec mice were stained with antibodies against RyR1 and desmin. No modification was observed in the RyR1 distribution between type I and type II fibers in RyR1-Rec TA sections, indicating a similar RyR1 reduction in all fiber types (Fig. 4b). Surprisingly, an important modification was observed in desmin distribution, with a huge increase in the small type I fibers (Fig. 4b): in CTRL TA sections, all fibers presented a similar peripheral staining, whereas the small type I fibers in RyR1-Rec TA sections were heavily stained both at the fiber periphery and in the cytosol (inset Fig. 4b). Although IF labelling is not quantitative, these results show that RyR1 reduction was most probably homogenous, without any huge difference between adjacent fibers as observed for desmin, the quantification performed by Western blot being the reflect of protein contained in each fiber and not a mean of fibers with 0% RyR1 and fibers with 100% RyR1 within the same muscle.

Triads organization was further studied using immunofluorescent labelling of isolated EDL fibers (Fig. 5a). The labeling of alpha-actinin (as a marker of the Z-line), of triadin and of RyR1 (as triad markers) on RyR1-Rec EDL fiber demonstrated that the reduction in RyR1 amount resulted in a generalized disorganization of the fiber with abnormal triads localization and disruption of the Z-line, but triadin and RyR1 were still partially colocalized. Although triads remained on both sides of the Z-line, the Z-line did not form a straight line as in CTRL and instead presented many micro-disruptions (inset Fig. 5a). Muscle ultrastructure was analyzed using electron microscopy on RyR1-Rec EDL fibers at D75 (Fig. 5b). Some regions had a relatively preserved structure (Fig. 5b, left fiber), whereas some adjacent regions were highly disorganized, with disruption of sarcomere regular organization, mitochondria disorganization, and

the presence of numerous stacks of membrane (Fig. 5b, arrows, enlarged in inset), previously called multiple triads [16, 28]. The morphological features of those multiple triads compared to the normal single triads are presented in Table 3, and additional examples are presented in Additional file 1: Fig. S5. Precise quantification of putative T-tubule width, putative SR width and intermembrane (T-tubule/SR) space (Additional file 1: Fig. S5) demonstrated a huge increase in the T-tubule mean size in those multiples triads (twofold increase, reaching 202% of the T-tubule size in normal triad), whereas the SR mean width was only slightly increased (+10%) and the intermembrane space was not modified. Those results point to a generalized structural disorganization of RyR1-Rec mice muscles associated with membranes remodeling.

#### RyR1 reduction is associated with modification in the amount of numerous proteins

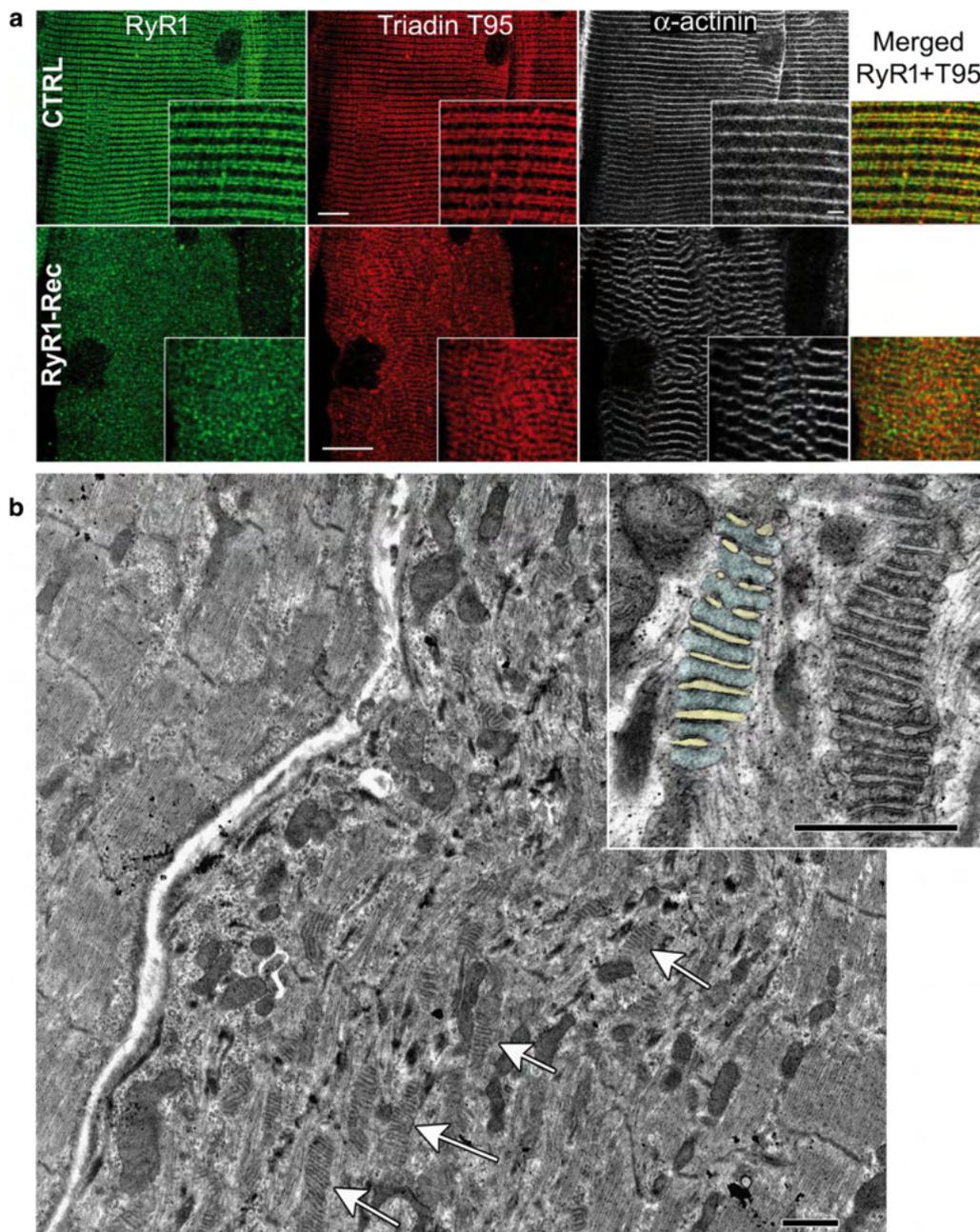
The consequences of RyR1 reduction were studied at the molecular level using quantitative Western blot on quadriceps muscle of CTRL or RyR1-Rec mice (8 animals in each group) at D75 after tamoxifen injection (Fig. 6). The relative amount of numerous proteins involved directly or indirectly in calcium handling was estimated, using as reference the total amount of proteins determined by stain free evaluation [29]. No difference in the quantification of RyR1 was observed between this method and the use of myosin heavy chain as a reference protein (comparison between Figs. 1, 6). No significant modification between CTRL and RyR1-Rec muscles was observed in the amount of the triadin isoform T95, the calcium binding protein CSQ1, the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA, the mitochondrial  $\text{FoF}_1$ -ATPase, and the alpha 1 subunit of DHPR (Fig. 6a, b). In contrast, an increase was observed in the amount of STIM1 ( $\times 3.7 \pm 1$ ,  $p=0.02$ ), the triadin isoform T51 ( $\times 1.6 \pm 0.1$ ,  $p<0.001$ ), CLIMP63 ( $\times 1.8 \pm 0.2$ ,  $p=0.004$ ), and ORAI1 ( $\times 3.7 \pm 1$ ,  $p=0.017$ ). As modification in the localization of the structural protein desmin was observed using immunofluorescent

**Table 2 Analysis of muscle fibers' diameter**

	CTRL diameter ( $\mu\text{m}$ )	SEM	Nb fiber	RyR1-Rec diameter ( $\mu\text{m}$ )	SEM	Nb fiber	Student t-test	%CTRL
EDL type I	23.6	0.9	700	17.2	0.7	700	$p<0.001^*$	73
EDL type II	40.0	1.6	600	32.5	1.2	700	$p<0.001^*$	81
TA type I	33.7	1.9	300	20.0	1.2	300	$p<0.001^*$	59
TA type II	46.8	2.7	300	35.6	2.1	300	$p<0.001^*$	76

The diameter of slow (type I) and fast (type II) fibers was quantified in *Extensor digitorum longus* (EDL) and *tibialis anterior* (TA) sections of CTRL and RyR1-Rec animals at D75 after NADH-TR staining. Hundred fibers were measured for each muscle. Between 3 and 7 mice in each group

\*Represent significant data



**Fig. 5** A generalized structural disorganization is observed in EDL muscle fibers. **a** EDL fibers from D75 CTRL and RyR1-Rec mice were stained with antibodies against RyR1 (green), triadin (red) and alpha-actinin (white). Bar 10  $\mu\text{m}$  and 2  $\mu\text{m}$  in inset. **b** Electron microscopy analysis of longitudinal EDL section of D75 RyR1-Rec mice. The upper left fiber has a normal structure, the adjacent lower fiber is extremely disorganized, with large stacks of membranes (up to 15 stacks, arrows) extending on few  $\mu\text{m}$  long. The inset presents two multiple triads, on the left one the membranes corresponding to T-tubules have been colored with light yellow and the SR sheets with light blue to allow a better visualization. Some electron dense material can be seen within the SR segment, all along the contact site with the adjacent T-tubule, which could correspond to accumulation of proteins. Bars 1  $\mu\text{m}$

labeling (Fig. 5b), desmin expression level was also quantified and a huge increase in desmin amount was observed ( $\times 8.2 \pm 1.2$ ,  $p=0.001$ ). The localization of

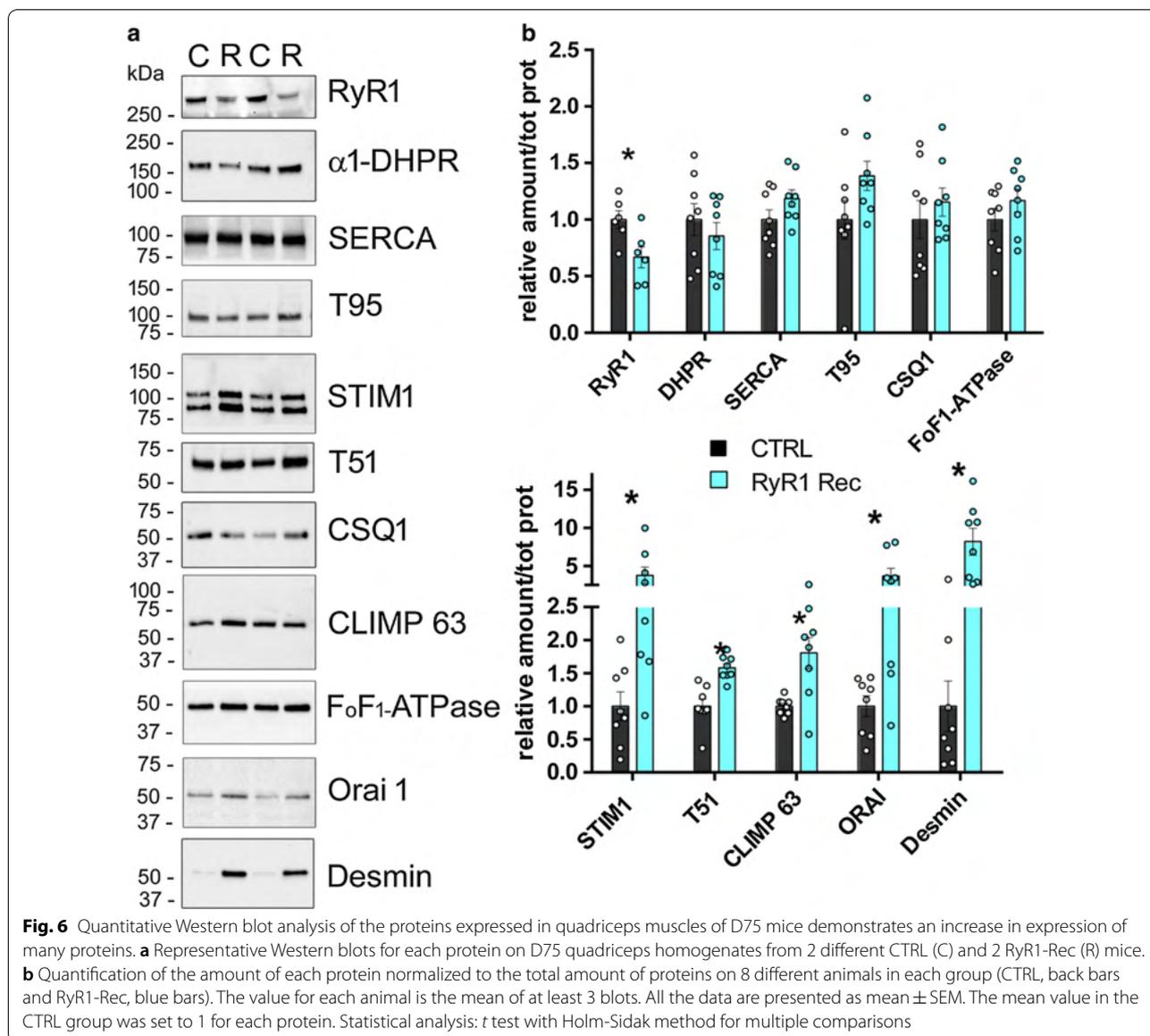
CLIMP63 and STIM1 in RyR1-Rec EDL fibers was analyzed using immunofluorescent labeling, and no major modification was observed (Additional file 1: Fig. S6).

**Table 3 Morphological characterization of single and multiple triads**

	Single (CTRL)			Multiple (RyR1-Rec)			Student t test	% CTRL
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n		
TT width (nm)	26.0	0.5	140	52.7	1.6	135	$p < 0.001^*$	202
SR width (nm)	77.5	0.8	239	85.2	1.2	107	$p < 0.001^*$	110
SR-TT space (nm)	20.6	0.3	135	20.5	0.4	138	0.9	100

The size of T-tubules, SR and intermembranes space thickness were measured as presented on Additional file 1: Fig. S5

\*Represent significant data



Therefore RyR1 protein reduction was associated with an increase in different proteins involved in calcium regulation or in muscle architecture.

**Autophagy is altered as a result of RyR1 reduction**

Alteration in autophagy has been observed in some myopathies [30, 31]. In order to identify the mechanisms

leading to the muscle atrophy subsequent to RyR1 reduction, we looked for modifications in the autophagy flux in RyR1-Rec muscles. The amount of LC3 II, a membrane protein of the autophagosomes, was evaluated with quantitative Western blot (Fig. 7a, b), and an increase in LC3 II was observed ( $172\% \pm 32\%$ ,  $p=0.03$ ). This increase in autophagosomes could reflect either an increase in formation of autophagosomes (due to an increase in autophagy process) or a decrease in their fusion with lysosomes (and therefore an inhibition of autophagy degradation). The precise nature of autophagy flux modification was further analyzed by quantification of p62, a well-known protein specifically degraded via autophagy, which amount was also significantly increased (Fig. 7a, b,  $172\% \pm 22\%$ ,  $p=0.006$ ). The associated increase in LC3 II and in p62 in RyR1-Rec muscle compared to control suggested that RyR1 reduction was therefore associated with inhibition of the autophagy flux. Moreover, an increase in the activation (phosphorylation) of two inhibitors of autophagy, mTOR and S6 protein (Fig. 7b, c), was observed (P-mTOR/mTOR increase by  $174\% \pm 17\%$ ,  $p=0.01$ ; P-S6/S6 increase by  $320\% \pm 50\%$ ,  $p<0.001$ ). The increase in the phosphorylation of these two autophagy inhibitors in RyR1-Rec animals compared to controls further pointed towards an inhibition of autophagy responsible for the muscle atrophy in RyR1-Rec animals.

#### Human patients' biopsies exhibit similar defects to those observed in RyR1-Rec mice

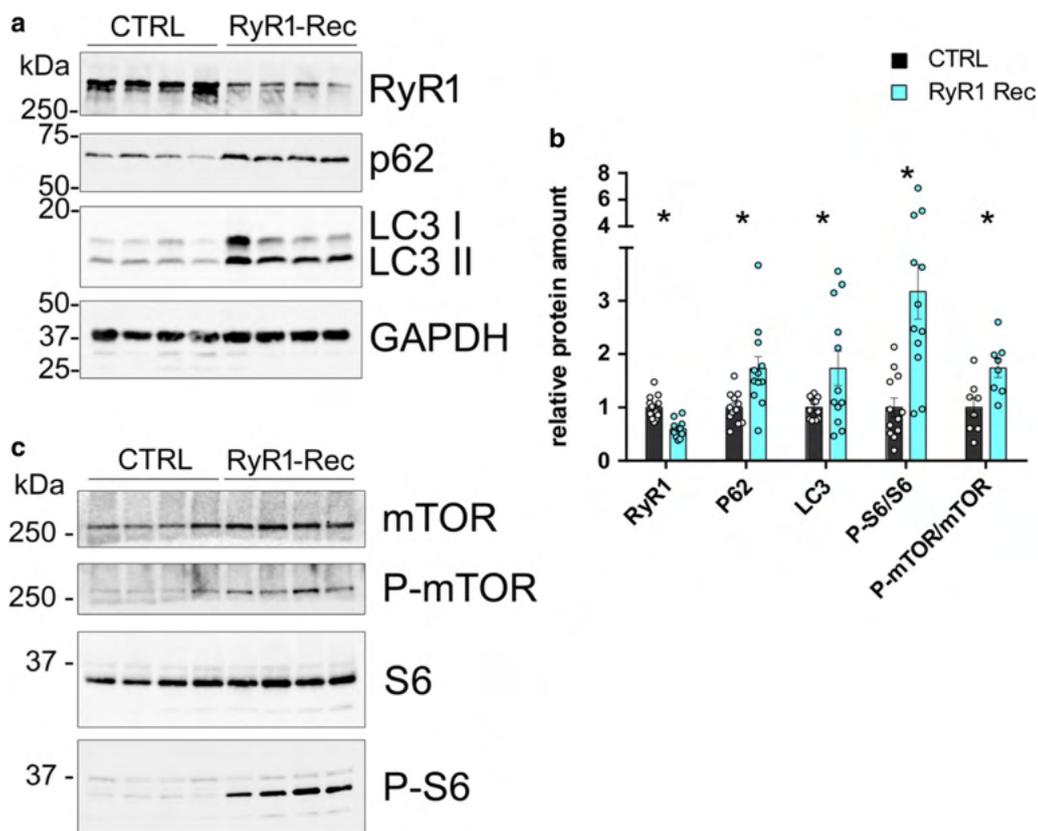
In a recent study on a large cohort of patients with a recessive congenital myopathy [16], we have identified the presence of atypical structures, called "dusty cores", in more than half of the patients with a reduction in RyR1 amount. They were observed by multiple staining and differ from the classical central core (well defined regions devoid of oxidative stain) by their poorly defined borders, their focal myofibrillar disorganization, a reddish-purple granular material deposition at Gomori trichrome staining and blended area with decreased or/and increased enzymatic activity at oxidative stains [16] (Additional file 1: Fig. S7). These structural alterations mirror the modifications observed in our mouse model (Fig. 4 and Additional file 1: Fig. S7). We therefore further compared our new mouse model and muscle biopsies from patients with a RyR1 protein reduction and "dusty cores". Using quantitative Western blot, the amount of the proteins which were clearly modified in our mouse model was also estimated in 5 patients with a recessive Dusty Core disease (two RyR1 mutations resulting in RyR1 protein reduction—Fig. 8a). Control biopsies of different age (between 3.5 and 64 years) were used as reference. A large reduction in RyR1 protein was observed in all the patients (mean

expression level  $19.8\% \pm 2.2\%$  of CTRL,  $p<0.001$ ). Moreover, an increase in CLIMP63 and desmin was also observed. The reduction in RyR1 was associated with an important increase in CLIMP 63 (mean expression level increase fivefolds,  $516\% \pm 220\%$ ). In addition, the expression level of desmin was also drastically increased in patients compared to control (mean expression level increase 240-folds,  $24170\% \pm 7635\%$ ). Using electron microscopy to analyze patient biopsy's ultrastructure, many stacks of membranes were observed in the disorganized regions (Fig. 8c, arrows) of all the patients. These regions, similar to the stacks observed in RyR1-Rec muscle (Fig. 4b), pointed to a common mechanism, both in mice and in human, leading to the formation of those structures as a result of RyR1 reduction. With identical modifications as the ones in Dusty Core Disease patients, this model constitutes thus a relevant model to study the pathophysiological mechanisms.

#### Discussion

We present here the first model of mice with a clear myopathy phenotype due to the exclusive reduction in the expression of the *RYR1* gene. Two mouse models with recessive RyR1 mutations have been recently published, with an hypomorphic allele combined with a point mutation [11, 12], but in these models, the reduction in RyR1 amount being associated to the expression of a mutant channel with altered calcium permeability, it not possible to discriminate the effects related to reduction in protein to the effects of abnormal channel expression. The common features observed in those two models and the one described here allow now to identify the underlying pathophysiological mechanisms and to attribute these features to RyR1 reduction.

The recombination of the *RYR1* gene in this inducible and muscle specific RyR1-KO mouse line was performed at the adult stage, and induced a progressive reduction in RyR1 protein amount in adult and well-structured muscles, thus avoiding possible developmental effects of *RYR1* knockdown. Although the production of *RYR1* transcript was rapidly shut down and plateaued at a low and stable level (fivefold reduction after 5–7 days), RyR1 protein reduction was much slower and incomplete, being reduced by 50% only after 90 days, without further modification. This could reflect a stability of RyR1 protein to an unknown extent although in vivo experiments with radioactive labeling in rat muscle suggested a turnover of 8–10 days [32, 33]. Such a long stability was observed for the alpha 1 subunit of DHPR, which was knocked down with a U7-exon skipping strategy that resulted only in a 50% reduction of the protein level after 2–6 months, in



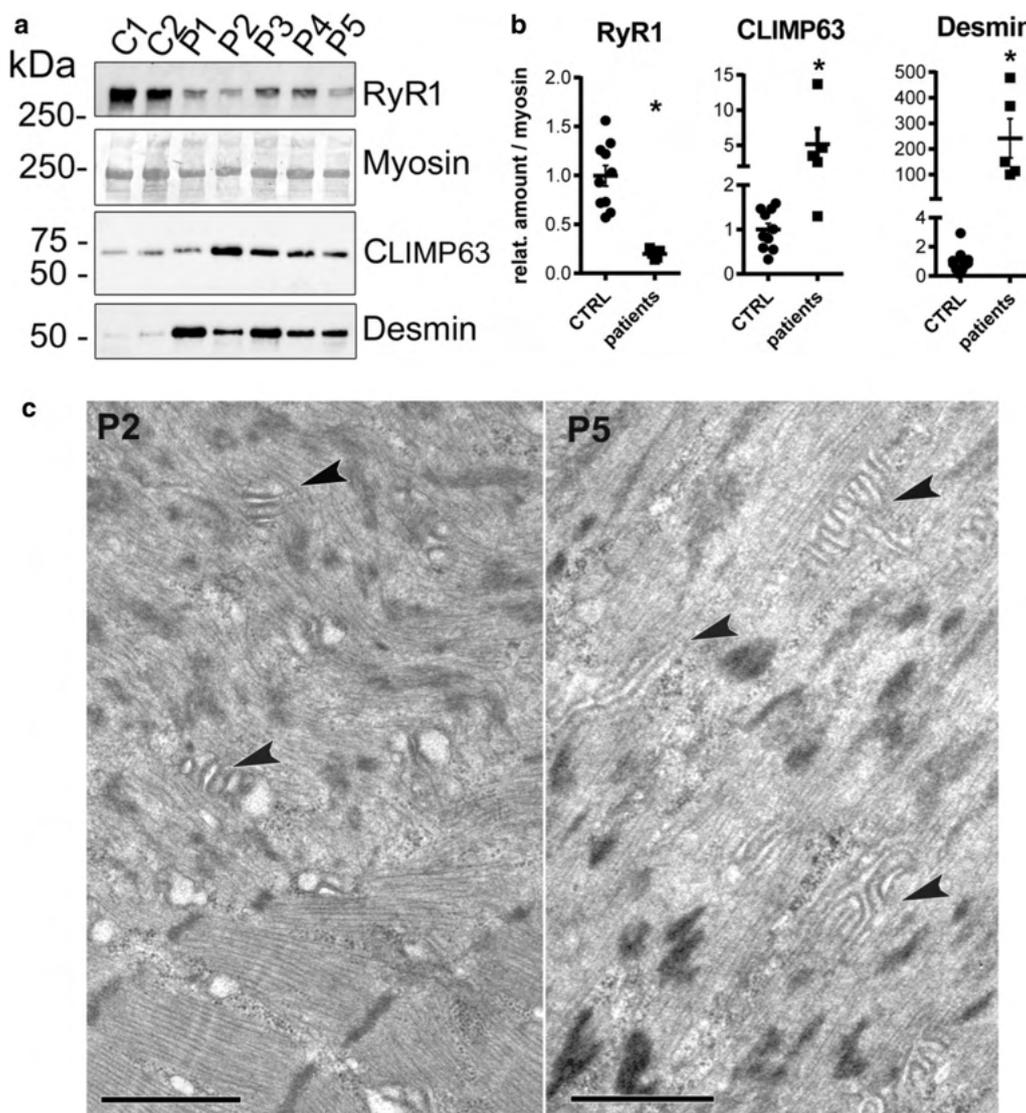
**Fig. 7** Autophagy is inhibited in RyR1-Rec D75 mice quadriceps muscle. **a, c** Representative Western blot on 4 CTRL and 4 RyR-Rec quadriceps muscle homogenates. **b** Quantification of the amount of protein normalized to the amount of GAPDH in 8–12 mice in each group (CTRL, black bars; RyR1-Rec, blue bars). For S6 and mTOR, the values are presented as ratio of the phosphorylated/non-phosphorylated protein. The value for each animal is the mean of at least 3 blots. All the data are presented as mean  $\pm$  SEM. The mean value in the CTRL group was set to 1 for each protein. Statistical analysis: *t* test with Holm-Sidak method for multiple comparisons

presence of a remaining amount of 10–20% at the mRNA level [34].

The progressive reduction in RyR1 amount in our mouse line was associated with a progressive reduction in muscle strength, as evidenced by the direct measurement of the spontaneous ability of the animals to hang on a grid or by the evaluation of muscle tension developed during muscle electrostimulation. Our results suggest a direct correlation between the amount of RyR1 protein and the muscle strength. In our model, almost no muscle weakness was observed when RyR1 amount was above 80% of control, as already observed with the heterozygous whole body RyR1-KO mice that showed a RyR1 protein amount of 85% of control and no functional alteration [15]. The drop in muscle strength in RyR1-Rec animals parallels protein amount, and when RyR1 amount reached 50% of control, the animals were unable to perform any of the two tests (hanging or electrostimulation). The direct study of DHPR and RyR1 function on isolated fiber demonstrated a reduction in the function of

both calcium channels. The reduction in RyR1-calcium release activity was of 25%, which is similar to the reduction in RyR1 protein in the specific muscle used for the experiment (*interosseous* muscle). Interestingly, a similar correlation between the amplitude of calcium release and the amount of RyR1 has been observed in the two recent recessive RyR1 mouse models [11, 12], with a 50% reduction in calcium release associated to a 65% reduction in protein amount [12]. Surprisingly, no modification in DHPR amount or in the T-tubule density was observed, although calcium influx through DHPR was reduced by 30%. This could reflect the so-called retrograde coupling [35] by which RyR1 controls DHPR function, as observed in the RyR1-KO cells with DHPR functional alteration [36].

At the structural level, all muscles were affected, and both type I (slow) and type II (fast) fibers were atrophied without any sign of basal membrane detachment (which would have reflected denervation), and with alteration in mitochondria distribution in type I fibers. A generalized



**Fig. 8** Analysis of human patients' biopsies reveals similar defects to those observed in RyR1-Rec mice. **a** Representative Western blot performed on muscle homogenate from human biopsies. C1: control, 23 years, female; C2: control, 3.5 years, male; P1: CCD (Dusty core), mutations p.M2423K + p.R2441\*, 43 years, male; P2: CCD (Dusty core), mutations p.T4709M + p.R1409\*, 4 years, male; P3: CCD (Dusty core), mutations p.[Ile1571Val; Arg3366His; Tyr3933Cys] + p.Val788Cysfs\*96, 25 years, female; P4: CCD (Dusty Core), mutations p.R2140W + p.L4828R, 9 years, female; P5: CCD (Dusty Core), mutations p.M4000del + p.Met2312Cysfs\*118, 28 years, female. **b** Quantification of protein amount, normalized to myosin (for RyR1, CLIMP63 and Desmin) or to GAPDH (for p62). Data are presented as mean  $\pm$  SEM of 10 controls samples (CTRL) and of 5 patients' samples (patients). The value for each patient is the mean of at least 2 Western blots. The mean value for each protein in CTRL samples was set to 1. RyR1 expression level compared to controls: P1—26  $\pm$  6%, P2—14  $\pm$  6%, P3—20  $\pm$  3%, P4—23  $\pm$  3%, P5—16  $\pm$  2%. CLIMP63 expression level compared to control: P1—130%  $\pm$  12%, P2—1372%  $\pm$  385%, P3—466%  $\pm$  92%, P4—262%  $\pm$  35%, P5—350%  $\pm$  85%. Desmin expression level compared to control: P1—47,789%  $\pm$  6097%; P2—10,052%  $\pm$  2957%; P3—36,745%  $\pm$  7150%; P4—14,951%  $\pm$  5584%; P5—11,307%  $\pm$  2858%. Student *t* test RyR1 *p* < 0.001, CLIMP63 *p* = 0.016, Desmin *p* < 0.001 **c** Electron microscopy pictures obtained during the course of the diagnosis, presenting multiples stacks of membranes in the disorganized core region of the biopsies of patients P2 and P5. Similar structures were identified in the muscle biopsies of the five patients. Bar 1  $\mu$ m

disorganization of muscle structure was observed in most fibers with variable severity, from almost normal muscle structure to focal highly disorganized regions. In those highly disorganized regions, resembling the core lesions

in patients, disruption of the regular alignment of the sarcomeres with abnormal mitochondria and triad localizations were observed, and the most striking feature was the presence of numerous and large stacks of membrane.

Those membrane stacks, hypothetically corresponding to the close alternate apposition of SR and T-tubules, were called multiple triads [16], but the exact nature of each membrane type remains to be determined. Similar structures have been observed in muscle of CSQ1-KO mice [28], although smaller. The size of the SR sheets in those multiple triads is similar to the size of the SR terminal cisternae in regular triads, but the T-tubules are dilated and twice the normal size. Careful examination of those multiple triads did not allow the identification of “feet”, those electron dense structures formed by RyR1 [37] between SR and T-tubule membranes. So these stacks of membranes are most likely depleted of RyR1. Space size between SR and T-tubule is similar in multiple triads and in the regular triads, thus the proteins involved in the assembly of those structures are probably the same. As the RyR1 staining is uniform on transversal section, RyR1 depletion occurred most likely in all fiber types, although desmin overexpression and delocalization has been seen mainly in type I fibers.

At the molecular level, some important modifications were observed, such as a twofold to threefold increase in CLIMP63 and in STIM1, and a massive increase in desmin ( $\times 80$ ). The mechanisms connecting the structural disorganizations with the overexpression of desmin, CLIMP63, STIM1 are still unclear, and require further analysis. Those modifications, both at the structural and protein levels, have been observed in mice and in human patients with RyR1 mutations resulting only in RyR1 reduction, pointing to a common pathophysiological mechanism between mouse and human. Desmin forms intermediate filaments involved in the muscle cell architecture by anchoring several structures (nucleus, mitochondria, Z-disc) to the plasma membrane at the costamers [38, 39], and alterations in desmin result in myopathies [40]. Desmin overexpression could reflect a direct regulation of the desmin gene by the calcium released from the sarcoplasmic reticulum. On the other hand, desmin aggregation and mislocalization leading to muscle weakness could contribute to the overall phenotype observed both in mice and in patients with RyR1 reduction. CLIMP63 is a reticulum protein, associated with the calcium release complex via its interaction with triadin [19], which is involved in the shaping of reticulum membrane and in the formation of reticulum sheets [41]. Its overexpression observed both in mice and in patients with RyR1 reduction could be associated with (and perhaps responsible for) the formation of the multiple triads observed in both cases. Along the same line, STIM1 is not only involved in the refilling of calcium stores via its interaction with ORAI1, but also in the reticulum morphogenesis via its interaction with the microtubule +TIP binding protein EB1 [41], pointing to its possible

involvement in the formation of those multiple triads. As ORAI1 undergoes the same magnitude of overexpression as STIM1, it is mostly likely that the two proteins still work together, but the functional consequences of this overexpression on the calcium entry activated by store depletion (SOCE) has to be demonstrated. The overexpression of STIM1 and ORAI1 has already been associated with SR and T-tubule remodeling during exercise [42, 43], resulting in the formation of stacks of few (2–4) SR membranes associated with a T-tubule, with a gap between both being smaller than the normal triadic gap. The structures observed in RyR1 deficient mouse muscle looked similar although much larger (up to 15 stacks of each membrane), and with a clear alternation of two membrane types but with the same space size between the membranes. Inhibition of autophagy has been evidenced in mice, which could explain the muscle atrophy observed, as both increase or decrease in autophagy have been described as leading to muscle atrophy [44].

## Conclusions

To conclude, this study demonstrates that RyR1 reduction is sufficient to induce a myopathy. This model recapitulates the main features observed in “Dusty core Disease” patients, a subgroup of Central Core Disease with exclusive RyR1 reduction, and due to a better homogeneity between the mice (same age, same sex, ...) than between the patients (different severity, different age at the biopsy, different age at onset of the disease, ...) and to the higher number of sample available, this mouse model has allowed to point to modifications that could shed a new light on the pathophysiological mechanisms, only partially known, and provide new clues for therapeutic development.

## Supplementary information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01068-4>

**Additional file 1.** Supplementary method and supplementary figures S1–S7.

## Abbreviations

CCD: central core disease; CRC: calcium release complex; CSQ: calsequestrin; DHPR: dihydropyridine receptor; ER: estrogen receptor; GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase; HRP: horseradish peroxidase; HSA: human skeletal actin; KO: knock-out; MR: magnetic resonance; PCr: phosphocreatine; PFA: paraformaldehyde; RyR: ryanodine receptor; SERCA: sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; SR: sarcoplasmic reticulum; T-tubules: transverse tubules.

## Acknowledgements

We thank Dr. Jacques Brocard for his advises with statistical analysis, Sara Virtanen for the proofreading of the manuscript, and the members of the GIN animal facility and imaging facility for their help.

**Author contributions**

LP, AP, BG, DG, VJ, JF and IM designed the research studies; LP, AP, JB, BG, DG, CS, LT, MC, MB, CK, VJ, CFA, DB, DM, NR, JR, IM conducted the experiments and acquired the data; LP, AP, JB, BG, DG, VJ, CFA, JF, IM analyzed the data, IM wrote the manuscript, all the authors read and approve the manuscript.

**Funding**

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon).

**Availability of data and materials**

The datasets used and/or analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

**Ethics approval**

All procedures using animals were approved by the institutional ethics committee (CEEA-GIN 04, N\_134) and followed the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. Experimental procedures for human studies were approved by the institutional ethics committee and performed in accordance with ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki. All biopsies were collected following informed consent.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup> INSERM, GIN-U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble Institut Neurosciences, University Grenoble Alpes, Bat EJ Safra, Chemin Fortuné Ferrini, La Tronche, Grenoble, France. <sup>2</sup> CNRS, CRMBM, Aix-Marseille Univ, Marseille, France. <sup>3</sup> CNRS UMR5310, INSERM U1217, Institut NeuroMyoGene, University Lyon I, Lyon, France. <sup>4</sup> CNRS UMR7104, INSERM U1258, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, University Strasbourg, Illkirch, France. <sup>5</sup> Department of Cell and Developmental Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. <sup>6</sup> Neuromuscular Morphology Unit, Center for Research in Myology, Myology Institute, Sorbonne University, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

Received: 8 September 2020 Accepted: 27 October 2020

Published online: 11 November 2020

**References**

- Marty I, Robert M, Villaz M, Lai Y, De Jongh KS, Catterall WA et al (1994) Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2270–2274. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2270>
- Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane*. *J Biol Chem* 272:23389–23397. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23389>
- Dirksen RT, Avila G (2002) Altered ryanodine receptor function in central core disease: leaky or uncoupled Ca(2+) release channels? *Trends Cardiovasc Med* 12:189–197. [https://doi.org/10.1016/s1050-1738\(02\)00163-9](https://doi.org/10.1016/s1050-1738(02)00163-9)
- Betzenhauser MJ, Marks AR (2010) Ryanodine receptor channelopathies. *Pflügers Arch* 460:467–480. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0794-4>
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a003996. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>
- MacLennan DH, Zvaritch E (2011) Mechanistic models for muscle diseases and disorders originating in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1813:948–964. <https://doi.org/10.1016/j.bbamc.2010.11.009>
- Marty I, Fauré J (2016) Excitation-contraction coupling alterations in myopathies. *J Neuromusc Dis* 3:443–453. <https://doi.org/10.3233/JND-160172>
- Jungbluth H, Treves S, Zorzato F, Sarkozy A, Ochala J, Sewry C et al (2018) Congenital myopathies: disorders of excitation-contraction coupling and muscle contraction. *Nat Rev Neurol* 14:151–167. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.191>
- Chelu MG, Goonasekera SA, Durham WJ, Tang W, Lueck JD, Riehl J et al (2006) Heat- and anesthesia-induced malignant hyperthermia in an RyR1 knock-in mouse. *FASEB J* 20:329–330. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4497fje>
- Zvaritch E, Kraeva N, Bombardier E, McCloy RA, Depreux F, Holmyard D et al (2009) Ca2+ dysregulation in RyR1(I4895T/wt) mice causes congenital myopathy with progressive formation of minicores, cores, and nemaline rods. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:21813–21818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912126106>
- Brennan S, Garcia-Castañeda M, Michelucci A, Sabha N, Malik S, Groom L et al (2019) Mouse model of severe recessive RYR1-related myopathy. *Hum Mol Genet* 28:3024–3036. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz105>
- Elbaz M, Ruiz A, Bachmann C, Eckhardt J, Pelczar P, Venturi E, Lindsay C et al (2019) Quantitative RyR1 reduction and loss of calcium sensitivity of RyR1Q1970fsX16+ A4329D cause cores and loss of muscle strength. *Hum Mol Genet* 28:2987–2999. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz092>
- Elbaz M, Ruiz A, Eckhardt J, Pelczar P, Muntoni F, Boncompagni S et al (2019) Quantitative reduction of RyR1 protein caused by a single-allele frameshift mutation in RYR1 ex36 impairs the strength of adult skeletal muscle fibres. *Hum Mol Genet* 28:1872–1884. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz025>
- Takekura H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O et al (1994) Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369:556–559. <https://doi.org/10.1038/369556a0>
- Cacheux M, Blum A, Sébastien M, Wozny AS, Brocard J, Mamchaoui K et al (2015) Functional characterization of a Central Core Disease RyR1 mutation (p. Y4864H) associated with quantitative defect in RyR1 protein. *J Neuromusc Dis* 2:421–432. <https://doi.org/10.3233/JND-150073>
- Garibaldi M, Rendu J, Brocard J, Lacene E, Fauré J, Brochier G et al (2019) ‘Dusty core disease’ (DuCD): expanding morphological spectrum of RYR1 recessive myopathies. *Acta Neuropathol Commun* 7:3. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0655-5>
- Schuler M, Ali F, Metzger E, Chambon P, Metzger D (2005) Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. *Genesis* 41:165–170. <https://doi.org/10.1002/gene.20107>
- Marty I, Thevenon D, Scotto C, Groh S, Sainnier S, Robert M et al (2000) Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J Biol Chem* 275:8206–8212. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8206>
- Osseni A, Sébastien M, Sarraut O, Baudet M, Couté Y, Fauré J et al (2016) Triadin and CLIMP-63 form a link between triads and microtubules in muscle cells. *J Cell Sci* 129:3744–3755. <https://doi.org/10.1242/jcs.188862>
- Moutin MJ, Cuillel M, Rapin C, Miras R, Anger M, Lompré AM et al (1994) Measurements of ATP binding on the large cytoplasmic loop of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase overexpressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269:11147–11154
- Lunardi J, Dupuis A, Frobert Y, Grassi J, Vignais PV (1989) Exploration of delta-subunit interactions in beef heart mitochondrial F1-ATPase by monoclonal antibodies. *FEBS Lett* 245:223–228. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)80226-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80226-1)
- Oddoux S, Brocard J, Schweitzer A, Szentesi P, Giannesini B, Brocard J et al (2009) Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem* 284:34918–34929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022442>
- Giannesini B, Vilmen C, Le Fur Y, Dalmasco C, Cozzone PJ, Bendahan D (2010) A strictly noninvasive MR setup dedicated to longitudinal studies of mechanical performance, bioenergetics, anatomy, and muscle recruitment in contracting mouse skeletal muscle. *Magn Reson Med* 64:262–270. <https://doi.org/10.1002/mrm.22386>
- Lefebvre R, Pouvreau S, Collet C, Allard B, Jacquemond V (2014) Whole-cell voltage clamp on skeletal muscle fibers with the silicone-clamp technique. *Methods Mol Biol* 1183:159–170. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1096-0_9)
- Kutchukian C, Lo Scudato M, Tourneur Y, Poulard K, Vignaud A, Berthier C et al (2016) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition restores Ca2+ release defects and prolongs survival in myotubularin-deficient mice. *Proc Natl*

- Acad Sci USA 113:14432–14437. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604099113>
26. Kutchukian C, Szentesi P, Allard B, Trochet D, Beuvin M, Berthier C et al (2017) Impaired excitation-contraction coupling in muscle fibres from the dynamin2<sup>R465W</sup> mouse model of centronuclear myopathy. *J Physiol* 595:7369–7382. <https://doi.org/10.1113/JP274990>
  27. Kemp GJ, Hands LJ, Ramaswami G, Taylor DJ, Nicolaidis A, Amato A et al (1995) Calf muscle mitochondrial and glycogenolytic ATP synthesis in patients with claudication due to peripheral vascular disease analysed using 31P magnetic resonance spectroscopy. *Clin Sci (Lond)* 89:581–590. <https://doi.org/10.1042/cs0890581>
  28. Paolini C, Quarta M, Nori A, Boncompagni S, Canato M, Volpe P et al (2007) Reorganized stores and impaired calcium handling in skeletal muscle of mice lacking calsequestrin-1. *J Physiol* 583:767–784. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.138024>
  29. Gürtler A, Kunz N, Gomolka M, Hornhardt S, Friedl AA, McDonald K et al (2013) Stain-free technology as a normalization tool in Western blot analysis. *Anal Biochem* 433:105–111. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.10.010>
  30. Durieux AC, Vassilopoulos S, Lainé J, Fraysse B, Briñas L, Prudhon B et al (2012) A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs autophagy in mice. *Traffic* 13:869–879. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01348.x>
  31. Al-Qusairi L, Prokic I, Amoasii L, Kretz C, Messaddeq N, Mandel JL et al (2013) Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways. *FASEB J* 27:3384–3394. <https://doi.org/10.1096/fj.12-220947>
  32. Ferrington DA, Krainev AG, Bigelow DJ (1998) Altered turnover of calcium regulatory proteins of the sarcoplasmic reticulum in aged skeletal muscle. *J Biol Chem* 273:5885–5891. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5885>
  33. Martonosi A, Halpin RA (1972) Sarcoplasmic reticulum. XVII. The turnover of proteins and phospholipids in sarcoplasmic reticulum membranes. *Arch Biochem Biophys* 152:440–450. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(72\)90237-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(72)90237-8)
  34. Piétri-Rouxel F, Gentil C, Vassilopoulos S, Baas D, Mouisel E, Ferry A et al (2010) DHP $\alpha$ 15 subunit controls skeletal muscle mass and morphogenesis. *EMBO J* 29:643–654. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.366>
  35. Dirksen RT (2002) Bi-directional coupling between dihydropyridine receptors and ryanodine receptors. *Front Biosci* 7:d659–d670
  36. Nakai J, Dirksen RT, Nguyen HT, Pessah IN, Beam KG, Allen PD (1996) Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* 380:72–75. <https://doi.org/10.1038/380072a0>
  37. Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C (1988) Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* 107:2587–2600. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.6.2587>
  38. Paulin D, Li Z (2004) Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res* 301:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.004>
  39. Franck A, Lainé J, Moulay G, Lemerle E, Trichet M, Gentil C et al (2019) Clathrin plaques and associated actin anchor intermediate filaments in skeletal muscle. *Mol Biol Cell* 30:579–590. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-11-0718>
  40. Goldfarb LG, Dalakas MC (2009) Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *J Clin Invest* 119:1806–1813. <https://doi.org/10.1172/JCI38027>
  41. Goyal U, Blackstone C (2013) Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation. *Biochim Biophys Acta* 1833:2492–2498. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.009>
  42. Michelucci A, Boncompagni S, Pietrangelo L, García-Castañeda M, Takano T, Malik S et al (2019) Transverse tubule remodeling enhances Orai1-dependent Ca<sup>2+</sup> entry in skeletal muscle. *Elife* 8:e47576. <https://doi.org/10.7554/eLife.47576>
  43. Boncompagni S, Michelucci A, Pietrangelo L, Dirksen RT, Protasi F (2017) Exercise-dependent formation of new junctions that promote STIM1-Orai1 assembly in skeletal muscle. *Sci Rep* 7:14286. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14134-0>
  44. Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M et al (2009) Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10:507–515. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.008>

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





Annexe 4 : Therapies for RYR1-Related Myopathies: Where We Stand and the Perspectives

## **Therapies for RYR1-Related Myopathies: Where We Stand and the Perspectives**

Mathilde Beaufils, **Lauriane Travard**, John Rendu, Isabelle Marty

Curr Pharm Des. 2022;28(1):15-25.

doi: 10.2174/1389201022666210910102516.

## REVIEW ARTICLE

# Therapies for RYR1-Related Myopathies: Where We Stand and the Perspectives

Mathilde Beaufiles<sup>1</sup>, Lauriane Travard<sup>1</sup>, John Rendu<sup>1</sup> and Isabelle Marty<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Grenoble Institute Neurosciences, University Grenoble Alpes, INSERM, U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France

## ARTICLE HISTORY

Received: February 28, 2021  
Accepted: August 13, 2021

DOI:  
10.2174/1389201022666210910102516

**Abstract:** RyR1-related myopathies are a family of genetic neuromuscular diseases due to mutations in the *RYR1* gene. No treatment exists for any of these myopathies today, which could change in the coming years with the growing number of studies dedicated to the pre-clinical assessment of various approaches, from pharmacological to gene therapy strategies, using the numerous models developed up to now. In addition, the first clinical trials for these rare diseases have just been completed or are being launched. We review the most recent results obtained for the treatment of RyR1-related myopathies, and, in view of the progress in therapeutic development for other myopathies, we discuss the possible future therapeutic perspectives for RyR1-related myopathies.

**Keywords:** Ryanodine receptor, myopathy, pharmacological therapy, gene therapy, calcium, skeletal muscle, excitation-contraction coupling.

## 1. INTRODUCTION: THE BASICS OF RYR1 FUNCTION

The type 1 ryanodine receptor (RyR1) is mainly expressed in skeletal muscle, where it is the cornerstone of the calcium release complex (CRC) responsible for the intracellular calcium release for muscle contraction. Within the CRC, RyR1 is activated by a voltage sensitive calcium channel, the dihydropyridine receptor (DHPR), through direct physical contact by a mechanism known as voltage induced calcium release. Additional proteins are associated with RyR1 in the CRC and regulate its function: a nonexhaustive list encompasses triadin, junctin, calsequestrin (CSQ), FKBP12, and calmodulin [1]. RyR1 function is also regulated by different ions, phosphorylation and oxidative stress [2]. Three different RyR isoforms are expressed in mammals (type 1 to 3), encoded by 3 different genes. Type 1 is the main skeletal muscle isoform, but it is also expressed in some specific neurons (like cerebellar Purkinje cells [3]). Type 2 is the cardiac isoform also expressed in the brain. RyR3 is ubiquitously expressed at a low level with larger amounts in some muscles like diaphragm and extraocular muscles or during development. According to their expression pattern, the RyR1 mutations mainly result in skeletal muscle defects, and the RyR2 mutations in cardiac muscle defects (arrhythmia). Variations in the *RYR3* gene have only been seldom identified (3 unrelated families affected by arthrogryposis [4]) in a straight line with the poorly defined function of RyR3. Its deletion in mice has been associated with alterations in neonatal muscle contractions [5], synaptic plasticity [6] and in extraocular muscles function [7]. The different animal models used to study the RyR1-related myopathies do not all express the same *RYR* genes repertoire. Mice, as mammals, have the same 3 isoforms as human, but the nematode *Caenorhabditis elegans* or the fruit fly *Drosophila melanogaster* have only one *RYR* gene, and the protein is similarly involved in larvae development and muscle contraction [8, 9]. On the other hand, the zebrafish *Danio rerio*, has 5 *RYR* genes, 3 of them (*ryr1a*, *ryr1b* and *ryr3*) being expressed in skeletal muscles [10].

In this review, we will focus on the RyR1 protein in skeletal muscles and on the RyR1-related myopathies. We will discuss the

current knowledge and the perspective of pharmacology and gene therapies for these pathologies.

### 1.1. Regulation of RyR1

The large *RYR1* gene (~150kb) is located on chromosome 19q13.2 in the human genome (GRCh38). It contains 106 exons (among which 2 are alternatively spliced, exons 70 and 83) for a coding sequence of 15kb and encodes a protein of 5038 amino acids (565kDa). The functional channel is a giant homotetramer of more than 2MDa. The protein is schematically organized in a large N-terminal cytosolic part (the first 4/5 of the protein, about 4000 amino acids) and a C-terminal domain (last 1/5 of the protein, about 1000 amino acids) organized in 6 transmembrane helices which form the pore of the channel and anchor the protein into the sarcoplasmic reticulum membrane. The N-terminal cytosolic domain fills the gap between the sarcoplasmic reticulum (SR) and the T-tubule membranes and constitutes what has been previously called “the feet” in electron microscopy studies [11]. This N-terminal domain contains the binding sites for many regulatory proteins/molecules, like calmodulin, FKBP12, ATP or junctin [12]. The C-terminal part contains the binding site for triadin [13].

For optimal muscle contraction, RyR1 has to be tightly regulated, and this is performed by the associated proteins (the major ones being FKBP12, calmodulin, DHPR, triadin) but also by post-translational modifications such as PKA-phosphorylation, S-nitrosylation and oxidation [2]. Any mutation in the *RYR1* gene which alters the interaction of the channel with its regulatory proteins or induces modification in the oxidative stress, as well as mutations in the genes encoding the associated proteins or involved in reactive oxygen species production, may affect this fine regulation and result in abnormal calcium homeostasis and muscle weakness.

### 1.2. Mutations in the *RYR1* Gene

Mutations in the *RYR1* gene have a number of functional consequences, all related to altered cytosolic calcium homeostasis, and schematically the pathophysiological mechanisms can be gathered in the following categories: i) hyperactivity of the channel related to hypersensitivity to an endogenous or external stimulus. The hypersensitivity to an endogenous stimulus at rest could result in intracellular calcium leak, with reduced calcium stored and increased cy-

\*Address correspondence to this author at the Grenoble Institute Neurosciences, University Grenoble Alpes, INSERM, U1216, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France; Tel: +33 456 52 05 71; E-mail: [isabelle.marty@univ-grenoble-alpes.fr](mailto:isabelle.marty@univ-grenoble-alpes.fr)

tosolic calcium, and thus a reduced amount of calcium released upon stimulation associated with muscle weakness. ii) decrease in the channel function upon stimulation, leading to reduction in the amount of calcium released and to muscle weakness. iii) reduction in the amount of RyR1 protein itself, with similar consequences: reduction in the amount of calcium released and reduction in muscle strength [12, 14]. In addition, the dysregulated calcium homeostasis has deleterious consequences, such as increased oxidative/nitrosative stress, which further alters calcium release.

Based on the public database Clinvar more than 3000 variants have been identified in the *RYR1* gene, among which 400 have been linked to RyR1-related diseases. All types of mutations have been identified: nonsense, missense, splice, deletion, duplication. The *RYR1* mutations are spread along the whole coding sequence, with both dominant and recessive transmission, and no clear correlation has been made between the location and the disease for recessive variants. Some general rules can be proposed after analysis of the mutations identified up to date: the dominant mutations usually result in a channel with altered calcium permeation properties (hyperactive/leaky or hypoactive), whereas loss-of-function mutations (no protein or non-functional protein) are usually recessive and without consequence at heterozygous state. The dominant mutations leading to reduced channel function are often in the C-terminal domain, which contains the transmembrane helices and forms the channel portion of the protein. Some mutations could also have multiple consequences and the combination between different mutations and their consequences for recessive disorder could explain the wide spectrum of RyR1 diseases.

### 1.3. The RyR1-Related Myopathies

The number of diseases associated with *RYR1* mutation has evolved with the progress of genome sequencing, and a nonexhaustive list includes Central Core Disease (CCD), Multi-mini core Disease (MmD), Centronuclear Myopathy (CNM), Congenital fiber type disproportion (CFTD), and some triggered syndromes like Malignant hyperthermia (MH), exertional heat stroke (EHS), exertional induced-rhabdomyolysis and myalgia. At the lower level of severity (although it could be lethal), MH is a non-myopathic syndrome in which the exposure to volatile anaesthetics (like halothane) induces an uncontrolled calcium release, resulting in muscle hyper contracture and an increase in body temperature characteristic of MH crisis. The MH crisis could be controlled by dantrolene injection, and the MH susceptible patients do not have clear myopathic signs. Other triggered syndromes have been linked to the *RYR1* gene, such as exertional heat stroke where hyperactivity of RyR1 might be induced by exercise [15], and exertional rhabdomyolysis/myalgia characterized by exercise-induced increase in plasma creatine kinase, a sign of muscle damage [16]. As for MH, these patients have no myopathic sign and there is no therapeutic need beyond anaesthesia or exercise induced-crisis for these patients, and therefore these syndromes will not be discussed in this review on therapeutic strategies for RyR1-related myopathies. More severe but usually associated with mild and non-progressive muscle weakness, CCD is often linked to dominant RyR1 mutations, localized in the C-terminal part of the protein [17, 18]. The other myopathies (MmD, CNM, CFTD and the newly described “Dusty Core Disease”) are often linked to recessive RyR1 mutations, spread all over the sequence [19, 20], and resulting in marked muscle weakness. This disease denomination based on histological/morphological characterization of the muscle biopsy of the patients (same clinical presentation although not always linked to *RYR1* gene mutation) is progressively changing for a gene-based denomination, the RyR1-Related Myopathies (RyR1-RM) [14, 21], and thus the RyR1-RM constitute a heterogeneous group of

pathologies (all the patients have mutations in the *RYR1* gene, but the consequences are different). The pediatric point prevalence for RyR1-RM has been estimated at 1:90 000 in the USA [22].

## 2. THERAPEUTIC APPROACHES

There is no treatment for RyR1-RM yet, in part because of the large number of mutations and of the diversity of their consequences. A prerequisite for therapeutic development is the availability of pertinent models reproducing the hallmarks of the disease and a good comprehension of the pathophysiological mechanisms. These two aspects are in rapid evolution, many cellular or animal models have been recently developed (review in [14] with an additional mouse model published afterward [23]), and different approaches are under evaluation, either in basic research studies, in pre-clinical studies or even in clinical trials. They can be classified as “general strategies”, targeting a pathophysiological mechanism common to different mutations/patients, such as chemical molecules, or patient-oriented strategy in personalized medicine, targeting each patient’s mutation, such as gene therapy. The goal is nonetheless to target as many patients as possible with the same molecule/strategy in order to be able to develop economically acceptable therapy.

The pharmacological approaches aim at testing molecules that interact with RyR1 or its associated proteins to improve the function of the channel or target physiological pathways to improve the RyR1 function. The gene therapy aims at directly targeting the mutated gene or mRNA to correct the RyR1 protein itself and to restore the expression of a functional protein. In both approaches, the goal is to restore normal calcium homeostasis, and subsequently, muscle strength.

### 2.1. Pharmacological Approaches

The use of chemical compounds to correct RyR1 functional alterations is based on the precise deciphering of the pathophysiological mechanisms and the identification of molecules acting on the targeted mechanism, usually able to restore calcium homeostasis. These compounds can directly act on RyR1, to change its properties, conformation or interaction with regulatory proteins, in order to restore normal calcium flux, but can also target the downstream consequences of calcium flux alterations.

#### 2.1.1. Oxidative Stress Modulation

Reactive oxygen species (ROS) are reactive molecules generated as a by-product of many biological processes. In skeletal muscle, moderate levels of ROS play a critical role in regulating genes expression, signalling pathways and maintaining optimal contractile function. However, prolonged/excessive ROS production leads to cell injury and death [24]. Elevated oxidative stress has been observed in many models of RyR1-RM [25-27], from zebrafish to mouse models and patient’s primary muscle culture. The proposed mechanism is an increased  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mitochondrial activity and activation of NO synthase leading to overproduction of ROS and RNS (reactive nitrogen species) and resulting either of calcium leak from sarcoplasmic reticulum due to the RyR1 mutation (leaky channel) or of increased calcium flux from SR to mitochondria due to SR overload (reduced channel permeability) and performed by a compensatory pathway [26]. The excessive ROS and RNS would result in oxidation/nitrosylation/glutathionylation of RyR1, which would further increase the calcium leak and induce mitochondrial damage. Along this line, treatment with the antioxidant N-Acetylcysteine (NAC) has been tested successfully on the different RyR1-RM models (zebrafish, patients’ cells and RyR1-Y522S mouse [25-27]) and resulted in improvement of molecular and phy-

biological features. All these encouraging results on various models of RyR1-RM have led to a clinical trial testing the efficacy of NAC for decreasing elevated oxidative stress and increasing physical endurance in patients with RyR1-related myopathies [28]. Sixteen patients (7 males- 8 females) have been treated with NAC during 6 months (30 mg/kg/day for children and 2.7 g/day for adults). Those patients were ambulatory, presenting with a mild to moderate form of the disease. The biomarker for oxidative stress was the urine ratio 15-F2t isoprostane/ mg creatinine, and the evaluation of muscle strength was performed using the 6-min walk test (6MWT, measuring the distance covered by walking for 6 min). This study confirmed the increase in oxidative stress in the RyR1-RM patients. But the NAC treatment was not able to correct this increase compared to the placebo group (17 patients). From the functional point of view, although a slight increase in the 6MWT distance was measured, it did not reach significance. This disappointing clinical trial result contrasts with the encouraging preliminary results on various preclinical models. Although negative, this study provides a number of important outcomes, which will be extremely useful for the future clinical trials in RyR1-RM. The 6MWT should be completed with additional functional tests, and sample size of approximately 100 patients should be used to detect functional benefit. This would probably be possible only through a multicenter clinical trial. In addition, the heterogeneity between the patients affected with different RyR1-RM could mask the benefits of a treatment active only on a well-defined and homogenous group, which would reduce the number of patients available for each trial.

### 2.1.2. Interaction with the Regulatory Protein FKBP12

RyR1 is a calcium channel which conformation fluctuates between open and close states, with intermediate subconductance states associated to a “leaky” channel behavior. It is regulated by numerous proteins, and FKBP12, the FK506 binding protein also called calstabin 1, has been shown to stabilize the closed state and to reduce the subconductance states of the channel [29, 30]. Four FKBP12 proteins are associated with the RyR1 tetramer, one per monomer, and this association has been shown to be inhibited by RyR1 oxidation/nitrosylation/phosphorylation [31]. The RyR1-FKBP12 dissociation could be prevented by chemical molecules (benzothiazepine derivatives) such as S107 [32, 33] and its derivatives, developed by ARMGO Pharma Inc., the so-called Rycals. It has been proposed that the RyR1 mutations resulting in a calcium leak from the SR would induce the dissociation of FKBP12 from RyR1 as a consequence of RyR1 phosphorylation/oxidation induced by the increase in calcium-induced oxidative stress, mirroring what has been observed in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) [34] or during aging [35]. In *mdx* mice, the mouse model of DMD, absence of dystrophin resulted in increased RyR1 S-nitrosylation, dissociation of FKBP12 from RyR1, calcium leak from the SR and reduction in exercise performance. All these features were at least partially restored by a 4-week subcutaneous injection of S107 (20µg/h) [34]. Similar observations were made during aging in mice, and a 4-week oral treatment with S107 (50mg/kg/d) partially restored FKBP12 binding to RyR1 and increased exercise capacity in old mice [35]. Following this proposed pathophysiological mechanism, muscle biopsies from RyR1-RM patients with mutations associated with a leaky RyR1 channel (17 patients) have been submitted to an *ex vivo* acute S107 treatment (1µM - non described methodology) [36]. The calcium leak associated with each mutation has been confirmed for each patient, as well as a 10-25% reduction in amounts of FKBP12 associated with RyR1 and oxidation of RyR1. The S107 treatment had some positive functional effects on the calcium leak demonstrated with *in vitro* tests (normalization of the open probability of purified RyR1 and reduction of Ca<sup>2+</sup> leak from purified microsomes), although no reduction in

RyR1 oxidation nor nitrosylation was observed. The consequences (benefits) of reduction of the calcium leak on muscle strength still have to be demonstrated in the specific context of RyR1-RM. Nevertheless this study sets the ground for a clinical trial testing the benefits of another molecule of the Rycal family, the S48168/ARM 210 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04141670>), sponsored by ARMGO Pharma Inc. The study population for this clinical trial is composed of 10 adult RyR1-RM affected patients, with RyR1 mutation(s) resulting in a confirmed leaky channel responsive to S48168 treatment *ex vivo*. Two different doses of S48168 will be tested by oral administration during 28 days. In addition to safety, tolerability and pharmacokinetics, the effect of the treatment on muscle function and fatigue will be determined. Patients' inclusion in this clinical trial being based on a clear pathophysiological mechanism (leaky RyR1 channel) demonstrated on the muscle biopsy of each patient, and on the prior demonstration of *ex vivo* responsiveness of each muscle biopsy to the pharmacological intervention, such a clinical trial is expected to provide a clear-cut answer on the benefit of S48168 on this optimally selected group of RyR1-RM patients. If successful, the same treatment could be further tested on other RyR1-RM affected patients, with a mutation resulting in other functional consequences than a leaky channel (hypoactive channel or absence of protein), or with a RyR1-leaky channel related to other conditions (aging, other myopathies such as DMD).

New molecules targeting the same pathophysiological mechanism have also recently been described, and their ability to rescue the FKBP12/RyR1 interaction in the context of increased oxidative stress makes these molecules good potential therapeutic candidates [37].

### 2.1.3. Targeting the Reticulum Stress and Improving Protein Folding

A study has been performed to reverse the consequences of another pathophysiological mechanism, initially called “uncoupled” channel [38] and corresponding to a RyR1 with a reduced calcium permeability [39]. Using a mouse model reproducing such a RyR1 mutation, identified in a CCD patient (the I4895T mutation in mice), Lee *et al.* [40] have shown that the mutation was associated with a decrease in the RyR1-associated protein triadin, which binding site is close to the mutation [13], and with dissociation of the calcium binding protein CSQ from the triad. This would induce an increase in mitochondria ROS production and an SR stress associated with an increase in Unfolded Protein Response (UPR) [40]. In an attempt to resolve SR stress and reverse the hallmarks of the disease, the authors treated the mice for 2 weeks with sodium 4-phenylbutyrate (4-PBA), a chemical chaperone. Not only this treatment reduced SR stress and UPR, it also improved muscle histology and function, but surprisingly without restoring calcium flux *via* RyR1. From a basic point of view, this study suggests that the major pathophysiological mechanism associated with this RyR1 mutation would be an increase in SR stress and UPR, and not an alteration of RyR1 channel function. The 4-PBA treatment would improve the folding of RyR1-associated proteins, like triadin and CSQ, without acting on the channel itself, and this would be sufficient to reverse the muscle weakness [40]. Such a pathophysiological mechanism should be confirmed with other mutations (in patients cells or mouse models) in order to ascertain whether it is a common pathway and for which group of patients it could be considered. If confirmed, 4-PBA, as a Food and Drug Administration (FDA) approved molecule, could be rapidly tested on a predetermined group of patients.

### 2.1.4. Screen on Multiple Animal Models

As developing new treatments is a long and expensive process, the repositioning of molecules already tested and used in humans

for other conditions appears as the fastest way to therapy. To do so, drugs are being tested on various models of pathologies in order to determine if these drugs can have a beneficial effect on other diseases, and specifically RyR1-RM patients. In addition, with the development of high throughput screening, larger screens are now emerging in order to identify without any *a priori*, all the possibly active molecules, either from libraries containing already FDA-approved molecules or with more general libraries. Along this line, to identify new molecules for RyR1-RM patients, a chemical library of thousands of molecules has been screened using a combination of different models (*C. elegans*, zebrafish and the C2C12 mouse myotubes [41]). The first step of this screening, performed in *C. elegans*, was based on the observation that the growth of *unc-68* worms (RyR null mutant [8] is stopped at an early stage by nemadipine-A, a DHPR inhibitor [42]. Identifying which drugs allowed mutant worms to escape nemadipine-A-induced growth arrest uncovered 74 hits, among which were several inhibitors of p38 MAPK. The screening was then further performed in zebrafish lines, either the severely affected *ryr1a/ryr1b* double mutant or the moderately affected *ryr1b* mutant. None of the compounds tested, including compounds that were identified as hits on *C. elegans*, improved movement of either the *ryr1a/ryr1b* double mutant or the *ryr1b* single mutant zebrafish relative to untreated mutant controls; however, the authors observed positive chemical-genetic interactions in *ryr1b* single mutant fish for two p38 inhibitors, SB203580 and SB202190. In C2C12 cells, both drugs decreased caffeine-induced calcium release in wild type myotubes but slightly restored it in C2C12-RyR1 KO myotubes, where calcium release is normally absent. Caffeine-induced calcium release was similarly restored in C2C12-RyR1 KO myotubes after siRNA knockdown of p38 isoforms. These results point to a possible effect on a non-RyR1 related pathway by which the drug would increase calcium release in the absence of RyR1. Surprisingly, the drug has an inhibitory effect on myotubes from the Y522S mouse model, considered as a leaky channel model. While this study suggests that p38 could be a promising therapeutic target able to restore calcium release independently of RyR1, further studies are required to understand its mechanisms of action (activation of calcium release in the absence of RyR1, and inhibition in the presence of a leaky channel), and it remains unclear whether these findings are translatable to humans, as the models used in the screening do not accurately replicate human disease: the *unc-68 C. elegans*, double mutant zebrafish and RyR1 KO C2C12 cells all display a complete loss of RyR1, while all known human patients have some remaining RyR1 expression.

### 2.1.5. Screen on *in vitro* Models

Two other screens aiming to identify RyR1 modulators able to fix the calcium leak were also published in recent years. The first one [43] used a fluorescence-based approach. Changes of fluorescence in isolated pig SR vesicles indicate that the tested compound induces a change in RyR1 conformation or affects its binding affinity with two of its effectors, FKBP12.6 and calmodulin (CaM), both of which have previously been linked to pathological calcium leak in RyR1 [44-46] and RyR2 [47-50]. The first screen of 727 drugs [43] followed by a larger screen on 1280 compounds [51] led to the identification of several reproducible hits with either an inhibiting or activating effect on RyR1 activity, some of which are known modulators of RyR1 or CaM and FKBP12.6 binding. Two of the inhibitors, chloroxine and myricetin, were further assessed and their effect was confirmed in skinned human and rat muscle fibers.

In another study, Murayama *et al.* [52] screened 1535 compounds with a calcium imaging approach using non-muscle cell lines stably expressing a genetic calcium indicator, R-CEPIA1er, and either a WT- or a mutant leaky-RyR1. This screen yielded four

hits with an inhibitor effect on RyR1 (including dantrolene, a known RyR1 inhibitor used to treat MH crises), whose effect was reproduced in three other non-muscle cell lines expressing 3 different mutant leaky RyR1s. Interestingly, several of the hit compounds identified by Rebbeck and colleagues were tested in this study: however, results here suggest chloroxine to have a weak activating effect on RyR1 rather than the previously observed inhibiting effect. The reasons for this inconsistency remain unclear.

Both of the two approaches share several strengths and weaknesses. They constitute rapid and efficient methods to identify RyR1 modulators with either an inhibiting or activating effect, a speed and precision suitable for high-throughput screening. However, a shared weakness is that the excitation-contraction coupling apparatus is not conserved in either case, as Rebbeck's screen uses isolated SR vesicles while Murayama's uses nonmuscle cells expressing exogenous RyR1 (HEK293 cells) in the absence of the many RyR1 effectors that are present in muscle cells. Thus, it is probable that compounds that would indirectly modulate RyR1 function through their partners in a muscle context would be discarded as false negatives in this nonmuscle context. Currently, none of the drugs identified in either screen have been shown to be ideal for long-term treatment of RyR1-RM in their current state, although Rebbeck and colleagues suggest that one of their hits, myricetin, could be further tested in animal models of muscle pathology. In both screens, further testing also demonstrates that most of the hits also modulate RyR2 activity, which can be undesirable in the context of RyR1-RM treatment as adverse effects may be observed on healthy cardiac function. Nevertheless, both methods constitute overall promising approaches for early-stage discovery of RyR1 modulators as a starting point for the development of future pharmacological therapies for RyR1-RM.

## 2.2. Gene Therapy

Gene therapy refers to products that affect transcription/translation of a gene or that transfer genetic material into the host genome. Gene therapy products are usually nucleic acids, viruses, or genetically engineered microorganisms. Development of therapeutic approaches for genetic diseases has been a challenge for decades and gene therapy nowadays provides promising results [53]. An important issue is to de-personalize the gene therapy strategy in order to target a large number of patients with the same approach/molecule, which is specifically important for the *RYR1* gene as most of the 400 *RYR1* variants are very rare and affect only a few families.

Once the mutation responsible for pathology is identified, the aim of gene therapy approaches is to modify the genome of the patient's cells in order to correct this mutation and sustainably restore the altered function characterized in the pathology. One important issue for neuromuscular diseases is the ability to target all the muscles of the body, and especially the respiratory muscles (diaphragm and intercostal muscles), which are among the less accessible to injection. There are several ways to design a gene strategy depending on the targeted mutation, its location in the DNA sequence and its consequences on the protein and pathways. The different possibilities, which are currently tested for other neuromuscular disorders, will be examined in the context of RyR1-RM.

### 2.2.1. Gene Replacement (Full Length or Mini Gene)

Gene replacement, the introduction of a new and functional copy of the altered gene thanks to a viral vector, is an interesting strategy for the loss-of-function mutations. The use of a viral vector such as an Adeno Associated Virus (AAV) allows, with a single

intravenous injection, to target all the muscles of the body, even the less accessible respiratory muscles and diaphragm. A spectacular result of gene therapy has been obtained for SMA, the spinal muscular atrophy [54], although the target tissue (the motor neurons) is not easily accessible. SMA is caused by the reduction in the SMN protein in motor neurones, and gene replacement using AAV encoding SMN1 protein is now one of the two recently approved therapies (by the FDA in the USA and by the European Medicines Agency-EMA) for SMA [55]. A similar strategy is also currently in clinical trial for another neuromuscular disease, the X-linked myotubular myopathy linked to MTM1-deletion (XLMTM - Study ASPIRO - NCT03199469), after demonstration of its efficacy in the dog model of the disease [56]. This promising therapeutic approach has, unfortunately some limitations, related to the packaging capacity of the viral vector used, which for AAV is about 5kb. This limit is far too low for the huge 15kb RyR1 coding sequence. Inspiration is sought for in another neuromuscular disease involving a very large gene: the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). To by-pass the impossibility to fit the 14kb dystrophin cDNA in an AAV, a smaller version of dystrophin, so-called “mini-dystrophin”, has been used and is now in clinical trial (phase 3, NCT04281485) after tests in mouse and dog models of DMD [57, 58]. The use of mini dystrophin stemmed from a number of observations: i) the dystrophin is a modular protein and contains a number of repeated rod-domains; ii) patients with a mild form of Becker Muscular Dystrophy (BMD) have been identified, who expressed a truncated form of dystrophin, with large in-frame deletion in the rod domain [59] and iii) patients with severe DMD have no dystrophin (out of frame mutation) whereas patients with mild BMD expressed low amounts of dystrophin. This led to the idea that shorter dystrophin might have sufficient functionality to preserve a correct muscle function and structure and that shorter but partially functional dystrophin would be better than no dystrophin. At the end, the severe DMD patients would be converted into mild BMD patients. This approach is unfortunately not applicable to RyR1-RM, because RyR1 is not a modular protein, and no region is dispensable. Along the same line, no mild patient has ever been identified with a truncated version of RyR1, and no experimental evidence has been obtained up to now that a mini-RyR1 protein could be functional.

### 2.2.2. Modulation of Endogenous Paralog

When a protein is missing in adult muscle but a paralog is present in the earlier development, the idea is to force or to maintain the expression of the embryonic protein in the adult muscle. This approach has been tested for dystrophin and its embryonic paralog utrophin. Overexpression of utrophin in adult skeletal muscle has been shown to correct the dystrophin deficiency in DMD models [60]. Different strategies have been used to induce utrophin expression, from pharmacological activation of its promoter [60] to inhibition of its normal downregulation [61, 62] or introduction of artificial transcription factors [63]. Such a strategy could be considered for *RYR1* and *RYR3*. *RyR3* is expressed at a low level in adult skeletal muscle, and its function is still partially unknown, but it is expressed at a higher level in embryonic skeletal muscle [64]. Could *RyR3* overexpression in adult skeletal muscle compensate for the lack of *RyR1* or its dysfunction? This has not been shown for the moment, and this approach requires a better knowledge of *RyR3* and its possible involvement in the CRC in place of *RyR1*, as well as its activation by the DHP. Thus further studies are required before such a strategy could be considered.

### 2.2.3. Therapies at the mRNA Level

When correction at the gene level is too complex, as for large genes, an alternative strategy is to target the mRNA. The pre-mRNA

correction is specifically suited for mutations which affect the splicing of the gene and result in exon deletion, insertion, intron retention, or which creates stop codon, but it can also be applied to other situations. In the presence of a mutation creating a stop codon, the goal of this splice modulation is to induce the skipping of exons with disease-causing mutation and/or adjacent exons in the pre-mRNA to maintain the reading frame and produce a corrected mRNA which will further be translated into a shorter but functional protein. In the case of exon deletion, exon insertion or intron retention, the goal is to restore the normal splicing of the pre-mRNA. This approach has shown extremely encouraging results and is in clinical development for some neuromuscular diseases, among which DMD, SMA and XLMTM [65].

For DMD, the skipping of different exons of the dystrophin gene (exons 45, 51, 53) using antisense oligonucleotides (AON) with different chemical backbones (2'-O-methyl- phosphorothioate or phosphorodiamidate morpholino oligomer) is being tested in clinical trials. Up to now, although a large number of patients have been enrolled in some of these clinical trials (up to 186 patients), no clear benefit of the treatment has been observed, possibly because of heterogeneity in the study group [66] or because this approach is expected to reduce the severity (from DMD to BMD) but not to cure the patients.

For SMA, caused by mutations in the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene which result in a decrease in the SMN protein and motor neuron degeneration, spectacular therapeutic improvement has been obtained with AONs. *SMN2*, a copy of *SMN1* which differs by a single nucleotide, produces a non-functional copy of SMN lacking exon 7. Splice modulation strategies (with AON or small chemical molecules) aim at forcing the inclusion of exon 7 and the production of a full-length protein by *SMN2*. After a promising clinical trial [67], the treatment by such an AON (Nusinersen) has been approved by the FDA in the US and the EMA in Europe (although the >100.000\$ price of each injection should be kept in mind [68]).

This splice modulation strategy could apply to RyR1-RM, as long as altered splicing is a pathophysiological mechanism identified. It could not be applied to delete exons with mutations, even if the reading frame is maintained, because no exon (besides the two alternative exons 70 and 83) has been identified as dispensable, and any exon deletion would probably result in the production of a destabilized protein.

Along this line, the first demonstration of the efficacy of exon skipping for RyR1-RM was published almost 10 years ago [69]. The splice modulation was tested on a patient with a deep intronic *RYR1* mutation resulting in the presence of an additional exon in the mRNA, leading to a destabilized protein and at the very end resulted in huge reduction in protein amount. Forcing the skipping of the additional exon by a viral vector encoding an antisense sequence resulted in the restoration of *RyR1* protein and the restoration of calcium release in patient's cultured muscle cells. Although encouraging, this approach is a highly personalized therapy that cannot be translated to other mutations.

The correction of the disease at the mRNA level has also been tested for dominant *RYR1* mutations using allele specific gene silencing at the mRNA level with RNA interference (RNAi) [70]. The silencing has been tested on two mice models with dominant *RyR1* mutations: the Y522S and the I4895T. Although very encouraging results were obtained, this study points to a number of limitations: the amount of *RyR1* function recovery was a reflect of RNAi efficiency, which is not at 100%, the delivery of the RNAi to the muscles using electroporation only allow the targeting of few accessible muscles and should be improved to be considered as a possi-

ble strategy. This strategy is also a highly personalized therapeutic approach, which would require a different RNAi for each mutation.

#### 2.2.4. Gene Editing

The new era of gene editing has begun with the rise of the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) and CRISPR associated proteins (Cas) as a tool for genome editing [71]. Adapted from a defense mechanism of bacteria against viruses, CRISPR/Cas is now largely used in many studies because it is simple, fast and easy to use, but also cheap and very specific compared to other gene editing tools commonly used like Transcription Activator-Like Nuclease (TALENs) and Zinc Finger Nuclease (ZFN). CRISPR/Cas editing gives new hopes for therapeutics approaches for genetic disorders with currently no cure [72], and has been awarded the 2020 Chemistry Nobel Prize [73]. In the CRISPR/Cas9 system, also called “molecular scissors”, a first step is the targeted cleavage of the DNA (for example, near a mutation), induced by an RNA guide and the Cas9, followed by the second step of DNA repair performed by the cell itself which can be either i) imperfect with insertion/deletion (indel) in the final DNA or ii) perfect with homologous recombination if a template is provided, resulting in the replacement of the template sequence in the final DNA in place of the original strand (for example, without the mutation). Whereas all the cells are able to perform the imperfect repair (leading to indel), only the cells which are actively dividing can perform the homologous recombination repair.

Although very recently emerged, the field of CRISPR-mediated genome editing is growing exponentially and technological improvement is evolving at an impressive speed. Up to now, its application to neuromuscular diseases has been mainly focused on DMD and Myotonic dystrophy type 1 (DM1) [74]. The major challenge is the importation of CRISPR tools into the muscle, which can be achieved with non-viral vectors (electroporation or nanoparticles, for example) or more efficiently with viral vectors such as AAV, allowing as mentioned previously, to target all the muscles of the body. The main application is CRISPR/Cas9 induced-exon skipping because it requires only 2 guides to cleave the DNA at the chosen sites (on both sides of the exon to be excised) and does not rely on the quality of the DNA repair (a perfect repair being difficult not to say impossible in the non-replicative muscle fibers). As exon-skipping with AON has shown promising results for DMD but with too low efficacy, CRISPR-Cas9 mediated exon skipping has been tested for DMD and it has demonstrated a good efficiency in various DMD animal models (mouse [75-77], dog [78] and pig [79] as well as in human cells [80]). Thanks to the large versatility of CRISPR, it is possible to target the mutations of a large number of DMD patients. The long-lasting efficiency of these gene editing strategies was also studied and showed promising results both in mice and dogs DMD models [81].

DM1 is caused by the expansion of repeated 3-nucleotides stretches in the non-coding region of the *DMPK* gene. Different strategies are being studied for DM1 correction using CRISPR mediated gene editing, the easiest one being the CRISPR/Cas9-induced deletion of this noncoding region [82].

In the context of RyR1-RM, similar strategies could be considered to suppress an additional exon or to excise a deleterious non-coding region, as done for DMD and DM1. Perfect gene editing, *i.e.* the change of a mutant nucleotide for the correct version, is not feasible for the moment, as it relies on homologous recombination, a process that is inefficient in the post-mitotic cells like muscle fiber.

### 3. DISCUSSION: PERSPECTIVES FOR RYR1-RM

The different pathways on which therapeutic interventions have been evaluated are presented in Fig. (1).

#### 3.1. Pharmacological Perspectives

Currently, drug development is a tightly controlled and well-known process, and countless drugs have already been developed for many diseases. Although it is a long and expensive process, it was the only alternative until the end of the 20<sup>th</sup> century. In order to speed up the development, reduce the number of molecules discarded before the end of the evaluation process, and therefore reduce the cost in the drug development, the repositioning of drugs already tested, characterized and used on humans to treat other conditions has been largely used. Along this line, the anti-estrogenic molecule tamoxifen has been shown to improve muscle strength in DMD and in XLMTM, and is now in clinical trial for DMD (NC-T03354039). Such a therapeutic development, if successful during the clinical trials, could rapidly result in therapy for the patients as the molecule is already developed and available. Unfortunately, as observed for NAC in the context of RyR1-RM, if the risks are excluded, the benefits are not always as high as expected, although the results in the pre-clinical tests were promising. Nonetheless, pharmacological therapies, although imperfect and with partial efficiency, are probably the most promising ones in the short term.

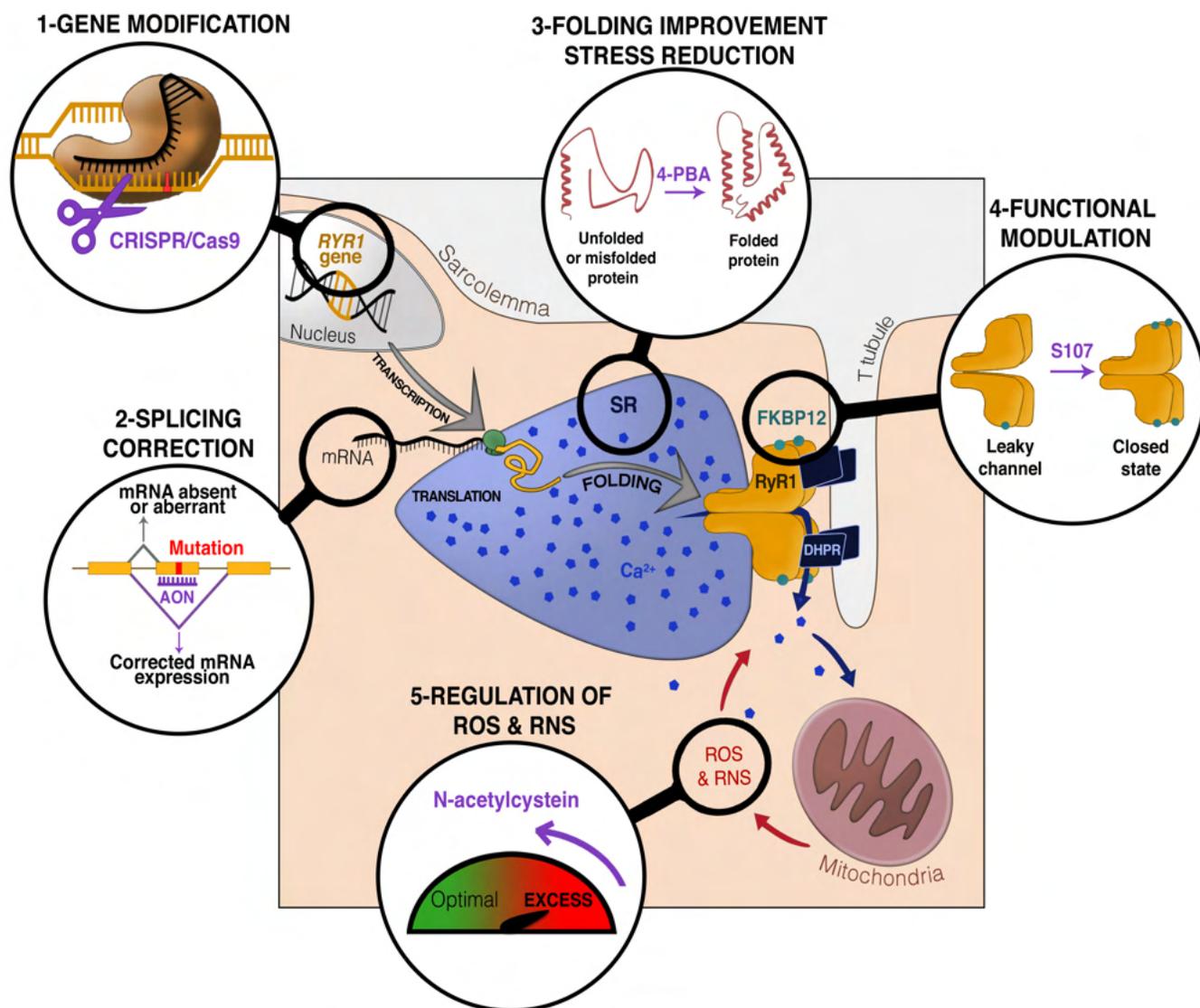
Out of the therapies being investigated that were reviewed in this paper, Rycals (S107 and S48168) seem to be the most promising ones, with an ongoing clinical trial on RyR1-RM patients. However, Rycals and the other approaches described here all target a calcium leak mechanism and might not be suitable for patients whose disease is caused by a loss of RyR1 expression and/or function.

The great benefit of chemical drugs and especially of FDA-approved drugs is that once the proof of concept will be validated, their use for the RyR1-RM can be extremely rapid. The second advantage is that it can be foreseen that the effect of the drug will probably not depend on the exact mutation of each patient, therefore a whole group of patients would be eligible for such a treatment.

#### 3.2. Gene Therapy Perspectives

Gene therapy is a new challenge for genetic diseases, which was only a dream 20 to 30 years ago. The first application to humans has been successfully provided in the early 2000s [83], only 20 years ago, and thus all the challenges, drawbacks, ethical issues are just emerging.

The efficacy of CRISPR-mediated gene editing coupled to the efficacy of viral transduction of the muscle emphasized a promising potential for this approach, but also its inevitable drawbacks. Some immune responses against the AAV vector or the Cas9 have been reported, especially as a high dose of AAV will be required [81], and the integration into the genome of the patients could also be damaging [84]. Off target cleavage is the major issue with the use of Cas9, and improvement both in the engineering of more specific Cas9 and in the screening of genome-wide off-target editing should help but not suppress the risk of induced unintended mutations [82]. Another issue could be an incomplete/insufficient correction related to the specific muscle structure, with multiples nuclei within each fiber. A correction of all the nuclei or at least a large fraction of the nuclei contained in a single muscle fiber could be necessary for the restoration of a minimal function, as observed for



**Fig. (1).** Summary of the main pathways targeted by current therapeutic interventions **1)** gene correction of the DNA at the nucleus level, **2)** splicing correction of the mRNA in the cytosol, **3)** improvement of protein folding and reduction of SR stress in the reticulum, **4)** regulation of the calcium leak at the triad, **5)** regulation of ROS and RNS production in the cytoplasm/mitochondria. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

DMD [85]. Although less efficient, the use of alternative non-viral methods for genome editing (such as nanoparticles or cell penetrating peptides with Cas9 protein) could offer some interesting advantages like the absence of integration in the genome and the transient expression, which would reduce the risk of off-target effect [82].

Despite all the challenges that the gene editing approach is facing and that should find solutions before moving to a real treatment in humans, in addition to a number of ethical considerations [86, 87] which have been raised by this new technology, gene therapy and genome editing appear to have the highest therapeutic potential in the long term.

The great benefit of gene therapy is that it will definitively cure the disease, but one possible issue is the difficulty to stop gene therapy in the case of unexpected adverse events, and thus the safe-

ty issues have to be improved. The second difficulty is to identify a gene therapy which is not (or at least not too much) mutation dependent and could target a reasonable number of mutations within the 400 variants identified in the RYR1 gene up to now (not to speak about the future variants that will be identified during the genetic screening). With the recent preclinical successes obtained for neuromuscular diseases (DMD), and especially with the CRISPR gene editing, and considering the impressive number of studies performed in this field, it seems reasonable to consider that part of these challenges will find solutions in the coming years.

## CONCLUSION

Although no treatment is available for RyR1-RM, therapeutic avenues are actively explored. From the oldest long used pharmacological therapy, with known pitfalls and more or less modest bene-

fits, to the newest gene therapy with unknown side effects and expected huge potential benefits, the perfect therapy in-between still has to be discovered. A combination of different approaches could be a good alternative, such as a chemical compound able to reduce the amount of viral vector needed for gene therapy by improving the entry in the muscle, or improving the structure of the muscle. Although the recent successes in different neuromuscular diseases probably raised new hopes for patients and their families, active research should continue in the two directions, as it is difficult to predict today what the future of therapies for RyR1-RM will be, the short term and the long term therapies being probably miles away.

#### LIST OF ABBREVIATIONS

AAV	= Adeno Associated Virus
AON	= Antisens Oligonucleotide
BMD	= Becker Muscular Dystrophy
Cas	= CRISPR Associated Proteins
CCD	= Central Core Disease
CFTD	= Congenital Fiber Type Disproportion
CNM	= Centronuclear Myopathy
CRC	= Calcium Release Complex
CRISPR	= Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSQ	= Calsequestrin
DHPR	= Dihydropyridine Receptor
DM1	= Myotonic Dystrophy
DMD	= Duchenne Muscular Dystrophy
EHS	= Exertional Heat Stroke
EMA	= European Medicines Agency
FDA	= Food and Drug Administration
KO	= Knock Out
MAPK	= Mitogen-Activated Protein Kinases
MH	= Malignant Hyperthermia
MmD	= Multi-Mini Core Disease
MTM1	= Myotubularin 1
6MWT	= 6 Minutes-Walk Test
NAC	= N-acetyl Cysteine
PKA	= Protein Kinase A
RNAi	= Interference RNA
RNS	= Reactive Nitrogen Species
ROS	= Reactive Oxygen Species
RYR1-RM	= RYR1 Related Myopathies
RYR1	= Type 1 Ryanodine Receptor
RYR2	= Type 2 Ryanodine Receptor
RYR3	= Type 3 Ryanodine Receptor
SMA	= Spinal Muscular Atrophy

SR	= Sarcoplasmic Reticulum
T-tubule	= Transverse Tubule
TALEN	= Transcription Activator Like Nuclease
UPR	= Unfolded Protein Response
WT	= Wild Type
XLMTM	= X linked Myotubular Myopathy
ZFN	= Zinc Finger Nuclear

#### AUTHORS' CONTRIBUTION

MB, LT, JR and IM analyzed and interpreted the data and wrote the manuscript.

#### CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

#### FUNDING

The work has been financially supported by the fundings from the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the French Auvergne Rhone Alpes Région (AU-RA).

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The author thank the financial support received from The Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the French Auvergne Rhone Alpes Région (AURA).

#### REFERENCES

- [1] Dulhunty AF, Beard NA, Casarotto MG. Recent advances in understanding the ryanodine receptor calcium release channels and their role in calcium signalling. *F1000Res* 2018; 7 F1000 Faculty Rev-1851.
- [2] Meissner G. Regulation of Ryanodine Receptor Ion Channels Through Posttranslational Modifications. *Curr Top Membr* 2010; 66: 91-113. [http://dx.doi.org/10.1016/S1063-5823\(10\)66005-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1063-5823(10)66005-X) PMID: 21666757
- [3] Mori F, Fukaya M, Abe H, Wakabayashi K, Watanabe M. Developmental changes in expression of the three ryanodine receptor mRNAs in the mouse brain. *Neurosci Lett* 2000; 285(1): 57-60. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01046-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01046-6) PMID: 10788707
- [4] Pehlivan D, Bayram Y, Gunes N, *et al.* The genomics of arthrogryposis, a complex trait: Candidate genes and further evidence for oligogenic inheritance. *Am J Hum Genet* 2019; 105(1): 132-50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.05.015> PMID: 31230720
- [5] Bertocchini F, Ovitt CE, Conti A, *et al.* Requirement for the ryanodine receptor type 3 for efficient contraction in neonatal skeletal muscles. *EMBO J* 1997; 16(23): 6956-63. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.23.6956> PMID: 9384575
- [6] Balschun D, Wolfer DP, Bertocchini F, *et al.* Deletion of the ryanodine receptor type 3 (RyR3) impairs forms of synaptic plasticity and spatial learning. *EMBO J* 1999; 18(19): 5264-73. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/18.19.5264> PMID: 10508160
- [7] Eckhardt J, Bachmann C, Sekulic-Jablanovic M, *et al.* Extraocular muscle function is impaired in *ryr3*<sup>-/-</sup> mice. *J Gen Physiol* 2019; 151(7): 929-43.

- http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201912333 PMID: 31085573
- [8] Maryon EB, Coronado R, Anderson P. unc-68 encodes a ryanodine receptor involved in regulating *C. elegans* body-wall muscle contraction. *J Cell Biol* 1996; 134(4): 885-93. http://dx.doi.org/10.1083/jcb.134.4.885 PMID: 8769414
- [9] Sullivan KM, Scott K, Zuker CS, Rubin GM. The ryanodine receptor is essential for larval development in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(11): 5942-7. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.110145997 PMID: 10811919
- [10] Wu HH, Brennan C, Ashworth R. Ryanodine receptors, a family of intracellular calcium ion channels, are expressed throughout early vertebrate development. *BMC Res Notes* 2011; 4: 541. http://dx.doi.org/10.1186/1756-0500-4-541 PMID: 22168922
- [11] Takekura H, Sun X, Franzini-Armstrong C. Development of the excitation-contraction coupling apparatus in skeletal muscle: peripheral and internal calcium release units are formed sequentially. *J Muscle Res Cell Motil* 1994; 15(2): 102-18. http://dx.doi.org/10.1007/BF00130422 PMID: 8051285
- [12] Marty I, Fauré J. Excitation-contraction coupling alterations in myopathies. *J Neuromuscul Dis* 2016; 3(4): 443-53. http://dx.doi.org/10.3233/JND-160172 PMID: 27911331
- [13] Goonasekera SA, Beard NA, Groom L, et al. Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J Gen Physiol* 2007; 130(4): 365-78. http://dx.doi.org/10.1085/jgp.200709790 PMID: 17846166
- [14] Lawal TA, Todd JJ, Witherspoon JW, et al. Ryanodine receptor 1-related disorders: an historical perspective and proposal for a unified nomenclature. *Skelet Muscle* 2020; 10(1): 32. http://dx.doi.org/10.1186/s13395-020-00243-4 PMID: 33190635
- [15] Roux-Buisson N, Monnier N, Sagui E, et al. Identification of variants of the ryanodine receptor type 1 in patients with exertional heat stroke and positive response to the malignant hyperthermia *in vitro* contracture test. *Br J Anaesth* 2016; 116(4): 566-8. http://dx.doi.org/10.1093/bja/aew047 PMID: 26994242
- [16] Witting N, Laforêt P, Voermans NC, et al. Phenotype and genotype of muscle ryanodine receptor rhabdomyolysis-myalgia syndrome. *Acta Neurol Scand* 2018; 137(5): 452-61. http://dx.doi.org/10.1111/ane.12885 PMID: 29635721
- [17] Monnier N, Romero NB, Lerale J, et al. Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor. *Hum Mol Genet* 2001; 10(22): 2581-92. http://dx.doi.org/10.1093/hmg/10.22.2581 PMID: 11709545
- [18] Galleni Leão L, Santos Souza L, Nogueira L, et al. Dominant or recessive mutations in the *RYR1* gene causing central core myopathy in Brazilian patients. *Acta Myol* 2020; 39(4): 274-82. PMID: 33458582
- [19] Amburgey K, Bailey A, Hwang JH, et al. Genotype-phenotype correlations in recessive RYR1-related myopathies. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 117. http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-8-117 PMID: 23919265
- [20] Garibaldi M, Rendu J, Brocard J, et al. 'Dusty core disease' (DuCD): expanding morphological spectrum of RYR1 recessive myopathies. *Acta Neuropathol Commun* 2019; 7(1): 3. http://dx.doi.org/10.1186/s40478-018-0655-5 PMID: 30611313
- [21] Lawal TA, Todd JJ, Meilleur KG. Ryanodine receptor 1-related myopathies: Diagnostic and therapeutic approaches. *Neurotherapeutics* 2018; 15(4): 885-99. http://dx.doi.org/10.1007/s13311-018-00677-1 PMID: 30406384
- [22] Amburgey K, McNamara N, Bennett LR, McCormick ME, Acsadi G, Dowling JJ. Prevalence of congenital myopathies in a representative pediatric united states population. *Ann Neurol* 2011; 70(4): 662-5. http://dx.doi.org/10.1002/ana.22510 PMID: 22028225
- [23] Pelletier L, Petiot A, Brocard J, et al. *In vivo* RyR1 reduction in muscle triggers a core-like myopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2020; 8(1): 192. http://dx.doi.org/10.1186/s40478-020-01068-4 PMID: 33176865
- [24] Wei L, Salahura G, Boncompagni S, et al. Mitochondrial superoxide flashes: metabolic biomarkers of skeletal muscle activity and disease. *FASEB J* 2011; 25(9): 3068-78. http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-187252 PMID: 21646399
- [25] Durham WJ, Aracena-Parks P, Long C, et al. RyR1 S-nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S RyR1 knockin mice. *Cell* 2008; 133(1): 53-65. http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.042 PMID: 18394989
- [26] Dowling JJ, Arbogast S, Hur J, et al. Oxidative stress and successful antioxidant treatment in models of RYR1-related myopathy. *Brain* 2012; 135(Pt 4): 1115-27. http://dx.doi.org/10.1093/brain/aws036 PMID: 22418739
- [27] Michelucci A, De Marco A, Guarnier FA, Protasi F, Boncompagni S. Antioxidant treatment reduces formation of structural cores and improves muscle function in RYR1<sup>Y522S/WT</sup> mice. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 6792694. http://dx.doi.org/10.1155/2017/6792694 PMID: 29062463
- [28] Todd JJ, Lawal TA, Witherspoon JW, et al. Randomized controlled trial of *N*-acetylcysteine therapy for RYR1-related myopathies. *Neurology* 2020; 94(13): e1434-44. http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000008872 PMID: 31941795
- [29] Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, et al. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 1994; 77(4): 513-23. http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90214-3 PMID: 7514503
- [30] Ahern GP, Junankar PR, Dulhunty AF. Subconductance states in single-channel activity of skeletal muscle ryanodine receptors after removal of FKBP12. *Biophys J* 1997; 72(1): 146-62. http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78654-5 PMID: 8994600
- [31] Chelu MG, Danila CI, Gilman CP, Hamilton SL. Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14(6): 227-34. http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2004.06.003 PMID: 15451514
- [32] Bellinger AM, Reiken S, Dura M, et al. Remodeling of ryanodine receptor complex causes "leaky" channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(6): 2198-202. http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711074105 PMID: 18268335
- [33] Mei Y, Xu L, Kramer HF, Tomberlin GH, Townsend C, Meissner G. Stabilization of the skeletal muscle ryanodine receptor ion channel-FKBP12 complex by the 1,4-benzothiazepine derivative S107. *PLoS One* 2013; 8(1): e54208. http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054208 PMID: 23349825
- [34] Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, et al. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 2009; 15(3): 325-30. http://dx.doi.org/10.1038/nm.1916 PMID: 19198614
- [35] Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, et al. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab* 2011; 14(2): 196-207. http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.014 PMID: 21803290
- [36] Kushnir A, Todd JJ, Witherspoon JW, et al. Intracellular calcium leak as a therapeutic target for RYR1-related myopathies. *Acta Neuropathol* 2020; 139(6): 1089-104. http://dx.doi.org/10.1007/s00401-020-02150-w PMID: 32236737
- [37] Aizpurua JM, Miranda JI, Irastorza A, et al. Discovery of a novel family of FKBP12 "reshapers" and their use as calcium modulators in skeletal muscle under nitro-oxidative stress. *Eur J Med Chem* 2021; 213: 113160. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113160 PMID: 33493827
- [38] Dirksen RT, Avila G. Altered ryanodine receptor function in central core disease: leaky or uncoupled Ca<sup>2+</sup> release channels? *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12(5): 189-97. http://dx.doi.org/10.1016/S1050-1738(02)00163-9 PMID: 12161072
- [39] Loy RE, Orynbayev M, Xu L, et al. Muscle weakness in Ryr1I4895T/WT knock-in mice as a result of reduced ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> ion permeation and release from the sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol* 2011; 137(1): 43-57. http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201010523 PMID: 21149547
- [40] Lee CS, Hanna AD, Wang H, et al. A chemical chaperone improves muscle function in mice with a RyR1 mutation. *Nat Commun* 2017; 8: 14659. http://dx.doi.org/10.1038/ncomms14659 PMID: 28337975
- [41] Volpatti JR, Endo Y, Knox J, et al. Identification of drug modi-

- fiers for RYR1-related myopathy using a multi-species discovery pipeline. *eLife* 2020; 9: e52946.  
<http://dx.doi.org/10.7554/eLife.52946> PMID: 32223895
- [42] Kwok TCY, Ricker N, Fraser R, *et al.* A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. *Nature* 2006; 441(7089): 91-5.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature04657> PMID: 16672971
- [43] Rebbeck RT, Essawy MM, Nitu FR, *et al.* High-throughput screens to discover small-molecule modulators of ryanodine receptor calcium release channels. *SLAS Discov* 2017; 22(2): 176-86.  
<http://dx.doi.org/10.1177/1087057116674312> PMID: 27760856
- [44] Andersson DC, Marks AR. Fixing ryanodine receptor Ca leak - a novel therapeutic strategy for contractile failure in heart and skeletal muscle. *Drug Discov Today Dis Mech* 2010; 7(2): e151-7.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ddmec.2010.09.009> PMID: 21113427
- [45] Aracena P, Tang W, Hamilton SL, Hidalgo C. Effects of S-glutathionylation and S-nitrosylation on calmodulin binding to triads and FKBP12 binding to type 1 calcium release channels. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(7-8): 870-81.  
<http://dx.doi.org/10.1089/ars.2005.7.870> PMID: 15998242
- [46] Blayney LM, Jones J-L, Griffiths J, Lai FA. A mechanism of ryanodine receptor modulation by FKBP12/12.6, protein kinase A, and K201. *Cardiovasc Res* 2010; 85(1): 68-78.  
<http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp273> PMID: 19661110
- [47] Oda T, Yang Y, Uchinoumi H, *et al.* Oxidation of ryanodine receptor (RyR) and calmodulin enhance Ca release and pathologically alter RyR structure and calmodulin affinity. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 85: 240-8.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.06.009> PMID: 26092277
- [48] Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, *et al.* CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 98: 62-72.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.06.007> PMID: 27318036
- [49] Oda T, Yang Y, Nitu FR, *et al.* In cardiomyocytes, binding of unzipping peptide activates ryanodine receptor 2 and reciprocally inhibits calmodulin binding. *Circ Res* 2013; 112(3): 487-97.  
<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300290> PMID: 23233753
- [50] Yang Y, Guo T, Oda T, *et al.* Cardiac myocyte Z-line calmodulin is mainly RyR2-bound, and reduction is arrhythmogenic and occurs in heart failure. *Circ Res* 2014; 114(2): 295-306.  
<http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302857> PMID: 24186966
- [51] Rebbeck RT, Singh DP, Janicek KA, *et al.* RyR1-targeted drug discovery pipeline integrating FRET-based high-throughput screening and human myofiber dynamic Ca<sup>2+</sup> assays. *Sci Rep* 2020; 10(1): 1791.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-58461-1> PMID: 32019969
- [52] Murayama T, Kurebayashi N, Ishigami-Yuasa M, *et al.* Efficient high-throughput screening by endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> measurement to identify inhibitors of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup>-release channels. *Mol Pharmacol* 2018; 94(1): 722-30.  
<http://dx.doi.org/10.1124/mol.117.111468> PMID: 29674523
- [53] Wirth T, Parker N, Ylä-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene* 2013; 525(2): 162-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137> PMID: 23618815
- [54] Al-Zaidy SA, Kolb SJ, Lowes L, *et al.* AVXS-101 (onasemnogene abeparvovec) for SMA1: Comparative study with a prospective natural history cohort. *J Neuromuscul Dis* 2019; 6(3): 307-17.  
<http://dx.doi.org/10.3233/JND-190403> PMID: 31381526
- [55] Messina S, Sframeli M. New treatments in spinal muscular atrophy: Positive results and new challenges. *J Clin Med* 2020; 9(7): 2222.  
<http://dx.doi.org/10.3390/jcm9072222> PMID: 32668756
- [56] Ross JA, Tasfaout H, Levy Y, *et al.* rAAV-related therapy fully rescues myonuclear and myofilament function in X-linked myotubular myopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2020; 8(1): 167.  
<http://dx.doi.org/10.1186/s40478-020-01048-8> PMID: 33076971
- [57] McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech* 2015; 8(3): 195-213.  
<http://dx.doi.org/10.1242/dmm.018424> PMID: 25740330
- [58] Kodippili K, Hakim CH, Pan X, *et al.* Dual AAV gene therapy for duchenne muscular dystrophy with a 7-kb mini-dystrophin gene in the canine model. *Hum Gene Ther* 2018; 29(3): 299-311.  
<http://dx.doi.org/10.1089/hum.2017.095> PMID: 28793798
- [59] Fairclough RJ, Wood MJ, Davies KE. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet* 2013; 14(6): 373-8.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrg3460> PMID: 23609411
- [60] Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, *et al.* Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 1998; 4(12): 1441-4.  
<http://dx.doi.org/10.1038/4033> PMID: 9846586
- [61] Sengupta K, Mishra MK, Loro E, Spencer MJ, Pyle AD, Khurana TS. Genome editing-mediated utrophin upregulation in duchenne muscular dystrophy stem cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020; 22: 500-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.omtn.2020.08.031> PMID: 33230452
- [62] Sengupta K, Loro E, Khurana TS. PMO-based let-7c site blocking oligonucleotide (SBO) mediated utrophin upregulation in mdx mice, a therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Sci Rep* 2020; 10(1): 21492.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-76338-1> PMID: 33298994
- [63] Pisani C, Strimpakos G, Gabanella F, *et al.* Utrophin up-regulation by artificial transcription factors induces muscle rescue and impacts the neuromuscular junction in mdx mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(4 Pt A): 1172-82.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.01.030> PMID: 29408646
- [64] Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(11): a003996.  
<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a003996> PMID: 20961976
- [65] Chiu W, Hsun Y-H, Chang K-J, *et al.* Current genetic survey and potential gene-targeting therapeutics for neuromuscular diseases. *Int J Mol Sci* 2020; 21(24): 9589.  
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249589> PMID: 33339321
- [66] Goemans N, Mercuri E, Belousova E, *et al.* A randomized placebo-controlled phase 3 trial of an antisense oligonucleotide, drisapersen, in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2018; 28(1): 4-15.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2017.10.004> PMID: 29203355
- [67] Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, *et al.* Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med* 2017; 377(18): 1723-32.  
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1702752> PMID: 29091570
- [68] Gidaro T, Servais L. Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Dev Med Child Neurol* 2019; 61(1): 19-24.  
<http://dx.doi.org/10.1111/dmcn.14027> PMID: 30221755
- [69] Rendu J, Brocard J, Denarier E, *et al.* Exon skipping as a therapeutic strategy applied to an RYR1 mutation with pseudo-exon inclusion causing a severe core myopathy. *Hum Gene Ther* 2013; 24(7): 702-13.  
<http://dx.doi.org/10.1089/hum.2013.052> PMID: 23805838
- [70] Loy RE, Lueck JD, Mostajo-Radji MA, Carrell EM, Dirksen RT. Allele-specific gene silencing in two mouse models of autosomal dominant skeletal myopathy. *PLoS One* 2012; 7(11): e49757.  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0049757> PMID: 23152933
- [71] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337(6096): 816-21.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1225829> PMID: 22745249
- [72] Sharma G, Sharma AR, Bhattacharya M, Lee S-S, Chakraborty C. CRISPR-Cas9: A preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Mol Ther* 2021; 29(2): 571-86.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymlthe.2020.09.028> PMID: 33238136
- [73] Strzyz P. CRISPR-Cas9 wins nobel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020; 21(12): 714.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41580-020-00307-9> PMID: 33051620
- [74] Chemello F, Bassel-Duby R, Olson EN. Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *J Clin Invest* 2020; 130(6): 2766-76.  
<http://dx.doi.org/10.1172/JCI136873> PMID: 32478678
- [75] Long C, Amoasii L, Mireault AA, *et al.* Postnatal genome editing

- partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* 2016; 351(6271): 400-3.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.aad5725> PMID: 26721683
- [76] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, *et al.* *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 2016; 351(6271): 403-7.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.aad5143> PMID: 26721684
- [77] Tabeordbar M, Zhu K, Cheng JKW, *et al.* *In vivo* gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* 2016; 351(6271): 407-11.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.aad5177> PMID: 26721686
- [78] Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, *et al.* Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of duchenne muscular dystrophy. *Science* 2018; 362(6410): 86-91.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.aau1549> PMID: 30166439
- [79] Moretti A, Fonteyne L, Giesert F, *et al.* Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 2020; 26(2): 207-14.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0738-2> PMID: 31988462
- [80] Min Y-L, Li H, Rodriguez-Caycedo C, *et al.* CRISPR-Cas9 corrects duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Sci Adv* 2019; 5(3): eaav4324.  
<http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aav4324> PMID: 30854433
- [81] Nelson CE, Wu Y, Gemberling MP, *et al.* Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 2019; 25(3): 427-32.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0344-3> PMID: 30778238
- [82] Marsh S, Hanson B, Wood MJA, Varela MA, Roberts TC. Application of CRISPR-Cas9-mediated genome editing for the treatment of myotonic dystrophy type 1. *Mol Ther* 2020; 28(12): 2527-39.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.10.005> PMID: 33171139
- [83] Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, *et al.* Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy. *N Engl J Med* 2002; 346(16): 1185-93.  
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa012616> PMID: 11961146
- [84] Hanlon KS, Kleinstiver BP, Garcia SP, *et al.* High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun* 2019; 10(1): 4439.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-12449-2> PMID: 31570731
- [85] van Westering TLE, Lomonosova Y, Coenen-Stass AML, *et al.* Uniform sarcolemmal dystrophin expression is required to prevent extracellular microRNA release and improve dystrophic pathology. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2020; 11(2): 578-93.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jcsm.12506> PMID: 31849191
- [86] Brokowski C, Adli M. CRISPR Ethics: Moral considerations for applications of a powerful tool. *J Mol Biol* 2019; 431(1): 88-101.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.044> PMID: 29885329
- [87] Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 2020; 578(7794): 229-36.  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5> PMID: 32051598

**DISCLAIMER:** The above article has been published, as is, ahead-of-print, to provide early visibility but is not the final version. Major publication processes like copyediting, proofing, typesetting and further review are still to be done and may lead to changes in the final published version, if it is eventually published. All legal disclaimers that apply to the final published article also apply to this ahead-of-print version.

Author Proofs Only  
For Personal Use Only

## Bibliographie

1. Aizpurua JM, Miranda JI, Irastorza A, Torres E, Eceiza M, Sagartzazu-Aizpurua M, et al. Discovery of a novel family of FKBP12 «reshapers» and their use as calcium modulators in skeletal muscle under nitro-oxidative stress. *Eur J Med Chem.* 5 mars 2021;213:113160.
2. Al-Qusairi L, Prokic I, Amoasii L, Kretz C, Messaddeq N, Mandel JL, et al. Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways. *FASEB J.* août 2013;27(8):3384-94.
3. Al-Zaidy SA, Mendell JR. From Clinical Trials to Clinical Practice: Practical Considerations for Gene Replacement Therapy in SMA Type 1. *Pediatr Neurol.* nov 2019;100:3-11.
4. Altamirano F, López JR, Henríquez C, Molinski T, Allen PD, Jaimovich E. Increased resting intracellular calcium modulates NF- $\kappa$ B-dependent inducible nitric-oxide synthase gene expression in dystrophic mdx skeletal myotubes. *J Biol Chem.* 15 juin 2012;287(25):20876-87.
5. Alter J, Lou F, Rabinowitz A, Yin H, Rosenfeld J, Wilton SD, et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med.* févr 2006;12(2):175-7.
6. Amburgey K, Bailey A, Hwang JH, Tarnopolsky MA, Bonnemann CG, Medne L, et al. Genotype-phenotype correlations in recessive RYR1-related myopathies. *Orphanet J Rare Dis.* 6 août 2013;8:117.
7. Amburgey K, McNamara N, Bennett LR, McCormick ME, Acsadi G, Dowling JJ. Prevalence of congenital myopathies in a representative pediatric united states population. *Ann Neurol.* oct 2011;70(4):662-5.
8. Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science.* 5 oct 2018;362(6410):86-91.
9. Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, et al. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab.* 3 août 2011;14(2):196-207.
10. Antigny F, Sabourin J, Saüc S, Bernheim L, Koenig S, Frieden M. TRPC1 and TRPC4 channels functionally interact with STIM1L to promote myogenesis and maintain fast repetitive Ca<sup>2+</sup> release in human myotubes. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* mai 2017;1864(5):806-13.
11. Avila G, Lee EH, Perez CF, Allen PD, Dirksen RT. FKBP12 binding to RyR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes. *J Biol Chem.* 20 juin 2003;278(25):22600-8.

12. Baltgalvis KA, Greising SM, Warren GL, Lowe DA. Estrogen regulates estrogen receptors and antioxidant gene expression in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. 13 avr 2010;5(4):e10164.
13. Bannister RA. Bridging the myoplasmic gap II: more recent advances in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *J Exp Biol*. janv 2016;219(Pt 2):175-82.
14. Barefield DY, Sell JJ, Tahtah I, Kearns SD, McNally EM, Demonbreun AR. Loss of dysferlin or myoferlin results in differential defects in excitation-contraction coupling in mouse skeletal muscle. *Sci Rep*. 5 août 2021;11(1):15865.
15. Barros RPA, Gabbi C, Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. juill 2009;297(1):E124-133.
16. Beam KG, Knudson CM, Powell JA. A lethal mutation in mice eliminates the slow calcium current in skeletal muscle cells. *Nature*. 13 mars 1986;320(6058):168-70.
17. Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol*. mai 2004;85(1):33-69.
18. Beard NA, Sakowska MM, Dulhunty AF, Laver DR. Calsequestrin is an inhibitor of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channels. *Biophys J*. janv 2002;82(1 Pt 1):310-20.
19. Beaufils M, Travard L, Rendu J, Marty I. Therapies for RYR1-Related Myopathies: Where We Stand and the Perspectives. *Curr Pharm Des*. 2022;28(1):15-25.
20. Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, et al. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med*. mars 2009;15(3):325-30.
21. Bellinger AM, Reiken S, Dura M, Murphy PW, Deng SX, Landry DW, et al. Remodeling of ryanodine receptor complex causes « leaky » channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 12 févr 2008;105(6):2198-202.
22. Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev*. juill 2000;80(3):1215-65.
23. Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J*. sept 1990;9(9):2811-8.
24. Bertorini TE, Palmieri GM, Griffin J, Igarashi M, Hinton A, Karas JG. Effect of dantrolene in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. juin 1991;14(6):503-7.
25. Biesemann N, Ried JS, Ding-Pfennigdorff D, Dietrich A, Rudolph C, Hahn S, et al. High throughput screening of mitochondrial bioenergetics in human differentiated myotubes identifies novel enhancers of muscle performance in aged mice. *Sci Rep*. 20 juin 2018;8(1):9408.
26. Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C. Structural evidence for

- direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol.* déc 1988;107(6 Pt 2):2587-600.
27. Boncompagni S, d'Amelio L, Fulle S, Fanò G, Protasi F. Progressive disorganization of the excitation-contraction coupling apparatus in aging human skeletal muscle as revealed by electron microscopy: a possible role in the decline of muscle performance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* oct 2006;61(10):995-1008.
  28. Boncompagni S, Rossi AE, Micaroni M, Hamilton SL, Dirksen RT, Franzini-Armstrong C, et al. Characterization and temporal development of cores in a mouse model of malignant hyperthermia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 déc 2009;106(51):21996-2001.
  29. Boncompagni S, Thomas M, Lopez JR, Allen PD, Yuan Q, Kranias EG, et al. Triadin/Junctin double null mouse reveals a differential role for Triadin and Junctin in anchoring CASQ to the jSR and regulating Ca(2+) homeostasis. *PLoS One.* 2012;7(7):e39962.
  30. Bootman MD, Chehab T, Bultynck G, Parys JB, Rietdorf K. The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium.* mars 2018;70:32-46.
  31. Bovo E, Nikolaienko R, Bhayani S, Kahn D, Cao Q, Martin JL, et al. Novel approach for quantification of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 juin 2019;316(6):H1323-31.
  32. Brandt NR, Caswell AH, Wen SR, Talvenheimo JA. Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J Membr Biol.* févr 1990;113(3):237-51.
  33. Brennan S, Garcia-Castañeda M, Michelucci A, Sabha N, Malik S, Groom L, et al. Mouse model of severe recessive RYR1-related myopathy. *Hum Mol Genet.* 15 sept 2019;28(18):3024-36.
  34. Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasová E, Moschella MC, et al. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell.* 20 mai 1994;77(4):513-23.
  35. Buj-Bello A, Laugel V, Messaddeq N, Zahreddine H, Laporte J, Pellissier JF, et al. The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 nov 2002;99(23):15060-5.
  36. Cacheux M, Blum A, Sébastien M, Wozny AS, Brocard J, Mamchaoui K, et al. Functional Characterization of a Central Core Disease RyR1 Mutation (p.Y4864H) Associated with Quantitative Defect in RyR1 Protein. *J Neuromuscul Dis.* 20 nov 2015;2(4):421-32.
  37. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell.* 10 mars 1995;80(5):675-9.
  38. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 août 2011;3(8):a003947.

39. Chagovetz AA, Klatt Shaw D, Ritchie E, Hoshijima K, Grunwald DJ. Interactions among ryanodine receptor isoforms contribute to muscle fiber type development and function. *Dis Model Mech.* 18 sept 2019;13(2):dmm038844.
40. Chelu MG, Danila CI, Gilman CP, Hamilton SL. Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc Med.* août 2004;14(6):227-34.
41. Chelu MG, Goonasekera SA, Durham WJ, Tang W, Lueck JD, Riehl J, et al. Heat- and anesthesia-induced malignant hyperthermia in an RyR1 knock-in mouse. *FASEB J.* févr 2006;20(2):329-30.
42. Chen L, Tang F, Gao H, Zhang X, Li X, Xiao D. CAPN3: A muscle-specific calpain with an important role in the pathogenesis of diseases (Review). *Int J Mol Med.* nov 2021;48(5):203.
43. Chen SR, Zhang L, MacLennan DH. Asymmetrical blockade of the Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) by 12-kDa FK506 binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 déc 1994;91(25):11953-7.
44. Chin ER. Intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in skeletal muscle: decoding a complex message. *Exerc Sport Sci Rev.* avr 2010;38(2):76-85.
45. Chiu W, Hsun YH, Chang KJ, Yarmishyn AA, Hsiao YJ, Chien Y, et al. Current Genetic Survey and Potential Gene-Targeting Therapeutics for Neuromuscular Diseases. *Int J Mol Sci.* 16 déc 2020;21(24):E9589.
46. Cho CH, Woo JS, Perez CF, Lee EH. A focus on extracellular Ca<sup>2+</sup> entry into skeletal muscle. *Exp Mol Med.* 15 sept 2017;49(9):e378.
47. Choi JH, Jeong SY, Oh MR, Allen PD, Lee EH. TRPCs: Influential Mediators in Skeletal Muscle. *Cells.* 1 avr 2020;9(4):E850.
48. Cignarella A, Fadini GP, Bolego C, Trevisi L, Boscaro C, Sanga V, et al. Clinical efficacy and safety of angiogenesis inhibitors: sex differences and current challenges. *Cardiovasc Res.* 16 mars 2022;118(4):988-1003.
49. Collibee SE, Bergnes G, Chuang C, Ashcraft L, Gardina J, Garard M, et al. Discovery of Reldesemtiv, a Fast Skeletal Muscle Troponin Activator for the Treatment of Impaired Muscle Function. *J Med Chem.* 28 oct 2021;64(20):14930-41.
50. Cui Y, Tae HS, Norris NC, Karunasekara Y, Pouliquin P, Board PG, et al. A dihydropyridine receptor alpha1s loop region critical for skeletal muscle contraction is intrinsically unstructured and binds to a SPRY domain of the type 1 ryanodine receptor. *Int J Biochem Cell Biol.* mars 2009;41(3):677-86.
51. Damiani E, Volpe P, Margreth A. Coexpression of two isoforms of calsequestrin in rabbit slow-twitch muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* déc 1990;11(6):522-30.
52. Danko S, Kim DH, Sreter FA, Ikemoto N. Inhibitors of Ca<sup>2+</sup> release from the isolated sarcoplasmic reticulum. II. The effects of dantrolene on Ca<sup>2+</sup> release induced by caffeine, Ca<sup>2+</sup> and depolarization. *Biochim Biophys Acta.* 11 juin 1985;816(1):18-24.

53. Darbellay B, Arnaudeau S, Bader CR, König S, Bernheim L. STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca<sup>2+</sup> release. *J Cell Biol.* 25 juill 2011;194(2):335-46.
54. Darbellay B, Arnaudeau S, Ceroni D, Bader CR, König S, Bernheim L. Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2. *J Biol Chem.* 16 juill 2010;285(29):22437-47.
55. Dayal A, Schrötter K, Pan Y, Föhr K, Melzer W, Grabner M. The Ca<sup>2+</sup> influx through the mammalian skeletal muscle dihydropyridine receptor is irrelevant for muscle performance. *Nat Commun.* 7 sept 2017;8(1):475.
56. De Luca A, Pierno S, Liantonio A, Cetrone M, Camerino C, Simonetti S, et al. Alteration of excitation-contraction coupling mechanism in extensor digitorum longus muscle fibres of dystrophic mdx mouse and potential efficacy of taurine. *Br J Pharmacol.* mars 2001;132(5):1047-54.
57. de Winter JM, Gineste C, Minardi E, Brocca L, Rossi M, Borsboom T, et al. Acute and chronic tirasemtiv treatment improves in vivo and in vitro muscle performance in actin-based nemaline myopathy mice. *Hum Mol Genet.* 26 juin 2021;30(14):1305-20.
58. Dolle RE. Historical overview of chemical library design. *Methods Mol Biol.* 2011;685:3-25.
59. Dolphin AC. The  $\alpha 2\delta$  subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta.* juill 2013;1828(7):1541-9.
60. Dorchies OM, Reutenauer-Patte J, Dahmane E, Ismail HM, Petermann O, Patthey-Vuadens O, et al. The anticancer drug tamoxifen counteracts the pathology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol.* févr 2013;182(2):485-504.
61. Dowling JJ, Low SE, Busta AS, Feldman EL. Zebrafish MTMR14 is required for excitation-contraction coupling, developmental motor function and the regulation of autophagy. *Hum Mol Genet.* 1 juill 2010;19(13):2668-81.
62. Dowling JJ, Arbogast S, Hur J, Nelson DD, McEvoy A, Waugh T, et al. Oxidative stress and successful antioxidant treatment in models of RYR1-related myopathy. *Brain.* avr 2012;135(Pt 4):1115-27.
63. Dowling JJ, Vreede AP, Low SE, Gibbs EM, Kuwada JY, Bonnemann CG, et al. Loss of myotubularin function results in T-tubule disorganization in zebrafish and human myotubular myopathy. *PLoS Genet.* févr 2009;5(2):e1000372.
64. Duan D, Goemans N, Takeda S, Mercuri E, Aartsma-Rus A. Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers.* 18 févr 2021;7(1):13.
65. Dulhunty AF, Beard NA, Casarotto MG. Recent advances in understanding the ryanodine receptor calcium release channels and their role in calcium signalling. *F1000Res.* 2018;7:F1000 Faculty Rev-1851.
66. Durham WJ, Aracena-Parks P, Long C, Rossi AE, Goonasekera SA, Boncompagni S, et al. RyR1 S-nitrosylation underlies environmental heat stroke and sudden death in Y522S

- RyR1 knockin mice. *Cell*. 4 avr 2008;133(1):53-65.
67. Durieux AC, Vassilopoulos S, Lainé J, Fraysse B, Briñas L, Prudhon B, et al. A centronuclear myopathy--dynamitin 2 mutation impairs autophagy in mice. *Traffic*. juin 2012;13(6):869-79.
  68. Elbaz M, Ruiz A, Bachmann C, Eckhardt J, Pelczar P, Venturi E, et al. Quantitative RyR1 reduction and loss of calcium sensitivity of RyR1Q1970fsX16+A4329D cause cores and loss of muscle strength. *Hum Mol Genet*. 15 sept 2019;28(18):2987-99.
  69. Ferreira A, Quijano-Roy S, Pichereau C, Moghadaszadeh B, Goemans N, Bönnemann C, et al. Mutations of the selenoprotein N gene, which is implicated in rigid spine muscular dystrophy, cause the classical phenotype of multimincore disease: reassessing the nosology of early-onset myopathies. *Am J Hum Genet*. oct 2002;71(4):739-49.
  70. Filipova D, Walter AM, Gaspar JA, Brunn A, Linde NF, Ardestani MA, et al. Gene profiling of embryonic skeletal muscle lacking type I ryanodine receptor Ca(2+) release channel. *Sci Rep*. 1 févr 2016;6:20050.
  71. Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev*. oct 2002;82(4):893-922.
  72. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2 nov 2017;377(18):1723-32.
  73. Fourest-Lieuvin A, Rendu J, Osseni A, Pernet-Gallay K, Rossi D, Oddoux S, et al. Role of triadin in the organization of reticulum membrane at the muscle triad. *J Cell Sci*. 15 juill 2012;125(Pt 14):3443-53.
  74. Franzini-Armstrong C, Kenney LJ, Varriano-Marston E. The structure of calsequestrin in triads of vertebrate skeletal muscle: a deep-etch study. *J Cell Biol*. juill 1987;105(1):49-56.
  75. Furuichi T, Furutama D, Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Mikoshiba K. Multiple types of ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci*. août 1994;14(8):4794-805.
  76. Gaburjakova M, Gaburjakova J, Reiken S, Huang F, Marx SO, Rosemblyt N, et al. FKBP12 binding modulates ryanodine receptor channel gating. *J Biol Chem*. 18 mai 2001;276(20):16931-5.
  77. Gao L, Balshaw D, Xu L, Tripathy A, Xin C, Meissner G. Evidence for a role of the luminal M3-M4 loop in skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor) activity and conductance. *Biophys J*. août 2000;79(2):828-40.
  78. Garibaldi M, Rendu J, Brocard J, Lacene E, Fauré J, Brochier G, et al. « Dusty core disease » (DuCD): expanding morphological spectrum of RYR1 recessive myopathies. *Acta Neuropathol Commun*. 5 janv 2019;7(1):3.
  79. Gayi E, Neff LA, Massana Muñoz X, Ismail HM, Sierra M, Mercier T, et al. Tamoxifen prolongs survival and alleviates symptoms in mice with fatal X-linked myotubular

- myopathy. *Nat Commun.* 19 nov 2018;9(1):4848.
80. Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium.* févr 2000;27(2):97-106.
  81. Gidaro T, Servais L. Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Dev Med Child Neurol.* janv 2019;61(1):19-24.
  82. Goemans N, Mercuri E, Belousova E, Komaki H, Dubrovsky A, McDonald CM, et al. A randomized placebo-controlled phase 3 trial of an antisense oligonucleotide, drisapersen, in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* janv 2018;28(1):4-15.
  83. Gonano LA, Jones PP. FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge. *Channels (Austin).* 3 sept 2017;11(5):415-25.
  84. Goonasekera SA, Beard NA, Groom L, Kimura T, Lyfenko AD, Rosenfeld A, et al. Triadin binding to the C-terminal luminal loop of the ryanodine receptor is important for skeletal muscle excitation contraction coupling. *J Gen Physiol.* oct 2007;130(4):365-78.
  85. Gregg RG, Messing A, Strube C, Beurg M, Moss R, Behan M, et al. Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 nov 1996;93(24):13961-6.
  86. Guhathakurta P, Prochniewicz E, Thomas DD. Actin-Myosin Interaction: Structure, Function and Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 5 sept 2018;19(9):E2628.
  87. Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 22 juill 2010;363(4):355-64.
  88. Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 9 nov 1992;312(2-3):229-35.
  89. Hanlon KS, Kleinstiver BP, Garcia SP, Zaborowski MP, Volak A, Spirig SE, et al. High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat Commun.* 30 sept 2019;10(1):4439.
  90. Henry J, Wlodkowic D. Towards High-Throughput Chemobehavioural Phenomics in Neuropsychiatric Drug Discovery. *Mar Drugs.* 6 juin 2019;17(6):E340.
  91. Hernandez-Lain A, Husson I, Monnier N, Farnoux C, Brochier G, Lacène E, et al. De novo RYR1 heterozygous mutation (I4898T) causing lethal core-rod myopathy in twins. *Eur J Med Genet.* févr 2011;54(1):29-33.
  92. Hirata H, Watanabe T, Hatakeyama J, Sprague SM, Saint-Amant L, Nagashima A, et al. Zebrafish relatively relaxed mutants have a ryanodine receptor defect, show slow swimming and provide a model of multi-minicore disease. *Development.* août 2007;134(15):2771-81.

93. Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:491-533.
94. Horstick EJ, Linsley JW, Dowling JJ, Hauser MA, McDonald KK, Ashley-Koch A, et al. Stac3 is a component of the excitation-contraction coupling machinery and mutated in Native American myopathy. *Nat Commun.* 2013;4:1952.
95. Hu H, Wang Z, Wei R, Fan G, Wang Q, Zhang K, et al. The molecular architecture of dihydropyridine receptor/L-type Ca<sup>2+</sup> channel complex. *Sci Rep.* 10 févr 2015;5:8370.
96. Hutchings DC, Madders GWP, Niort BC, Bode EF, Waddell CA, Woods LS, et al. Interaction of background Ca<sup>2+</sup> influx, sarcoplasmic reticulum threshold and heart failure in determining propensity for Ca<sup>2+</sup> waves in sheep heart. *J Physiol.* 1 mars 2022;
97. Jeong SY, Oh MR, Choi JH, Woo JS, Lee EH. Calsequestrin 1 Is an Active Partner of Stromal Interaction Molecule 2 in Skeletal Muscle. *Cells.* 20 oct 2021;10(11):2821.
98. Jeyakumar LH, Ballester L, Cheng DS, McIntyre JO, Chang P, Olivey HE, et al. FKBP binding characteristics of cardiac microsomes from diverse vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 9 mars 2001;281(4):979-86.
99. Jeyakumar LH, Copello JA, O'Malley AM, Wu GM, Grassucci R, Wagenknecht T, et al. Purification and characterization of ryanodine receptor 3 from mammalian tissue. *J Biol Chem.* 26 juin 1998;273(26):16011-20.
100. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 17 août 2012;337(6096):816-21.
101. Jing M, Verardi R, Veglia G, Bowser MT. Development of a Sensitive Assay for SERCA Activity Using FRET Detection of ADP. *Anal Methods.* 7 mars 2014;6(5):1468-74.
102. Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 22 déc 1995;270(51):30787-96.
103. Jungbluth H, Sewry CA, Muntoni F. Core myopathies. *Semin Pediatr Neurol.* déc 2011;18(4):239-49.
104. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov.* mai 2006;5(5):387-98.
105. Kendall GC, Mokhonova EI, Moran M, Sejbuk NE, Wang DW, Silva O, et al. Dantrolene enhances antisense-mediated exon skipping in human and mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med.* 12 déc 2012;4(164):164ra160.
106. Khersonsky SM, Jung DW, Kang TW, Walsh DP, Moon HS, Jo H, et al. Facilitated forward chemical genetics using a tagged triazine library and zebrafish embryo screening. *J Am Chem Soc.* 1 oct 2003;125(39):11804-5.
107. Kim KC, Caswell AH, Talvenheimo JA, Brandt NR. Isolation of a terminal cisterna

- protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry*. 2 oct 1990;29(39):9281-9.
108. Kinder TB, Dranchak PK, Inglese J. High-Throughput Screening to Identify Inhibitors of the Type I Interferon-Major Histocompatibility Complex Class I Pathway in Skeletal Muscle. *ACS Chem Biol*. 17 juill 2020;15(7):1974-86.
  109. Kitajima Y, Ono Y. Estrogens maintain skeletal muscle and satellite cell functions. *J Endocrinol*. juin 2016;229(3):267-75.
  110. Kodippili K, Hakim CH, Pan X, Yang HT, Yue Y, Zhang Y, et al. Dual AAV Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy with a 7-kb Mini-Dystrophin Gene in the Canine Model. *Hum Gene Ther*. mars 2018;29(3):299-311.
  111. Komm BS, Mirkin S. An overview of current and emerging SERMs. *J Steroid Biochem Mol Biol*. sept 2014;143:207-22.
  112. Koo T, Popplewell L, Athanasopoulos T, Dickson G. Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length dystrophin protein into dystrophic mice. *Hum Gene Ther*. févr 2014;25(2):98-108.
  113. Korematsu S, Imai K, Sato K, Maeda T, Suenobu S, Kojo M, et al. Congenital neuromuscular disease with uniform type-1 fibers, presenting early stage dystrophic muscle pathology. *Brain Dev*. janv 2006;28(1):63-6.
  114. Kramerova I, Kudryashova E, Ermolova N, Saenz A, Jaka O, López de Munain A, et al. Impaired calcium calmodulin kinase signaling and muscle adaptation response in the absence of calpain 3. *Hum Mol Genet*. 15 juill 2012;21(14):3193-204.
  115. Kramerova I, Kudryashova E, Wu B, Ottenheijm C, Granzier H, Spencer MJ. Novel role of calpain-3 in the triad-associated protein complex regulating calcium release in skeletal muscle. *Hum Mol Genet*. 1 nov 2008;17(21):3271-80.
  116. Krause T, Gerbershagen MU, Fiege M, Weisshorn R, Wappler F. Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia*. avr 2004;59(4):364-73.
  117. Kurebayashi N, Ogawa Y. Depletion of Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca<sup>2+</sup> entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol*. 15 mai 2001;533(Pt 1):185-99.
  118. Kushnir A, Todd JJ, Witherspoon JW, Yuan Q, Reiken S, Lin H, et al. Intracellular calcium leak as a therapeutic target for RYR1-related myopathies. *Acta Neuropathol*. juin 2020;139(6):1089-104.
  119. Kutchukian C, Szentesi P, Allard B, Buj-Bello A, Csernoch L, Jacquemond V. Ca<sup>2+</sup>-induced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in myotubularin-deficient muscle fibers. *Cell Calcium*. juin 2019;80:91-100.
  120. Kwok TCY, Ricker N, Fraser R, Chan AW, Burns A, Stanley EF, et al. A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist. *Nature*. 4 mai 2006;441(7089):91-5.

121. Lamb GD. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: comparisons with cardiac muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* mars 2000;27(3):216-24.
122. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* nov 2010;2(11):a003996.
123. Lawal TA, Todd JJ, Meilleur KG. Ryanodine Receptor 1-Related Myopathies: Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Neurotherapeutics.* oct 2018;15(4):885-99.
124. Lawal TA, Todd JJ, Witherspoon JW, Bönnemann CG, Dowling JJ, Hamilton SL, et al. Ryanodine receptor 1-related disorders: an historical perspective and proposal for a unified nomenclature. *Skelet Muscle.* 16 nov 2020;10(1):32.
125. Lawal TA, Wires ES, Terry NL, Dowling JJ, Todd JJ. Preclinical model systems of ryanodine receptor 1-related myopathies and malignant hyperthermia: a comprehensive scoping review of works published 1990-2019. *Orphanet J Rare Dis.* 7 mai 2020;15(1):113.
126. Lee CS, Hanna AD, Wang H, Dagnino-Acosta A, Joshi AD, Knoblauch M, et al. A chemical chaperone improves muscle function in mice with a RyR1 mutation. *Nat Commun.* 24 mars 2017;8:14659.
127. Li L, Mirza S, Richardson SJ, Gallant EM, Thekkedam C, Pace SM, et al. A new cytoplasmic interaction between junctin and ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *J Cell Sci.* 1 mars 2015;128(5):951-63.
128. Liu J, Campagna J, John V, Damoiseaux R, Mokhonova E, Becerra D, et al. A Small-Molecule Approach to Restore a Slow-Oxidative Phenotype and Defective CaMKII $\beta$  Signaling in Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Cell Rep Med.* 20 oct 2020;1(7):100122.
129. Long C, Amoasii L, Bassel-Duby R, Olson EN. Genome Editing of Monogenic Neuromuscular Diseases: A Systematic Review. *JAMA Neurol.* 1 nov 2016;73(11):1349-55.
130. Louis M, Zanou N, Van Schoor M, Gailly P. TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J Cell Sci.* 1 déc 2008;121(Pt 23):3951-9.
131. Loy RE, Lueck JD, Mostajo-Radji MA, Carrell EM, Dirksen RT. Allele-specific gene silencing in two mouse models of autosomal dominant skeletal myopathy. *PLoS One.* 2012;7(11):e49757.
132. Loy RE, Orynbayev M, Xu L, Andronache Z, Apostol S, Zvaritch E, et al. Muscle weakness in Ryr1I4895T/WT knock-in mice as a result of reduced ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> ion permeation and release from the sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol.* janv 2011;137(1):43-57.
133. Lynch PJ, Tong J, Lehane M, Mallet A, Giblin L, Heffron JJ, et al. A mutation in the transmembrane/luminal domain of the ryanodine receptor is associated with abnormal Ca<sup>2+</sup> release channel function and severe central core disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 mars 1999;96(7):4164-9.

134. Maani N, Sabha N, Rezai K, Ramani A, Groom L, Eltayeb N, et al. Tamoxifen therapy in a murine model of myotubular myopathy. *Nat Commun.* 19 nov 2018;9(1):4849.
135. Mahling R, Ben-Johny M. A bridge from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane comes into view. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 avr 2022;119(15):e2202254119.
136. Mareedu S, Million ED, Duan D, Babu GJ. Abnormal Calcium Handling in Duchenne Muscular Dystrophy: Mechanisms and Potential Therapies. *Front Physiol.* 2021;12:647010.
137. Marks AR, Tempst P, Hwang KS, Taubman MB, Inui M, Chadwick C, et al. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1989;86(22):8683-7.
138. Marsh S, Hanson B, Wood MJA, Varela MA, Roberts TC. Application of CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing for the Treatment of Myotonic Dystrophy Type 1. *Mol Ther.* 2 déc 2020;28(12):2527-39.
139. Marty I, Robert M, Villaz M, De Jongh K, Lai Y, Catterall WA, et al. Biochemical evidence for a complex involving dihydropyridine receptor and ryanodine receptor in triad junctions of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 mars 1994;91(6):2270-4.
140. Marty I, Thevenon D, Scotto C, Groh S, Sainnier S, Robert M, et al. Cloning and characterization of a new isoform of skeletal muscle triadin. *J Biol Chem.* 17 mars 2000;275(11):8206-12.
141. Marty I, Villaz M, Arlaud G, Bally I, Ronjat M. Transmembrane orientation of the N-terminal and C-terminal ends of the ryanodine receptor in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochem J.* 15 mars 1994;298 Pt 3:743-9.
142. Marty I. Triadin regulation of the ryanodine receptor complex. *J Physiol.* 1 août 2015;593(15):3261-6.
143. Marty I, Fauré J. Excitation-Contraction Coupling Alterations in Myopathies. *J Neuromuscul Dis.* 29 nov 2016;3(4):443-53.
144. Marty I, Fauré J, Fourest-Lieuvain A, Vassilopoulos S, Oddoux S, Brocard J. Triadin: what possible function 20 years later? *J Physiol.* 1 juill 2009;587(Pt 13):3117-21.
145. Maryon EB, Coronado R, Anderson P. unc-68 encodes a ryanodine receptor involved in regulating *C. elegans* body-wall muscle contraction. *J Cell Biol.* août 1996;134(4):885-93.
146. Maryon EB, Saari B, Anderson P. Muscle-specific functions of ryanodine receptor channels in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci.* oct 1998;111 ( Pt 19):2885-95.
147. McClements ME, Charbel Issa P, Blouin V, MacLaren RE. A fragmented adeno-associated viral dual vector strategy for treatment of diseases caused by mutations in large genes leads to expression of hybrid transcripts. *J Genet Syndr Gene Ther.* 14 nov 2016;7(5):311.

148. McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech.* mars 2015;8(3):195-213.
149. Mei Y, Xu L, Kramer HF, Tomberlin GH, Townsend C, Meissner G. Stabilization of the skeletal muscle ryanodine receptor ion channel-FKBP12 complex by the 1,4-benzothiazepine derivative S107. *PLoS One.* 2013;8(1):e54208.
150. Meizoso-Huesca A, Pearce L, Barclay CJ, Launikonis BS. Ca<sup>2+</sup> leak through ryanodine receptor 1 regulates thermogenesis in resting skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 janv 2022;119(4):e2119203119.
151. Melville Z, Kim K, Clarke OB, Marks AR. High-resolution structure of the membrane-embedded skeletal muscle ryanodine receptor. *Structure.* 6 janv 2022;30(1):172-180.e3.
152. Mendell JR, Al-Zaidy SA, Lehman KJ, McColly M, Lowes LP, Alfano LN, et al. Five-Year Extension Results of the Phase 1 START Trial of Onasemnogene Apeparvovec in Spinal Muscular Atrophy. *JAMA Neurol.* 1 juill 2021;78(7):834-41.
153. Michelucci A, Boncompagni S, Pietrangelo L, Takano T, Protasi F, Dirksen RT. Pre-assembled Ca<sup>2+</sup> entry units and constitutively active Ca<sup>2+</sup> entry in skeletal muscle of calsequestrin-1 knockout mice. *J Gen Physiol.* 5 oct 2020;152(10):e202012617.
154. Michelucci A, De Marco A, Guarnier FA, Protasi F, Boncompagni S. Antioxidant Treatment Reduces Formation of Structural Cores and Improves Muscle Function in RYR1Y522S/WT Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6792694.
155. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, et al. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature.* 20 juill 1989;340(6230):230-3.
156. Mitchell RD, Simmerman HK, Jones LR. Ca<sup>2+</sup> binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem.* 25 janv 1988;263(3):1376-81.
157. Monnier N, Romero NB, Lerala J, Nivoche Y, Qi D, MacLennan DH, et al. An autosomal dominant congenital myopathy with cores and rods is associated with a neomutation in the RYR1 gene encoding the skeletal muscle ryanodine receptor. *Hum Mol Genet.* 1 nov 2000;9(18):2599-608.
158. Monnier N, Ferreiro A, Marty I, Labarre-Vila A, Mezin P, Lunardi J. A homozygous splicing mutation causing a depletion of skeletal muscle RYR1 is associated with multi-minicore disease congenital myopathy with ophthalmoplegia. *Hum Mol Genet.* 15 mai 2003;12(10):1171-8.
159. Monnier N, Marty I, Faure J, Castiglioni C, Desnuelle C, Sacconi S, et al. Null mutations causing depletion of the type 1 ryanodine receptor (RYR1) are commonly associated with recessive structural congenital myopathies with cores. *Hum Mutat.* mai 2008;29(5):670-8.
160. Moretti A, Fonteyne L, Giesert F, Hoppmann P, Meier AB, Bozoglu T, et al. Somatic gene editing ameliorates skeletal and cardiac muscle failure in pig and human models of

Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med.* févr 2020;26(2):207-14.

161. Mukherjee PK. Chapter 13 - Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs. In: Mukherjee PK, éditeur. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 30 mai 2022]. p. 515-37. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128133743000132>
162. Murayama T, Oba T, Katayama E, Oyamada H, Oguchi K, Kobayashi M, et al. Further characterization of the type 3 ryanodine receptor (RyR3) purified from rabbit diaphragm. *J Biol Chem.* 11 juin 1999;274(24):17297-308.
163. Murayama T, Kurebayashi N, Ishigami-Yuasa M, Mori S, Suzuki Y, Akima R, et al. Efficient High-Throughput Screening by Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Measurement to Identify Inhibitors of Ryanodine Receptor Ca<sup>2+</sup>-Release Channels. *Mol Pharmacol.* juill 2018;94(1):722-30.
164. Murphy RM, Verburg E, Lamb GD. Ca<sup>2+</sup> activation of diffusible and bound pools of mu-calpain in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 15 oct 2006;576(Pt 2):595-612.
165. Nagy S, Hafner P, Schmidt S, Rubino-Nacht D, Schädelin S, Bieri O, et al. Tamoxifen in Duchenne muscular dystrophy (TAMDMD): study protocol for a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind phase 3 trial. *Trials.* 21 nov 2019;20(1):637.
166. Nakai J, Dirksen RT, Nguyen HT, Pessah IN, Beam KG, Allen PD. Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature.* 7 mars 1996;380(6569):72-5.
167. Nakai J, Sekiguchi N, Rando TA, Allen PD, Beam KG. Two regions of the ryanodine receptor involved in coupling with L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem.* 29 mai 1998;273(22):13403-6.
168. Nelson BR, Wu F, Liu Y, Anderson DM, McAnally J, Lin W, et al. Skeletal muscle-specific T-tubule protein STAC3 mediates voltage-induced Ca<sup>2+</sup> release and contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 juill 2013;110(29):11881-6.
169. Nelson CE, Wu Y, Gemberling MP, Oliver ML, Waller MA, Bohning JD, et al. Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med.* mars 2019;25(3):427-32.
170. Nelson TE, Lin M, Zapata-Sudo G, Sudo RT. Dantrolene sodium can increase or attenuate activity of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel. *Clinical implications.* *Anesthesiology.* juin 1996;84(6):1368-79.
171. Neylon CB, Richards SM, Larsen MA, Agrotis A, Bobik A. Multiple types of ryanodine receptor/Ca<sup>2+</sup> release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 oct 1995;215(3):814-21.
172. Oddoux S, Brocard J, Schweitzer A, Szentesi P, Giannesini B, Brocard J, et al. Triadin deletion induces impaired skeletal muscle function. *J Biol Chem.* 11 déc 2009;284(50):34918-29.

173. Ogasawara M, Ogawa M, Nonaka I, Hayashi S, Noguchi S, Nishino I. Evaluation of the Core Formation Process in Congenital Neuromuscular Disease With Uniform Type 1 Fiber and Central Core Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 4 déc 2020;79(12):1370-5.
174. Olesen C, Picard M, Winther AML, Gyruup C, Morth JP, Oxvig C, et al. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature*. 13 déc 2007;450(7172):1036-42.
175. Ottenheijm CAC, Heunks LMA, Dekhuijzen RPN. Diaphragm adaptations in patients with COPD. *Respir Res*. 24 janv 2008;9:12.
176. Palnitkar SS, Mickelson JR, Louis CF, Parness J. Pharmacological distinction between dantrolene and ryanodine binding sites: evidence from normal and malignant hyperthermia-susceptible porcine skeletal muscle. *Biochem J*. 15 sept 1997;326 ( Pt 3):847-52.
177. Paolini C, Quarta M, Wei-LaPierre L, Michelucci A, Nori A, Reggiani C, et al. Oxidative stress, mitochondrial damage, and cores in muscle from calsequestrin-1 knockout mice. *Skelet Muscle*. 2015;5:10.
178. Parr MK, Zhao P, Haupt O, Ngueu ST, Hengevoss J, Fritzemeier KH, et al. Estrogen receptor beta is involved in skeletal muscle hypertrophy induced by the phytoecdysteroid ecdysterone. *Mol Nutr Food Res*. sept 2014;58(9):1861-72.
179. Pelletier L, Petiot A, Brocard J, Giannesini B, Giovannini D, Sanchez C, et al. In vivo RyR1 reduction in muscle triggers a core-like myopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 11 nov 2020;8(1):192.
180. Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, et al. The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*. 6 nov 2008;456(7218):116-20.
181. Pereira DA, Williams JA. Origin and evolution of high throughput screening. *Br J Pharmacol*. sept 2007;152(1):53-61.
182. Perni S, Lavorato M, Beam KG. De novo reconstitution reveals the proteins required for skeletal muscle voltage-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 déc 2017;114(52):13822-7.
183. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol*. mars 2014;10(3):143-56.
184. Plant DR, Lynch GS. Depolarization-induced contraction and SR function in mechanically skinned muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. sept 2003;285(3):C522-528.
185. Polster A, Nelson BR, Olson EN, Beam KG. Stac3 has a direct role in skeletal muscle-type excitation-contraction coupling that is disrupted by a myopathy-causing mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 sept 2016;113(39):10986-91.
186. Polster A, Nelson BR, Papadopoulos S, Olson EN, Beam KG. Stac proteins associate with the critical domain for excitation-contraction coupling in the II-III loop of CaV1.1.

J Gen Physiol. 2 avr 2018;150(4):613-24.

187. Protasi F, Franzini-Armstrong C, Allen PD. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 23 févr 1998;140(4):831-42.
188. Protasi F, Paolini C, Nakai J, Beam KG, Franzini-Armstrong C, Allen PD. Multiple regions of RyR1 mediate functional and structural interactions with alpha(1S)-dihydropyridine receptors in skeletal muscle. *Biophys J.* déc 2002;83(6):3230-44.
189. Qi Y, Ogunbunmi EM, Freund EA, Timerman AP, Fleischer S. FK-binding protein is associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. *J Biol Chem.* 25 déc 1998;273(52):34813-9.
190. Rebbeck RT, Essawy MM, Nitu FR, Grant BD, Gillispie GD, Thomas DD, et al. High-Throughput Screens to Discover Small-Molecule Modulators of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *SLAS Discov.* févr 2017;22(2):176-86.
191. Rebbeck RT, Karunasekara Y, Gallant EM, Board PG, Beard NA, Casarotto MG, et al. The  $\beta(1a)$  subunit of the skeletal DHPR binds to skeletal RyR1 and activates the channel via its 35-residue C-terminal tail. *Biophys J.* 16 févr 2011;100(4):922-30.
192. Rebbeck RT, Singh DP, Janicek KA, Bers DM, Thomas DD, Launikonis BS, et al. RyR1-targeted drug discovery pipeline integrating FRET-based high-throughput screening and human myofiber dynamic  $Ca^{2+}$  assays. *Sci Rep.* 4 févr 2020;10(1):1791.
193. Reiken S, Lacampagne A, Zhou H, Kherani A, Lehnart SE, Ward C, et al. PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure. *J Cell Biol.* 17 mars 2003;160(6):919-28.
194. Reinholt BM, Ge X, Cong X, Gerrard DE, Jiang H. Stac3 is a novel regulator of skeletal muscle development in mice. *PLoS One.* 2013;8(4):e62760.
195. Rendu J, Brocard J, Denarier E, Monnier N, Piétri-Rouxel F, Beley C, et al. Exon skipping as a therapeutic strategy applied to an RYR1 mutation with pseudo-exon inclusion causing a severe core myopathy. *Hum Gene Ther.* juill 2013;24(7):702-13.
196. Rezgui SS, Vassilopoulos S, Brocard J, Platel JC, Bouron A, Arnoult C, et al. Triadin (Trisk 95) overexpression blocks excitation-contraction coupling in rat skeletal myotubes. *J Biol Chem.* 25 nov 2005;280(47):39302-8.
197. Rios E, Brum G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature.* 19 févr 1987;325(6106):717-20.
198. Ríos E, Gillespie D, Franzini-Armstrong C. The binding interactions that maintain excitation-contraction coupling junctions in skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 1 avr 2019;151(4):593-605.
199. Robinson R, Carpenter D, Shaw MA, Halsall J, Hopkins P. Mutations in RYR1 in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum Mutat.* oct 2006;27(10):977-89.
200. Rogers EF, Koniuszy FR. Plant insecticides; ryanodine, a new alkaloid from *Ryania speciosa* Vahl. *J Am Chem Soc.* sept 1948;70(9):3086-8.

201. Romero-Suarez S, Shen J, Brotto L, Hall T, Mo C, Valdivia HH, et al. Muscle-specific inositide phosphatase (MIP/MTMR14) is reduced with age and its loss accelerates skeletal muscle aging process by altering calcium homeostasis. *Aging (Albany NY)*. août 2010;2(8):504-13.
202. Ross JA, Tasfaout H, Levy Y, Morgan J, Cowling BS, Laporte J, et al. rAAV-related therapy fully rescues myonuclear and myofilament function in X-linked myotubular myopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 19 oct 2020;8(1):167.
203. Russell AJ, Hartman JJ, Hinken AC, Muci AR, Kawas R, Driscoll L, et al. Activation of fast skeletal muscle troponin as a potential therapeutic approach for treating neuromuscular diseases. *Nat Med*. 19 févr 2012;18(3):452-5.
204. Sacchetto R, Volpe P, Damiani E, Margreth A. Postnatal development of rabbit fast-twitch skeletal muscle: accumulation, isoform transition and fibre distribution of calsequestrin. *J Muscle Res Cell Motil*. déc 1993;14(6):646-53.
205. Salvatori L, Pallante P, Ravenna L, Chinzari P, Frati L, Russo MA, et al. Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. *Oncogene*. 31 juill 2003;22(31):4875-81.
206. Samsó M. A guide to the 3D structure of the ryanodine receptor type 1 by cryoEM. *Protein Sci*. janv 2017;26(1):52-68.
207. Samsó M, Wagenknecht T. Apocalmodulin and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin bind to neighboring locations on the ryanodine receptor. *J Biol Chem*. 11 janv 2002;277(2):1349-53.
208. Sandow A. Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J Biol Med*. déc 1952;25(3):176-201.
209. Schaaf TM, Peterson KC, Grant BD, Bawaskar P, Yuen S, Li J, et al. High-Throughput Spectral and Lifetime-Based FRET Screening in Living Cells to Identify Small-Molecule Effectors of SERCA. *SLAS Discov*. mars 2017;22(3):262-73.
210. Schartner V, Romero NB, Donkervoort S, Treves S, Munot P, Pierson TM, et al. Dihydropyridine receptor (DHPR, CACNA1S) congenital myopathy. *Acta Neuropathol*. avr 2017;133(4):517-33.
211. Schenone M, Dančík V, Wagner BK, Clemons PA. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat Chem Biol*. avr 2013;9(4):232-40.
212. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 28 juin 2012;9(7):676-82.
213. Schredelseker J, Shrivastav M, Dayal A, Grabner M. Non-Ca<sup>2+</sup>-conducting Ca<sup>2+</sup> channels in fish skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 mars 2010;107(12):5658-63.
214. Scott BT, Simmerman HK, Collins JH, Nadal-Ginard B, Jones LR. Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *J Biol Chem*. 25

- juin 1988;263(18):8958-64.
215. Sengupta K, Loro E, Khurana TS. PMO-based let-7c site blocking oligonucleotide (SBO) mediated utrophin upregulation in mdx mice, a therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Sci Rep.* 9 déc 2020;10(1):21492.
  216. Serysheva II. Structural insights into excitation-contraction coupling by electron cryomicroscopy. *Biochemistry (Mosc).* nov 2004;69(11):1226-32.
  217. Serysheva II, Ludtke SJ, Baker MR, Chiu W, Hamilton SL. Structure of the voltage-gated L-type Ca<sup>2+</sup> channel by electron cryomicroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 août 2002;99(16):10370-5.
  218. Sharma G, Sharma AR, Bhattacharya M, Lee SS, Chakraborty C. CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. *Mol Ther.* 3 févr 2021;29(2):571-86.
  219. Shen X, Franzini-Armstrong C, Lopez JR, Jones LR, Kobayashi YM, Wang Y, et al. Triadins modulate intracellular Ca(2+) homeostasis but are not essential for excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 28 déc 2007;282(52):37864-74.
  220. Sheridan DC, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Beam KG, Allen PD, Perez CF. Bidirectional signaling between calcium channels of skeletal muscle requires multiple direct and indirect interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 déc 2006;103(52):19760-5.
  221. Shishmarev D. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle: recent progress and unanswered questions. *Biophys Rev.* févr 2020;12(1):143-53.
  222. Shu C, Kaxon-Rupp AN, Collado JR, Damoiseaux R, Crosbie RH. Development of a high-throughput screen to identify small molecule enhancers of sarcospan for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle.* 12 déc 2019;9(1):32.
  223. Shu C, Parfenova L, Mokhonova E, Collado JR, Damoiseaux R, Campagna J, et al. High-throughput screening identifies modulators of sarcospan that stabilize muscle cells and exhibit activity in the mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle.* 18 sept 2020;10(1):26.
  224. Snyder HR, Davis CS, Bickerton RK, Halliday RP. 1-[(5-arylfurfurylidene)amino]hydantoin. A new class of muscle relaxants. *J Med Chem.* sept 1967;10(5):807-10.
  225. Sorrentino V. The ryanodine receptor family of intracellular calcium release channels. *Adv Pharmacol.* 1995;33:67-90.
  226. Stammers AN, Susser SE, Hamm NC, Hlynsky MW, Kimber DE, Kehler DS, et al. The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol.* oct 2015;93(10):843-54.
  227. Sundberg SA, Chow A, Nikiforov T, Wada HG. Microchip-based systems for target validation and HTS. *Drug Discov Today.* 1 déc 2000;5(12 Suppl 1):92-103.
  228. Takekura H, Bennett L, Tanabe T, Beam KG, Franzini-Armstrong C. Restoration of

- junctional tetrads in dysgenic myotubes by dihydropyridine receptor cDNA. *Biophys J.* août 1994;67(2):793-803.
229. Takeshima H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, et al. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature.* 16 juin 1994;369(6481):556-9.
  230. Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature.* 8 juin 1989;339(6224):439-45.
  231. Tanabe T, Beam KG, Adams BA, Niidome T, Numa S. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature.* 9 août 1990;346(6284):567-9.
  232. Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature.* 10 nov 1988;336(6195):134-9.
  233. Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, et al. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature.* 23 juill 1987;328(6128):313-8.
  234. Tang W, Sencer S, Hamilton SL. Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front Biosci.* 1 juin 2002;7:d1583-1589.
  235. Thevenon D, Smida-Rezgui S, Chevessier F, Groh S, Henry-Berger J, Beatriz Romero N, et al. Human skeletal muscle triadin: gene organization and cloning of the major isoform, Trisk 51. *Biochem Biophys Res Commun.* 4 avr 2003;303(2):669-75.
  236. Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med.* déc 1998;4(12):1441-4.
  237. Todd JJ, Sagar V, Lawal TA, Allen C, Razaqyar MS, Shelton MS, et al. Correlation of phenotype with genotype and protein structure in RYR1-related disorders. *J Neurol.* nov 2018;265(11):2506-24.
  238. Toyoshima C, Nomura H. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature.* 8 août 2002;418(6898):605-11.
  239. Treves S, Jungbluth H, Muntoni F, Zorzato F. Congenital muscle disorders with cores: the ryanodine receptor calcium channel paradigm. *Curr Opin Pharmacol.* juin 2008;8(3):319-26.
  240. Tripathy A, Xu L, Mann G, Meissner G. Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor). *Biophys J.* juill 1995;69(1):106-19.
  241. Tsabari R, Simchovitz E, Lavi E, Eliav O, Avrahami R, Ben-Sasson S, et al. Safety and clinical outcome of tamoxifen in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* sept 2021;31(9):803-13.

242. Ursu D, Sebille S, Dietze B, Freise D, Flockerzi V, Melzer W. Excitation-contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit gamma1. *J Physiol.* 1 juin 2001;533(Pt 2):367-77.
243. Vallejo-Illarramendi A, Toral-Ojeda I, Aldanondo G, López de Munain A. Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med.* 8 oct 2014;16:e16.
244. van Westering TLE, Lomonosova Y, Coenen-Stass AML, Betts CA, Bhomra A, Hulsker M, et al. Uniform sarcolemmal dystrophin expression is required to prevent extracellular microRNA release and improve dystrophic pathology. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* avr 2020;11(2):578-93.
245. Vassilopoulos S, Oddoux S, Groh S, Cacheux M, Fauré J, Brocard J, et al. Caveolin 3 is associated with the calcium release complex and is modified via in vivo triadin modification. *Biochemistry.* 27 juill 2010;49(29):6130-5.
246. Vassilopoulos S, Thevenon D, Rezgui SS, Brocard J, Chapel A, Lacampagne A, et al. Triadins are not triad-specific proteins: two new skeletal muscle triadins possibly involved in the architecture of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 5 août 2005;280(31):28601-9.
247. Velders M, Schleipen B, Fritzemeier KH, Zierau O, Diel P. Selective estrogen receptor- $\beta$  activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB J.* mai 2012;26(5):1909-20.
248. Velez LM, Van C, Moore T, Zhou Z, Johnson C, Hevener AL, et al. Genetic variation of putative myokine signaling is dominated by biological sex and sex hormones. *Elife.* 13 avr 2022;11:e76887.
249. Villa A, Podini P, Nori A, Panzeri MC, Martini A, Meldolesi J, et al. The endoplasmic reticulum-sarcoplasmic reticulum connection. II. Postnatal differentiation of the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res.* nov 1993;209(1):140-8.
250. Volpatti JR, Endo Y, Knox J, Groom L, Brennan S, Noche R, et al. Identification of drug modifiers for RYR1-related myopathy using a multi-species discovery pipeline. *Elife.* 30 mars 2020;9:e52946.
251. Vukcevic M, Broman M, Islander G, Bodelsson M, Ranklev-Twetman E, Müller CR, et al. Functional properties of RYR1 mutations identified in Swedish patients with malignant hyperthermia and central core disease. *Anesth Analg.* juill 2010;111(1):185-90.
252. Wakizaka M, Eshima H, Tanaka Y, Shirakawa H, Poole DC, Kano Y. In vivo Ca<sup>2+</sup> dynamics induced by Ca<sup>2+</sup> injection in individual rat skeletal muscle fibers. *Physiol Rep.* mars 2017;5(5):e13180.
253. Wang DW, Mokhonova EI, Kendall GC, Becerra D, Naeini YB, Cantor RM, et al. Repurposing Dantrolene for Long-Term Combination Therapy to Potentiate Antisense-Mediated DMD Exon Skipping in the mdx Mouse. *Mol Ther Nucleic Acids.* 1 juin 2018;11:180-91.

254. Wappler F, Schulte Am Esch J. [Safety in anaesthesia--are there new concepts for patients with neuromuscular diseases?]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* mars 2002;37(3):123-4.
255. Ward A, Chaffman MO, Sorkin EM. Dantrolene. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use in malignant hyperthermia, the neuroleptic malignant syndrome and an update of its use in muscle spasticity. *Drugs.* août 1986;32(2):130-68.
256. Wei L, Gallant EM, Dulhunty AF, Beard NA. Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin. *Int J Biochem Cell Biol.* nov 2009;41(11):2214-24.
257. Wei L, Salahura G, Boncompagni S, Kasischke KA, Protasi F, Sheu SS, et al. Mitochondrial superoxide flashes: metabolic biomarkers of skeletal muscle activity and disease. *FASEB J.* sept 2011;25(9):3068-78.
258. Wiik A, Ekman M, Johansson O, Jansson E, Esbjörnsson M. Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol.* févr 2009;131(2):181-9.
259. Wildey MJ, Haunso A, Tudor M, Webb M, Connick JH. Chapter Five - High-Throughput Screening. In: Goodnow RA, éditeur. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* [Internet]. Academic Press; 2017 [cité 30 mai 2022]. p. 149-95. (Platform Technologies in Drug Discovery and Validation; vol. 50). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065774317300076>
260. Witherspoon JW, Meilleur KG. Review of RyR1 pathway and associated pathomechanisms. *Acta Neuropathol Commun.* 17 nov 2016;4(1):121.
261. Wong King Yuen SM, Campiglio M, Tung CC, Flucher BE, Van Petegem F. Structural insights into binding of STAC proteins to voltage-gated calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 nov 2017;114(45):E9520-8.
262. Xu H, Van Remmen H. The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase (SERCA) pump: a potential target for intervention in aging and skeletal muscle pathologies. *Skelet Muscle.* 12 nov 2021;11(1):25.
263. Yamaguchi N, Xu L, Pasek DA, Evans KE, Chen SRW, Meissner G. Calmodulin regulation and identification of calmodulin binding region of type-3 ryanodine receptor calcium release channel. *Biochemistry.* 15 nov 2005;44(45):15074-81.
264. Yamazawa T, Kobayashi T, Kurebayashi N, Konishi M, Noguchi S, Inoue T, et al. A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke. *Nat Commun.* 13 juill 2021;12(1):4293.
265. Yao S, Chen Z, Yu Y, Zhang N, Jiang H, Zhang G, et al. Current Pharmacological Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:689533.
266. Yuan Q, Fan GC, Dong M, Altschafkl B, Diwan A, Ren X, et al. Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation.* 23 janv 2007;115(3):300-9.

267. Zaharieva IT, Sarkozy A, Munot P, Manzur A, O'Grady G, Rendu J, et al. STAC3 variants cause a congenital myopathy with distinctive dysmorphic features and malignant hyperthermia susceptibility. *Hum Mutat.* déc 2018;39(12):1980-94.
268. Zaidi M, Shankar VS, Towhidul Alam AS, Moonga BS, Pazianas M, Huang CL. Evidence that a ryanodine receptor triggers signal transduction in the osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 nov 1992;188(3):1332-6.
269. Zalk R, Clarke OB, des Georges A, Grassucci RA, Reiken S, Mancina F, et al. Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature.* 1 janv 2015;517(7532):44-9.
270. Zarain-Herzberg A, Fliegel L, MacLennan DH. Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin gene. *J Biol Chem.* 5 avr 1988;263(10):4807-12.
271. Zeng B, Chen GL, Garcia-Vaz E, Bhandari S, Daskoulidou N, Berglund LM, et al. ORAI channels are critical for receptor-mediated endocytosis of albumin. *Nat Commun.* 4 déc 2017;8(1):1920.
272. Zhang J, Singh DP, Ko CY, Nikolaienko R, Wong King Yuen SM, Schwarz JA, et al. Cardiac ryanodine receptor N-terminal region biosensors identify novel inhibitors via FRET-based high-throughput screening. *J Biol Chem.* janv 2022;298(1):101412.
273. Zhang L, Franzini-Armstrong C, Ramesh V, Jones LR. Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol.* févr 2001;33(2):233-47.
274. Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane.* *J Biol Chem.* 12 sept 1997;272(37):23389-97.
275. Zhang L, Wang L, Li S, Xue J, Luo D. Calsequestrin-1 Regulates Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry by Inhibiting STIM1 Aggregation. *Cell Physiol Biochem.* 2016;38(6):2183-93.
276. Zhou H, Jungbluth H, Sewry CA, Feng L, Bertini E, Bushby K, et al. Molecular mechanisms and phenotypic variation in RYR1-related congenital myopathies. *Brain.* août 2007;130(Pt 8):2024-36.
277. Zhou H, Yamaguchi N, Xu L, Wang Y, Sewry C, Jungbluth H, et al. Characterization of recessive RYR1 mutations in core myopathies. *Hum Mol Genet.* 15 sept 2006;15(18):2791-803.
278. Zhou Y, Wang X, Wang X, Loktionova NA, Cai X, Nwokonko RM, et al. STIM1 dimers undergo unimolecular coupling to activate Orai1 channels. *Nat Commun.* 24 sept 2015;6:8395.
279. Zvaritch E, Depreux F, Kraeva N, Loy RE, Goonasekera SA, Boncompagni S, et al. An Ryr1I4895T mutation abolishes Ca<sup>2+</sup> release channel function and delays development in homozygous offspring of a mutant mouse line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 nov 2007;104(47):18537-42.
280. Zvaritch E, Kraeva N, Bombardier E, McCloy RA, Depreux F, Holmyard D, et al. Ca<sup>2+</sup>

dysregulation in Ryr1(I4895T/wt) mice causes congenital myopathy with progressive formation of minicores, cores, and nemaline rods. Proc Natl Acad Sci U S A. 22 déc 2009;106(51):21813-8.