



HAL
open science

Étude de stratégies thérapeutiques ciblant les anomalies calciques dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne

Anna Creisméas

► **To cite this version:**

Anna Creisméas. Étude de stratégies thérapeutiques ciblant les anomalies calciques dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1047 . tel-04611853

HAL Id: tel-04611853

<https://theses.hal.science/tel-04611853v1>

Submitted on 14 Jun 2024

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.

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Thérapie Génique

Par

Anna CREISMEAS

Étude de stratégies thérapeutiques ciblant les anomalies calciques dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 13/06/2022

Unité de recherche : TaRGeT Lab, UMR 1089, INSERM et Université de Nantes

Rapporteurs avant soutenance :

Dr Ana BUJ BELLO
Dr Bruno ALLARD

DR INSERM, Généthon
PU, Institut NeuroMyogène

Composition du Jury :

Président :

Dr Bruno ALLARD

PU, Institut NeuroMyogène

Dir. de thèse :

Dr Caroline LE GUINER

Ingénieure de Recherche, TaRGeT Lab

Co-dir. de thèse :

Dr Bodvaël FRAYSSE

Ingénieur de Recherche, TaRGeT Lab

Invité(s)

Pr Agnès MOREAU-AUBRY
Dr Marc BITOUN
Pr Yann PEREON

PU, CRCINA
DR INSERM, Institut de Myologie
PU/PH, Centre de Référence des Maladies Rares

REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser de nombreux remerciements à toutes les personnes qui m'ont entouré professionnellement ainsi qu'à mon entourage, pendant ce périple à la fois enrichissant et sinueux qu'a été cette thèse :

Tout d'abord, merci à Bodvaël et Caroline pour avoir dirigé ma thèse. Bod, merci de m'avoir accueilli en stage pour mon Master 1, et de m'avoir soutenu pour réaliser cette thèse. Tu as su m'encourager, me challenger, et me ménager quand il l'a fallu. J'ai eu de la chance d'apprendre avec un chercheur aussi « fou » et créatif, merci ! Je remercie également Caroline Le Guiner d'avoir dirigé ma thèse. Merci de m'avoir accueilli dans l'équipe DMD, de m'avoir apporté un super soutien en m'apportant des conseils et solutions. Merci pour votre encadrement au long de ces 5 ans au labo.

Un grand merci à Oumeya Adjali, directrice de l'U1089 pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire, merci pour cette opportunité qui m'a été offerte de réaliser ma thèse dans ce laboratoire.

Je remercie le docteur Ana Buj Bello, ainsi que le professeur Bruno Allard d'avoir accepté de devenir rapporteurs de mon mémoire de thèse. Merci également au professeur Yann Péréon d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance de thèse.

Merci au professeur Agnès Aubry ainsi qu'au docteur Marc Bitoun d'avoir encadré chacun de mes comités de suivi individuel de thèse ainsi que d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance de thèse

Merci aux membres de la plateforme MicroPicell et en particulier à Philippe Hulin et Steven Nedellec que j'ai souvent sollicité, qui m'ont formé à la microscopie confocale et qui m'ont accompagné pendant mes très longues heures d'acquisition d'images.

D'une manière générale je souhaiterais remercier tout le laboratoire Target U1089, et en particulier Anita, Manuela, Charlène, Cynthia, Nathalie et Anthony, vous avez toujours

répondu présent, avec beaucoup de gentillesse. Un énorme merci ! Plus largement, merci de m'avoir apporté cette qualité d'enseignement et de savoir-faire. Vous m'avez accordé beaucoup de temps pour me conseiller et résoudre mes soucis techniques qui ont été (trop) nombreux, cela m'a beaucoup aidé sur ce projet de thèse !

Un grand merci à Christine pour m'avoir formé (supporté) au clonage, c'était une super formation ! Merci aussi pour tous tes conseils en séquençage, PCR et j'en passe, j'ai dû te casser un peu les pieds à te solliciter autant, mais tu m'as vachement aidé ! Et le miel de ton papa est terrible, il va me manquer !

Et merci également à Aline pour avoir réalisé mes clonages pendant ma période de couvage et après, tu m'as rendu un grand service. Entre collègues matinales, nos pauses café vont me manquer 😊.

J'en profite pour également remercier Karine, je garderai un super souvenir de notre participation à la fête de la science, ce fut une belle expérience que vous avez su mener à la baguette !

Merci Nicolas pour toute l'assistance informatique/logistique/azote/FACS, surtout avec cette période de crise, sans toi, ma thèse aurait pris bien plus de retard, merci !

Un grand merci à Jean-Baptiste et son équipe : Clémence, Anne-Maëlys et Elise. Merci pour les cellules, les conseils, la gentillesse et l'aide apportée sur mon projet, c'était super ! Bonne continuation à vous tous 😊

Je remercie également les collaborateurs de l'équipe qui ont contribué à ce projet et à l'article publié : Aude Lafoux, Corinne Huchet, Gilles Toumaniantz, Thibaut Larcher, Mireille Ledevin et Ignacio Anegon. Merci d'avoir alimenté cette étude de vos travaux et expertises, d'avoir consacré du temps à mon projet de thèse.

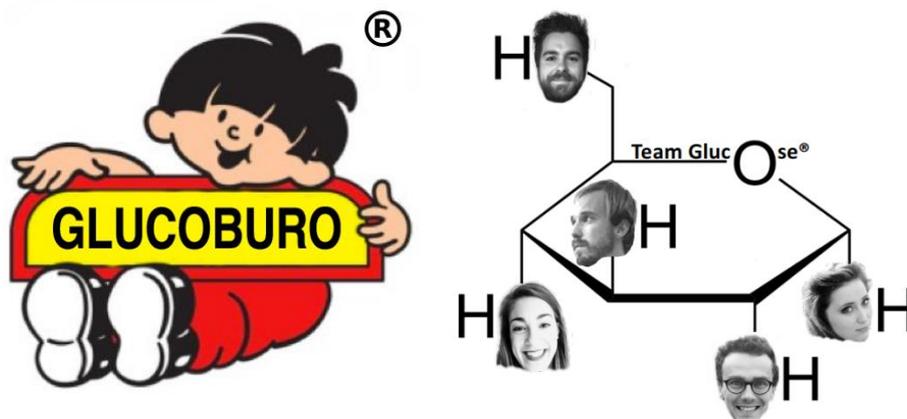
Un merci particulier à l'ensemble de l'équipe DMD, les anciens comme les nouveaux :

- Un énorme merci à Virginie qui m'a énormément briefé sur le fonctionnement du labo, et qui m'a formé sur beaucoup de manips. Tu m'as appris énormément de choses et j'espère croiser un jour à nouveau ton chemin, merci encore !

- Audrey, merci de m'avoir montré la voie de la thèse dans l'équipe DMD. Merci pour tes conseils, tes échantillons et tout le reste ! Merci également pour l'organisation des afterworks qui m'ont créé de très bons souvenirs ! Bon courage pour la suite sur PAC !
- Merci aussi à Cyrielle, merci pour ta bonne humeur et merci de m'avoir formé lorsque je suis arrivée pour mes stages, et d'avoir réalisé des manips pour moi par la suite !
- Tiphaine et Emeline, merci d'avoir été de super collègues et de m'avoir aidé dans les manips !
- Justine ! Merci pour nos parties de rigolades/covoit/sauvetage de chiens, j'ai beaucoup aimé travailler avec toi et j'espère te recroiser bientôt, mention spéciale au congrès Myology 2019 et notre crise de rires/larmes en parlant de ces films qu'on aime tant. Je te souhaite le meilleur succès pour ta thèse !
- Merci également à Arthur et Marco d'avoir réalisé vos stages avec nous, même si on ne se sera finalement pas beaucoup vu dans cette période carrément nulle de pandémie !
- Merci à Claire Gazaille que je n'ai pas croisé au laboratoire mais qui a ouvert la voie de ce projet du calcium chez le rat *DMD^{mdx}*.

Marianne et Rebecca, merci pour votre bonne humeur et gentillesse, votre bureau restera dans les annales du labo !

Un merci tout particulier à la team glucose / Glucobureau, lors de mes stages de master



Merci à Alicia, Malo, Ragnar et Jean-Baptiste Deltour pour avoir participé au succès inégalable du Glucobureau. Je garderai de supers souvenirs de cette collaboration avec vous et

tous ceux qui y ont été de passage. Merci pour l'alimentation en nourriture et rires de ce bureau qui a permis à nos cerveaux de ne jamais manquer ni de glucose, ni d'O₂ !

Malo, un grand merci pour ta bonne humeur sans faille ! Merci pour ton implication dans le labo, que ce soit pour les labolympiades (grand succès, Team ErlenBlue évidemment), ou pour les projets à la Fête De la Science, tu gères la fougère ! Plein de belles choses et j'espère te revoir par la suite avec ton mini-toi autour d'une bonne binouze !

Maintenant pour ceux qui tiennent une place particulière dans ma vie, je tiens à remercier tout d'abord mes parents, mes frangins, ma famille, et mes chats. Merci de m'avoir encouragé dans cette voie, d'avoir cru en moi. C'est grâce à vous que j'ai eu l'opportunité de réaliser ces longues études et je mesure la chance que cela représente. Puis finalement, j'ai aussi envie de remercier ma belle Bretagne natale, mon Trégor et mon Léon (pourquoi pas ?). Y retourner pour retrouver ma famille m'a fait un bien fou pendant cette thèse.

Merci à tous mes amis et en particulier à Camille et Lucille, pour avoir toujours répondu présent. Vous m'avez écouté et permis de décompresser en partageant de sincères moments de vie jusqu'à ce sprint de fin de thèse, et pour ça, merci.

Enfin, pour toi Matthieu. Merci pour tout, merci de m'avoir encouragé, de n'avoir jamais douté, et d'avoir même exagéré avec ce fichu qualificatif « scientifique de renom » dont tu m'affubles encore. Tu as été là avant le début, et jusqu'à la fin. Merci de m'avoir supporté quand ça allait bien et surtout quand ça allait moins bien grâce à ton humour à toute épreuve. Merci d'avoir relu ma thèse, et d'avoir été mon spectateur de répét'. Tous les beaux projets qui ont été annexé à cette fin de thèse, ceux auquel je me suis accroché pour finir et qui m'ont fait tout relativiser, n'auraient jamais pu être possible sans toi, merci !

Et le dernier merci, pour toi ma fille, je t'aime.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLEAUX.....	14
AVANT-PROPOS	15
INTRODUCTION.....	18
Chapitre I : La Dystrophie Musculaire de Duchenne.....	18
I. Les premières descriptions de la maladie	18
II. Les symptômes et l'origine de la maladie de Duchenne	20
A. Les symptômes de la dystrophie musculaire de Duchenne	20
B. La dystrophie musculaire de Becker	22
C. Diagnostic de la maladie	22
D. L'absence de la protéine dystrophine.....	24
1. La structure et le rôle de la dystrophine.....	24
2. Les mutations du gène de la dystrophine.....	27
E. Principales lésions histologiques décrites dans la DMD	30
III. Les animaux modèles de la DMD	31
1. La souris <i>mdx</i>	32
2. Le chien GRMD	35
3. Le rat <i>DMD^{mdx}</i>	36
Chapitre II : Les traitements de la DMD et pistes thérapeutiques	39
I. La prise en charge du patient	39
II. Les pistes thérapeutiques.....	45
A. Les thérapies pharmacologiques	45

B. La thérapie cellulaire	50
C. La thérapie génique	53
1. Les vecteurs AAV	54
2. Les méthodes de production	57
3. Les limites des vecteurs AAVr en application thérapeutique	60
4. Les thérapies géniques pour compenser l'absence de dystrophine.....	65
5. Les thérapies géniques pour faire exprimer une dystrophine	65
Chapitre III : A la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques contre la DMD.....	74
I. Des généralités sur le tissu musculaire.....	74
A. Qu'est-ce que le muscle strié squelettique ?.....	74
B. Le muscle strié squelettique	75
1. L'organisation anatomique macroscopique du muscle strié squelettique	75
2. L'organisation histologique du muscle strié squelettique	76
3. La genèse du tissu musculaire	77
C. Le rôle du calcium dans le couplage excitation-contraction	77
D. La gestion du calcium dans la contraction musculaire.....	80
II. La physiopathologie musculaire de la DMD	82
1. La fragilité mécanique du sarcolemme.....	82
2. Les rôles précoces et prépondérants de la dérégulation de l'homéostasie calcique	83
III. Les pistes thérapeutiques ciblant les anomalies calciques.....	87
IV. La super famille des canaux Transient Receptor Potential.....	90
E. Revue des sous-familles de canaux TRP	91
F. Les canaux TRPC	97
1. La sélectivité des canaux TRPC	97
2. La structure des canaux TRPC.....	98

3.	Les mécanismes d'activation des canaux TRPC	99
4.	Les canaux TRPC dans les pathogénèses	105
5.	Les canaux TRPC dans le muscle squelettique.....	106
6.	Les canaux TRPC dans les dystrophies musculaires	109
Chapitre IV : Objectif de la thèse : Evaluation d'une nouvelle approche thérapeutique pour cibler les anomalies calciques impliquées dans la DMD		112
RÉSULTATS.....		114
I.	Matériels et Méthodes.....	114
II.	TRPC3, but not TRPC1, as a good therapeutic target for standalone or complementary treatment of DMD	118
A.	Étude de l'expression des canaux TRPC dans le cœur des rats <i>DMD^{mdx}</i>	138
B.	Étude de l'expression de TRPC3 chez des rats <i>DMD^{mdx}</i> traités par des microdystrophines	140
C.	Discussion préliminaire	144
III.	Étude de l'expression de TRPC3 chez le patient DMD.....	146
A.	Évaluation de l'expression génétique et protéique de TRPC3 chez le patient DMD... ..	146
B.	Discussion.....	149
IV.	Les stratégies d'inhibition du canal TRPC3	151
A.	Choix des stratégies d'inhibition de TRPC3	151
1.	Les inhibiteurs pharmacologiques	151
2.	Les transgènes dominants négatifs	154
B.	Conception des outils de biologie moléculaire pour les transgènes dominants négatifs	157
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....		161
ANNEXE.....		173
BIBLIOGRAPHIE		190

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV : Adéno-Associated Virus	DRC : Domaine Riche en Cystéine
AAVr : Adéno-Associated Virus recombinant	EDL : <i>Extensor Digitorum Longus</i>
ABD1 : Actin-Binding amino terminal Domain 1	EMA : European Medicines Agency
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	FDA : Food and Drug Administration
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	GRMD : Golden Retriever Muscular Dystrophy
AFM : Association Française de Myologie	HA : Hemagglutinine
ALAT : Alanine AminoTransferase	HEK : Human Embryonic Kidney
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché	ITR : Inverted Terminal Repeats
AON : Anti-sens Oligo Nucleotide	kDa : kilo Dalton
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	<i>mdx</i> : X-Linked Muscular Dystrophy
ASAT : Aspartate AminoTransferase	NCX : Na ⁺ -Ca ²⁺ Exchanger
CaM : Calmoduline	NO : Nitric Oxyde
CaMKII : Calmoduline Kinase II	NSAA : North Star Ambulatory Assessment
CIRB : CaM/IP3 Receptor Binding	N-ter : N-terminal
CMD : Cardiomyopathie dilatée	ORF : Open Reading Frame
CMV : Cytomégalovirus	P2A : Peptide autoclivant A2
C-ter : C-terminal	Pb : Paire de base
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	PLC : Phospholipase C
DAPC: Dystrophine-Associated Protein Complex ou Complexe Protéique Associé à la Dystrophine	PMO : Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer
DHPR : DiHydroPyridine Recepteur	PPMO : Peptide Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer
dKO : double Knock-Out	P-loop : Pore Loop
DMB : Dystrophie Musculaire de Becker	PTC : Prematured Stop Codon
DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne	qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

RQ : Relative Quantity	TRPA : Transient Receptor Potential Ankyrin
RE : Réticulum Endoplasmique	TRPC : Transient Receptor Potential Canonical
ROS : Reactive Oxygene Species	TRPM : Transient Receptor Potential Melastatin
RS : Réticulum Sarcoplasmique	TRPML : Transient Receptor Potential Mucolipin
RyR : Ryanodine Receptor	TRPP : Transient Receptor Potential Polycystic
SAC : Stretch- Activated Channel	TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloid
SERCA : Pompe Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase	VGCC : Voltage-Gated Calcium Channel
SNC : Système Nerveux Central	ZNF : Zinc Nuclease Finger
SOAR : STIM-Orai1 Activating Region	
SOCE : Store-Operated Calcium Entry	
SPCa : Sarcolemmal Permeability to Calcium	
TRP : Transient Receptor Potential	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustrations historiques pour documenter la dystrophie musculaire de Duchenne.	19
Figure 2 : Schéma illustrant la progression et les principales étapes de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	20
Figure 3: Illustration représentant un enfant atteint de DMD.....	21
Figure 4 : Schéma de la démarche diagnostique de la Dystrophie Musculaire de Duchenne. .	24
Figure 5 : Schéma de la structure du gène DMD	25
Figure 6 : Schéma de la dystrophine.....	27
Figure 7 : Schémas d'exemples de mutations du gène DMD et leurs conséquences sur la production de dystrophine et les phénotypes correspondants.....	28
Figure 8 : Proportion de chaque type de mutations du gène de la dystrophine observées chez les patients DMD et BMD	30
Figure 9: Coupe histologique de muscle squelettique d'un individu sain et de patient DMD ..	31
Figure 10: Schéma représentant le génome AAV sauvage.	55
Figure 11 : Illustration du tropisme des différents sérotypes AAV envers les principaux organes chez l'homme.	56
Figure 12 : Schéma représentant le génome AAV sauvage en comparaison du génome du vecteur AAV recombinant.....	58
Figure 13: Illustration de la méthode de production de vecteurs AAVr en cellules HEK293 par co-transfection	59
Figure 14 : Schéma illustrant la stratégie du saut d'exon	66
Figure 15 : Schéma des constructions de mini et microdystrophines actuellement en essais cliniques.....	70
Figure 16 : Exemples de nomenclature musculaire	75
Figure 17 : Structure du muscle squelettique.....	76
Figure 18 : Schéma du couplage excitation-contraction.....	79
Figure 19 : Schéma de la cascade de mécanismes induite par les dérégulations calciques dans une fibre musculaire dystrophique.....	86
Figure 20 : Les canaux Transient Receptor Potential.....	92

Figure 21: Représentation schématique des principaux domaines structurels des canaux TRPC	99
Figure 22 : Mécanismes d'activation des canaux TRPC	105
Figure 23 : Schéma de la cuve expérimentale de marquage pour l'immunofluorescence	115
Figure 24 : Schéma illustrant l'évolution physiopathologique de la dystrophie musculaire de Duchenne chez le rat DMD ^{mdx}	119
Figure 25 : Représentation en histogramme de l'expression de TRPC3 dans les cœurs de rats DMD ^{mdx} comparé aux rats sains	139
Figure 26 : Schéma représentant la structure de MD1 et MD3 évaluées dans l'étude de Audrey Bourdon	141
Figure 27: Analyse de l'efficacité du transfert de gène dans les EDL des rats DMD ^{mdx} injectés	142
Figure 28 : Analyse de l'expression des transgènes microdystrophines dans les EDL des rats DMD ^{mdx} injectés	143
Figure 29 : Evaluation de l'expression protéique de TRPC3 dans les EDL des rats DMD ^{mdx} injectés	144
Figure 30 : Histogramme représentant l'expression génétique et protéique de TRPC3 dans les muscles paravertébraux d'hommes sains et de patients DMD	148
Figure 31 : Schéma de la composition et structure chimique du Pyr10	152
Figure 32 : Représentation schématique des canaux TRPC3 dominants négatifs designés pour l'étude de l'inhibition de TRPC3	156
Figure 33 : Représentation schématique des isoformes ADNc de hTRPC3 et de rTRPC3	157
Figure 34 : Schéma représentant la mutation de rTRPC3 ^{DN}	158
Figure 35 : Schéma représentant la taille cassette d'expression de l'AAVr-MD1, et de l'AAVr-MD1-TRPC3 ^{mut} hypothétique	170

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé des différents modèles animaux pour l'étude de la Dystrophie Musculaire de Duchenne.....	32
Tableau 2: Comparaison des caractéristiques pathologiques et fonctionnelles entre les patients DMD et les animaux modèles de la DMD	38
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des échantillons humains obtenus auprès de la Myobank-AFM et leurs caractéristiques	146
Tableau 4 : Récapitulatif des différents transgènes designés et conçus, de leur composition et de leur rôle dans la stratégie de validation in vitro.	160

AVANT-PROPOS

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie létale héréditaire liée à l'X affectant environ une naissance masculine sur cinq mille. Elle provoque une atrophie musculaire sévère. La DMD est causée par des mutations du gène *DMD* conduisant à l'absence d'expression de la protéine dystrophine chez les patients. Cette protéine est essentielle à la stabilité et à la fonction des myofibres squelettiques et des cardiomyocytes. Les garçons atteints de DMD développent une faiblesse musculaire au cours des premières années de leur vie, puis ils perdent l'ambulation lors de l'adolescence. La dégénérescence musculaire progressant, des complications plus graves causées par une fonte des muscles respiratoires et une cardiomyopathie dilatée provoquent la plupart des décès des patients avant l'âge de 40 ans.

Malgré l'identification de l'origine de la maladie liée à la mutation du gène *DMD*, il y a près de quarante ans, il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif. Une prise en charge multidisciplinaire des patients a néanmoins permis d'améliorer leur confort de vie et permis d'allonger leur espérance de vie. La prévalence élevée de la DMD et les avancées de la recherche ont engendré l'émergence de nombreuses stratégies thérapeutiques, qu'elles soient pharmacologiques, ou basées sur la thérapie cellulaire ou la thérapie génique. Parmi les stratégies thérapeutiques envisagées, la thérapie génique ayant pour but de restaurer l'expression de la dystrophine est une approche prometteuse pour le traitement de la DMD. Les vecteurs issus des virus adéno-associés recombinants (AAVr) sont particulièrement efficaces pour la transduction des fibres musculaires squelettiques ainsi que des cardiomyocytes. Cependant, l'ADN complémentaire de la dystrophine (ADNc) dépasse largement la capacité d'encapsulation de ces vecteurs viraux. C'est pourquoi ont été synthétisés des transgènes raccourcis codant pour des microdystrophines (MD), protéines tronquées mais fonctionnelles. Ce concept d'utilisation de MD en remplacement de la dystrophine complète, comme transgènes thérapeutiques, s'appuie sur l'observation des patients atteints par la Dystrophie Musculaire de Becker (DMB). Ces patients ont également une mutation de leur gène *DMD*, mais qui, contrairement aux patients DMD, respecte le cadre de lecture de la protéine. La protéine résultant de la traduction est présente mais tronquée, et

donc partiellement fonctionnelle. Bien que la gravité de la dystrophie musculaire soit très hétérogène en fonction des mutations chez les patients DMB, ils présentent une dystrophinopathie plus légère que les patients DMD.

Notre équipe a participé à la première étude décrivant le bénéfice fonctionnel à long terme d'un traitement de thérapie génique basé sur la délivrance systémique de AAVr-MD chez le chien Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), un modèle animal de DMD. Quatre essais cliniques utilisant cette stratégie ont été lancés depuis 2018, et les premiers résultats rapportés sont très prometteurs. Ces stratégies compensatoires à l'absence de la dystrophine permettraient d'atténuer le phénotype dystrophique des patients DMD, pour tendre vers un phénotype DMB. Cependant elles ne pourront sans doute jamais être totalement curatives. En effet, les essais actuels d'AAVr-MD sont basés sur des MD qui sont environ 40% plus petites que la plus petite dystrophine observée chez un patient atteint de DMB. De plus, la DMB reste une pathologie, avec une faiblesse musculaire souvent observée dès l'adolescence ou au début de l'âge adulte, et une cardiomyopathie qui reste la cause d'un décès prématuré des patients avant l'âge de 60 ans. Il est donc urgent de trouver des stratégies thérapeutiques alternatives ou complémentaires à la thérapie génique-MD qui pourraient traiter à la fois les patients DMD et DMB. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux événements précoces et cruciaux de la pathogenèse de la DMD, afin d'en déduire de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Le calcium joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de la DMD car la nécrose des muscles squelettiques est principalement causée par une surcharge intracellulaire en Ca^{2+} . Les altérations calciques sont des événements très précoces : elles ont été détectées dans les fibres musculaires de fœtus de garçons DMD et mesurées dans des myotubes DMD humains non complètement différenciés. La surcharge intracellulaire en Ca^{2+} dans la DMD est principalement liée à une augmentation de la perméabilité du sarcolemme au Ca^{2+} (SPCa) par l'accumulation de canaux ioniques perméables au Ca^{2+} . L'identité des canaux impliqués dans l'augmentation de la SPCa n'est pas encore claire mais des membres de la famille des Transient Receptor Potential (TRP) ont été proposés comme candidats possibles. La superfamille des canaux TRP de mammifères comprend vingt-huit membres qui sont subdivisés en six sous-familles selon leur homologie de séquence.

Deux canaux TRP ont retenu notre attention dans le cadre de la DMD : TRPC1 et TRPC3. Les travaux de cette thèse ont porté sur l'étude de l'expression et de la fonctionnalité de ces canaux dans un modèle animal de la DMD, le rat *DMD^{mdx}*, particulièrement pertinent pour l'étude de la DMD. Cette étude s'est faite de manière longitudinale sur des échantillons musculaires et cardiaques d'une cohorte de rats. Des échantillons musculaires humains de patients DMD et d'individus sains ont également été analysés. Nous avons ensuite évalué l'expression de ces canaux en concomitance d'un traitement AAVr-MD sur le rat *DMD^{mdx}*. Finalement, nous avons également élaboré des stratégies thérapeutiques ciblant l'inhibition des anomalies calciques survenant dans les fibres musculaires dystrophiques via le ciblage de ces canaux TRP.

INTRODUCTION

Chapitre I : La Dystrophie Musculaire de Duchenne

I. Les premières descriptions de la maladie

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) a été décrite par le docteur neurologue Duchenne qui en a recensé les symptômes dans un ouvrage médical en 1868 (Duchenne, 1868). Le docteur Duchenne a recensé plus d'une vingtaine de cas de par l'Europe en une dizaine d'année. Plusieurs noms ont initialement été attribués à cette maladie, le principal étant « paralysie pseudo-hypertrophique ».

Dans son ouvrage, le Dr Duchenne a décrit le diagnostic de la maladie à partir de critères symptomatologiques et anatomo-pathologiques. Il a documenté sa description en appui d'autres médecins comme les docteurs allemands Schutzenberger et Griesinger ainsi que le médecin anglais Meryon. Le docteur Duchenne a détaillé la maladie en trois grandes phases d'évolution durant lesquelles il a préconisé des traitements comme la faradisation, consistant à l'application de courants électriques dans les membres des patients malades, l'hydrothérapie et les massages. Parmi les caractéristiques symptomatiques des enfants malades, il a décrit l'enchaînement de mouvements qu'emploient les enfants pour se lever du sol, en s'aidant de leurs bras. Ce schéma est caractéristique des enfants myopathes, et a été illustré en 1886 par le docteur Gowers duquel la manœuvre tient son nom (Figure 1.A) (Gowers, 1886). Le Dr Duchenne a également grandement documenté l'histologie des muscles des malades en mettant au point un instrument de biopsie musculaire « emporte-pièce histologique » (Figure 1.B). Cet outil lui a permis de réaliser des prélèvements musculaires sur des patients vivants, afin de les observer au microscope. Il a ainsi pu mettre en évidence l'adipose décrite par des « vésicules granuleuses ». Il a aussi relevé une fibrose marquée chez les patients en décrivant « l'hyperplasie du tissu connectif-interstitiel avec production de tissu fibroïde », ainsi qu'une anisocytose des fibres musculaires. L'anisocytose consiste en une hétérogénéité du diamètre des fibres musculaires due à la présence simultanée de fibres hypertrophiques avec des petites fibres centronucléées en régénération (Victor Dubowitz *et al.*, 2020). Afin de discriminer entre

différents diagnostics, le docteur Duchenne a réalisé une étude comparative de la paralysie pseudo-hypertrophique par rapport à une autre affection musculaire de l'enfant alors nommée « atrophie musculaire graisseuse progressive de l'enfant » (et dont on ignore aujourd'hui la correspondance), qui avait la particularité de débiter a des âges variables par une atteinte des muscles de la face et du tronc.

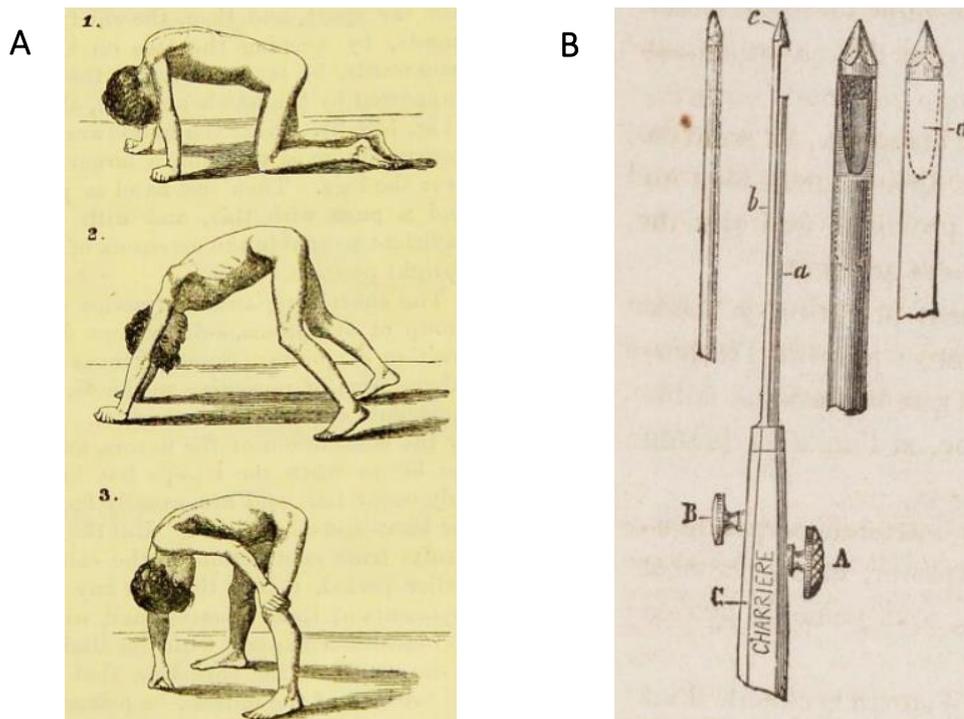


Figure 1 : Illustrations historiques pour documenter la dystrophie musculaire de Duchenne

A. Illustration de la manière de se relever du sol dans la paralysie pseudo-hypertrophique – Manœuvre de Gowers (Gowers 1886)

B. Schéma des différentes pièces composant l'emporte-pièce histologique ainsi que leur organisation (Duchenne, 1868)

En 1861, le docteur Duchenne a supposé une origine neurologique de la maladie en mettant en corrélation les symptômes musculaires des patients avec l'état de leur facultés mentales qu'il jugeait « d'obtus, quelques fois jusqu'au crétinisme ». Il est revenu sur cette hypothèse après avoir rencontré de nouveaux patients ne présentant pas ces caractéristiques mentales. L'ensemble des médecins ayant travaillé à recenser et décrire la maladie se sont interrogés sur l'origine vasculaire, pour finalement éliminer cette autre hypothèse. Le docteur Duchenne conclu son étude sur l'origine inconnue et obscure de la maladie (Duchenne, 1868).

II. Les symptômes et l'origine de la maladie de Duchenne

A. Les symptômes de la dystrophie musculaire de Duchenne

La dystrophie musculaire de Duchenne est la dystrophie musculaire la plus fréquente chez l'enfant et consiste en une dégénérescence progressive des muscles squelettiques (Figure 2). C'est une maladie génétique récessive liée au chromosome X où le gène de la dystrophine est muté, ce qui résulte en l'absence d'expression de la protéine dystrophine. Elle touche donc presque exclusivement les garçons avec une prévalence d'une naissance masculine sur cinq-mille (Crisafulli *et al.*, 2020). Elle est classifiée comme maladie génétique rare selon la définition réglementaire européenne, c'est-à-dire touchant moins d'une personne sur deux-mille (solidarités-sante.gouv.fr). La DMD conduit au décès des patients à un âge très variable mais ne dépassant que rarement 40 ans. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la maladie.

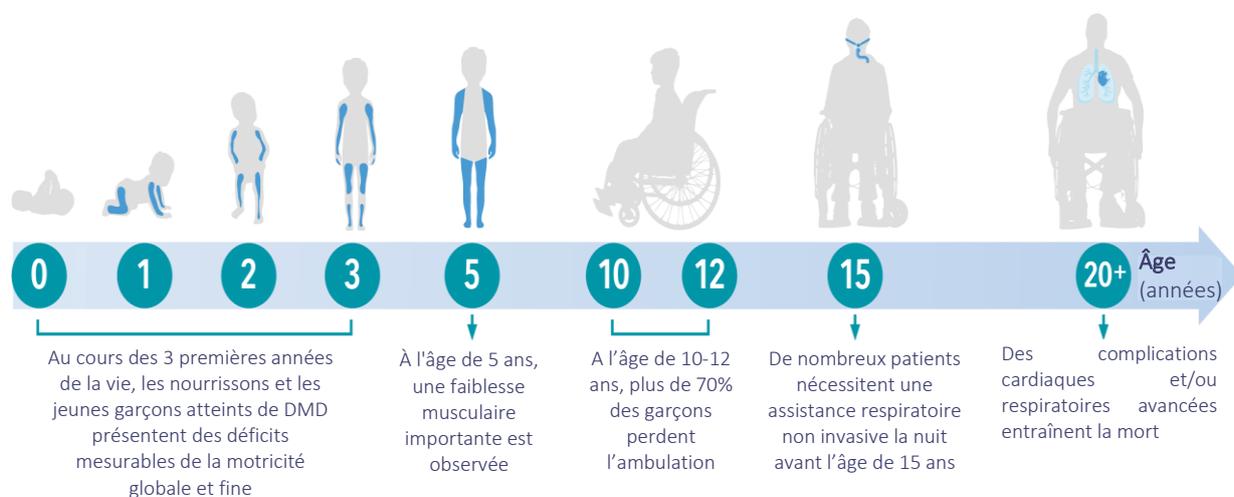


Figure 2 : Schéma illustrant la progression et les principales étapes de la dystrophie musculaire de Duchenne

Adapté de takeonduchenne.eu

La caractéristique évolutive de la maladie la rend tardivement décelable. Ce n'est que vers l'âge de 3 ans que les enfants sont dépistés sous l'impulsion des parents qui rapportent différents symptômes comme par exemple, une marche tardive, des chutes fréquentes, des difficultés à se relever et monter les escaliers, et un développement intellectuel tardif. C'est à ce stade précoce de l'ambulation que les enfants développent instinctivement la manœuvre de

Gowers, caractéristique des enfants myopathes (Chabrol and Desguerre, 2015). Durant ce stade, les muscles des mollets et spinaux lombaires des patients deviennent anormalement gros, ce qu'on appelle une pseudo-hypertrophie (Figure 3). Le terme de pseudo-hypertrophie est employé ici car il ne s'agit pas d'une hypertrophie du tissu musculaire à proprement parler

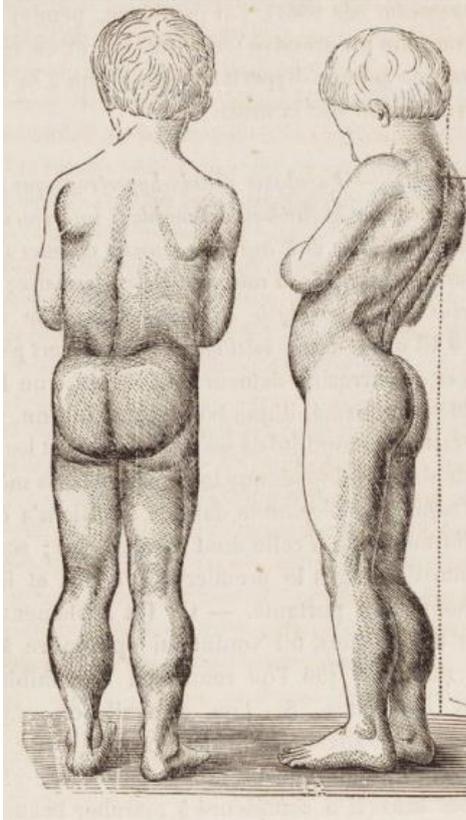


Figure 3: Illustration représentant un enfant atteint de DMD

Extrait de Duchenne 1886

mais bien d'un remplacement de celui-ci par une accumulation de tissus fibreux et adipeux, rendant le muscle plus volumineux. Les patients DMD ont une démarche dandinante caractéristique avec une exagération de la courbure lombaire appelée hyperlordose (Duchenne, 1868). Chez les patients DMD, les lésions musculaires provoquent des fuites de protéines musculaires dans le sang dont on peut mesurer les taux. Elles peuvent renseigner sur l'état de dégradation musculaire, et ainsi aider au diagnostic en servant de biomarqueurs. Les biomarqueurs sanguins de la DMD dosés classiquement chez les patients sont la créatine kinase, qui peut être dix fois supérieur à la normale, et les enzymes transaminase aspartate aminotransférases (ASAT) et alanine aminotransférases (ALAT) (Darras *et al.*, 1993).

Une hétérogénéité clinique existe entre les patients, mais la perte de l'ambulation se constate généralement vers l'âge de 12 ans, ils entrent alors dans la phase non ambulatoire (dmd-guide.org). A l'atteinte des muscles de la locomotion s'ajoute progressivement l'atteinte des muscles de la posture provoquant des scoliozes et des rétractations tendineuses (Szabo *et al.*, 2021). Durant ce stade du développement de la maladie, les patients développent une insuffisance cardiaque se traduisant par une cardiomyopathie dilatée (CMD) ainsi que des difficultés respiratoires dues à l'atteinte du diaphragme (James *et al.*, 2020; Meyers and Townsend, 2019). La CMD se caractérise par un déficit de la fonction systolique et diastolique. Pendant la mise en place de cette cardiomyopathie, la paroi du ventricule gauche s'épaissit

pour compenser la faiblesse du muscle dystrophique, ensuite il s'affine et se dilate avec l'âge. L'ensemble de ces facteurs rendent les patients DMD plus susceptibles de développer des infections pulmonaires (Yiu and Kornberg, 2008). Les personnes atteintes de DMD peuvent aussi souffrir de problèmes gastro-intestinaux lourds comme la dénutrition, l'obésité, qui concerne 40% des patients, la constipation chronique et la dysphagie (Mok *et al.*, 2006; Willig *et al.*, 1993). Le décès des patients est imputable à plus de 30% au déficit cardio-respiratoire selon une étude rétrospective menée aux Etats-Unis, avec un âge médian de décès à 20 ans (Wittlieb-Weber *et al.*, 2020).

B. La dystrophie musculaire de Becker

La dystrophie musculaire de Becker (DMB) comme la DMD est caractérisée par une faiblesse des muscles squelettiques et une atteinte cardiaque des patients (Capitanio *et al.*, 2020). Décrite par le professeur Becker en 1955, cette myopathie proche de la DMD se distingue de celle-ci par une atteinte moins sévère, une progression plus lente de la pathologie, et une perte de la marche généralement après 20 ans (Yazaki *et al.*, 1999). La DMB est une myopathie rare, dont la prévalence se situe entre 1/18 000 et 1/31 000 naissances et affecte principalement les garçons (orpha.net). Cette prévalence est probablement sous-évaluée en raison de l'absence de diagnostic sur les formes les moins sévères, voire asymptomatiques (Yazaki *et al.*, 1999). C'est une dystrophie musculaire avec une très grande variabilité clinique. Les patients DMB peuvent souffrir d'une atteinte très sévère, proche de la DMD, comme d'une forme très légère, avec une faiblesse musculaire n'apparaissant que vers 60 ans. Malgré l'hétérogénéité de l'atteinte motrice les patients DMB ont presque constamment des taux élevés de créatine kinase sérique (Bello *et al.*, 2016). De plus, 90% des patients Becker développent des problèmes cardiaques, responsables d'environ 50% des décès (Hermans *et al.*, 2010).

C. Diagnostic de la maladie

Le diagnostic précoce et précis est la première étape pour la mise en place des soins pour les patients DMD. Lorsque la maladie n'est pas connue dans la famille, c'est à partir de l'observation des parents sur les difficultés motrices de l'enfant, que le médecin sera le plus fréquemment consulté. Il peut ainsi confirmer la faiblesse musculaire et la manœuvre de Gowers par exemple, puis oriente les parents vers un spécialiste neuromusculaire avec un

généticien qui proposeront une analyse génétique. Dans d'autres cas plus rares, les parents consultent le médecin pour un retard de développement cognitif, ou des dosages en ALAT, ASAT ou CK trop élevés (Aartsma-Rus *et al.*, 2016). Souvent ces dernières observations ne permettent pas à elles seules de suspecter directement une myopathie, et induisent souvent un retard de diagnostic de DMD (Birnkrant *et al.*, 2018a; Ciafaloni *et al.*, 2009).

La DMD et la DMB résultent d'une mutation sur le gène de la dystrophine. L'analyse génétique des patients est le seul moyen de confirmer le diagnostic et d'anticiper la sévérité du phénotype pathologique (Falzarano *et al.*, 2015). Historiquement, la confirmation du diagnostic DMD était obtenue par analyse biochimique en recherchant directement la protéine dystrophine dans les biopsies musculaires (Aartsma-Rus *et al.*, 2016). Avec l'avancée des techniques et outils d'analyses scientifiques, le diagnostic peut maintenant se faire directement par analyse génétique. Dans un premier temps l'analyse génétique sur échantillon sanguin consiste à déceler si le patient présente des larges duplications ou délétions sur le gène de la dystrophine, ce qui est le cas pour environ 70% des patients DMD ou DMB. Cette première analyse peut se faire par la technique d'amplification ligature dépendante multiplex de sonde. Cette analyse a l'avantage de ne pas être coûteuse, mais elle ne permet pas de déceler les autres types de mutations comme les mutations ponctuelles (Falzarano *et al.*, 2015). Celles-ci pourront être recherchées dans un second temps par séquençage Sanger ou par technique de séquençage nouvelle génération, plus coûteuses. L'ensemble des résultats d'analyse génétique sont étudiés pour prédire si la mutation détectée induit un décalage du cadre de lecture de la dystrophine et ainsi prédire la sévérité du phénotype pathologique, à savoir s'il va s'agir d'un phénotype DMD ou DMB (Birnkrant *et al.*, 2018a). Si ces méthodes ne permettent toujours pas de diagnostiquer les patients, la biopsie musculaire est réalisée pour tester la présence de protéine dystrophine dans le tissu musculaire par immuno-histo-fluorescence ou Western-blot (Birnkrant *et al.*, 2018a) (Figure 4).

Après le diagnostic de dystrophie de Duchenne de l'enfant, le médecin généticien peut recommander une analyse génétique de la mère et de la fratrie du patient afin de déterminer si la mutation a été transmise de manière héréditaire, ou s'il s'agit d'une mutation *de novo*. Dans le cas d'une mère porteuse de mutation, la patiente nécessite une évaluation et un suivi médical (Birnkrant *et al.*, 2018a).

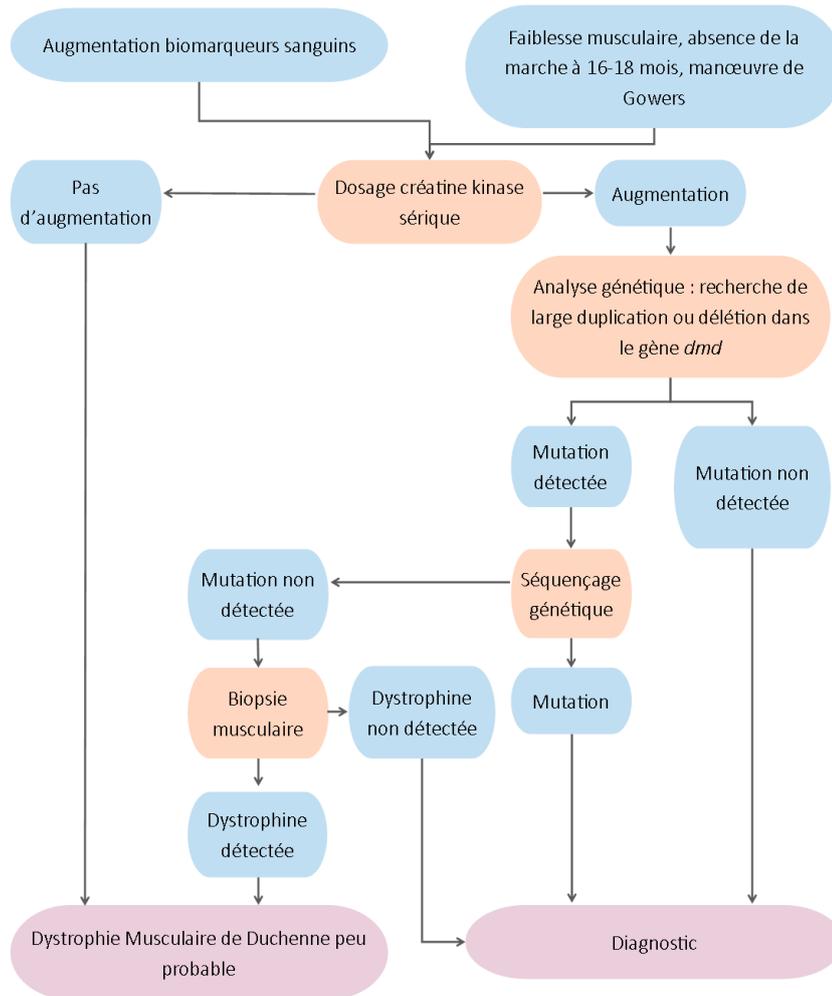


Figure 4 : Schéma de la démarche diagnostique de la Dystrophie Musculaire de Duchenne.
Selon Birnkrant et al., 2018

D. L'absence de la protéine dystrophine

1. La structure et le rôle de la dystrophine

La DMD est causée par l'absence d'expression de la protéine dystrophine chez les patients. Codée par le gène DMD, qui est le plus long gène identifié chez l'homme, cette protéine compte parmi les plus grandes de l'organisme à ce jour. Le gène *DMD* est situé sur le bras court du chromosome X (Xp21.2-p21.1). Il mesure 2,2 millions de paires de bases (pb) et représente 1,5% du chromosome X et 0,1% du génome humain. Ce gène code pour 8 isoformes de la protéine : Dp427b, Dp427m, Dp427p, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp40, symbolisées

par leur taille respective en kilodalton. L'Acide RiboNucléique messager (ARNm) de la dystrophine est long de 14 kilobases (kb) et présente 79 exons (Muntoni *et al.*, 2003).

La dystrophine taille entière Dp427 est codée par un gène possédant 3 promoteurs tissus-spécifiques distincts, exprimés de manière prédominante dans le cerveau, dans le muscle squelettique et les cellules de Purkinje (respectivement Dp427b, Dp427m, et Dp427p). L'isoforme Dp260 est principalement exprimée dans la rétine et possède son promoteur dans l'intron 29. Dp140 a son promoteur dans l'intron 44 et est exprimée dans le Système Nerveux Central (SNC), tandis que Dp116 a son promoteur dans l'intron 55 et est majoritairement exprimée dans les cellules de Schwann (Douglas and Wood, 2013). Dp71 et Dp40 dépendent d'un même promoteur dans l'intron 62 et sont exprimées de manière ubiquitaire bien qu'elles semblent jouer un rôle particulièrement important dans le SNC (Figure 5) (Paúl-González *et al.*, 2021; Tozawa *et al.*, 2012).

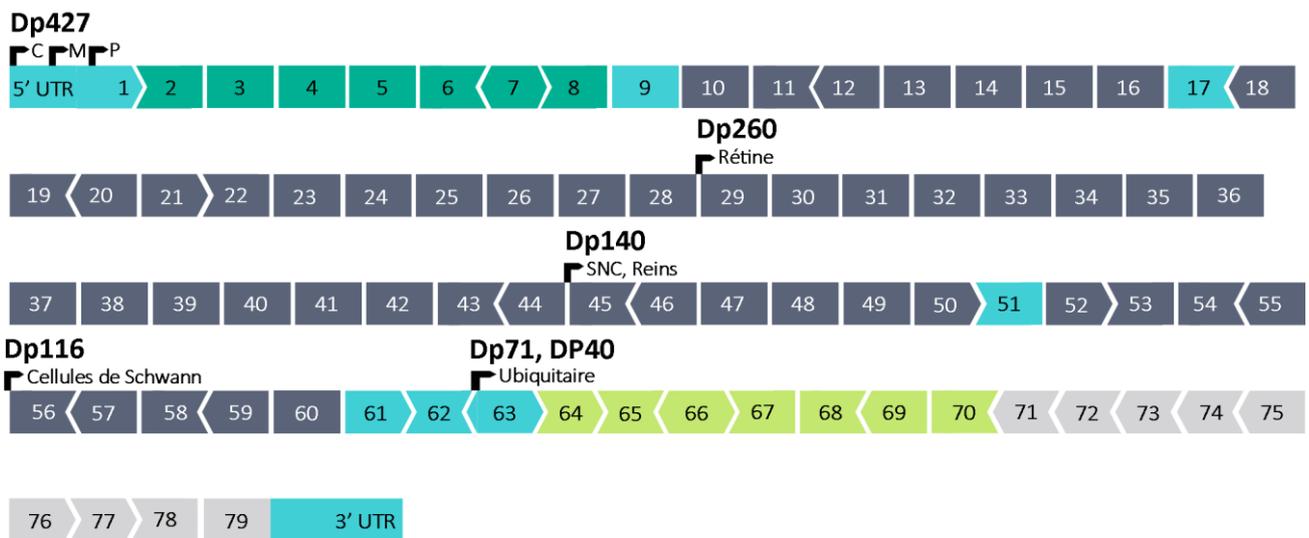


Figure 5 : Schéma de la structure du gène DMD

Représentation de la position des différents promoteurs. Le schéma montre comment les 79 exons s'assemblent en terme de cadre de lecture. Chaque exon individuel peut coïncider avec les positions 1, 2 ou 3 d'un codon dans le cadre de lecture ouvert normal. L'extrémité des exons est représentée par 3 formes différentes. Si les exons s'emboîtent, le cadre de lecture est conservé. Si un exon (ou un bloc d'exons) avec des extrémités de forme différente est supprimé du gène, le cadre de lecture est perturbé et le résultat est la DMD. Cependant, la suppression d'un exon avec des extrémités de la même configuration n'affectera pas le cadre de lecture puisque les exons restants s'adapteront toujours ensemble (l'équivalent de BMD). Les exons sont colorés en fonction du domaine protéique qu'ils codent. N-terminal en vert foncé, domaine central en gris foncé avec les régions charnières en bleu. Le domaine riche en cystéine en vert clair et le domaine C-terminal en gris clair.

Dans les cellules musculaires, la dystrophine fait partie des protéines de maintien de la structure du cytosquelette (LaPelusa and Kentris, 2021). Elle assure un lien entre le cytosquelette via les filaments d'actine qui sont des protéines contractiles des fibres musculaires et la matrice extra-cellulaire via un ensemble de protéines qui composent le DAPC (Dystrophine-Associated Protein Complex, ou en français Complexe Protéique Associé à la Dystrophine) ancrées dans le sarcolemme (Figure 6). Localisée à la face cytoplasmique du sarcolemme, la dystrophine présente 4 domaines structuraux distincts :

- L'extrémité N-terminale (N-ter) qui lie les filaments d'actine appelé Actin-Binding amino terminal Domain 1 (ABD1).
- Le segment central appelé rod domain. Il est composé de vingt-quatre répétitions de structures « spectrin-like » arborant un second motif de liaison à l'actine ABD2 et portant des résidus tryptophanes permettant une liaison aux phospholipides membranaires. Ces structures permettent de renforcer l'ancrage de la dystrophine au cytosquelette ainsi qu'au sarcolemme. La souplesse de la protéine dystrophine est assurée par la présence de quatre régions charnières « hinges » réparties le long du rod domain (Gao and McNally, 2015; Koenig *et al.*, 1988).
- Le Domaine Riche en Cystéine (DRC) contient deux motifs « EF-Hand » permettant la liaison au calcium ainsi que 2 domaines de liaison Zinc finger permettant la liaison à la calmoduline (CaM) de manière calcium dépendante (Koenig *et al.*, 1988; Kornegay *et al.*, 2014).
- L'extrémité C-terminale (C-ter) est constituée de motifs « coiled coils » impliqués dans l'interaction avec les protéines du DAPC comme la dystrobrevine et les syntrophines (Blake *et al.*, 2002; Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997).

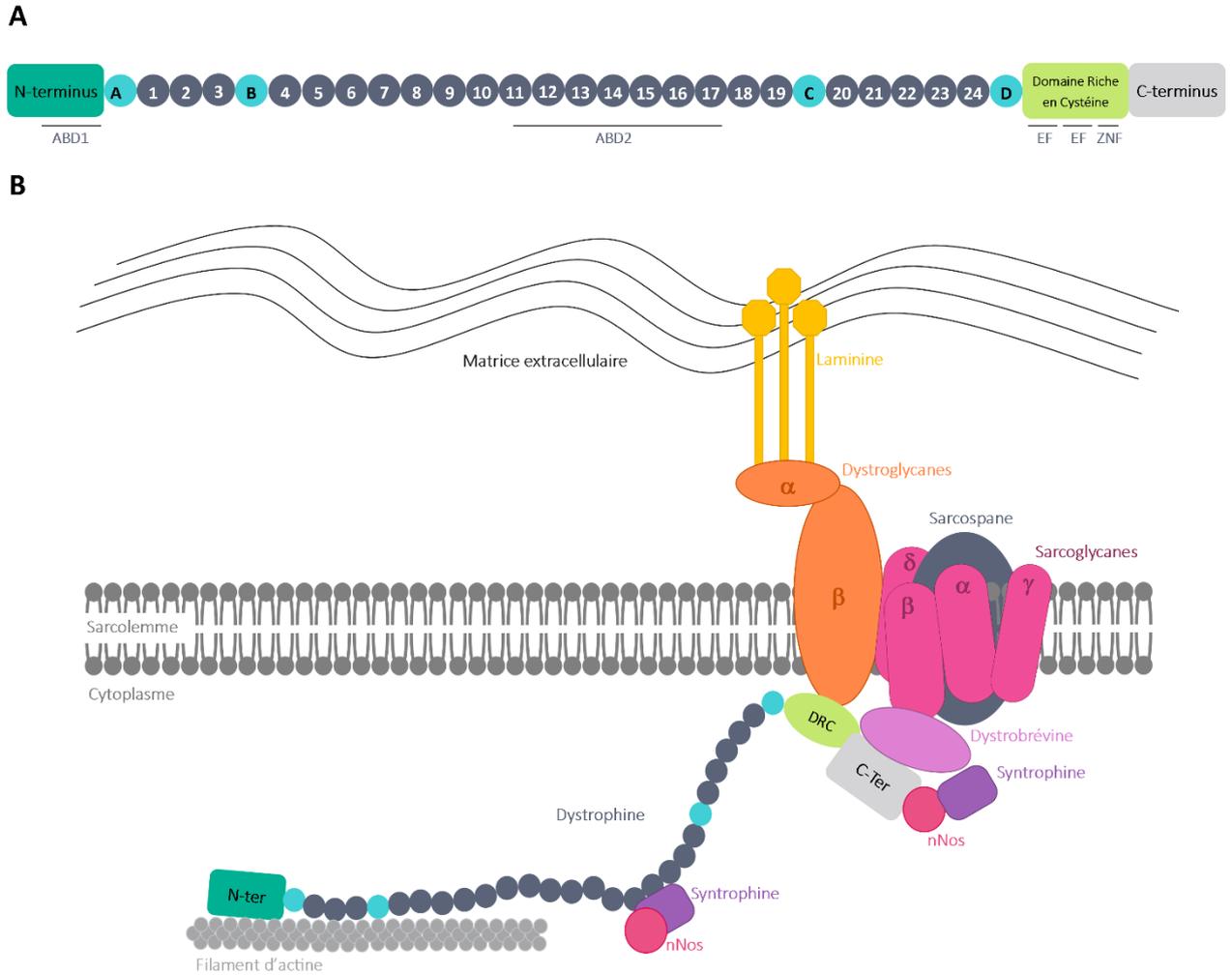


Figure 6 : Schéma de la dystrophine

A. Schéma de la structure de la protéine dystrophine dans sa forme complète Dp427. En vert foncé le domaine N-terminal, en bleu les domaines charnières A, B, C et D, et en gris foncé les domaines répétitions « spectrin-like », numérotés de 1 à 24. La région riche en cystéine DRC, en vert clair, précède le domaine C-terminal en gris clair. **B.** Schéma de l'organisation de la dystrophine dans la cellule musculaire, avec les principales protéines du DAPC.

2. Les mutations du gène de la dystrophine

La grande taille du gène *DMD*, ainsi que sa structure complexe (plus de 99% de séquences introniques), participent à la forte probabilité de mutations sur sa séquence. Ces mutations sont classées en deux grandes catégories en fonction de leur impact sur la production de la protéine. Le premier type de mutations regroupe celles qui induisent un décalage du cadre de lecture de la protéine dystrophine, ou qui font apparaître un codon stop prématuré ou Premature Termination Codon (PTC), entraînant une absence totale de

traduction de l'ARNm en protéine, et donc une absence de dystrophine chez les patients DMD. L'autre type de mutations concerne celles qui respectent le cadre de lecture de la séquence codante de la dystrophine tout en entraînant l'expression d'une forme tronquée, du fait d'un défaut d'épissage. Les personnes ayant ce genre de mutations ont une protéine dystrophine raccourcie et produite en moins grande quantité que chez les personnes saines, elles sont alors atteintes de dystrophie musculaire de Becker et présentent un phénotype moins grave que celui de la dystrophie musculaire de Duchenne (Juan-Mateu *et al.*, 2015) (Figure 7).



Figure 7 : Schémas d'exemples de mutations du gène DMD et leurs conséquences sur la production de dystrophine et les phénotypes correspondants

Les cases représentent les exons. Les faces droites des cases indiquent que l'exon code pour une séquence protéique entière basée sur des codons à 3 bases (exemples : exons 48, 49). Les faces anguleuses indiquent que l'exon ne code pas pour une séquence protéique entière mais que la première ou la dernière base a besoin de l'exon précédent ou suivant pour coder un codon complet à 3 bases (exemples : exons 50, 51, 52). **A.** Cas d'une personne saine, l'épissage de l'ARNm se fait « en phase », une dystrophine fonctionnelle complète peut se faire. **B.** Mutation sur un exon qui induit un PTC ou un défaut d'épissage, entraînant un décalage du cadre de lecture, impliquant une impossibilité de synthèse de la protéine à partir du messenger, et un phénotype DMD. **C.** Cas d'une mutation apparaissant sur un exon n'incluant pas de décalage du cadre de lecture du messenger, induisant une production de dystrophine incomplète mais fonctionnelle.

Plusieurs milliers de mutations différentes ont été recensées à travers le monde chez les patients atteints de DMB ou DMD. Chez les patients DMB les mutations majoritairement observées sont des larges délétions. Ces dernières représentent 80% des mutations, puis viennent les mutations ponctuelles avec 13% et les larges duplications dans 6% des cas. Dans un contexte DMD, on retrouve aussi majoritairement des mutations de type délétion à environ 60%. On observe ensuite 26% de mutations ponctuelles et 13% de duplications (Péréon *et al.*, 2015). Les mutations ponctuelles peuvent être de différents types, comme par exemple des mutations non-sens principalement retrouvées chez les patients DMD, ou des mutations sur les sites d'épissage qui concernent la majorité des mutations ponctuelles observées dans un contexte DMB (Figure 8) (Aartsma-Rus *et al.*, 2006; Magri *et al.*, 2011). Malgré la longueur du gène, les grands réarrangements ne surviennent pas de manière totalement aléatoire mais se situent dans des régions appelées « hot spot ». Ce sont des régions du génome particulièrement impactées par les mutations lors de la réplication ou des réparations de l'ADN (Acide DesoxyriboNucléique). Pour exemple, chez les patients DMD, environ 50% des délétions et duplications se localisent entre les exons 45 et 55. Tandis que les mutations ponctuelles sont réparties le long de la séquence codante (Nakamura *et al.*, 2017). Chez les patients DMD comme pour les patients DMB, la mutation du gène de la dystrophine est héritée par la mère dans deux tiers des cas. Cependant, dans un tiers des cas, il s'agit de mutation *de novo* du gène de la dystrophine survenant dans la lignée germinale maternelle (Duan *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2014).

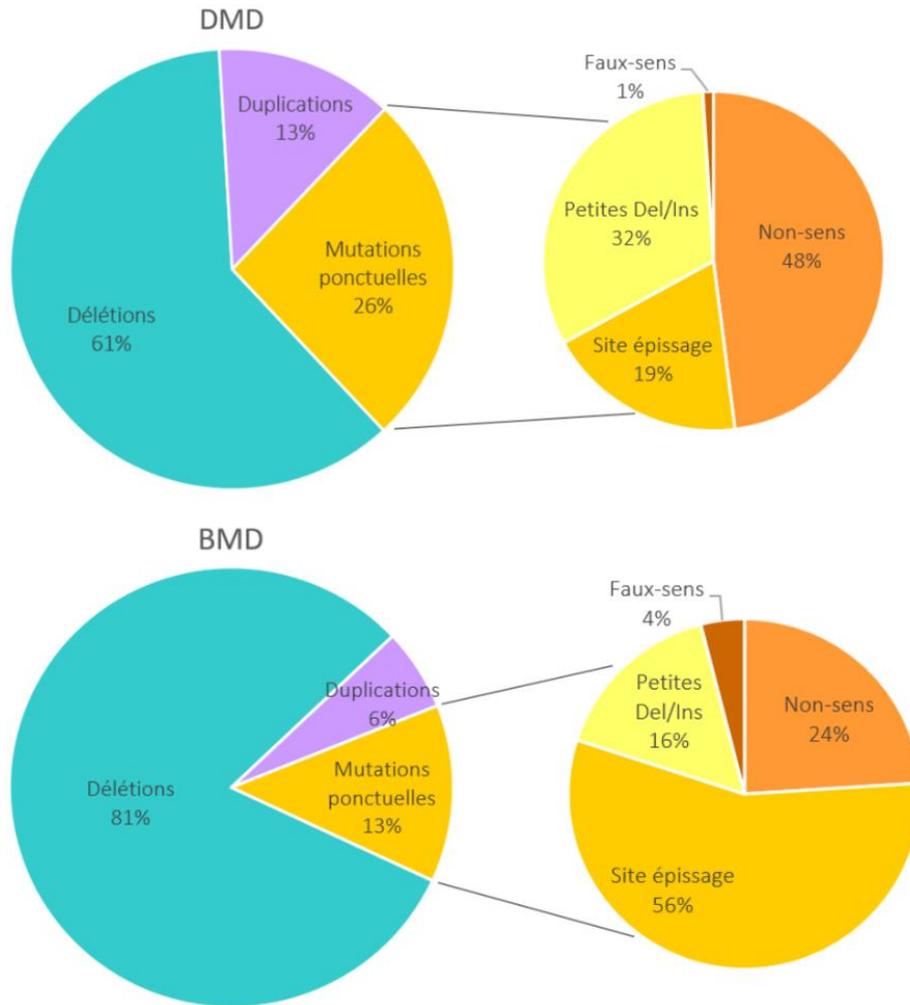


Figure 8 : Proportion de chaque type de mutations du gène de la dystrophine observées chez les patients DMD et BMD

E. Principales lésions histologiques décrites dans la DMD

Dans la physiopathologie de la DMD, la compréhension du mécanisme menant de l'absence de la dystrophine à la dégénérescence musculaire est encore imprécise (Deconinck and Dan, 2007; Fortunato *et al.*, 2021). Chez les patients DMD, les biopsies musculaires mettent en évidence une nécrose des tissus et une dégénérescence des fibres caractéristique, souvent observée en grappes (Deconinck and Dan, 2007). Les muscles dystrophiques sont également inflammés et sont entourés d'infiltrats de cellules immunitaires, macrophages et lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Desguerre *et al.*, 2009; McDouall *et al.*, 1990). De petites fibres musculaires immatures à nucléation centrale sont également observées, reflétant la régénération musculaire à partir des myoblastes (Schmalbruch, 1984). Dans la phase précoce de la DMD, il y a un équilibre entre les processus nécrotiques et régénératifs dans les muscles squelettiques.

Avec la progression de la myopathie, la capacité de régénération cellulaire semble s'épuiser et les fibres musculaires sont progressivement remplacées par du tissu fibreux et adipeux (Deconinck and Dan, 2007; Skuk, 2004) (Figure 9, A à D). De plus, des dépôts calciques intracellulaires ont été observés dans des biopsies musculaires de patients et des muscles de foetus DMD (Bertorini *et al.*, 1984; Emery and Burt, 1980; Jackson *et al.*, 1985) (Figure 9, E).

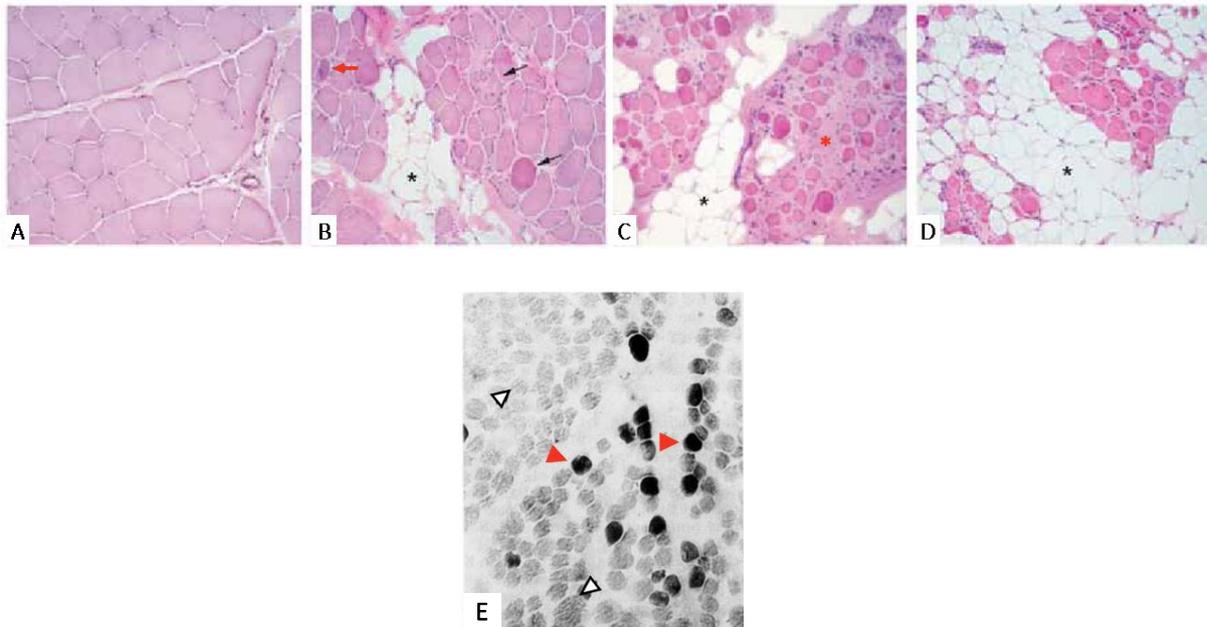


Figure 9: Coupe histologique de muscle squelettique d'un individu sain et de patient DMD

A à D : Coupes histologiques transversales de muscles squelettiques marquées en hématoxyline et éosine (adapté de Skuk, 2004).
A. Coupe de muscle d'un individu sain. **B, C et D :** Coupes de muscle d'un patient DMD à différents stades de progression de la maladie. En comparaison du muscle sain, le muscle dystrophique présente une anisocytose des fibres musculaires (fibres de taille hétérogène). La flèche rouge indique une fibre en régénération, et les flèches noires indiquent des fibres nécrotiques. Progressivement, le tissu musculaire est envahi par le tissu adipeux (astéris noirs) et par du tissu fibreux (astéris rouge).
E : Coupe histologique de muscle de bébé prématuré atteint par la DMD (adapté de Bertorini *et al.*, 1984). La coupe musculaire a été colorée au rouge d'alizarine S, permettant de révéler les dépôts calciques en coloration rouge. Les flèches rouges indiquent les fibres musculaires positives au calcium, tandis que les flèches blanches indiquent des fibres négatives.

III. Les animaux modèles de la DMD

Pour l'étude de la dystrophie musculaire de Duchenne, plus d'une soixantaine de modèles animaux sont actuellement disponibles, qu'il s'agisse de modèles naturels, ou d'animaux génétiquement modifiés. Du nématode, en passant par les arthropodes et les chordés, les mammifères restent la classe animale la plus représentée (Tableau 1) (Wilson *et*

al., 2017). Chaque espèce utilisée possède ses caractéristiques propres qui représentent des avantages ou des inconvénients. Dans ce chapitre nous discuterons des limites des modèles mammifères qui ont été les plus utilisés dans les études précliniques réalisées jusqu’alors, la souris *mdx* (X-linked Muscular Dystrophy) et le chien Golden Retriever Muscular Dystrophy GRMD, et nous présenterons le modèle de rat *DMD^{mdx}* plus récemment développé.

Espèce	Détails
Non mammifères	Zebrafish Plusieurs modèles de <i>C.elegans</i> Plusieurs modèles de Drosophile
Souris déficientes en dystrophine	17 modèles de souris <i>mdx</i>
Souris immunodéficientes	4 modèles de souris <i>mdx</i>
Souris double knock-out	13 modèles de souris
Souris double knock-out avec phénotype similaire à la souris <i>mdx</i>	3 modèles de souris
Souris double knock-out avec phénotype pathologique atténué	11 modèles de souris
Souris <i>mdx</i> transgénique	13 modèles de souris
Lapin	1 modèle
Rat	4 modèles
Chat	2 modèles
Chien	22 races, dont 7 ont donné lieu à des modèles
Cochon	2 modèles DMD, 1 modèle DMB

Tableau 1 : Résumé des différents modèles animaux pour l’étude de la Dystrophie Musculaire de Duchenne

Adapté de McGreevy et al, 2015

1. La souris *mdx*

L’animal le plus largement utilisé pour étudier la DMD est la souris *mdx*. Les principaux avantages de ce modèle sont sa rapidité de reproduction, ainsi que son coût d’élevage relativement faible. Cela permet l’inclusion d’un grand nombre d’animaux dans les études, et l’amélioration de la significativité des résultats.

La souris *mdx* a été découverte de manière fortuite lors de la génération de lignées consanguines de souris C57BL/10ScSn pour l’étude de l’activité des enzymes impliquées dans

la glycolyse et néoglucogénèse (Bulfield *et al.*, 1978). Cette souris présente une absence complète de la protéine dystrophine dû à une mutation ponctuelle non-sens, induisant un PTC dans l'exon 23 (Sicinski *et al.*, 1989).

Contrairement à l'homme, l'absence de la dystrophine chez ces souris n'est que peu délétère sur le tableau clinique, et leur espérance de vie n'est réduite que de 25% en moyenne, contre 75% chez l'homme (Chamberlain *et al.*, 2007; McGreevy *et al.*, 2015). Sur les vingt-deux mois d'espérance de vie de la souris *mdx*, la maladie présente plusieurs étapes d'évolution. Durant les deux premières semaines de vie des animaux, les muscles dystrophiques sont indiscernables des muscles de souris saines, puis jusqu'à la sixième semaine, les muscles sont sujets à d'importantes nécroses. Ensuite les muscles deviennent hypertrophiques et entrent dans des processus de régénération qui permettent de les maintenir dans un état stable, à l'exception du diaphragme qui se détériore malgré tout, comme chez le patient DMD (McGreevy *et al.*, 2015; Stedman *et al.*, 1991). Le phénotype dystrophique sévère chez les souris *mdx* n'apparaît qu'à partir d'un âge avancé de l'animal, vers ses 15 mois ou plus. Ils peuvent alors développer une fonte musculaire, une scoliose, une insuffisance cardiaque et des sarcomes (Bostick *et al.*, 2008, 2009; Hakim and Duan, 2013; Lefaucheur *et al.*, 1995; Lynch *et al.*, 2001; Pastoret and Sebillé, 1995). Cette faible atteinte clinique de la souris peut s'expliquer par la surexpression de la protéine utrophine, analogue à la dystrophine qui permet d'assurer la liaison à l'actine et au β -dystroglycane et compense ainsi l'absence de la dystrophine (McDonald *et al.*, 2015). De plus, la souris *mdx* a la particularité de présenter un grand nombre de fibres révertantes. C'est-à-dire que les fibres musculaires sont capables d'exprimer la dystrophine malgré la mutation du gène. Cela est supposé dû à des mécanismes épigénétiques qui permettraient des modulations d'épissages et une correction naturelle de la mutation par saut d'exon. Cependant aucune relation n'a été clairement établie entre la présence des fibres révertantes et le degré de sévérité d'atteinte dystrophique des muscles (Pigozzo *et al.*, 2013).

De cette souris initiale *mdx*, ont été générées plusieurs nouvelles lignées de souris afin de modifier ses caractéristiques physiopathologiques, immunitaires, ou cliniques. Elles sont issues de croisements avec d'autres souches de souris ou de modifications génétiques induites. Les souris issues de croisements possèdent la même mutation non-sens sur l'exon 23 que la

souris *mdx* initiale. Parmi elles, on retrouve par exemple les souris albinos-*mdx*, possédant un phénotype neurologique plus sévère et des niveaux de cytokines circulantes plus élevées (Krivov *et al.*, 2009; Stenina *et al.*, 2013). Il y a également les souris BALB/c-*mdx* et C3H-*mdx* qui sont moins sujettes aux développements spontanés de sarcomes (Schmidt *et al.*, 2011). Les souris DBA2-*mdx* qui montrent un phénotype plus sévère que les souris *mdx* initiales avec une fibrose musculaire plus importante et moins de processus de régénération. Cependant cette dernière lignée présente également des problèmes de reproduction et ces mutations provoquent des anomalies oculaires et auditives (Fukada *et al.*, 2010).

D'autres croisements ont été réalisés afin de générer des souris *mdx* immunodéficientes. Il s'agit de souris dystrophiques sur fond immunodéficient permettant l'étude des thérapies géniques et cellulaires en atténuant les réactions immunitaires contre les produits thérapeutiques. Il s'agit par exemple des lignées de souris *scid-mdx*, déficientes en lymphocytes B et T ou de la souris *nude-mdx* (Farini *et al.*, 2007; Morrison *et al.*, 2000).

C'est également dans l'objectif de générer des souris au phénotype plus sévère que la souris *mdx*, que des lignées génétiquement modifiées ont été créées. Les premiers variants chimiques cv (chemical variants) de la souris *mdx* ont été publiés en 1989 grâce à l'agent mutagène chimique N-éthyl-N-nitrosuré, il s'agit des lignées *mdx2cv*, *mdx3cv*, *mdx4cv*, et *mdx5cv* (Chapman *et al.*, 1989). Chacune de ces lignées possède une mutation différente de la lignée *mdx* initiale, mais une présentation clinique assez similaire et donc peu sévère (Cox *et al.*, 1993; Im *et al.*, 1996). D'autres lignées de souris ont été générées grâce à des techniques de génie génétique, comme les souris double knock-out (dKO) qui sont invalidées pour un autre gène en supplément de celui codant pour la dystrophine. Ces lignées dKO ont des phénotypes qui peuvent être plus ou moins sévères par rapport à celui de la souris *mdx*, en fonction des gènes touchés. Un modèle en particulier a été généré dKO pour les gènes de la dystrophine et de l'utrophine, il présente un phénotype beaucoup plus sévère que la souris *mdx*, avec une espérance de vie réduite de 85%, des atteintes motrices, respiratoires et cardiaques (Deconinck *et al.*, 1997; Grady *et al.*, 1997). Malgré une évolution physiopathologique beaucoup plus proche du patient DMD que la souris *mdx*, les résultats obtenus sur ce modèle ne permettent pas une transposition chez les patients qui continuent d'exprimer l'utrophine.

Afin de proposer des stratégies thérapeutiques correctives facilement transposables chez l'homme, des lignées de souris portant des mutations similaires à celles retrouvées chez l'homme ont été générées. Il s'agit de souris portant leur mutation du gène de la dystrophine dans les régions « hot spots » du gène dystrophine humain (exon 45 à 55), contrairement à la souris *mdx* qui possède sa mutation dans l'exon 23. Parmi ces souris, peuvent être citées la lignée *mdx52* ayant permis la preuve de concept du saut d'exon 51 ou les modèles Δ Ex44 et Δ Ex50 générés récemment grâce à la technologie CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (Wasala *et al.*, 2020). Les produits thérapeutiques testés sur ces modèles auront néanmoins besoin d'être adaptés à la séquence génétique humaine, c'est pourquoi a été créé une lignée de souris portant la totalité du gène humain de la dystrophine inséré dans le chromosome 5, la souris hDMD ('t Hoen *et al.*, 2008). Ces souris hDMD, aux phénotypes sains, ont été croisées avec des modèles de souris *mdx* (mutation dans l'exon 23) et de souris *dmd*-null (délétées de l'entièreté du gène *dmd* murin), pour n'exprimer que la dystrophine humaine, puis, elles ont finalement été mutées dans les régions de « hot spots » du gène DMD humain (Echigoya *et al.*, 2017). Ces stratégies ont donné lieu à 2 modèles de souris, la souris *mdx* Δ 45hDMD et la souris *mdx* Δ 52hDMD au phénotype peu sévère (Veltrop *et al.*, 2018). Ces deux modèles servent à la mise au point de stratégies correctives en thérapies géniques directement transposables aux patients DMD ayant le même type de mutation (Veltrop *et al.*, 2018; Young *et al.*, 2017).

La légèreté du phénotype des modèles de souris pour l'étude DMD est le principal inconvénient à son utilisation. C'est pourquoi un autre modèle animal montrant une atteinte plus sévère est aussi très utilisé pour l'étude de la maladie de Duchenne, il s'agit du chien GRMD.

2. Le chien GRMD

Le chien GRMD est un modèle de la DMD entrant dans la catégorie des gros animaux, il s'agit de l'un des premiers modèles naturels de la Dystrophie Musculaire de Duchenne, identifié dans les années 1980 (Cooper *et al.*, 1988). Il porte une mutation dans l'intron 6 induisant un saut de l'exon 7. Dans l'ARNm en résultant, le cadre de lecture est rompu et la protéine dystrophine n'est pas traduite (Sharp *et al.*, 1992). Le chien GRMD a un phénotype

dystrophique plus sévère que la souris *mdx* et est donc plus comparable à l'évolution de la maladie chez le patient DMD (Valentine and Cooper, 1991). Le chien dystrophique a une espérance de vie réduite de 75% avec un décès entre la première et troisième année selon les individus. Les premiers symptômes chez le chien surviennent entre la naissance et les 3 mois d'âge des animaux, et commencent par la difficulté à marcher, une posture anormale et de la fatigue à l'effort (Kornegay, 2017). Comme cela a été décrit chez la souris, le chien GRMD montre une perturbation de l'homéostasie calcique avec des dépôts calciques subsarcolemmaux (Valentine *et al.*, 1989). Avec la progression de la maladie, l'atrophie musculaire se met en place, et des dysphagies (difficultés à déglutir) surviennent chez les chiens. Les chiens peuvent également développer une atteinte cardiaque, mais cela est très variable entre les individus et assez tardif. Enfin, malgré une mutation identique entre tous les chiens GRMD, il y a une hétérogénéité de sévérité du phénotype (Kornegay, 2017; Le Guiner *et al.*, 2017; McGreevy *et al.*, 2015). Ce modèle de chiens GRMD est très intéressant pour les essais pré-cliniques et a été historiquement utilisé par notre équipe pour montrer l'efficacité au long terme d'un produit de thérapie génique AAVr-microdystrophine (Le Guiner *et al.*, 2017).

La sévérité pathologique du chien GRMD en fait un modèle très pertinent pour l'étude de la DMD. Cependant, bien que l'hétérogénéité du phénotype entre les individus s'assimile à celle retrouvée chez les patients DMD, elle nécessite l'inclusion d'un grand nombre d'animaux dans les études. Cet impératif implique une contrainte supplémentaire liée au coût important d'élevage des chiens GRMD. C'est pourquoi notre intérêt s'est porté sur un autre modèle animal, le rat *DMD^{mdx}*.

3. Le rat *DMD^{mdx}*

Le principal inconvénient du modèle souris est sa faible atteinte phénotypique, rendant l'évaluation clinique des stratégies thérapeutiques difficile en comparaison à l'homme. C'est pourquoi d'autres modèles de petits animaux ont été générés, comme plusieurs modèles de rats et un modèle lapin. Parmi eux, le modèle étudié pour ce projet de thèse est le rat *DMD^{mdx}* (Larcher *et al.*, 2014). Ce modèle a été généré et caractérisé à Nantes grâce à la collaboration de plusieurs équipes des recherches.

Le rat DMD^{mdx} a été généré à partir de la souche Sprague-Dawley par transgénèse par la méthode des TALEN's (Transcription Activator Like-Effector Nucleases). Il porte une mutation dans l'exon 23, consistant en une délétion de 11 pb induisant un décalage du cadre de lecture et l'apparition rapide d'un PTC. La caractérisation de ce modèle a tout d'abord montré que l'évolution physiopathologique du rat DMD^{mdx} est proche de celle de l'homme avec un phénotype dystrophique beaucoup plus sévère que la souris mdx et montre une espérance de vie réduite de 60% (Le Guiner *et al*, WMS 2017). Sur le tableau clinique, les rats dystrophiques souffrent d'une perte de masse corporelle et en particulier de masse musculaire. Dès 1,5 mois d'âge, ils montrent également une diminution de la force musculaire et une activité locomotrice réduite (Larcher *et al.*, 2014, Le Guiner *et al*, WMS 2017). Les altérations histologiques typiques du phénotype dystrophique sont également présente chez le rat DMD^{mdx} . Il souffre de nécrose des tissus musculaires, de fibrose interstitielle et d'adipose touchant les muscles squelettiques (y compris le diaphragme) et le cœur, avec des infiltrations de cellules inflammatoires. Cela est corrélé avec une augmentation de la créatine kinase sérique dès 1,5 mois. Finalement, et contrairement aux modèles de la souris mdx ou du chien GRMD, le rat développe précocement des anomalies de la fonction cardiaque (troubles du rythmes visibles, remodelage du tissu cardiaque, dysfonction diastolique, puis dysfonction systolique), qui évolue en fin de vie des animaux vers une cardiomyopathie dilatée (Larcher *et al.*, 2014; Szabó *et al.*, 2021). Au niveau moléculaire, le rat DMD^{mdx} ne présente que peu de fibres musculaires squelettiques révertantes, et la dystrophine est indétectable dans le tissu cardiaque par Western-blot et immunomarquage. L'absence de la dystrophine dans ce modèle implique aussi des dérégulations du DAPC.

L'ensemble des caractéristiques du rats DMD^{mdx} en font un modèle très pertinent offrant de nombreux avantages à son utilisation dans l'étude de la DMD, comme sa facilité d'élevage, et son évolution physiopathologique proche de celle de l'homme, tant au niveau musculaire que par son atteinte cardiaque précoce, qui est une des causes principales de décès chez les patients DMD. C'est le premier modèle de petit animal robuste pour la mise au point de traitements ciblant la cardiomyopathie dilatée dans la DMD. Tout en respectant la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer), le rat DMD^{mdx} permet d'inclure un plus grand nombre d'animaux, et de mener des études plus rapides et moins coûteuses qu'en utilisant des modèles comme le chien GRMD (Tableau 2).

	Souris <i>mdx</i>	Rat <i>DMD^{mdx}</i>	Chien GRMD	Patient DMD	
Réduction de l'espérance de vie	25%	60%	75%	75%	
Histopathologie musculaire	Fibres révertantes	5%	5%	< 1%	1 à 3%
	Nécrose	5%	> 10%	2%	0,5 à 3,5%
	Fibrose	Tardive et principalement diaphragme	Marquée	Présente	Marquée
	Adipose	Absente	Moyenne	Absente	Sévère
Cardiomyopathie	Absente ou tardive	Marquée	Moyenne	Marquée, principale cause de décès	
Calcium	Dépôts calciques	Oui	Non	Oui	Oui
	Concentration calcique intracellulaire	Augmentée	Augmentée	N/A	Augmentée
	SPCa	Augmentée	Augmentée	N/A	N/A
Fonction musculaire	Impact sur la force musculaire	Moyen	Sévère	Sévère	Sévère
	Locomotion	Non impactée	Impactée	Impactée	Sévèrement impactée
Difficulté d'élevage	Facile / peu coûteuse	Facile / peu coûteuse	Difficile / coûteux		

Tableau 2: Comparaison des caractéristiques pathologiques et fonctionnelles entre les patients DMD et les animaux modèles de la DMD

Adapté de Larcher et al., 2014 ; et McGreevy et al., 2015

Chapitre II : Les traitements de la DMD et pistes thérapeutiques

Bien que le gène responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne soit connu depuis près de 40 ans maintenant, elle reste une pathologie incurable actuellement. Cependant, avec la standardisation du diagnostic et l'amélioration de la prise en charge médicale, l'espérance de vie des patients est passée d'environ 20 ans dans les années 2000, à presque 40 ans ces dernières années (Saito *et al.*, 2017). Cette prise en charge médicale coordonnée a permis d'améliorer l'espérance de vie des patients mais également leur qualité de vie grâce à la combinaison de traitements médicamenteux, chirurgicaux, orthopédiques, cardio-respiratoires et nutritionnels (Chabrol and Desguerre, 2015; Desguerre and Laugel, 2015).

De plus, grâce à la recherche, les essais cliniques proposant de nouvelles stratégies thérapeutiques se sont multipliés ces dernières années, ce qui représente un espoir pour les patients et leurs familles.

I. La prise en charge du patient

A l'issu du diagnostic, le spécialiste neuromusculaire assure le rôle de clinicien référent, responsable de la prise en charge des soins du patient DMD (Birnkrant *et al.*, 2018a). Cette prise en charge s'est structurée au fil des années en approche multidisciplinaire, consistant en des consultations spécifiques dédiées. En France, l'impulsion de l'Association Française contre les Myopathies (AFM) a grandement aidé à la mise en place de ce parcours de soin depuis plus de 30 ans (Chabrol and Desguerre, 2015). Des centres de soins existent dans lesquels le patient est dirigé vers différentes consultations de spécialistes, regroupées dans un même lieu rassemblant tous les professionnels de santé. Ces consultations ont pour mission le diagnostic, la surveillance médicale et la prise en charge personnalisée et quotidienne du malade (AFM-Telethon.fr).

La prise en charge orthopédique

L'évaluation clinique de la fonction neuromusculaire des patients est réalisée de manière réfléchie et standardisée. La cohérence et la reproductibilité des tests est essentielle pour établir une bonne corrélation entre les scores cliniques et la progression de la pathologie, en particulier chez les patients ambulants. Parmi les tests efficaces pour cette évaluation, le test de 6 minutes de marche consiste à mesurer la distance parcourue par le patient pendant un temps chronométré de 6 minutes (Henricson *et al.*, 2013; McDonald *et al.*, 2015). Le test North Star Ambulatory Assessment (NSAA) est également parmi les plus utilisés, il regroupe 17 points d'évaluation de la fonction motrice, allant du stationnement en position debout, la marche sur un parcours donné, la montée de marches d'escalier, à une épreuve de course sur 10 mètres (Mazzone *et al.*, 2013). L'ensemble des résultats obtenus sur ces différents points permet d'établir un score clinique afin d'étudier l'évolution de la maladie. Ensemble, ces techniques permettent non seulement d'évaluer les stades de progression de la DMD chez les jeunes patients ambulants, permettant d'anticiper les pertes de mobilité et d'accompagner les familles, mais également d'évaluer sur le plan clinique l'effet des traitements (Mayhew *et al.*, 2013).

Sur le plan orthopédique, les patients DMD développent différents problèmes avec la progression de la dystrophie. Au fur et à mesure les patients souffrent de contractures musculaires, et articulaires, de déformation de la colonne vertébrale et de perte de la masse osseuse (Fox *et al.*, 2020). L'évaluation de l'état musculaire et osseux des patients est réalisée grâce aux techniques d'imagerie médicale comme les radiographies de la colonne, et la mesure densitométrique osseuse (Bushby *et al.*, 2010a). La prise en charge du patient a pour but de préserver la fonction motrice le plus longtemps possible, à favoriser la santé osseuse, minimiser l'apparition de contractures articulaires et maintenir la colonne vertébrale droite, avec une garantie du confort pour le patient. Pour cela, il va bénéficier de séances de kinésithérapie pour l'étirement musculaire, avec l'emploi de systèmes de contention pour les membres inférieurs (pieds, cheville, genoux) pour améliorer sa posture (Birnkranz *et al.*, 2018a). L'activité physique est depuis peu préconisée pour retarder les processus de dégénérescence musculaire chez les patients DMD (Honório *et al.*, 2019). Avec l'augmentation de la fibrose musculaire, une rigidité des tendons est ressentie par les patients et différentes chirurgies peuvent être proposées pour

les soulager (Bushby *et al.*, 2010b). Lorsque le patient devient non ambulant, il développe une scoliose sévère pour laquelle il va subir une opération de fusion des vertèbres, l'arthrodèse vertébrale, afin de le rapprocher d'une posture physiologique (Apkon *et al.*, 2018).

Dans les années 1970, les premiers essais de corticothérapie sur les patients dystrophiques ont été menés de manière empirique et leur utilisation est restée longtemps polémique. Il a fallu attendre une étude rétrospective sur les 40 dernières années pour que soit établi le bénéfice de la corticothérapie au long terme chez les patients (Amthor, 2015). Il a été notamment démontré que ces traitements pouvaient améliorer et prolonger la phase ambulatoire des patients DMD et DMB en réduisant la survenue et la sévérité des scolioses ainsi qu'en ralentissant la progression globale de la maladie (Amthor, 2015; Drachman *et al.*, 1974; Griggs *et al.*, 2016). Il s'agit de molécules comme la prednisolone ou le deflazacort qui sont devenues des traitements standards pour les patients DMD (Guglieri *et al.*, 2017). Les corticothérapies basées sur des molécules comme la prednisolone ou le deflazacort sont devenues des traitements standards pour les patients DMD. Il s'agit du seul traitement médicamenteux connu actuellement capable de repousser la perte de l'ambulation d'environ trois ans et de prolonger l'espérance de vie, à condition d'être administré le plus tôt possible, dès le stade précoce de la maladie (Bello *et al.*, 2015). Les mécanismes d'actions exacts de ces molécules n'ont cependant pas été clairement établis. Il semblerait que les bénéfices de ces anti-inflammatoires stéroïdiens soient associés à l'augmentation de l'expression de deux protéines impliquées dans les processus de réparation membranaire, l'annexine A1 et A6. Les corticostéroïdes assurant ainsi un rôle d'activation des voies de signalisation anti-inflammatoires. D'autre part, les corticostéroïdes joueraient un rôle d'inhibition du facteur de transcription $\text{NK-}\kappa\text{B}$ (Nuclear Factor kappa B) impliqué dans l'activation de voies de signalisations cellulaires pro-inflammatoires (Quattrocchi *et al.*, 2017, 2021; Vandewalle *et al.*, 2018).

L'administration au long terme de corticostéroïdes est associée à la survenue d'effets secondaires importants comme par exemple de l'ostéoporose, un taux accru d'infections, des complications cardio-vasculaires et du diabète, nécessitant une surveillance rigoureuse des patients (Houde *et al.*, 2008; Kinnett *et al.*, 2015). De fait, des recherches sont en cours afin de trouver des molécules anti-inflammatoires non stéroïdiennes mieux tolérées par les patients.

C'est dans ce contexte que trois essais cliniques successifs ont été menés sur la molécule vamorolone pendant plus de deux ans (Hoffman *et al.*, 2019). Cette molécule agit comme un corticoïde en présentant moins d'effets secondaires. Les résultats montrent un bénéfice sur la fonction motrice des patients ayant reçu une forte dose de vamorolone (communiqué de presse du 28/04/2021, Santhera Pharmaceuticals). Les patients DMD se relèvent plus vite du sol et courent plus vite que les patients non traités. Le vamorolone est bien toléré par les patients, et n'a pas été associé à une perte de densité osseuse ni à un retard de croissance. Des effets secondaires ont cependant été rapportés comme de l'œdème, et des troubles du comportement. Le vamorolone ne possède pas encore d'autorisation de mise sur le marché (AMM) mais aux États-Unis, Canada et Israël, les patients DMD peuvent en bénéficier dans le cadre d'un dispositif d'accès étendu (afm-Telethon.fr).

La prise en charge de la fonction cardiaque

Avec l'amélioration de la prise en charge multidisciplinaire des patients, l'atteinte cardiaque devient la cause majoritaire du décès des patients souffrant de DMD. L'atteinte cardiaque des patients peut débiter avant même les premiers symptômes moteurs des enfants et leur diagnostic DMD. Il est donc primordial d'initier une surveillance de la fonction cardiaque dès le plus jeune âge chez les patients afin de déceler et prévenir au mieux le dysfonctionnement et le remodelage cardiaque (Buddhe *et al.*, 2018). Des techniques non invasives d'imagerie médicale comme l'imagerie par résonance magnétique IRM, l'échocardiographie trans-thoracique sont utilisées dans ce cas. De plus, la surveillance de l'activité électrique cardiaque est surveillée par électrocardiographie (Kinnett *et al.*, 2015). D'autres techniques, invasives, comme l'angiographie coronarienne, peuvent être aussi employées (Hershberger and Jordan, 1993).

Les premiers signes de l'atteinte cardiaque chez les patients se manifestent souvent par une arythmie, puis une dysfonction systolique avec une diminution significative de la fraction d'éjection. Une dilatation du ventricule gauche confirme le diagnostic de cardiomyopathie dilatée (Hershberger and Jordan, 1993; de Kermadec *et al.*, 1994).

Afin de prévenir le remodelage ventriculaire, les patients sont placés précocement sous traitements anti-hypertenseurs comme les inhibiteurs d'enzyme de conversion de

l'angiotensine et/ou les antagonistes compétitifs spécifiques des récepteurs β -adrénergiques (β -bloquants) (Buddhe *et al.*, 2018; Messina and Vita, 2018; Porcher *et al.*, 2021; Stalens *et al.*; Venugopal and Pavlakis, 2021). Le traitement anti-inflammatoire à base de corticostéroïdes précédemment évoqué semble également efficace pour diminuer l'atteinte cardiaque (Guglieri *et al.*, 2017; Wahbi, 2015). Lorsque l'atteinte cardiaque devient sévère avec des risques d'arrêts cardiaques, l'implantation de dispositif de défibrillation cardiaque peut être proposée (Buddhe *et al.*, 2018; McCulloch *et al.*, 2020). Les patients dystrophiques sont néanmoins concernés par un risque opératoire élevé sous anesthésie générale en raison de l'atteinte cardiaque et de la faiblesse respiratoire. Certains anesthésiques volatiles curares dépolarisants ou halogénés comme la succinylcholine ou l'isoflurane présentent un risque léthal pour les patients dystrophiques. Ils sont à proscrire, pour éviter des risques de rhabdomyolyse (dégradation du tissu musculaire), d'hyperkaliémie (excès de potassium sanguin), et d'évènements d'hyperthermie maligne (Bamaga *et al.*, 2016; Segura *et al.*, 2013).

La prise en charge de la fonction respiratoire

Les patients DMD souffrent de complications respiratoires (Messina and Vita, 2018). Parmi elles, on retrouve l'obstruction des voies respiratoires par du mucus, la fatigue des muscles thoraciques exacerbée par les toux, et l'atélectasie (affaissement de tout ou partie des poumons lorsque les bronches et bronchioles se bouchent). La prise continue de corticostéroïdes et la présence abondante de mucus favorise les infections pulmonaires chez les patients. La nuit, ils peuvent également subir des épisodes d'apnée du sommeil (Bushby *et al.*, 2010b). L'ensemble de ces phénomènes induit un risque d'hypoxie du patient.

Afin de prévenir les infections pulmonaires, les jeunes patients suivent un schéma vaccinal complet contre les pneumocoques et le virus influenza (Birnkranz *et al.*, 2018a). Des études ont montré qu'un placement anticipé des patients sous assistance respiratoire nocturne non-invasive corrèle avec une augmentation de l'espérance de vie ainsi que de la qualité de vie des patients (Eagle *et al.*, 2002; Ishikawa *et al.*, 2011). Lorsque l'atteinte respiratoire s'aggrave, l'assistance respiratoire non invasive peut être prolongée en journée et, dans les derniers stades de la maladie, la trachéotomie est proposée lorsque les méthodes non invasives ne suffisent plus et que les patients sont trop gênés par leur toux et les sécrétions muqueuses obstruant leurs voies respiratoires (Birnkranz *et al.*, 2018b).

Depuis la mise en place de la prise en charge respiratoire des patients avec les systèmes d'assistance respiratoire, les patients ont gagné environ 10 ans d'espérance de vie (Landfeldt *et al.*, 2020).

La gestion de la fonction nutritionnelle

Les patients DMD souffrent également de complications gastro-intestinales et nutritionnelles en lien avec le passage en fauteuil, impliquant une immobilité et une baisse de la dépense énergétique (Shimizu-Fujiwara *et al.*, 2012). Parmi celles rencontrées, on peut citer : la prise ou la perte de poids, un déséquilibre hydrique, un dysfonctionnement de la déglutition avec des contractures mandibulaires et surtout un ralentissement du transit digestif (van Bruggen *et al.*, 2015). A un stade avancé de la maladie, les patients se voient proposer une gastrostomie afin de faciliter la prise alimentaire impactée par les dysphagies (Birnkrant *et al.*, 2018a; Venugopal and Pavlakis, 2021)

La prise en charge psychologique

Suite au diagnostic, les patients et leur famille sont également à prendre en charge sur le plan psychologique tout au long de la vie du patient. Les patients DMD vivent désormais jusqu'à l'âge adulte et sont de mieux en mieux adaptés au monde qui les entoure en menant une vie indépendante et productive en ayant un emploi et un logement propre. Néanmoins, l'adaptation à une maladie de dégénérescence progressive nécessite d'avoir des compétences d'adaptation, de compréhension et un soutien émotionnel continu (Birnkrant *et al.*, 2018c).

L'absence de dystrophine, ou l'absence de certaines isoformes neuronales peut également impacter le développement cognitif des patients, ce qui peut jouer un rôle sur l'apprentissage émotionnel ou social des patients DMD. Ces aspects peuvent aussi être exacerbés par les effets secondaires du traitement stéroïdien. Les troubles psychosociaux ne sont pas l'apanage des patients DMD et concernent de manière générale, beaucoup d'autres maladies chroniques. Parmi les difficultés rencontrées par les patients DMD, certaines sont d'origine biologique et dépendent de compétences cognitives, comme la réciprocité sociale et la discrimination affective. Par ailleurs, les limitations physiques peuvent induire un isolement social, et un accès réduit aux activités culturelles. Les difficultés de prise de parole peuvent progressivement devenir source de stress et d'anxiété chez les patients (Birnkrant *et al.*, 2018a;

Bushby *et al.*, 2010a). Le bilan cognitif du patient est réalisé par un spécialiste neuropsychologue qui accompagne une prise en charge cognitive ciblée. Les mesures adoptées visent à aider les patients à atteindre les niveaux d'éducation souhaités et pour ceux qui le peuvent, trouver des emplois et des logements ainsi qu'à rendre leur vie la plus autonome possible.

Bien qu'ils aient conscience de leur situation et de leur espérance de vie réduite, les patients dystrophiques sont perçus comme heureux et en bonne santé par leur personnel soignant. Le test HRQOL, pour Health-Related Quality of Life, est un questionnaire de santé physique et mentale perçues par un individu au fil du temps. Il a été proposé à une cohorte de plus de sept-cent patients DMD à travers l'Europe afin d'évaluer leur perception de leur état pathologique. Il en a résulté que les scores des patients dystrophiques ne sont que substantiellement altérés par rapport aux valeurs de référence de la population générale. Bien que les valeurs décroissent avec la progression de la maladie, et les différentes étapes de perte de la marche et de la mise sous assistance respiratoire, la majorité des enfants et adultes dystrophiques se considèrent heureux et en bonne santé. Les parents interrogés sur ce même test à propos de leurs enfants obtiennent des résultats plus faibles, indiquant qu'ils sous-évaluent la qualité de vie de leurs enfants par rapport à ceux-ci (Landfeldt *et al.*, 2016). De plus, le taux accru de dépression chez les parents d'enfants atteints par la DMD souligne la nécessité d'une évaluation et d'une prise en charge de toute la famille (Bushby *et al.*, 2010a; Kinnett *et al.*, 2015).

II. Les pistes thérapeutiques

A. Les thérapies pharmacologiques

Outre les traitements anti-inflammatoires et ceux pour réduire l'atteinte cardiaque faisant partie de la prise en charge présentée ci-dessus, de nombreuses molécules ont été ou sont encore à l'essai pour traiter la DMD. Elles sont notamment destinées à la prise en charge du stress oxydatif, des dérégulations calciques, de la fonte musculaire, de la réduction de la fibrose, de l'atteinte cardiaque ou de la mutation du gène de la dystrophine.

Le stress oxydatif

Le stress oxydatif, résultant des dommages moléculaires et cellulaires causés par les ROS, joue un rôle inflammatoire et de vieillissement prématuré de l'organisme. Chez les patients DMD, bien que le métabolisme oxydatif mitochondrial soit diminué, les muscles montrent une plus grande susceptibilité au stress oxydant par rapport à des muscles sains. Le stress oxydatif accentue les dégâts mitochondriaux, membranaires et cellulaires induisant l'apoptose des cellules. Il exacerbe également l'inflammation et la nécrose des tissus (Brennan *et al.*, 1995; Disatnik *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2013; Haycock *et al.*, 1996; Jongpipitvanich *et al.*, 2005; Rando *et al.*, 1998). Une molécule antioxydante, l'ubiquinol, analogue du coenzyme Q10, a été testé pendant plus de dix ans dans deux essais cliniques, Sideros et Sideros-E, par le laboratoire Santhera Pharmaceuticals. L'objectif était de protéger les membranes mitochondriales du stress oxydatif. Si les premiers résultats avaient montré que la prise d'ubiquinol était bien tolérée et associée à une certaine amélioration de la fonction respiratoire des patients, tous les essais ont été récemment arrêtés en raison d'une efficacité insuffisante de l'ubiquinol sur la capacité vitale forcée (indicateur spirométrique de la capacité pulmonaire) (Buyse *et al.*, 2009, 2011, 2013; Servais *et al.*, 2020).

La fonte musculaire

Des stratégies thérapeutiques sont actuellement à l'étude, afin de limiter la fonte musculaire. Parmi elles, on peut citer la stratégie d'inhibition de la myostatine, facteur de croissance de la famille des TGF- β (Transforming Growth Factor- β). La myostatine limite la croissance musculaire lorsqu'elle se fixe à son récepteur cellulaire (ActRII). Certaines espèces animales comme les vaches Piémontaises ont naturellement une inactivation mono ou dizygote du gène *mstn* codant pour la myostatine, ce qui entraîne une hypertrophie musculaire (Wheeler *et al.*, 2001). D'autre part, une espèce de porc a été génétiquement modifiée pour générer des animaux beaucoup plus musclés, dans un objectif agro-alimentaire (Cyranski, 2015; Kambadur *et al.*, 1997).

Pour réduire la fonte musculaire, un modèle de souris a été généré portant une mutation sur le gène de la myostatine (Zimmers *et al.*, 2002). Ce modèle présente une augmentation de sa masse musculaire mais développe également une hypertrophie cardiaque.

Un croisement a été réalisé entre ces souris et les souris *mdx*, modèle de souris pour la DMD humaine (Wagner *et al.*, 2002). Chez ces souris, il a été observé une amélioration du phénotype dystrophique mais sans impact sur la fonction cardiaque. L'inhibition de la myostatine chez les souris *mdx* ne prévenait pas la dégénérescence musculaire, mais réduisait la fibrose et améliorait la capacité de régénération du tissu musculaire (Wagner *et al.*, 2002).

C'est dans cette logique qu'ont été réalisés différents essais cliniques. En 2010 notamment, un essai clinique destiné à tester l'injection systémique du récepteur soluble de la myostatine (sActRIIB-Fc) a été initié (Amthor, 2015). L'essai a été rapidement suspendu après avoir constaté un effet vasodilatateur et des saignements muqueux importants (NCT01099761). En 2017, un essai clinique de phase II/III (NCT03039686) portant sur l'administration de l'adnectin, un anticorps anti-myostatine, a été arrêté sans explication à ce jour (communiqué de Roche et Genentech Global Duchenne Team du 06/11/2019). Ce traitement avait été testé dans un essai clinique de phase I/II (NCT02515669) en montrant une bonne tolérance du produit, avec une tendance à l'augmentation de la masse musculaire et de la capacité contractile du muscle chez les patients DMD traités (Nielsen *et al.*, 2021).

Dans le traitement de la DMD et de la DMB, une autre approche concernant la follistatine, inhibiteur naturel de la myostatine a été l'objet d'un essai clinique pharmacologique. Il visait à augmenter la transcription de la follistatine grâce à la molécule givinostat, un inhibiteur d'histone acétylase (Bettica *et al.*, 2016; Giovarelli *et al.*, 2021; Shawi *et al.*, 2016). Il a permis une amélioration de la régénération musculaire associée à une réduction de la fibrose et de l'inflammation chez la souris, il est testé en clinique pour la DMD et la DMB (Consalvi *et al.*, 2013). Deux essais cliniques de phase II/III et de phase III sont actuellement en cours (respectivement NCT03373968 et NCT02851797). La piste de la follistatine est également l'objet de stratégie de thérapie génique (voir paragraphe 4 « Les thérapies géniques pour compenser l'absence de dystrophine », page 65).

Depuis, des études ont montré que l'ensemble de la voie de la myostatine était sous-exprimée chez patients DMD, tant au niveau génétique que protéique (Mariot *et al.*, 2017, 2020). Cette sous-expression ne serait pas le reflet de la fonte musculaire mais bien l'altération de la régulation de la myostatine par le tissu malade. Cela expliquerait la faible efficacité des traitements ciblant la myostatine pour lutter contre la DMD.

La réduction de la fibrose

Un enjeu majeur dans les thérapies de la DMD est la réduction de la fibrose se formant en remplacement du muscle suite aux processus de nécrose. De nombreuses molécules déjà commercialisées, dont les mécanismes moléculaires sont mieux compris aujourd'hui et sont réemployées afin de traiter d'autres pathologies, notamment la DMD. C'est le cas pour le tamoxifène, un modulateur des récepteurs œstrogènes, très employé pour le traitement des cancers du sein hormono-dépendants. Testé sur le modèle de souris *mdx5cv*, un traitement au tamoxifène induit une amélioration de la structure et de la fonction musculaire avec une diminution de la fibrose (Dorchies *et al.*, 2013; Farrar and Jacobs, 2021). Le tamoxifène a fait l'objet d'un essai clinique de phase I (NCT02835079), dont les résultats encourageants ont permis de démarrer un essai clinique de phase III débuté en juin 2018 TAMDMD (NCT03354039) (Dorchies and Brignol, 2019; Tsabari *et al.*, 2021).

La molécule simvastatine initialement indiquée, entre autres, pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale, est également envisagée pour le traitement de la DMD. Molécule inhibitrice de l'enzyme hydroxyméthylglutaryl CoA réductase, impliquée dans la synthèse du cholestérol, la simvastatine est aussi connue pour réduire l'inflammation, le stress oxydatif et la fibrose (Schönbeck and Libby, 2004). L'étude d'un traitement par cette molécule chez la souris *mdx*, a mis en évidence une amélioration de la fonction musculaire par réduction de l'inflammation, de la fibrose et du stress oxydatif (Whitehead *et al.*, 2015). Une étude plus poussée a également permis de mettre en évidence une amélioration de la fonction cardiaque grâce à la simvastatine dans le même modèle dystrophique (Kim *et al.*, 2019). Plus récemment une étude a remis en question ces résultats (Verhaart *et al.*, 2021). Les résultats ont montré qu'aucun bénéfice de traitement à la simvastatine n'était observé chez la souris *mdx*.

L'atteinte cardiaque

L'un des défis dans l'étude des paramètres cardiologiques dans la DMD est la nécessité d'un recul de plusieurs années pour observer une potentielle efficacité dû à l'impact du remodelage tissulaire cardiaque sur les paramètres mesurés (Vitiello *et al.*, 2019). On peut cependant citer l'étude de l'inhibition des minéralocorticoïdes endogènes, responsables de l'augmentation de la postcharge, et de l'activation des voies pro-fibrotiques et donc participant

à la dégradation de la fonction cardiaque chez les patients dystrophiques (Vitiello *et al.*, 2019). Il a été montré que des molécules antagonistes aux minéralocorticoïdes comme la spironolactone et l'éplérénone, permettent une amélioration de la fonction ventriculaire chez des patients traités lors d'essais cliniques (NCT02354352 et NCT01521546) (Rafael-Fortney *et al.*, 2011; Raman *et al.*, 2015, 2019).

Les mutations du gène de la dystrophine

Chez les patients DMD, 10 à 15% des patients DMD présentent des mutations non-sens (voir illustration Figure 8). Dans ce contexte, des stratégies pharmacologiques visant la translecture des codons stops prématurés sont testées. Le principe consiste à forcer le complexe ribosomique, grâce à des molécules aminoglycosides, à lire « à travers » le codon stop en ajoutant un acide aminé de manière aléatoire (Dabrowski *et al.*, 2018). Un médicament de ce type, l'ataluren (Translarna™), développé par PTC Therapeutics possède une AMM conditionnelle en Europe. Identifié par screening moléculaire, l'agent chimique alors nommé PTC124 permet une translecture efficace des codons stops prématurés sans cibler les codons stops normaux, avec une bonne tolérance chez la souris *mdx* (Welch *et al.*, 2007). Plusieurs essais cliniques ont été menés par la suite en montrant une bonne tolérance de l'organisme à la molécule, une augmentation de l'expression de la dystrophine, une amélioration du test de marche de six minutes et un ralentissement de la dégénérescence musculaire (Finkel *et al.*, 2013). Ces résultats ont mené à une AMM conditionnelle en Europe, réservant la prescription aux jeunes patients DMD de moins de cinq ans dans le contexte d'une mutation non-sens du gène de la dystrophine. Aux États-Unis, la Food and Drug Administration (FDA) n'a cependant pas autorisé la mise sur le marché de la molécule, ne considérant pas son efficacité suffisante. Un essai clinique de phase III regroupant 230 patients a été mené suite aux exigences de l'AMM conditionnelle et les résultats n'ont pas permis de confirmer l'efficacité de l'ataluren par rapport au placebo chez les patients traités (McDonald *et al.*, 2017). L'agence européenne du médicament a malgré tout prolongé l'AMM conditionnelle jusqu'en septembre 2021 en l'étendant également aux patients dès l'âge de 2 ans, avec une demande de nouvelles études d'efficacité. D'autres essais cliniques sont donc actuellement menés dont un essai international (NCT02369731) mené dans plus de 70 centres internationaux. Ces études vont permettre d'affiner l'étude de l'efficacité de la molécule, notamment sur le potentiel prolongement de

l'ambulation des patients et le niveau d'expression de la dystrophine obtenu (NCT03648827) (Mercuri *et al.*, 2020).

B. La thérapie cellulaire

Toujours dans le but de faire exprimer une dystrophine dans les fibres musculaires des patients DMD, des travaux étudient la possibilité de traiter les patients par thérapie cellulaire. Pour introduire ces principes thérapeutiques, il est important de présenter le processus de régénération cellulaire du muscle.

Lors de lésions des fibres musculaires, qu'il s'agisse de dommages liés à un exercice physique ou liés à une condition pathologique particulière, le processus de régénération recrute différents types cellulaires (Chal and Pourquié, 2017; Dueweke *et al.*, 2017). Il s'agit de cellules souches satellites quiescentes naturellement présentes dans le tissu musculaire, de fibroblastes et de cellules du système immunitaire. Dans les premières étapes du processus de régénération, les noyaux des fibres musculaires squelettiques jouent un rôle important sur le contrôle de la fonction des fibres musculaires (Dueweke *et al.*, 2017). Suite à la lésion d'une fibre musculaire, les noyaux de la zone endommagée subissent souvent une apoptose. L'incapacité à remplacer les noyaux perdus lors de la lésion peut expliquer une partie de l'atrophie persistante, souvent observée dans les muscles ayant subi des lésions modérées à graves (Biral *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). La population de cellules souches satellites musculaires au stade myoblaste fournit une source de nouveaux noyaux en fusionnant avec les fibres musculaires lésées (Hawke and Garry, 2001). Les cellules satellites résident dans un espace entre le sarcolemme et la membrane basale et existent dans un état de quiescence. En réponse à une blessure, les cellules satellites s'activent, migrent vers le site de la lésion, prolifèrent et fusionnent en structures appelées myotubes. Puis elles fusionnent avec la fibre lésée pour repeupler les noyaux perdus (Hawke and Garry, 2001). Lors de cette activation, un pool de cellules satellites se forme pour revenir en quiescence, permettant de faire face aux prochaines lésions potentielles. Ces cellules souches jouent également un rôle important dans la régulation de l'activité des fibroblastes, qui sont principalement responsables de la synthèse et du remodelage de la matrice extracellulaire (Murphy *et al.*, 2011).

La thérapie cellulaire est basée sur la transplantation hétérologue ou autologue de cellules, dans le but de régénérer le tissu ou l'organe endommagé du patient, ou de reconstituer des populations spécifiques de cellules (Sun *et al.*, 2020a). Plusieurs stratégies sont actuellement étudiées afin de transplanter, chez les patients DMD, des cellules capables de venir fusionner avec les fibres musculaires. Ces cellules issues d'un individu sain, hétérologues, ou autologues corrigées avant transplantation, viendraient apporter des noyaux contenant du matériel génétique sain, et donc une version fonctionnelle du gène de la dystrophine capable de s'exprimer chez les patients.

La première transplantation expérimentale de myoblastes remonte à 1989, lorsque ces essais ont été effectués sur la souris *mdx* (Morgan *et al.*, 1990; Partridge *et al.*, 1989). Les travaux chez l'homme et la souris ont montré que les myoblastes humains ou murins normaux injectés en intramusculaire forment des fibres musculaires positives à la dystrophine, avec la reconstitution partielle d'une morphologie musculaire normale (Gussoni *et al.*, 1992; Huard *et al.*, 1992; Kinoshita *et al.*, 1994). Cependant, les taux de fibre musculaire exprimant la dystrophine étaient assez faibles : 0-5% (Karpati *et al.*, 1993), 0-10,3% (Mendell *et al.*, 1995), 0-3,6% (Tremblay *et al.*, 1993), 0% (Morandi *et al.*, 1995), 0-80% (Huard *et al.*, 1992). Une seule étude a été translatée en essai clinique, essai au cours duquel les patients DMD ayant reçu les myoblastes humains hétérologues et partiellement immunocompatibles, n'ont montré aucune amélioration fonctionnelle du membre transplanté. Ces résultats ont été expliqués par un rejet immunitaire des cellules, par le nombre limité et la faible migration des cellules injectées, et par la mort massive des cellules après transplantation (Skuk and Tremblay, 2003).

Par la suite, plusieurs études ont testé la transplantation de myoblastes provenant de donneurs sains chez le patient DMD, par injection intramusculaire (Skuk *et al.*, 2004, 2006, 2007). Il a été montré que les cellules transplantées s'étaient bien intégrées au muscle, en exprimant de la dystrophine, mais ne s'étaient pas disséminées au-delà de la zone d'injection, ce qui ne permettait pas une analyse fonctionnelle des patients injectés. Un essai clinique canadien de phase I/II du CHU de Québec-Université Laval est en cours avec pour objectif de tester la transplantation intramusculaire de myoblastes de donneurs sains dans un muscle du bras (*extensor carpi radialis*) de patients DMD (NCT02196467).

D'autres essais cliniques ciblant la cardiomyopathie des patients, sont menés par la société Capricor Therapeutics aux États-Unis. Ces essais de phase 1 et 2 sont basés sur la transplantation de cellules souches cardiaques allogéniques, provenant de donneurs sains, et appelées CAP-1002 (NCT02485938 et NCT03406780). Des essais précliniques avaient démontré les propriétés anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et régénératrices de ces cellules (Tseliou *et al.*, 2013), avec une amélioration de la fonction cardiaque lors de leur administration chez la souris *mdx* de 6 mois. Les patients semblent présenter une bonne tolérance des cellules transplantées. Les premiers résultats indiqueraient une amélioration de la fonction cardiaque avec une fibrose significativement diminuée et une amélioration de la fonction musculaire squelettique (Taylor *et al.*, 2019). Une extension de ces essais est en cours (NCT04428476) et l'essai de phase 3 va bientôt débiter (NCT05126758).

D'autres populations de cellules à potentiel myogénique sont testées comme les cellules mésangioblastes (Benedetti *et al.*, 2018; Cossu *et al.*, 2015; Serena *et al.*, 2016). Ces cellules sont une sous-population des cellules péricyaires que l'on trouve généralement autour des capillaires sanguins dans les muscles squelettiques et les tissus adipeux des mammifères adultes (Dellavalle *et al.*, 2007; Tedesco *et al.*, 2017). Elles présentent un intérêt particulier car elles peuvent se différencier en muscle squelettique, muscle lisse, adipocytes ou ostéocytes en fonction de la voie de signalisation (Quattrocchi *et al.*, 2012). Un intérêt particulier est porté à ces cellules en raison de leur capacité à traverser la paroi des vaisseaux sanguins pour atteindre les muscles, ce qui pourrait permettre une utilisation systémique potentielle (Bonfanti *et al.*, 2015). Un essai clinique italien de phase I/II a été lancé en 2011 (Eudract 2011-000176-33). Ce projet a tout d'abord permis de montrer qu'il était techniquement possible d'injecter des centaines de millions de cellules souches hématopoïétiques dans la circulation artérielle périphérique de patients pédiatriques (Cossu *et al.*, 2015). Un évènement d'effet secondaire grave est survenu chez un patient qui a été victime d'un accident vasculaire cérébral, dont la cause est incertaine. Bien que l'étude n'ait pas été conçue afin d'évaluer l'efficacité du traitement, mais sa sécurité, chez les deux patients DMD les plus jeunes, il a été observé des améliorations cliniques comme une diminution de la fréquence des chutes et une amélioration de la marche.

Une autre stratégie thérapeutique, consistant à la transplantation d'un type particulier de cellules souches dérivées du muscle, est également à l'étude. Découvertes chez le chien et retrouvées également chez l'homme, ces cellules ont été appelées cellules MuStem (Muscle-derived Stem cell). Cette technique est en cours de développement pour être évaluée en clinique (Lorant *et al.*, 2018a, 2018b; Rouger *et al.*, 2011).

Le principal avantage des thérapies cellulaires est de permettre l'expression d'une protéine dystrophine complète dans les muscles de patients myopathes. Cependant cette expression est dépendante du nombre de cellules transplantées qui réussissent à fusionner dans les fibres musculaires pour exprimer la dystrophine. Grâce à la thérapie génique, l'ensemble des noyaux des fibres musculaires pourraient être ciblés par des vecteurs transportant un gène médicament codant pour une dystrophine.

C. La thérapie génique

L'étude et le développement de thérapies géniques est le principal sujet d'étude du laboratoire TaRGet (Translational Research in Gene Therapy, UMR Inserm 1089, INSERM et Nantes Université). Les projets de recherche portés par Caroline Le Guiner et Bodvaël Fraysse sont plus particulièrement focalisés sur la thérapie génique à l'aide de vecteurs AAVr (Adeno Associated Virus recombinant) pour la DMD.

L'Agence Européenne des Médicaments (EMA) définit un médicament de thérapie génique comme un médicament biologique remplissant les deux caractéristiques suivantes (Wirth *et al.*, 2013) :

- Il contient une substance active qui contient ou consiste en un acide nucléique recombinant utilisé ou administré à l'être humain en vue de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique endogène.
- Son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique est directement lié à la séquence d'acides nucléiques recombinants qu'il contient, ou au produit d'expression génétique de cette séquence.

La FDA aux États-Unis définit les produits de thérapie génique comme des produits « qui agissent via la transcription et/ou la traduction du matériel génétique transféré et/ou par

intégration dans le génome de l'hôte et qui sont administrés sous forme d'acides nucléiques, de virus ou microorganismes génétiquement modifiés. Les produits peuvent être utilisés pour modifier des cellules *in vivo* ou transférés sur des cellules *ex vivo* avant administration au patient » (Wirth *et al.*, 2013).

A l'heure actuelle, plus de trois mille essais cliniques de thérapies géniques ont été approuvés (<http://www.abedia.com/wiley/index.html>). Le cancer est la maladie la plus largement ciblée par les thérapies géniques avec près de 70% des essais cliniques concernés dans le monde, suivi par les maladies monogéniques et les maladies cardiovasculaires (<http://www.abedia.com/wiley/index.html>). Bien que de nombreux types de vecteurs soient employés, qu'il s'agisse de vecteurs viraux ou chimiques (tel les nanoparticules et polymères), ici ne seront abordés que les vecteurs viraux de type AAV, majoritairement utilisés aujourd'hui dans le développement des stratégies thérapeutiques de la DMD.

1. Les vecteurs AAV

Les virus AAV (Adéno-Associated Virus), sous leur forme sauvage, sont de petits virus non enveloppés possédant un ADN simple brin d'environ 4,7kb (Naso *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2010). Cet ADN a la particularité de contenir 3 cadres ouverts de lecture (ORF, Open Reading Frame). Il code pour quatre protéines nécessaires à la réplication du virus (Rep78, 68, 52, et 40), pour trois protéines de structure de la capsid (VP1, VP2 et VP3) ainsi que la protéine AAP (Assembly-Activating Protein), participant à l'assemblage de la capsid (Balakrishnan and Jayandharan, 2014). De part et d'autre de ces gènes viraux se trouvent des régions palindromiques terminales inversées répétées dites ITR (Inverted Terminal Repeat) (Lusby *et al.*, 1980). Ces séquences permettent la formation de structures secondaires de l'ADN viral en forme d'épingle à cheveux aux extrémités 5' et 3'. Elles servent d'origines de réplifications indispensables à la synthèse du brin d'ADN complémentaire (Figure 10).

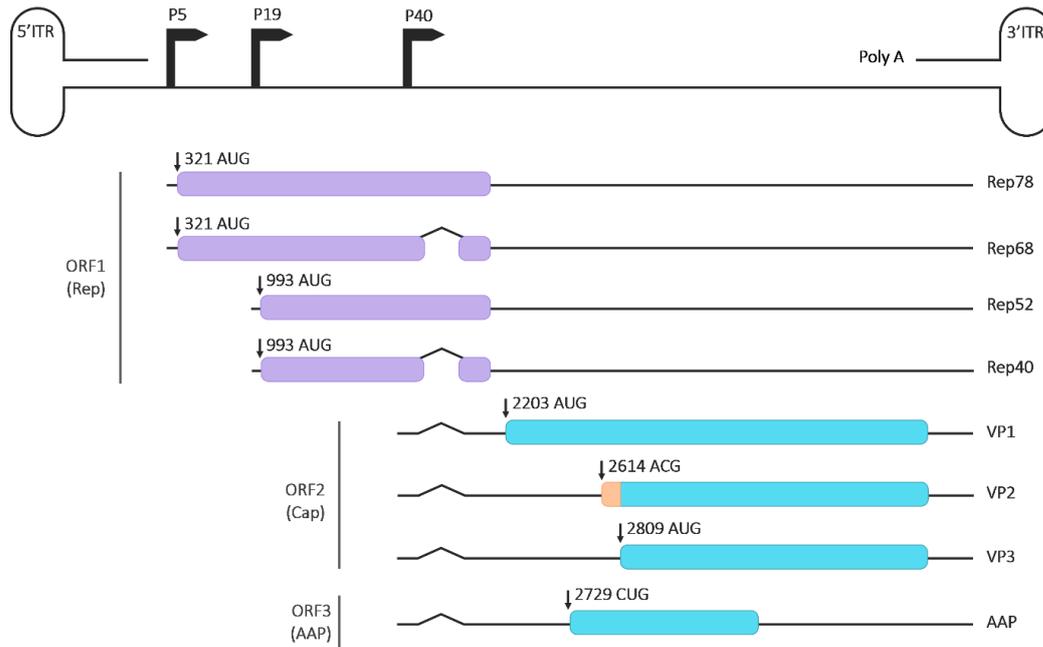


Figure 10: Schéma représentant le génome AAV sauvage.

Les 2 ITR de l'AAV encadrent les 3 cadres de lecture ORF. L'ORF1 permet la lecture du gène REP, codant pour 4 protéines : Rep78 et Rep68 sous le contrôle du promoteur P5, et Rep 52 avec Rep 40 dépendants de P19. L'ORF2 permet la lecture du gène Cap, transcrit à partir du promoteur P40 et codant pour les protéines de capsid VP1, VP2 et VP3. L'ORF3, cadre alternatif de lecture permet la production d'AAP. Adapté de Balakrishnan and Jayandharan, 2014.

Les virus AAV font partie de la famille des *Parvoviridae* du genre *Dependovirus*, c'est-à-dire que leur réplication est dépendante de la co-infection par un autre virus, dit « helper », tel que l'adénovirus, ou l'herpèsvirus, par exemple. Les virus AAV sont capables de transduire des cellules quiescentes ainsi que des cellules en division (Shupe *et al.*, 2022). De plus ce sont des virus dits non-intégratifs, c'est-à-dire que le génome viral ne s'intègre pas dans le matériel génétique de la cellule hôte. Des études ont montré que le matériel génétique des vecteurs AAVr persistait sous forme de chromatine épisomale circulaire, permettant son expression à long terme dans les cellules cibles (Clark and Penaud-Budloo, 2011; Penaud-Budloo *et al.*, 2008). Cependant, des cas d'intégration du matériel génétique de l'AAV sauvage ont déjà été décrits. Chez l'homme, un locus du chromosome 19, a été décrit pour être un site d'intégration non homologue du génome AAV sauvage (Kotin *et al.*, 1992). Bien qu'il ait longtemps été admis que les virus AAV n'étaient associés à aucune pathologie humaine, des études ont rapporté des cas d'intégration du génome de l'AAV (de sérotype 2) dans quelques cas d'hépatocarcinomes humains (Bijlani *et al.*, 2022; Nault *et al.*, 2015). Chez ces patients qui ne présentaient pas de facteur de risque connu, les intégrations localisées dans des oncogènes ont conduit à une

surexpression des gènes cibles, remettant en question l'absence de pathogénicité de l'AAV (Nault *et al.*, 2015).

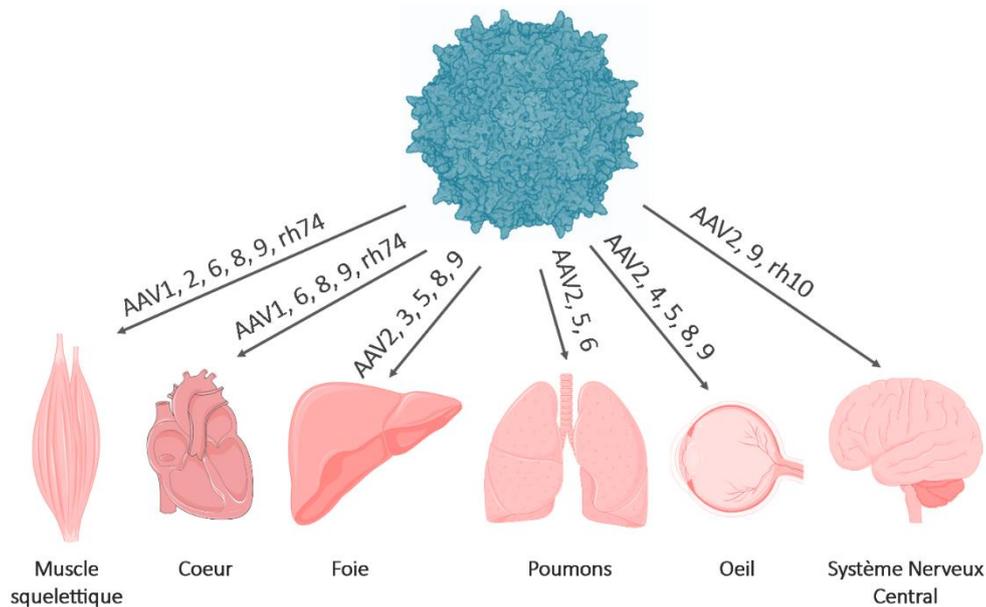


Figure 11 : Illustration du tropisme des différents sérotypes AAV envers les principaux organes chez l'homme.
Adapté de Li and Samulski, 2020, Srivastava, 2016, et Manini *et al.*, 2022.

Plus de cents sérotypes naturels d'AAV ont été identifiés à ce jour, dont une dizaine sont particulièrement étudiés dans le cadre de la thérapie génique (Pillay *et al.*, 2017). Les différents sérotypes d'AAV se distinguent par la séquence de leurs protéines VP, influant sur la composition protéique de leur capsid (Li and Samulski, 2020; Manini *et al.*, 2022; Pillay *et al.*, 2017; Srivastava, 2016). Cette dernière influe directement sur leur tropisme, c'est-à-dire leur capacité à infecter préférentiellement un type cellulaire. Il s'avère très important de choisir un sérotype adapté lors de la conception d'une thérapie génique afin d'optimiser la distribution du vecteur dans l'organe cible et ainsi de potentialiser la transduction tout en limitant les effets secondaires et les réactions du système immunitaire. L'efficacité des différents sérotypes varie entre les tissus (Figure 11). Il peut également varier entre les espèces et en fonction du mode d'administration (Srivastava, 2016).

Découvert à l'origine par accident dans une préparation d'adénovirus simien (Atchison *et al.*, 1965), les virus AAV sont également retrouvés chez l'homme (Blacklow *et al.*, 1967). C'est 19 ans plus tard, en 1984 qu'un AAV a été vectorisé pour la première fois, et appelé AAVr à des fins de transferts de gènes (Hermonat and Muzyczka, 1984). La vectorisation du virus consiste

au retrait du matériel génétique viral, à l'exception des séquences ITR, qui est remplacé par le gène médicament (Figure 12). Ce vecteur viral a été utilisé 11 ans plus tard (en 1995) pour la première fois chez un patient atteint de mucoviscidose (Flotte *et al.*, 1996). Plusieurs essais cliniques pour d'autres maladies monogéniques ont suivi (Mendell *et al.*, 2021). Et c'est en 2012 que l'EMA a approuvé le premier médicament de thérapie génique utilisant l'AAVr, le Glybera, indiqué dans le traitement du déficit en lipoprotéine lipase (Ylä-Herttuala, 2012). Le Glybera a été retiré du marché récemment en raison du faible nombre de patients mais aussi de son prix très élevé (un million de dollars). Il a été suivi par l'approbation du Luxturna par la FDA en 2017 pour le traitement de l'Amaurose Congénitale de Leber, une maladie rétinienne héréditaire (Miraldi Utz *et al.*, 2018), et en 2019 par l'approbation du Zolgensma par la FDA pour le traitement de l'amyotrophie spinale de type 1 (Hoy, 2019).

Pour le traitement de la DMD chez l'homme, l'ensemble des muscles squelettiques du corps et le cœur doivent être ciblés par le vecteur AAVr pour espérer un bénéfice thérapeutique. Bien que les spécificités de tropisme des vecteurs AAVr chez l'homme soient encore peu connues, elles sont étudiées sur de nombreux modèles cellulaires et animaux (Manini *et al.*, 2022). Les sérotypes AAV6 (Blankinship *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2010), AAV8 (Gao *et al.*, 2002; Nakai *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005), AAV9 (Mendell *et al.*, 2017; Pacak *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2011; Zincarelli *et al.*, 2008) et l'AAVrh74 (Mendell *et al.*, 2020; Rodino-Klapac *et al.*, 2007) ont été montrés comme particulièrement efficaces pour transduire les différents types de muscles, et cibler les maladies musculaires impliquant le cœur et le diaphragme (Figure 11). Le sérotype AAV9 a notamment été choisi pour deux essais cliniques de thérapie géniques de la DMD, celui de Pfizer (PF-06939926) et celui de Solid Biosciences (SGT-001). Le sérotype AAVrh74 a été choisi quant à lui pour les essais cliniques de Sarepta (SRP-9001) et le sérotype AAV8 pour l'essai de Généthon (GNT 0004) (voir paragraphe « La thérapie génique AAV-microdystrophine », page 69).

2. Les méthodes de production

Le vecteur recombinant AAVr est obtenu en modifiant le génome de l'AAV. Les gènes Rep et Cap de l'AAV sont remplacés par la cassette d'expression contenant le gène médicament (transgène). Les ITR du génome de l'AAV sont par contre conservés de part et d'autre de la

cassette d'expression (Figure 12). Ces derniers sont nécessaires à la réplication et l'encapsidation du génome dans les cellules lors de la production de vecteur AAVr, puis à la circularisation du vecteur au sein des cellules transduites (Ayuso *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2005).

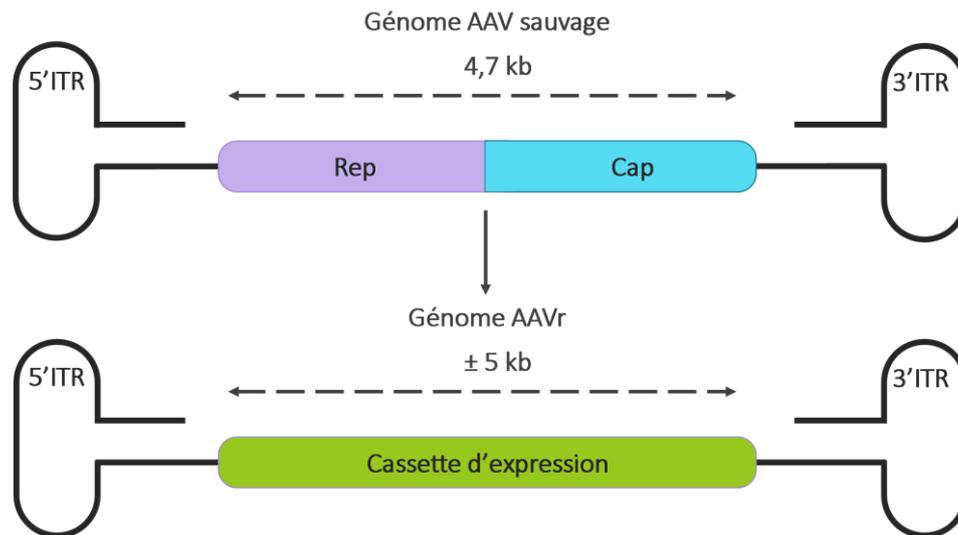


Figure 12 : Schéma représentant le génome AAV sauvage en comparaison du génome du vecteur AAV recombinant. Dans le matériel génétique de l'AAV, a été inséré la cassette d'expression thérapeutique, à la place des gènes Rep et Cap.

Plusieurs méthodes de production de vecteur AAVr existent. La plus communément utilisée est la méthode de co-transfection transitoire de deux à trois plasmides dans des cellules productrices HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) (Aponte-Ubillus *et al.*, 2018; Escandell *et al.*, 2022; Xiao *et al.*, 1998). Les plasmides co-transfétés sont constitués des éléments suivants, et sont représentés sur la Figure 13 :

- Un premier plasmide porte les gènes Rep et Cap du sérotype de vecteur AAV choisi. Ce sont les protéines traduites à partir du gène Cap qui déterminent le sérotype de l'AAVr produit.
- Le deuxième plasmide code pour la cassette d'expression à encapsider avec les ITR de part et d'autre. La plupart du temps, les ITR codés sont ceux de l'AAV2 en raison de leur facilité à être encapsidés dans les capsides d'autres sérotypes d'AAV.
- Le troisième plasmide code pour des gènes auxiliaires de l'adénovirus E4, E2a et VA RNA essentiels à la production du vecteur AAVr. Afin d'améliorer la co-

transfection de l'ensemble des éléments, les deux derniers plasmides peuvent être regroupés en un seul.

Cette méthode de transfection transitoire de plasmide dans des cellules humaines adhérentes a l'avantage d'être simple et flexible pour la recherche fondamentale et pour les essais préliminaires (Aponte-Ubillus *et al.*, 2018). Cependant, la culture en milieu adhérent limite la production à grande échelle de lots d'AAVr. Des travaux réalisés dans le but d'augmenter la quantité de vecteurs AAVr obtenus, ont permis de mettre au point des systèmes de culture de cellules HEK293 en suspension (Grieger *et al.*, 2016). Ces systèmes permettent la production en bioréacteurs et augmentent considérablement le rendement en vecteurs AAVr obtenu. L'utilisation du modèle de cellules d'insecte Sf9 permet également une production d'AAVr à grande échelle. Cette méthode nécessite l'utilisation de baculovirus recombinants portant les gènes Rep, Cap et la cassette d'expression du vecteur AAVr flanquée des ITR (Penaud-Budloo *et al.*, 2018; Virag *et al.*, 2009).

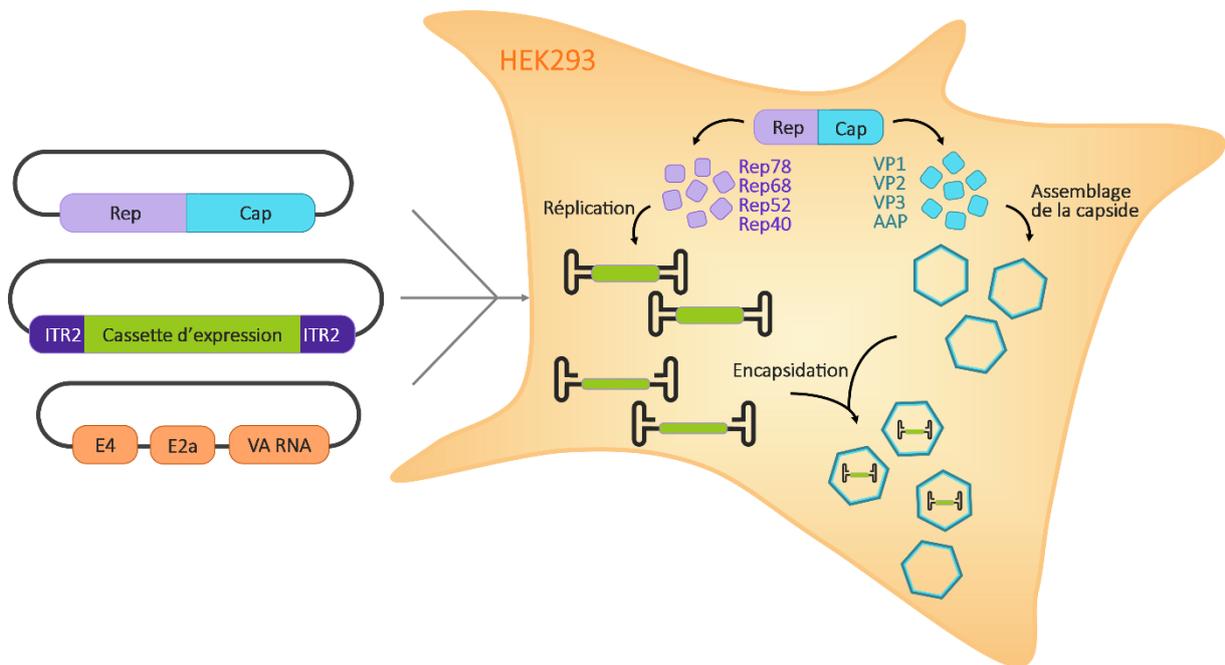


Figure 13: Illustration de la méthode de production de vecteurs AAVr en cellules HEK293 par co-transfection

Les deux à trois plasmides portant les gènes Rep, Cap, la cassette d'expression avec les ITR2 et les gènes auxiliaires E4, E2a et VA RNA sont co-transfectés en cellules HEK293. Les fonctions de complémentation de l'adénovirus, grâce aux gènes auxiliaires, permettent l'activation des phases du cycle de l'AAV. L'ADN polymérase des cellules HEK293 avec les protéines Rep permettent la réplication du génome portant la cassette d'expression et l'encapsidation dans les capsides vides formées par l'assemblage des protéines VP.

Les particules d'AAVr produites sont extraites par lyse des cellules productrices HEK293. Les débris cellulaires sont séparés des vecteurs par filtration ou centrifugation, puis purifiées classiquement par gradient de chlorure de césium ou d'iodixanol (Ayuso *et al.*, 2010; Sena-Esteves and Gao, 2020). La purification par gradient de césium présente l'avantage de permettre une séparation par différence de densité des particules AAVr vides ou pleines, alors que la purification par gradient d'iodixanol conserve davantage de particules vides. Lors de productions à grande échelle avec des critères de qualité de grade clinique, la purification est le plus souvent réalisée par des combinaisons de chromatographies par échange d'ions et d'affinité. Ces purifications ne permettent cependant pas de trier les particules AAVr pleines et vides, ce manque d'homogénéité du lot de vecteur AAVr peut en impacter l'efficacité. Les méthodes de production d'AAVr sont choisies également en fonction du grade de qualité recherché : grade recherche ou grade clinique répondant à différentes normes comme les BPF (Bonnes pratiques de Fabrication). Le lot d'AAVr produit est ensuite soumis à différentes analyses de « contrôle qualité » afin de déterminer notamment le titre, la pureté et l'infectiosité des vecteurs (Ayuso *et al.*, 2010).

3. Les limites des vecteurs AAVr en application thérapeutique

Aujourd'hui, on dénombre plus de cent-trente essais cliniques qui impliquent des thérapies par vecteurs AAVr (Au *et al.*, 2022) (Clinicaltrials.gov). Comme spécifié précédemment, trois médicaments de thérapies géniques par vecteur AAVr ont déjà obtenu une AMM. Les nombreux avantages que présente l'utilisation des vecteurs AAVr en thérapie génique, induisent une forte croissance des études et essais cliniques employant cette technologie (Au *et al.*, 2022). Il est d'ailleurs attendu que plus de cinquante essais cliniques s'achèvent au cours des trois prochaines années, dont plus de 80% d'essais de phase II ou plus. Cela permettra l'obtention d'avantage de données d'efficacité des vecteurs AAVr, et on l'espère plus de médicaments disponibles sur le marché pour les patients.

Il est cependant important de préciser que des limites existent quant à l'utilisation de ces vecteurs AAVr en thérapie génique. Elles sont notamment liées à la réponse immunitaire de l'organisme et à la capacité d'encapsulation de l'AAVr.

L'immunogénicité des vecteurs AAVr

D'une manière générale, il a été décrit que l'AAV était peu immunogène par rapport à d'autres virus comme l'adénovirus. Bien que les raisons ne soient pas complètement comprises, une hypothèse repose sur l'observation que certains AAV ne transduisent pas efficacement les cellules présentatrices d'antigène (Mays *et al.*, 2014). Malgré cela, les protéines de la capsid de l'AAVr ainsi que le transgène et produit du transgène peuvent déclencher des réactions immunitaires.

Le système immunitaire se compose des réponses immunitaires innées et adaptatives. Ces deux immunités sont étroitement liées mais médient des réactions humorales et cellulaires différentes (Grubbs and Kahwaji, 2022). La réponse immunitaire innée est rapide et non spécifique de l'agent immunogène, tandis que l'immunité adaptative est plus lente à se mettre en place et est spécifique. Cette réaction immunitaire fait notamment intervenir les lymphocytes B pour la réponse humorale et les lymphocytes T pour la réponse cellulaire. Suite à la primo-infection c'est la réponse adaptative du système immunitaire qui permet la mise en place de la mémoire immunitaire (Hook and Friedman, 2007).

Lors de l'entrée du vecteur AAVr dans l'organisme, la première réaction à se mettre en place est la réaction immunitaire innée (Dauletbekov *et al.*, 2019). Il a été montré que les particules AAVr pouvaient être détectées par des PRR (Pattern Recognition Receptors) comme les TLR (Toll-Like Receptor), et en particulier par le TLR2 qui reconnaît les glycoprotéines et lipoprotéines de capsid et par le TLR9 capable de détecter l'ADN double brin du vecteur (Vandamme *et al.*, 2017). Ces interactions seraient à l'origine de cascades cytokiniques comme avec l'interféron de type I, par exemple (Zhu *et al.*, 2009). Par ailleurs, des études ont montré qu'il y aurait une activation du système du complément dans la réponse immunitaire de l'hôte au vecteur AAVr, ce qui a notamment été observé dans au moins deux essais cliniques pour la DMD (Duan, 2018). Le type et l'étendue des mécanismes cellulaires et humoraux déployés fournissent des signaux pour le recrutement des acteurs de l'immunité adaptative, c'est-à-dire les lymphocytes B et T, ainsi que les cellules présentatrices d'antigène (Rogers *et al.*, 2011).

L'immunité adaptative survient après l'immunité innée et permet la reconnaissance spécifique de l'antigène et l'élimination des agents pathogènes, suivi de l'établissement de la

mémoire immunitaire. Lors de la primo-infection de l'hôte par le vecteur AAVr, les lymphocytes T et B s'activent après avoir reconnu un antigène présenté par les cellules présentatrices d'antigènes (Abbas, 2020). Il a été montré que les cellules transduites et les cellules présentatrices d'antigène présentent des épitopes immunogènes dérivés de la capsidie des vecteurs AAVr aux lymphocytes T CD8+ cytotoxiques via le CMH de classe I (Hui *et al.*, 2015; Mingozi *et al.*, 2007; Pien *et al.*, 2009; Rogers *et al.*, 2017). Les lymphocytes cytotoxiques sont ensuite activés et éliminent les cellules transduites, ce qui provoque une inflammation de l'organe ciblé et une diminution de la durée d'efficacité du vecteur AAVr (George *et al.*, 2017; Manno *et al.*, 2006; Nathwani *et al.*, 2011; Palaschak *et al.*, 2017). La première preuve de l'importance de la réponse cellulaire contre la capsidie de l'AAV a été obtenue lors d'un essai clinique pour l'hémophilie B. L'injection d'un AAV2-FIX a permis une expression transitoire du transgène qui s'est complètement éteinte ensuite (Manno *et al.*, 2006; Mingozi *et al.*, 2007). Cette perte d'expression du transgène corrélait avec une augmentation des transaminases hépatiques dans le sang, signifiant la destruction des hépatocytes transduits par les lymphocytes T cytotoxiques. En parallèle, la reconnaissance de ces épitopes dérivés de la capsidie, présentés par le CMH de classe II active les lymphocytes T CD4+ auxiliaires qui vont faciliter les réponses immunitaires humorales et cellulaires (Shirley *et al.*, 2020). Dans une certaine mesure, les résultats des essais cliniques suggèrent que l'immunogénicité du vecteur AAVr corrèle avec la dose de vecteurs AAVr injectés (Mingozi *et al.*, 2009; Nathwani *et al.*, 2011). Ainsi, une faible dose de vecteurs serait mieux « silencieuse » immunologiquement et favoriserait le maintien de l'expression du transgène. De la même manière que pour l'immunité anti-capsidie, le produit du transgène peut également être immunogène pour l'organisme hôte. La présentation d'épitopes du transgène, dans la mesure où il s'agit d'une protéine du « non-soi » pour le système immunitaire, peut induire une activation des lymphocytes et médier des réponses cytotoxiques et humorales délétères pour l'expression du transgène thérapeutique (Ashley *et al.*, 2019; Butterfield *et al.*, 2019; Herzog *et al.*, 2017; Hoffman *et al.*, 2011). Ce phénomène a d'ailleurs été observé dans un essai clinique de thérapie génique microdystrophine pour la DMD (Mendell *et al.*, 2010). Dans le but de limiter ces réactions néfastes pour le patient et le produit thérapeutique, les stratégies privilégiées consistent en (i) l'exclusion de patients présentant des mutations nulles avec absence complète de la protéine déficiente, et/ou (ii) l'administration transitoire de traitements pharmacologiques

immunosuppresseurs. Des molécules anti-inflammatoires stéroïdiennes comme la prednisolone permettent de limiter la réponse cellulaire anti-AAVr et prolongent l'expression du gène médicament (Basner-Tschakarjan and Mingozzi, 2014; Nathwani *et al.*, 2014).

De nombreuses études sont menées pour optimiser le transfert de gènes par vecteur AAVr dans le but de limiter les réactions du système immunitaire et préserver l'expression du transgène thérapeutique. Des pistes comme l'optimisation des protéines de la capsid sont notamment à l'étude pour augmenter l'efficacité de transduction, et ainsi à la fois réduire les doses thérapeutiques à injecter et échapper au système immunitaire (Li and Samulski, 2020).

Un autre obstacle immunitaire à prendre en considération dans les stratégies de thérapie génique par vecteur AAVr est l'immunité préexistante à l'AAV sauvage chez l'homme (Verdera *et al.*, 2020). Les AAV sauvages sont naturellement présents dans l'environnement et peuvent naturellement infecter l'homme. Ainsi, une partie de la population développe des anticorps et des facteurs neutralisants contre la capsid de l'AAV qui constituent l'immunité humorale préexistante aux AAV. Ces anticorps et facteurs neutralisants qui réagissent contre la capsid de l'AAV peuvent se lier aux protéines de capsid des vecteurs AAVr et les empêcher de transduire les cellules cibles. Ce phénomène limite considérablement l'efficacité du transfert de gènes. Les études de prévalence montrent qu'environ 80% de la population serait séropositive pour au moins un sérotype d'AAV (Verdera *et al.*, 2020). Il existerait cependant des variations importantes de la prévalence en fonction des différents sérotypes d'AAV, et des régions géographiques considérées (Verdera *et al.*, 2020). A l'heure actuelle, on estime que 30 à 60% de la population serait séropositive à l'AAV2 qui serait le sérotype affichant la plus forte prévalence. En raison de la forte homologie de séquence et homologie structurelle des capsides des différents sérotypes d'AAV, il existe une réactivité croisée des anticorps neutralisants. Ainsi, certains anticorps neutralisants peuvent reconnaître plusieurs sérotypes AAV, augmentant la séropositivité estimée dans la population (Calcedo and Wilson, 2016; Kruzik *et al.*, 2019). Une sérologie est donc systématiquement réalisée chez les patients avant toute inclusion dans des protocoles d'essais cliniques utilisant des vecteurs AAVr. Des pistes sont envisagées pour inclure des patients séropositifs, comme par exemple des protocoles de plasmaphérèse (Bertin *et al.*, 2020; Leborgne *et al.*, 2020) ou des administrations d'endopeptidases pour réduire le taux d'anticorps neutralisants circulants chez les patients (Elmore *et al.*, 2020; Leborgne *et al.*,

2020). De la même manière que pour l'immunité humorale préexistante, lors d'un premier contact avec l'AAV sauvage ou vecteur AAVr, une immunité cellulaire va se mettre en place et persister sous forme de mémoire immunitaire (Verdera *et al.*, 2020). Cette mémoire immunitaire qui mobilise les lymphocytes B et T est limitante pour une ré-administration potentielle de vecteur AAVr chez le patient, dans le cas où l'expression du gène médicament serait perdue. Cependant, lorsque cette immunité est dirigée contre les protéines de la capsid du vecteur, des pistes de traitements immunomodulateurs sont envisagées. Des essais chez la souris et le primate non humains ont montré une réinjection possible du vecteur AAVr lorsqu'il était coadministré avec de la rapamycine (Meliani *et al.*, 2018).

La composante immunitaire lors de la mise en place d'un essai clinique est très importante à prendre en compte. En particulier lorsque des décès inexplicables surviennent chez des patients inclus en essais cliniques AAVr. En décembre 2021, Pfizer a annoncé le décès d'un jeune patient qui était inclus dans l'essai de phase I minidystrophine NCT03362502. Les causes du décès ne sont pas encore communiquées, cependant les critères d'inclusion des patients ont été durcis pour exclure les patients présentant un plus haut risque d'inflammation cardiaque (Pagliarulo N, Biopharmadive.com).

La limite d'encapsulation des vecteurs AAVr

Dans le contexte de la thérapie génique pour lutter contre la DMD, l'inconvénient principal des vecteurs AAVr est la limite de la taille de la cassette d'expression qui peut être encapsulée. Des équipes ont étudié la capacité maximale d'encapsulation des vecteurs AAVr en essayant de produire des particules encapsulant plus de matériel génétique que les virus AAV sauvages (avec 4,7 kb de taille de génome) (Dong *et al.*, 2010; Grieger and Samulski, 2005; Lai *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010). Les différents résultats générés ont permis de conclure que les AAVr1 à 9 ne pouvaient pas encapsider de génome supérieur à 6 kb, sans pour autant fixer de limite précise d'encapsulation entre 4,7 et 6 kb. Cette limite serait également variable en fonction du sérotype des vecteurs AAVr et de la nature du transgène. C'est pourquoi il est généralement considéré que la limite d'encapsulation des vecteurs AAVr est de 5 kb (Figure 12). L'ensemble de la cassette d'expression délivrée par le vecteur AAVr en thérapie génique est donc limitée à une taille de 5 kb ce qui constitue un inconvénient pour les stratégies d'addition de gène, en particulier pour la lutte contre la DMD. En effet, cette limite ne permet

pas le transfert de l'ADNc complet de la dystrophine qui est d'une longueur d'environ 14 kb (Athanasopoulos *et al.*, 2004). C'est pourquoi des stratégies alternatives au transfert de la séquence codant la dystrophine complète sont étudiées. Il s'agit par exemple de stratégies additives visant à faire exprimer des dystrophines raccourcies mais fonctionnelles appelées mini ou microdystrophines. D'autres stratégies de thérapies géniques par édition de gènes ou permettant de générer des sauts d'exons sont aussi à l'étude pour le traitement de la DMD. Cette limite d'encapsulation des vecteurs AAVr a également mené à l'étude de thérapies pour compenser par d'autres voies l'absence de la dystrophine dans la DMD.

4. Les thérapies géniques pour compenser l'absence de dystrophine

Un exemple de thérapie génique pour compenser l'absence de la dystrophine chez les patients DMD, vise à faire surexprimer la follistatine dans les muscles dystrophiques. L'intérêt de cibler la follistatine a été présenté dans le paragraphe concernant les stratégies pharmacologiques pour traiter la DMD (voir paragraphe A. « Les thérapies pharmacologiques », page 45). La thérapie génique follistatine consiste à faire exprimer un transgène codant pour la follistatine et vectorisé par AAVr (Mendell *et al.*, 2015). Après administration chez le primate sain, une augmentation de la force et de la taille musculaire a été mesurée (Kota *et al.*, 2009). La stratégie thérapeutique a ensuite été testée en essai clinique de phase I/II chez des patients DMB (NCT01519349). Les résultats ont montré que certains patients avaient gagné en force musculaire après l'injection bilatérale dans le quadriceps (Mendell *et al.*, 2015). Ces bénéfices fonctionnels étaient accompagnés d'une diminution du nombre de noyaux centraux, une diminution de l'anisocytose des fibres musculaires et une réduction de la fibrose. Aucun effet secondaire n'a été observé par ailleurs. Les bons résultats obtenus chez les patients DMB ont permis d'autoriser un essai clinique chez les patients DMD, débuté en 2015 (NCT02354781), dont les résultats ne sont pas encore communiqués.

5. Les thérapies géniques pour faire exprimer une dystrophine

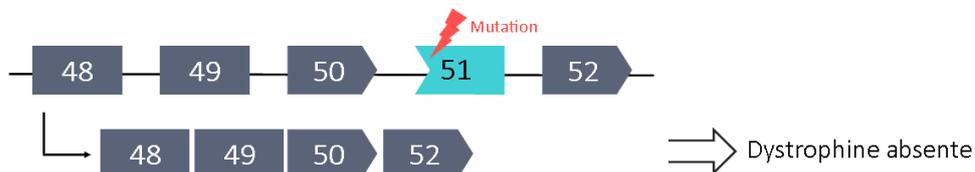
Parmi les pistes de thérapie génique étudiées pour soigner la DMD, certaines visent à faire exprimer une dystrophine pour rétablir un phénotype sain chez les patients. A défaut de pouvoir restaurer l'expression de la protéine entière, en raison de la difficulté technique à

transférer un gène aussi long (14 kb pour l'ADNc, ADN complémentaire de la dystrophine complète), il a été proposé de faire exprimer la protéine raccourcie mais toujours fonctionnelle. Cette version de la protéine est naturellement exprimée chez les patients DMB, qui présentent un phénotype moins sévère que les patients DMD (Aartsma-Rus *et al.*, 2009). C'est dans ce but qu'a été développée la stratégie du saut d'exon visant à corriger l'ARNm de la dystrophine.

Le saut d'exon médié par les oligonucléotides anti-sens

Cette technique permet d'induire un saut de certains exons précis lors de l'épissage de l'ARNm afin de produire une protéine plus courte mais fonctionnelle (Aartsma-Rus *et al.*, 2009). Sur la base de ce raisonnement, des oligonucléotides anti-sens (AON) de 20 à 30 pb de longueur ont été conçus pour s'hybrider et masquer spécifiquement les sites d'épissage des exons ciblés, afin que la machinerie d'épissage omette leur inclusion dans l'ARNm mature (Ferlini *et al.*, 2021). Ainsi, un nouvel ARNm corrigé est généré, permettant la traduction d'une dystrophine fonctionnelle et tronquée (Figure 14).

Mutation induisant une délétion de l'exon 51



Traitement par saut d'exon

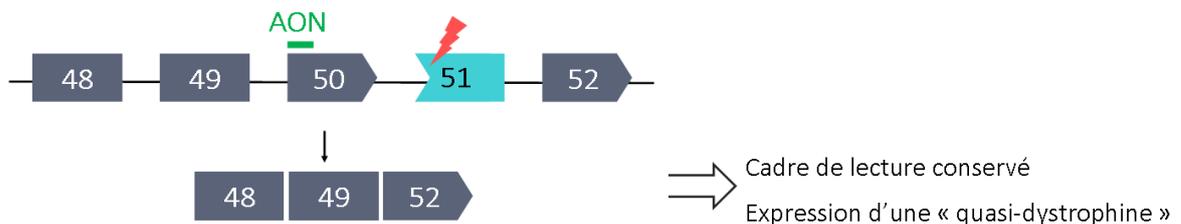


Figure 14 : Schéma illustrant la stratégie du saut d'exon

Dans cet exemple, l'exon 51 est sauté lors de l'épissage de l'ARN pré-messager en raison de la mutation du gène de la dystrophine. Cela induit un décalage du cadre de lecture symbolisé par la forme d'emboîtement des exons. L'hybridation d'une séquence oligonucléotide anti-sens (AON) sur le site d'épissage de l'exon 50 permet de masquer cet exon au spliceosome et empêche son inclusion dans l'ARNm mature DMD. Le cadre de lecture est ainsi rétabli et permet l'expression d'une « quasi-dystrophine ».

Le saut d'exon médié par AON est une approche spécifique à certaines mutations. Actuellement réservée aux mutations par délétion, cette technique est théoriquement applicable à environ 83% des patients DMD (Fortunato *et al.*, 2021).

Plusieurs AON ont été conçus pour le saut d'exon. Pour optimiser l'adressage de ces acides nucléiques dans les cellules et les protéger lors de leur distribution dans l'organisme, ils sont couplés à des molécules chimiques comme les PMO (Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer), le 2'OMePS (2'-O-méthyl), ou des PMO conjugués à des peptides de pénétration cellulaire PPMO (Peptide phosphorodiamidate Morpholino Oligomer) (Sun *et al.*, 2020b). Chimiquement, les AON-PMO sont très stables, électriquement neutres et hautement hydrophiles. Cela leur confère un excellent profil de sécurité avec une faible réponse immunitaire et peu d'effets hors cible (Fortunato *et al.*, 2021).

Plusieurs AON-PMO ont été développés comme l'Eteplirsén (Exondys 51 ; NCT03218995, NCT03985878 ; NCT03992430 ; NCT04179409), conçu pour sauter l'exon 51. L'Eteplirsén a été approuvé (approbation conditionnelle) comme médicament orphelin par la FDA. Récemment, la FDA a également donné son approbation pour le Golodirsén et le Viltolarsén, conçus pour sauter l'exon 53, et le Casimersén, conçu pour sauter l'exon 45. Les données recueillies jusqu'alors chez les patients DMD, montrent que les AON-PMO sont bien tolérés et sûrs dans la DMD après administration intraveineuse hebdomadaire (Frank *et al.*, 2020; Komaki *et al.*, 2020; Kuntz *et al.*, 2020). Un inconvénient avec ces stratégies thérapeutiques est leur efficacité clinique limitée en raison d'un ciblage tissulaire peu efficace et sous-optimal, comme en témoignent les faibles taux de restauration de la dystrophine (environ 5%) dans les biopsies musculaires squelettiques malgré les hautes doses administrées (Godfrey *et al.*, 2017). Dans le modèle de la souris *mdx*, l'emploi d'AON-PPMO (PMO conjugués à des peptides de pénétration cellulaire) a montré une augmentation significative du ciblage musculaire avec une restauration de la dystrophine à la fois dans le muscle squelettique et le cœur (Tsoumpra *et al.*, 2019). Alors que les études précliniques ont soulevé certaines inquiétudes concernant le profil d'innocuité des PPMO de première génération, la nouvelle génération de PPMO basée sur la nouvelle chimie PPMO de Sarepta (SRP-5051) est récemment entrée dans un essai clinique de phase I/II (NCT03675126, NCT04004065) (Fortunato *et al.*, 2021).

Le saut d'exon médié par AAVr

Pour compenser les défauts de ciblage des AON dans les tissus, et les inconvénients liés aux injections hebdomadaires, il a été proposé de vectoriser ces petits oligonucléotides dans des vecteurs AAVr, grâce à des petites cassettes d'expression U7snRNA (pour small nuclear RNA) (Goyenvalle, 2012; Goyenvalle *et al.*, 2004). Le snRNA U7 est un petit ARN nucléaire impliqué de manière physiologique dans la maturation 3' des ARN pré-messagers des histones (Brun *et al.*, 2003; De Angelis *et al.*, 2002; Gorman *et al.*, 1998). Il peut également être converti en outil pour la modulation de l'épissage en y insérant un site de liaison aux protéines du spliceosome, et une séquence AON d'intérêt (Schümperli and Pillai, 2004). Une fois exprimée dans les cellules cibles, la séquence AON est intégrée dans des particules snRNP (small nuclear ribonucleoprotein), ce qui la protège de la dégradation et permet son accumulation dans le noyau où se produit l'épissage (Goyenvalle, 2012).

Suite à la preuve de concept chez les souris *mdx* (Goyenvalle *et al.*, 2004), des études supplémentaires ont montré une correction du phénotype dystrophique et une récupération partielle de la force musculaire après injection intramusculaire et intraveineuse d'AAV-U7snRNA chez des chiens golden retriever atteints de dystrophie musculaire (Le Guiner *et al.*, 2014; Vulin *et al.*, 2012). Ce type d'approche de saut d'exon médié par vecteur lentiviral peut être combiné à des thérapies cellulaires pour corriger le cadre de lecture des cellules souches musculaires avant leur injection (Benchaouir *et al.*, 2007). De plus, cette approche vectorisée offre la possibilité de délivrer efficacement plusieurs cassettes U7snRNA afin de cibler plusieurs exons, ce qui pourrait être extrêmement utile pour élargir le nombre de patients éligibles à ces thérapies « personnalisées ».

L'édition de gène par CRISPR/Cas9

L'édition de génome à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9, qui est un autre moyen pour corriger la mutation du gène de la dystrophine directement dans le code génétique des patients, est étudiée pour soigner la DMD.

Le système CRISPR/Cas9 est une technologie d'édition du génome spécifique, efficace et polyvalente, de la famille des nucléases programmables (Fortunato *et al.*, 2021). Ces nucléases peuvent effectuer des coupures d'ADN double brin en repérant des régions

spécifiques de l'ADN. Suite à ces clivages, le système de réparation de l'ADN peut effectuer deux types de ligations : (i) les ligations non homologues, dites Non-Homologous End-Joining (NHEJ), qui sont fréquemment sujettes à erreur, et (ii) les ligations par recombinaison homologue dites Homologous-Directed Repair (HDR), rendues possibles grâce à des séquences nucléotidiques portant des régions d'homologies avec les extrémités générées. Cette recombinaison homologue permet d'orienter la ligation en incluant des insertions, délétions, ou substitutions dans la zone d'intérêt. Cette technologie peut ainsi être utilisée pour corriger ou éliminer un défaut génétique (Cox *et al.*, 2015).

Dans le cadre de la DMD, le système CRISPR/Cas9 a été utilisé pour restaurer le cadre de lecture ouvert de la dystrophine, en simulant l'effet de saut d'exon par AON, de manière définitive. Des études récentes ont permis de montrer que l'administration de CRISPR/Cas9 médiée par AAVr, peut restaurer le cadre de lecture du gène *DMD*, et ainsi restaurer la protéine dystrophine *in vitro* et *in vivo* dans le modèle de souris Δ Ex50, et chez la souris *mdx* (Amoasii *et al.*, 2017; Long *et al.*, 2016).

Cette stratégie thérapeutique est en cours d'optimisation pour palier à certaines limitations avant son transfert en essai clinique. Il s'agit en particulier de réduire la réponse du système immunitaire au vecteur AAVr, et au système CRISPR/Cas9, ainsi que de diminuer le risque d'effet « off-target » (autrement dit, une édition de gène aspécifique dans le génome) (Fortunato *et al.*, 2021).

La thérapie génique AAV-microdystrophine

Afin de pallier au problème de la taille du transcrite de la dystrophine trop grand pour être encapsidé dans l'AAVr, des transgènes plus courts que celui de la dystrophine complète ont été synthétisés et nommés mini et microdystrophine (Ramos and Chamberlain, 2015). C'est en 1997 que les premiers travaux ont été publiés sur la construction d'une minidystrophine Δ DysM3 de 3,7 kb (Yuasa *et al.*, 1997). L'expression que de cette minidystrophine chez la souris *mdx* a permis de rétablir le DAPC au sarcolemme sans pour autant voir un effet thérapeutique (Yuasa *et al.*, 1998), sûrement lié au fait que cette minidystrophine est dépourvue du domaine central (Cox *et al.*, 1994). De nombreuses études ont ensuite été menées pour déterminer les domaines de la dystrophine qui seraient soit dispensables soit essentiels à la fonction de la

protéine raccourcie (Athanasopoulos *et al.*, 2004; Duan, 2018). Bien que le rôle de chaque domaine ne soit pas encore totalement établi, l'ensemble de ces travaux a fait émerger trois constructions de mini et microdystrophines (MD) qui sont actuellement en essais cliniques pour la DMD (Mendell *et al.*, 2021) (AFM-Telethon.fr). Ces trois MD conservent les domaines N-ter, le domaine riche en cystéine, les premiers et derniers domaines « spectrine-like », ainsi que les premiers et derniers domaines charnières (Figure 15).

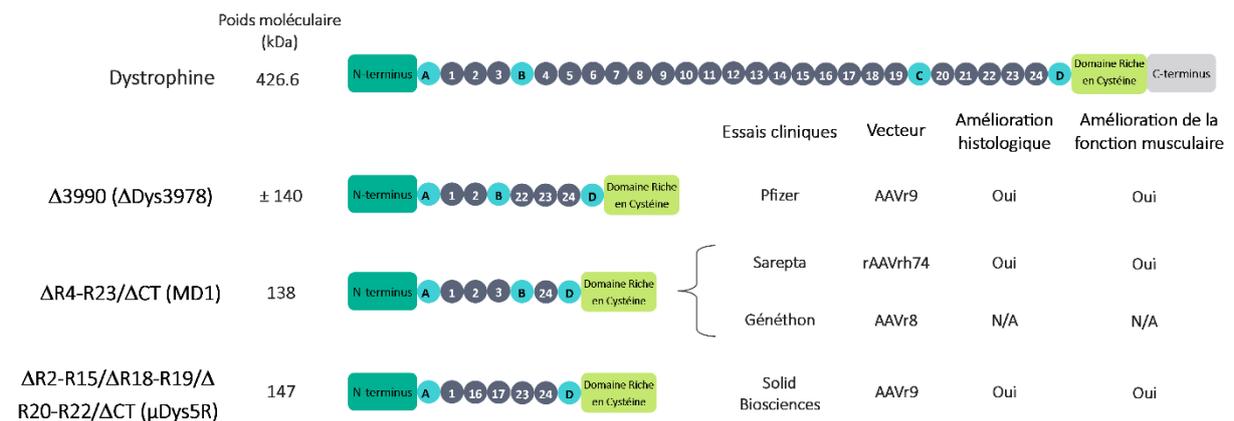


Figure 15 : Schéma des constructions de mini et microdystrophines actuellement en essais cliniques

Adapté de la thèse Bourdon 2020, figure 20 « Structures et caractéristiques des différentes constructions de MDs évaluées par transfert de gène en études précliniques », page 86

Le premier essai clinique AAVr-MD pour la dystrophie musculaire de Duchenne a été mené aux États-Unis en 2006 par le docteur Mendell et ses collaborateurs (Bowles *et al.*, 2012; Mendell *et al.*, 2010). Le produit thérapeutique AAVr2.5-MDΔ3990 a été injecté à différentes doses en intramusculaire dans le biceps de six patients DMD âgés de 5 à 11 ans. Le vecteur AAVr2.5 choisi correspond à un variant chimérique de la capsid de l'AAV2 portant cinq mutations de l'AAV1. Malgré le fait que plusieurs patients aient montré une expression génétique de la MD, un faible taux de transduction du vecteur a été observé chez deux patients qui possédaient un fort taux d'anticorps neutralisants contre l'AAV2.5 et donc une immunité préexistante contre ce sérotype de vecteur. De plus, la protéine MD n'a pu être détectée que faiblement chez deux patients. L'échec de ce protocole a permis de reconsidérer les points critiques que représentent le choix du vecteur et l'étude de la sérologie des patients, ainsi que la surveillance de la réponse immunitaire cellulaire contre la capsid et le transgène.

Depuis lors, trois essais menés par les sociétés Pfizer (NCT03362502 de phase I, NCT04281485 de phase III), Solid Biosciences (NCT03368742 de phase I/II) et Sarepta

Therapeutics (NCT03375164, NCT04626674 et NCT03769116 de phase I et II, NCT05096221 de phase III) ont débutés depuis 2017 aux États-Unis et un essai mondial porté par Généthon (GNT-004 de phase I/II/III) en collaboration avec Sarepta a débuté en 2021 (AFM-Téléthon). Les quatre essais cliniques visent à évaluer la sécurité et l'efficacité de thérapies géniques AAVr-MD par injection intraveineuse, mais présentent des différences de protocoles majeurs. La première différence notable entre ces essais cliniques est le vecteur d'AAVr choisi, tandis que Pfizer et de Solid Biosciences ont choisi d'utiliser l'AAVr9, Généthon utilise le sérotype AAVr8 et Sarepta Therapeutics utilise le sérotype rAAVrh74. Ce dernier sérotype a été découvert chez les macaques rhésus, il présente un tropisme élevé pour le cœur et les muscles squelettiques (Mendell *et al.*, 2020; Rodino-Klapac *et al.*, 2007). Pour augmenter la spécificité tissulaire pour l'expression du transgène thérapeutique, les séquences codantes des MD ont été placées sous contrôle de promoteurs spécifiques du muscle : le promoteur synthétique spc5.12 pour Généthon (Li *et al.*, 1999), et ceux dérivés du promoteur de la créatine kinase, le MHCK7 pour Sarepta (Salva *et al.*, 2007), et le CK8 pour Solid (Martari *et al.*, 2009). L'étude de dose est également différente entre les essais, alors que Sarepta teste une dose unique de 2^{E14} vg/kg, les protocoles de Pfizer et Solid prévoient respectivement deux (1^{E14} et 2^{E14} vg/kg) et trois doses (à partir de 5^{E13} vg/kg) croissantes de vecteurs. Différentes constructions de MD ont été utilisées par les différents groupes pharmaceutiques, la MD Δ 3990 pour Pfizer, la MD1 pour Sarepta et Généthon, et la μ Dys5R pour Solid (Figure 15).

Les résultats préliminaires obtenus pour le produit thérapeutique de Sarepta, le SRP-9001, montre qu'il est bien toléré chez les patients avec peu d'effets secondaires, principalement des vomissements. Le traitement entraîne une production significative de microdystrophine dans les muscles des patients injectés 3 mois après son administration. Avec un recul de 3 ans après injection aujourd'hui, les résultats cliniques montrent un maintien général de la force musculaire, avec une amélioration du score NSAA des patients par rapport au groupe contrôle. Cependant les scores des patients DMD traités diminuent tout de même avec la progression de la maladie (communiqué de Sarepta à la Muscular Dystrophy Association 2022) (Mendell *et al.*, 2020; Willcocks *et al.*, 2021).

Concernant les premiers résultats communiqués par Pfizer au sujet de l'essai de son produit PF-06939926, il a été montré que la minidystrophine était exprimée dans 20 à 40% des

fibres musculaires des patients injectés. Des analyses par imagerie IRM ont montré qu'il y avait moins d'adipose musculaire chez les patients injectés. De plus, un an après l'injection, le score fonctionnel NSAA était stable ou augmenté pour 70% des patients injectés par rapport au groupe contrôle. Très récemment, en décembre 2021 l'essai NCT03362502 de phase I a été suspendu par la FDA en raison du décès d'un jeune patient DMD inclus dans le protocole. Les raisons précises de son décès ne sont pas encore communiquées, même si les critères d'inclusion de Pfizer dans cet essai ont été durcis pour exclure les patients porteurs de mutations génétiques les prédisposant à un fort risque d'inflammation cardiaque (communiqué de Pfizer à la Muscular Dystrophy Association 2022, clinicaltrialsarena.com).

L'essai de Solid Biosciences a également connu des difficultés. En effet, l'essai avait été suspendu en raison d'effets secondaires survenus chez les patients. Suite à l'injection du produit thérapeutique SGT-001, les patients ont montré une activation de la cascade du complément, accompagnée de fièvre et de vomissement. De plus, un patient a développé une hépatite grave qui a été soignée après un traitement anti-inflammatoire stéroïdien. Il a été précisé que tous les effets secondaires se sont produits dans les trois mois suivant l'administration de la thérapie génique, sans autre événement à des périodes de suivi plus longues, qui allaient de quatre mois à près de quatre ans. Malgré cela, les données de biopsies musculaires ont montré que le traitement induisait une production de microdystrophine dans les muscles, associée à une localisation membranaire restaurée du β -sarcoglycane et de la nNOS. Deux ans après traitement, les patients ont montré une stabilisation ou amélioration des scores cliniques NSAA et du 6MWT, ainsi que de la fonction pulmonaire comparé aux données historiques (communiqué de Solid à la Muscular Dystrophy Association 2022, muscular dystrophy news.com).

Le dernier essai clinique a été lancé en 2020 par Généthon, en collaboration avec Sarepta Therapeutics (AFM-Telethon.fr). Il s'intègre dans un programme en deux étapes qui a débuté par une étude d'histoire naturelle de la maladie chez plus de 100 patients DMD. L'essai clinique de phase I/II/III est international et se tient en France, au Royaume-Uni, en Israël et aux États-Unis. Il a également pour but d'évaluer un produit thérapeutique AAVr8-microdystrophine, et un premier patient a reçu le traitement à Paris en Mars 2021. Malheureusement, l'essai a été suspendu environ un mois après, en raison d'un événement

indésirable grave survenu chez ce patient. Sans que l'on ait à ce jour plus de détails sur la nature et les causes de cet événement indésirable, Généthon a récemment annoncé la reprise de cet essai, avec des modifications du protocole ([Genethon.fr/product/dmd/](https://www.genethon.fr/product/dmd/)).

Les premiers résultats de ces essais de thérapies géniques AAVr-MD sont encourageants, bien que des effets secondaires soient survenus chez des patients injectés. En effet, plusieurs réactions secondaires graves qui n'avaient pas été observées en préclinique sont survenues chez l'homme après l'injection des vecteurs AAVr, dont le décès d'un patient en Décembre 2021. Même si le lien entre le décès du patient dans l'essai de Pfizer et l'injection du produit thérapeutique n'a pas été établi à ce jour, les principaux effets secondaires développés par les patients sont liés à des réactions du système immunitaire. La meilleure compréhension de ces phénomènes ainsi que l'optimisation des vecteurs AAV pourraient permettre de limiter la survenue de ces événements néfastes pour les patients et pour l'expression du transgène thérapeutique. Malgré cela, les résultats préliminaires de ces essais cliniques AAVr-MD restent encourageants au niveau de l'expression de mini et microdystrophine chez les patients injectés, et de l'amélioration de l'état physiopathologique des muscles (en IRM et score cliniques). Les résultats à long terme de ces thérapies pourront renseigner sur l'évolution de l'expression des MD dans les muscles, ainsi que sur l'amélioration de la fonction musculaire et cardiaque des patients. Ils pourront également permettre de renseigner sur les durées potentielles d'efficacité de ces thérapies géniques qui rapprochent les patients DMD des patients DMB. En effet, la perspective d'une guérison complète grâce à la thérapie génique par vecteur AAVr est actuellement limitée par la capacité d'encapsulation restreinte de celui-ci. Tant qu'il sera impossible d'encapsider la séquence codante de la dystrophine complète dans les vecteurs AAVr, nous ne pouvons espérer qu'un allègement des symptômes des patients DMD, qui deviendront des patients DMB. Pour ces patients, qui présenteront toujours une atteinte musculaire certaine, il est nécessaire de développer d'autres stratégies thérapeutiques qui ciblent les atteintes physiopathologiques communes aux patients Duchenne et Becker.

Chapitre III : A la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques contre la DMD

I. Des généralités sur le tissu musculaire

En l'absence de dystrophine, de nombreuses dérégulations d'expression génétique, protéique et d'homéostasie surviennent. De nombreuses cascades de mécanismes moléculaires et cellulaires en découlent sans que les liens avec l'absence de dystrophine soient clairement établis. Ces événements survenant principalement dans le muscle squelettique, il est nécessaire d'en rappeler la structure et le rôle physiologique. Pour ensuite, en présenter les atteintes physiopathologiques dans le contexte de la Dystrophie Musculaire de Duchenne.

A. Qu'est-ce que le muscle strié squelettique ?

Les muscles présents dans l'organisme se classent en deux grandes catégories en fonction de leur organisation histologique et leur mode de contraction (Campbell and Maani, 2021). Le premier type sont les muscles lisses, qui sont retrouvés dans la paroi de nombreux organes comme les vaisseaux sanguins, les intestins, et l'utérus (Hafen and Burns, 2021; Hafen *et al.*, 2021). Ils sont capables de se contracter de manière involontaire et sont constitués de petites cellules fusiformes. Elles sont organisées en tuniques musculaires ou en cellules isolées dans le tissu conjonctif. Ces caractéristiques les différencient du second type de muscles retrouvés dans l'organisme qui est le muscle strié, nommé ainsi du fait des stries observées en microscopie le long des cellules musculaires (Ripa *et al.*, 2021). Ces muscles comprennent les muscles striés squelettiques, ainsi que le muscle cardiaque. Le muscle cardiaque a la particularité d'être un muscle creux émettant des contractions rythmiques automatiques et involontaires (Saxton *et al.*, 2021). Les cardiomyocytes sont des cellules cylindriques qui présentent à leurs extrémités, un sarcolemme en forme de « marche d'escalier » appelé trait scalariforme. Leurs segments transversaux permettent la jonction adhérent avec les autres cardiomyocytes, tandis que leurs segments longitudinaux permettent une jonction communicante entre les cellules (campus.cerimes.fr, institut-myologie.org). Les muscles striés squelettiques tiennent leur nom du fait qu'ils sont fixés au squelette par l'intermédiaire des tendons (Kamina, 2009). Ils sont constitués de longues cellules multinucléées appelées fibres

musculaires, elles-mêmes organisées en groupements de fibres, appelés faisceaux de fibres musculaires.

B. Le muscle strié squelettique

Le terme muscle vient du latin *musculus*, signifiant « petite souris ». Les muscles ont des propriétés comme l'excitabilité, la contractilité et l'élasticité, qui leur permettent, grâce au système nerveux central, de déployer de la force et de générer un mouvement.

1. L'organisation anatomique macroscopique du muscle strié squelettique

Les muscles striés squelettiques représentent environ 40% de la masse corporelle, on en dénombre plus de six-cent chez l'homme (Campbell and Maani, 2021). En général, le muscle se compose d'un corps épais rouge et contractile, le ventre, et d'extrémités plus étroites blanches et résistantes qui sont les parties tendineuses. Tandis que le ventre produit la force et la puissance, les tendons transmettent la force et servent de leviers osseux. Bien que les muscles squelettiques s'insèrent principalement sur les os, grâce à leurs parties tendineuses, ils peuvent également être liés à différents tissus comme le cartilage ou d'autres muscles. On distingue 2 types d'insertions aux muscles, l'origine et la terminaison (Figure 16) (Kamina, 2009).

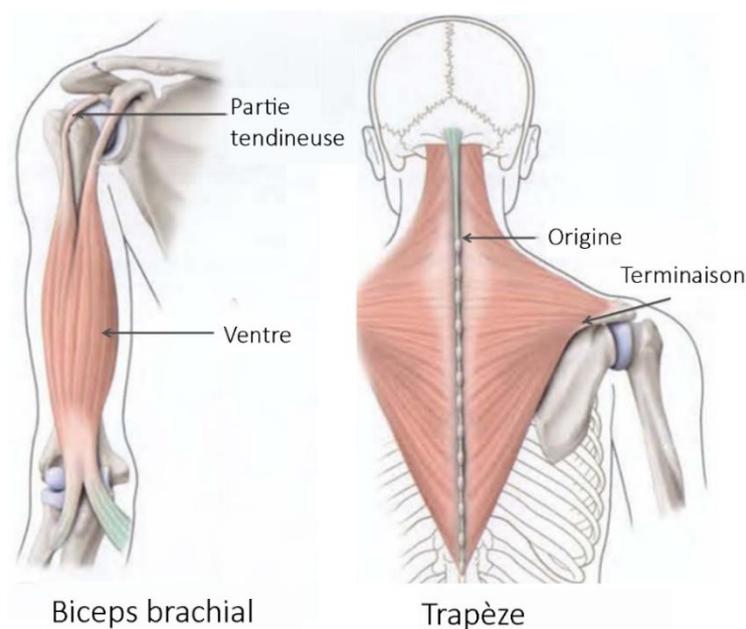


Figure 16 : Exemples de nomenclature musculaire

Adapté de Kamina, 2009

3. La genèse du tissu musculaire

Le tissu musculaire squelettique prend son origine dans le feuillet primitif, le mésoderme, et suit plusieurs stades de développement embryonnaire. Par la suite le muscle adulte est capable de varier en masse musculaire en fonction de son activité physique ainsi que se régénérer suite à des lésions (Chal and Pourquié, 2017).

Le muscle est généré lorsque des cellules à potentiel myogénique fusionnent entre elles afin de former des myotubes qui mûrissent ensuite en fibres musculaires. Lors de ce processus, les noyaux des cellules fusionnées sont conservés et se positionnent en périphérie des fibres musculaires. Le muscle squelettique possède des cellules souches myogéniques en périphérie des myofibres qui sont dites cellules satellites. Elles interviennent après une lésion, en sortant de quiescence et en s'activant. Ces myoblastes prolifèrent afin de former deux groupes de cellules distincts. Une partie minoritaire de ces cellules s'engage dans la voie d'auto-renouvellement et rentrent en quiescence afin de former un nouveau pool de cellules satellites. La majeure partie des myoblastes s'engage dans la voie de différenciation myogénique terminale pour combler le muscle lésé et former de nouvelles fibres musculaires (Chazaud, 2018).

C. Le rôle du calcium dans le couplage excitation-contraction

Le muscle est un tissu voué à se contracter. Une contraction musculaire sert au maintien de la posture du corps ou à la dynamique des membres. La contraction du muscle squelettique consiste au raccourcissement des fibres musculaires, grâce au glissement des protéines du sarcomère l'actine et myosine, l'une sur l'autre.

Pour générer une contraction, le muscle squelettique a besoin de recevoir un influx nerveux stimulateur (Kamina, 2009). Le muscle squelettique est constitué de fibres musculaires, chacune innervée via une jonction neuromusculaire appelée plaque motrice par laquelle l'influx nerveux arrive au muscle. Le potentiel d'action arrivant à cette plaque motrice provoque la libération d'acétylcholine dans la synapse neuromusculaire. Il s'agit de la première étape du couplage excitation-contraction. L'acétylcholine, qui est un neurotransmetteur, va se fixer aux récepteurs à l'acétylcholine du sarcolemme qui vont ainsi s'activer pour permettre l'entrée d'ions sodium dans la fibre musculaire. L'influx sodique initie une dépolarisation

membranaire qui provoque la genèse d'un potentiel d'action. Cette dépolarisation auto-entretenu se propage le long du sarcolemme, jusqu'aux tubules T à la triade. Le couplage excitation-contraction fait alors intervenir le récepteur à la dihydropyridine (DHPR), canal calcique voltage dépendant, qui active mécaniquement le récepteur à la ryanodine (RyR), un autre canal calcique, à citerne terminale du réticulum sarcoplasmique. Le RS est le principal réservoir intracellulaire de calcium des fibres musculaires. L'activation des RyR à sa membrane permet le relargage du calcium stocké, dans le cytoplasme (Zabłocka *et al.*, 2021). C'est aux sarcomères, où sont organisés les filaments d'actine et de myosine, que le calcium va servir de messenger secondaire au couplage excitation-contraction. Le raccourcissement des sarcomères survient lorsque les têtes de myosines peuvent se lier à l'actine et générer un mouvement grâce à l'hydrolyse de l'ATP. En l'absence de calcium, la fibre musculaire est au repos, les sites de liaison de la myosine sur l'actine sont masqués par la tropomyosine et la troponine. C'est en se fixant à la troponine que le calcium permet le changement de conformation de la tropomyosine, libérant ainsi les sites de liaison de la myosine sur l'actine. La myosine, en hydrolysant l'ATP, génère l'énergie qui est traduite en glissement de la myosine sur l'actine. La force et le degré de la contraction résultent du nombre de fibres musculaires stimulées. La contraction musculaire prend fin lorsque le calcium est recapté dans les compartiments intracellulaires (Figure 18) (Frontera and Ochala, 2015).

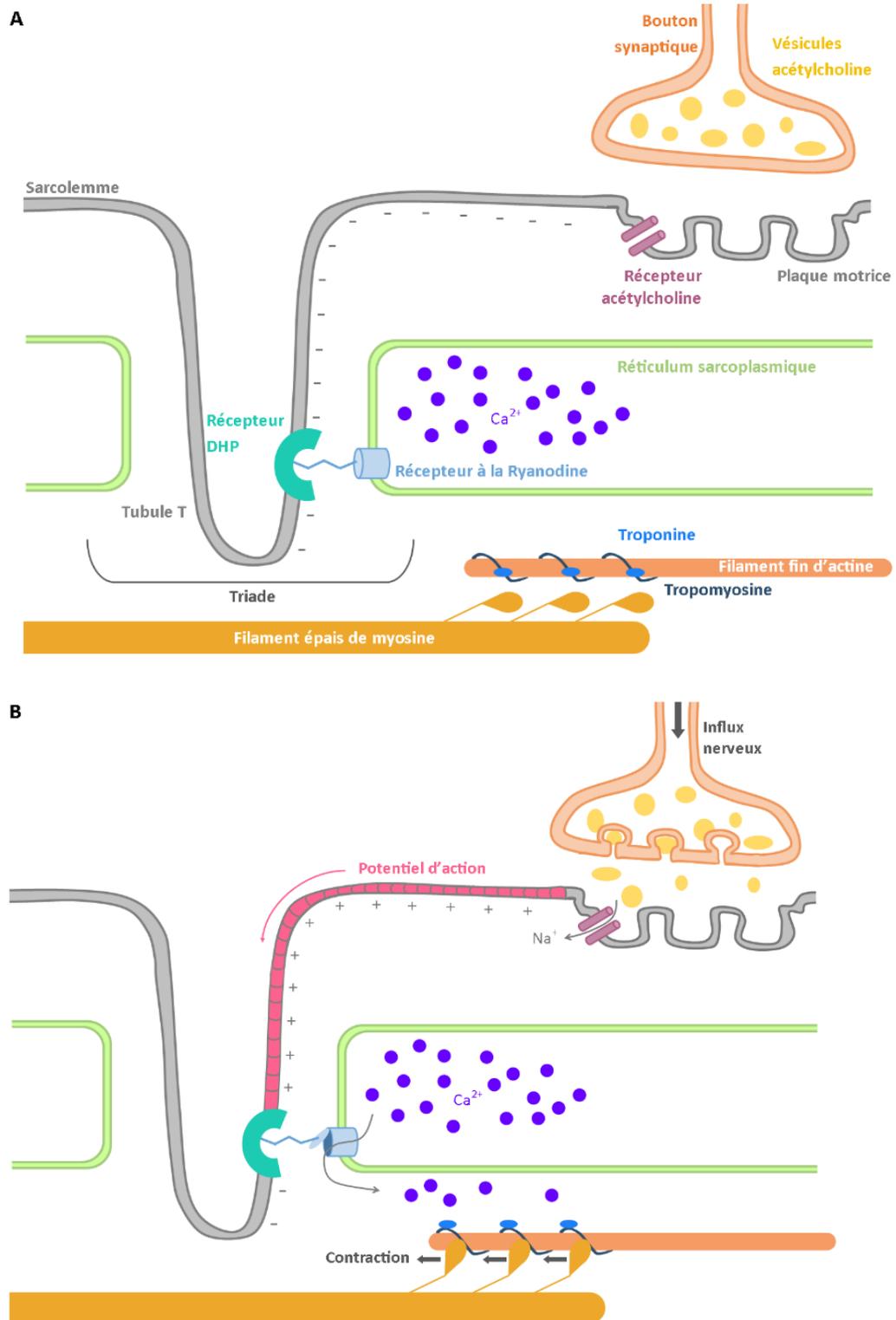


Figure 18 : Schéma du couplage excitation-contraction

A. Représentation de l'interface de la fibre musculaire et du motoneurone, au repos. **B.** Représentation du mécanisme de contraction musculaire.

D. La gestion du calcium dans la contraction musculaire

Dans le muscle squelettique, le calcium intracellulaire du RS est la source calcique prépondérante pour le couplage excitation-contraction (Cho *et al.*, 2017, 2018; Lee, 2010; Lee *et al.*, 2006a; Rios *et al.*, 1992; Zucchi and Ronca-Testoni, 1997). C'est pourquoi pendant longtemps, le rôle du calcium extracellulaire a suscité peu d'intérêt. Il y a une vingtaine d'années, une étude a cependant montré que l'épuisement du RS en calcium induisait une entrée de calcium extracellulaire dans les fibres musculaires squelettiques de souris (Kurebayashi and Ogawa, 2001). Cette étude a mis en évidence que des flux calciques provenant du milieu extracellulaire étaient induit lorsque que le RS se vidait en calcium. Un certain nombre de questions se sont alors posées : pourquoi, quand et comment le calcium extracellulaire est mobilisé et utilisé dans les fibres musculaires squelettiques ? (Choi *et al.*, 2020).

Les mécanismes d'entrée du calcium dans le muscle squelettique opérée par la vidange des stocks intracellulaires en calcium

Lors du couplage excitation-contraction, des courants calciques issus du milieu extracellulaire surviennent en réponse à la déplétion des stocks intracellulaires en calcium (du ER ou RS). Ils sont définis comme courants SOCE (Store-Operateur Calcium Entry). Les fonctions des canaux SOCE n'étaient initialement pas claires dans ces études (Kurebayashi and Ogawa, 2001; Launikonis *et al.*, 2003). Certaines études utilisant des myotubes différenciés *in vitro* ou des fibres musculaires isolées ont révélé les rôles des canaux SOCE dans la physiologie et physiopathologie des muscles squelettiques (Dirksen, 2009; Ducret *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2002, 2014; Stiber and Rosenberg, 2011; Stiber *et al.*, 2008a; Wei-LaPierre *et al.*, 2013; Yarotsky and Dirksen, 2012). Le processus SOCE est important dans le remplissage calcique et maintien la teneur calcique du RS. Cela permet la performance maximale des muscles squelettiques (Allen *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2014; Stiber *et al.*, 2008a; Sztretye *et al.*, 2017). Généralement, lors de l'épuisement du RS en calcium, STIM1 (molécule d'interaction stromale, senseur du calcium du RE et RS) s'auto-oligomérisse et active les courants SOCE en se liant aux canaux d'entrée du calcium dans la membrane plasmique, comme Orai1 (Feske *et al.*, 2006; Liou *et al.*, 2005, 2007; Park *et al.*, 2009; Roos *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Dans les cellules musculaires squelettiques, les canaux médiateurs de SOCE dépendants de STIM sont divisés en

deux groupes : les canaux Orai (acteurs principaux) et les canaux calciques TRPC (canaux Transient Receptor Potential Canonical) (voir paragraphe B « Les canaux TRPC », page 97) (Antigny *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2006; Kiviluoto *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2007; López *et al.*, 2006; Lyfenko and Dirksen, 2008; Pan *et al.*, 2014; Peinelt *et al.*, 2006; Prakriya *et al.*, 2006; Stiber *et al.*, 2008a; Vandebrouck *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2007). Les deux groupes de canaux médiateurs de SOCE peuvent être localisés à la triade, aux tubules T (Cho *et al.*, 2017, 2018; Lee, 2010; Lee *et al.*, 2006a; Rios *et al.*, 1992; Zucchi and Ronca-Testoni, 1997).

Les protéines Orai et STIM dans les courants SOCE musculaires squelettiques

En plus de l'interaction d'Orai1 avec les STIM, les TRPC peuvent fonctionner directement en tant que canaux SOCE dans les cellules musculaires squelettiques, lorsqu'ils sont hétéromérisés avec STIM1 (Liao *et al.*, 2007; López *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2007). Dans le muscle squelettique, le principal acteur des courants SOCE est Orai1 (Dirksen, 2009; Lee *et al.*, 2013; Roberts-Thomson *et al.*, 2010; Stiber *et al.*, 2008a; Sztretye *et al.*, 2017; Wei-LaPierre *et al.*, 2013). L'inactivation d'Orai1 chez la souris qui provoque l'absence de courants SOCE médiés par ce canal, induit des défauts de développement musculaire et de différenciation myogénique terminale avec une diminution de la masse musculaire (Carrell *et al.*, 2016; Kiviluoto *et al.*, 2011; Wei-LaPierre *et al.*, 2013). Les mutations du gène Orai1 et les anomalies de courants SOCE résultantes sont étroitement liées aux maladies du muscle squelettique (Choi *et al.*, 2020). Les patients porteurs d'une mutation délétère Orai1 (R91W) présentent une hypotonie musculaire associée à un déficit immunitaire combiné sévère (SCID), principalement dû à l'impact sur le SOCE (McCarl *et al.*, 2009). D'autres mutations du gène codant pour Orai1 ont été identifiées chez l'homme (V107M, G98S ou T184M) (Böhm *et al.*, 2017). Ces mutations rendent le canal constitutivement actif, ce qui induit une myopathie des agrégats tubulaires associée à une suractivité des courants SOCE. Chez la souris, il a été démontré que les SOCE, via Orai1, participent au maintien des niveaux de Ca^{2+} dans le cytosol et le RS au repos dans les myotubes squelettiques (Li *et al.*, 2010). Les rôles des autres canaux Orai identifiés à ce jour, Orai2 et Orai3, sont mal connus dans le muscle squelettique (Choi *et al.*, 2020).

Quant aux protéines STIM, STIM1, STIM2 et STIM1L, elles sont exprimées dans les cellules musculaires squelettiques, et STIM1 est directement impliquée dans le développement normal et les fonctions du muscle squelettique (Darbellay *et al.*, 2010, 2011; Horinouchi *et al.*,

2012; Lee *et al.*, 2013; Lyfenko and Dirksen, 2008; Stiber *et al.*, 2008a). Des études ont montré que l'inactivation de STIM1 inhibe le remplissage du RS en calcium par les courants SOCE et altère ensuite la différenciation terminale des myoblastes en myotubes, tandis que la surexpression de STIM1 accélère la différenciation et augmente les courants SOCE (Antigny *et al.*, 2013; Darbellay *et al.*, 2009; Lyfenko and Dirksen, 2008).

II. La physiopathologie musculaire de la DMD

1. La fragilité mécanique du sarcolemme

Les membranes plasmiques sont composées de bicouches lipidiques asymétriques constituées de différents lipides comme les phospholipides, sphingolipides, glycolipides et stérols, ainsi que de 20 à 30% de protéines (Goñi, 2014; Lombard, 2014; Nicolson, 2014). Ces protéines sont responsables de la conduction ionique, impliquées dans diverses voies de signalisations cellulaires ou dans l'intégrité structurelle de la membrane plasmique (Houang *et al.*, 2018; van Meer *et al.*, 2008). Cette composition peut considérablement varier en fonction du type cellulaire ainsi que du contexte pathologique (Houang *et al.*, 2018; Maxfield and Tabas, 2005). La fonction principale de la membrane plasmique est de séparer le milieu intracellulaire de l'environnement extérieur pour préserver l'homéostasie intracellulaire (Houang *et al.*, 2018). L'incapacité de cette barrière à assurer cette fonction conduit à l'épuisement du métabolisme énergétique cellulaire, avec une perte des potentiels de membrane et dérégulations biochimiques, pouvant mener à une mort cellulaire.

Comme pour les autres membranes plasmiques, le sarcolemme peut être caractérisé par plusieurs critères : la fluidité membranaire liée aux mouvements intra-bicouche lipidique, ou le degré de tassement de ses composants, par exemple. D'un autre côté, la composition ainsi que la structure de la membrane peuvent être décrites par la mesure de la rigidité, de l'élasticité et de la résistance à la traction (Evans and Needham, 1987; Houang *et al.*, 2018; Marguet *et al.*, 2006). D'un point de vue structurel, la seule bicouche lipidique du sarcolemme n'est pas suffisante pour résister aux tensions membranaires provoquées par les contractions musculaires (Nichol and Hutter, 1996). L'intégrité mécanique du sarcolemme est soutenue par des protéines clés du cytosquelette, incluant la dystrophine, la spectrine et l'actine-F (Le

Rumeur *et al.*, 2010; Manno *et al.*, 2002). Dans les années 1970-1980, l'analyse par microscopie électronique du muscle dystrophique ont montré des perturbations de la membrane musculaire appelées lésions delta (Mokri and Engel, 1975; Pestronk *et al.*, 1982). Ces lésions ont été décrite en forme de dôme avec leur base en appui sur la surface de la fibre et leur sommet pointant vers l'intérieur de la fibre musculaire. Cette découverte a conduit à proposer l'hypothèse selon laquelle la perte de la dystrophine dans la DMD, avec la dérégulation des protéines du DAPC, induit une fragilité et l'apparition de trous au sarcolemme suite aux contractions musculaires (Houang *et al.*, 2018). La libération d'enzymes intracellulaires comme la créatine kinase dans le milieu extracellulaire a suggéré que les perturbations membranaires étaient suffisamment importantes pour permettent le passage transmembranaire de macromolécules. Celles-ci peuvent ainsi être surveillées en tant que biomarqueurs de lésions musculaires (Ozawa *et al.*, 1999). De manière artificielle, ces passages de grandes molécules ont été reproduites en laboratoire. Il a été démontré que l'absorption de protéines telles que l'albumine ainsi que les colorants vitaux comme l'orange Procion (Petrof *et al.*, 1993) et le bleu Evans (Matsuda *et al.*, 1995) dans des fibres musculaires dystrophiques non nécrotiques, était possible. Cette fragilité du sarcolemme concerne les muscles squelettiques dont le diaphragme (Stedman *et al.*, 1991) et le cœur (Yasuda *et al.*, 2005).

2. Les rôles précoces et prépondérants de la dérégulation de l'homéostasie calcique

Chez les patients dystrophiques, des processus de nécrose cellulaire, d'infiltration de cellules inflammatoires et de fibrose d'inflammation apparaissent (Kharraz *et al.*, 2014). Les mécanismes liant ces processus à l'absence de dystrophine ne sont pas clairement établis. Cependant l'homéostasie calcique du muscle est perturbée dans un contexte dystrophique et ce phénomène serait une composante importante des processus pathogéniques conduisant à la dégénérescence des cellules musculaires (Houang *et al.*, 2018).

Le calcium est un acteur majeur de la contraction musculaire car il est impliqué dans le couplage excitation-contraction en plus de son rôle dans diverses voies de signalisation cellulaire (voir paragraphe C « Le rôle du calcium dans le couplage excitation-contraction », page 77) (Bravo-Sagua *et al.*, 2020). Les cellules saines et au repos maintiennent la concentration en ions calcium cytosolique au niveau de 100 nanomolaires, tandis que la

concentration extracellulaire en calcium est d'environ 1,0-1,8 milimolaires (Lee, 2010; Rizzuto and Pozzan, 2006). Les influx calciques au travers de la membrane cellulaire, ainsi que des organelles doivent être régulés précisément pour répondre aux besoins spécifiques de chaque cellule en fonction de son état physiologique. La gestion de ce calcium cellulaire est assurée par différents acteurs participant à son entrée cellulaire, son trafic intracellulaire et son évacuation extracellulaire, comme des canaux ioniques perméables au calcium, des pompes calciques, et des échangeurs calciques (Lee, 2010).

C'est dans les années 1970-1980 que des perturbations calciques ont été observées pour la première fois chez les patients DMD. Plusieurs équipes de recherche ont constaté des surcharges calciques cytosoliques, et observé des dépôts calciques intracellulaires dans des biopsies de muscles de patients et des muscles de fœtus DMD (Bertorini *et al.*, 1984; Emery and Burt, 1980; Jackson *et al.*, 1985). Parmi les hypothèses avancées pour expliquer l'origine de la surcharge calcique, une des premières proposait l'implication des lésions et ruptures membranaires des fibres dystrophiques. Cette hypothèse expliquait l'augmentation du calcium intracellulaire par une entrée du calcium non sélective et exacerbée depuis le milieu extracellulaire (Davies and Nowak, 2006; Mokri and Engel, 1975; Petrof *et al.*, 1993). Une autre hypothèse proposait l'implication de canaux ioniques perméables au calcium, donc une entrée plus sélective. Des études ont alors montré qu'en présence d'inhibiteurs non sélectifs de canaux calciques, il y avait une diminution de la SPCa (Sarcolemmal Permeability to Calcium) (Frayssé *et al.*, 2004) dans un contexte de lésions membranaires (Sonobe *et al.*, 2008; Whitehead *et al.*, 2006a; Yeung and Allen, 2004). Cela réfutait la seule et unique implication des lésions dans l'augmentation de la SPCa. Ces études ont aussi pu montrer que les augmentations d'influx calciques survenaient suite à des contractions musculaires ou des dépolarisations membranaires et qu'elles étaient exacerbées par l'augmentation de la production de ROS (Whitehead *et al.*, 2006a). Bien que l'identité moléculaire des canaux responsables de l'augmentation de la SPCa dans la DMD soit encore incertaine aujourd'hui, de nombreuses études sont menées pour les identifier.

Dans les cellules dystrophiques, l'augmentation de la SPCa provoque une surcharge calcique intracellulaire (Hopf *et al.*, 1996; Houang *et al.*, 2018). Cette surcharge calcique induit une cascade de mécanismes moléculaires. Il survient notamment une suractivation de

protéases calcium-dépendante comme les calpaïnes, ainsi que des phospholipases avec la phospholipase A₂ (PLA₂). Ces protéases entraînent ensuite, respectivement, une protéolyse et une lipolyse de nombreux éléments du cytosquelette, des myofibrilles, de la membrane, ainsi qu'une réponse nécrotique et inflammatoire (Alderton and Steinhardt, 2000; Mosqueira *et al.*, 2013). L'augmentation du calcium cytosolique induit la perturbation d'autres voies de signalisation activées par le calcium comme la voie des calmodulines (Niebroj-Dobosz *et al.*, 1989), et celle de la calcineurine (Klee *et al.*, 1979). Les mitochondries, qui sont capables de stocker une grande quantité de calcium, sont aussi concernées par la surcharge calcique (Houang *et al.*, 2018; Kyrychenko *et al.*, 2015). Dans ce contexte, le calcium provoque une ouverture irréversible du pore de transition de perméabilité mitochondriale. Cela provoque une dysfonction mitochondriale, avec une réduction de production d'ATP. Cette privation d'énergie cellulaire conduirait à la mort cellulaire (Gissel, 2006). Il a été montré que la dysfonction mitochondriale compromet aussi la capacité de réparation membranaire endogène des fibres musculaires déficientes en dystrophine (Vila *et al.*, 2017). L'augmentation de la SPCa influe également sur la Nitric-Oxyde (NO) synthase qui est située au sarcolemme dans un contexte sain, et qui se retrouve délocalisée dans les fibres dystrophiques. Dérégulée, elle provoque une augmentation du stress oxydatif. Il se traduit par la production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), toxiques pour le métabolisme cellulaire car ils sont capables d'entraîner à leur tour une peroxydation des lipides membranaires (Péréon *et al.*, 2015; Shkryl *et al.*, 2009; Whitehead *et al.*, 2006b). L'une des enzymes responsables de la production de ROS dans la cellule musculaire est NOX2 (NADPH Oxydase 2). NOX2 produit des radicaux libres lorsqu'il est activé par la protéine Rac1 associée au microtubules lors de l'étirement du sarcolemme (Li *et al.*, 2011; Prosser *et al.*, 2011). Dans la physiopathologie de la DMD, la production de ROS par NOX2 est augmentée, et est liée à la désorganisation du réseau de microtubules en raison de la perte des interactions dystrophine-microtubules. L'augmentation collective de la production de ROS dans les cellules dystrophiques conduit à une augmentation des marqueurs d'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN (Grounds *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2013). Le muscle dystrophique est également plus sensible au stress oxydatif que le tissu sain (Rando, 2001). En effet, le glutathion sous sa forme réduite qui est l'un des antioxydants les plus abondants de la fibre musculaire, est significativement moins présente dans le muscle dystrophique que dans le muscle sain (Dudley *et al.*, 2006; Petrillo *et*

al., 2017). Le stress oxydatif, par la production de ROS qui induit notamment une lipolyse et une protéolyse, participe aux dégradations membranaires. La dégradation des différents éléments du sarcolemme entretenue dans la boucle du stress oxydatif participe ensuite aux surcharges calciques et à l'augmentation de la SPCa des fibres dystrophiques (Gissel, 2006). C'est ainsi qu'est bouclé le cercle vicieux de l'augmentation de l'influx calcique dû à l'absence de la dystrophine.

A l'augmentation de la SPCa s'ajoute une augmentation de l'influx calcique des compartiments intracellulaires vers le cytosol. En effet, dans les fibres dystrophiques, les canaux RyR1 situés à la membrane du réticulum sarcoplasmique et impliqués dans le relargage du calcium pendant le couplage excitation-contraction, fuient (Bellinger *et al.*, 2009). De plus, chez les patients DMD, la re-captation du calcium est ralentie et diminuée du fait d'une activité réduite de la pompe calcium ATPase du RS (SERCA) (Vandebrouck *et al.*, 2006) (Figure 19). L'accumulation de calcium dans les muscles dystrophiques et les difficultés de recyclage de celui-ci rendent le processus de relaxation musculaire difficile avec une endurance diminuée et une fatigabilité musculaire accrue (Hara *et al.*, 2002).

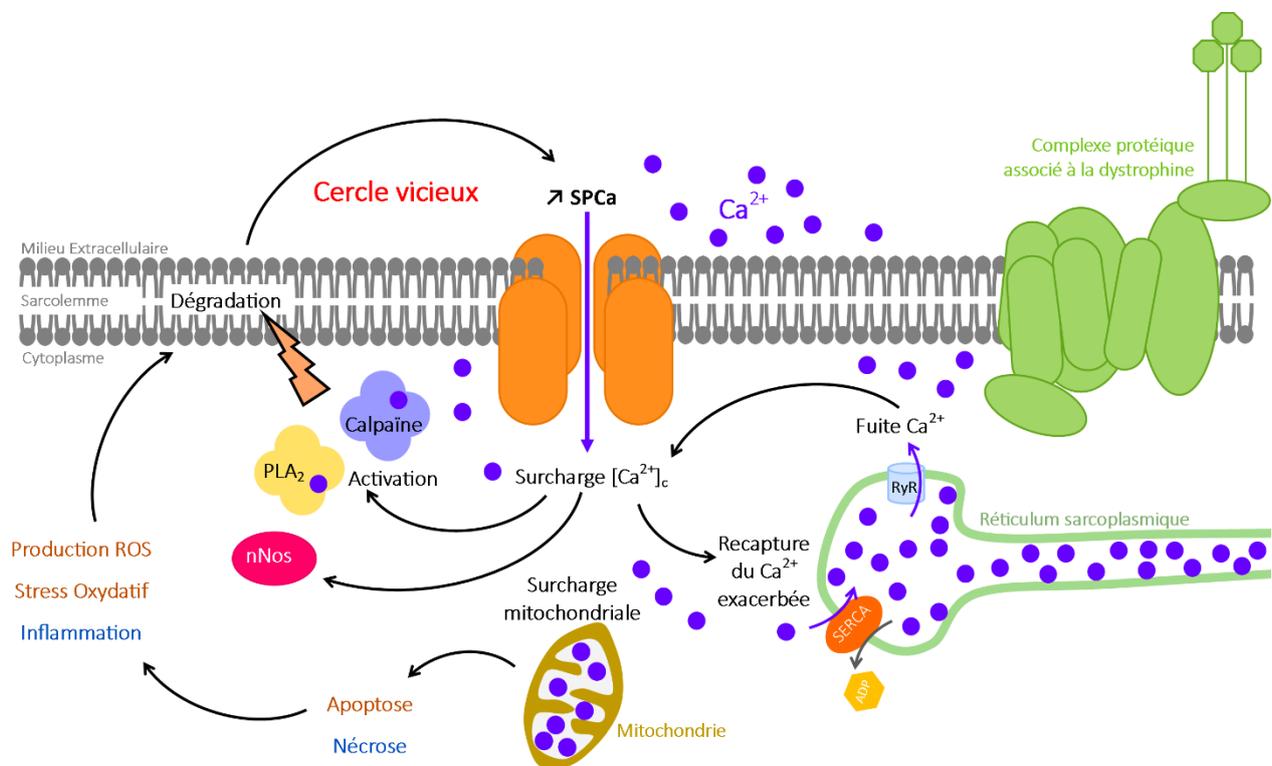


Figure 19 : Schéma de la cascade de mécanismes induite par les dérégulations calciques dans une fibre musculaire dystrophique
 SPCa : perméabilité du sarcolemme au calcium, PLA₂ : Phospholipase A2, RyR : récepteur à la ryanodine, SERCA : pompe calcium ATPase sarcoplasmique, ADP : adénosine di phosphate, ROS : espèces réactives de l'oxygène

III. Les pistes thérapeutiques ciblant les anomalies calciques

En plus des stratégies thérapeutiques déjà citées précédemment, des projets étudient la possibilité de contrer la toxicité calcique dans des contextes dystrophiques en testant de nouvelles approches thérapeutiques. Une stratégie visant à corriger la perméabilité membranaire a été testée sur des souris *mdx* et des chiens GRMD avec pour but d'inhiber l'influx calcique intracellulaire grâce à un polymère non ionique : le poloxamer 188. Cette molécule, connue pour s'insérer comme lipide artificiel pour réparer et stabiliser les dommages membranaires, a permis la diminution de l'influx calcique dans les cardiomyocytes des animaux traités. Cela a induit une diminution de la fibrose, de l'ischémie et une diminution du remodelage du ventricule gauche chez ces animaux (Martindale and Metzger, 2014; Spurney *et al.*, 2011; Townsend *et al.*, 2010; Yasuda *et al.*, 2005). Un essai clinique de phase II incluant dix patients a été initié en 2018 puis suspendu en 2022 pour raison de fabrication du produit thérapeutique, les résultats sont en attente de publication (NCT03558958).

Des molécules inhibitrices de l'échangeur sodium/proton de type 1 (NHE-1), comme le riméporide, sont aussi à l'étude pour l'inhibition des anomalies calciques. Cette isoforme NHE-1 est omniprésente dans les membranes cellulaires des mammifères mais est prédominante dans le cœur et les muscles squelettiques. Dans des conditions physiologiques, cette protéine a un rôle de maintien du pH intracellulaire et du volume cytoplasmique grâce à l'échange de protons intracellulaires contre les ions sodium extracellulaires (Fliegel, 2005). Dans certaines conditions pathologiques comme la DMD, la surcharge sodique cytoplasmique entraîne une augmentation du calcium via l'interaction et réversion directe de l'échangeur sodium calcium (NCX) (Ioannou *et al.*, 2015; Previtali *et al.*, 2020). Des travaux ont ainsi montré que NHE-1 contribue à l'hypertrophie cardiaque (Odunewu-Aderibigbe and Fliegel, 2014). Son inhibition permet une atténuation du remodelage du myocarde et de l'insuffisance cardiaque (Evans *et al.*, 2009). Plusieurs études ont été menées sur l'inhibition de NHE-1 dans le cœur par le riméporide, notamment sur le modèle du chien GRMD. Ces travaux ont permis de confirmer l'effet cardioprotecteur du riméporide dans le cadre d'un traitement préventif de la cardiomyopathie dilatée (Ghaleh *et al.*, 2020). Les résultats ont montré un effet anti-inflammatoire et anti-fibrotique du riméporide avec une amélioration de la fonction cardiaque des animaux dystrophiques. Le riméporide a donc été l'objet d'un essai clinique de phase Ib,

RIM4DMD, pour la DMD (NCT02710591). Les résultats indiquent une bonne tolérance de la molécule justifiant d'une poursuite de l'essai clinique pour évaluer l'effet du riméporide sur la pathologie cardiaque, principalement (Previtali *et al.*, 2020).

Les dérégulations calciques étant également induites par les fuites du calcium du réticulum sarcoplasmique via le canal RyR, des études se sont intéressées à l'inhibition de ces flux calciques par la stabilisation du complexe RyR-calstabile grâce à la molécule Rycal® (Andersson and Marks, 2010; Law *et al.*, 2020). Dans le modèle de la souris *mdx*, le Rycal® a permis de diminuer la concentration calcique au repos dans les cardiomyocytes, de réduire l'influx calcique du RyR et de diminuer les arythmies cardiaques provoquées par un challenge à l'isoproterenol (Fauconnier *et al.*, 2010). Un essai clinique de phase I initié en 2020 par Servier en collaboration avec ARMGO est en cours pour tester une molécule Rycal® (S48168) sur des patients atteints de myopathies en lien avec le RyR1 (NCT04141670), mais aucun essai n'a encore démarré pour les patients DMD.

Une autre molécule déjà commercialisée, le Tranilast, a été testé chez les patients DMD. Cette molécule connue comme antiasthmatique s'est également révélée être inhibitrice du canal ionique perméable au calcium TRPV2 et son administration à des souris *mdx* a montré une réduction de la fibrose et une amélioration de la fonction musculaire (Darakhshan and Pour, 2015; Swiderski *et al.*, 2014). Une étude pilote a été menée sur deux patients DMD afin d'étudier la bonne tolérance et l'efficacité du Tranilast sur la cardiomyopathie dilatée. Cependant, les patients ont montré plusieurs effets secondaires, comme une atteinte rénale et des interactions médicamenteuses avec les anticoagulants. Une étude de phase I/II multicentrique a été approuvée au Japon, elle doit inclure vingt patients qui recevront quotidiennement du Tranilast pendant 28 à 116 semaines (Matsumura *et al.*, 2018, 2019). Les résultats attendus 2 ans après la fin de l'étude renseigneront principalement sur le taux de BNP (peptide natriuretic de type B, biomarqueur de l'insuffisance cardiaque) mesuré dans le sang des patients.

Chez la souris *mdx*, des molécules aminoglycosides comme la streptomycine, connue pour inhiber les canaux ioniques mécanosensibles et les canaux activés par l'étirement (Belus and White, 2003) ont été testées en vue d'inhiber les anomalies calciques via le blocage des canaux calciques (Jørgensen *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2008). Une administration fœtale de la

molécule lors de la gestation des femelles a permis d'étudier un effet au long terme sur le développement pathologique des souris *mdx*. Il a été montré que la streptomycine permettait l'inhibition des influx calciques dans les fibres musculaires des souris *mdx*, et induisait une diminution de l'atteinte des muscles dystrophiques, avec une stabilisation du complexe β -dystroglycane et par extension, du sarcolemme (Jørgensen *et al.*, 2011). Cette stratégie comporte cependant des limites car la streptomycine a un effet nocif direct sur les ribosomes mitochondriaux. Elle peut induire à long terme une accélération de la dégénérescence musculaire se traduisant par l'observation d'un grand nombre de noyaux centraux dans les fibres musculaires *mdx* (Holliday, 2005; Jørgensen *et al.*, 2011).

Cibler les anomalies calciques qui surviennent dans les muscles des patients DMD est difficile à mettre en œuvre à l'heure actuelle. Une stratégie thérapeutique idéale permettrait de cibler directement le canal responsable de l'augmentation de la SPCa, et cela uniquement dans les muscles, de manière à ne pas induire d'effets indésirables dans les autres organes du patient. Le principal frein à la mise en place de ces stratégies thérapeutiques aujourd'hui est l'identité moléculaire inconnue des canaux impliqués dans l'augmentation de la SPCa. Les stratégies proposées en essais cliniques ciblent donc indirectement les anomalies calciques chez les patients DMD. Dans l'attente des résultats de ces essais, des inconvénients et limites sont déjà perceptibles quant à l'utilisation de ces stratégies thérapeutiques. Le principal inconvénient est la nature des produits proposés, il s'agit uniquement de molécules pharmacologiques. Cela implique une administration systémique des principes actifs, et donc un ciblage non spécifique des différents organes et tissus du patient. Cette inhibition du calcium de manière non spécifique pourrait probablement induire de nombreux effets indésirables dans certains organes. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, qui a consisté à l'identification de canaux calciques candidats à l'augmentation de la SPCa, et à la conception de stratégie thérapeutique par thérapie génique pour les cibler dans un contexte dystrophique.

L'identité moléculaire des canaux impliqués dans l'augmentation de la SPCa demeure incertaine encore aujourd'hui. Cependant, plusieurs hypothèses ont été émises quant à l'identité de ces canaux ioniques (Allen and Whitehead, 2011). Elles ont été proposées à partir des caractéristiques de flux calciques observés dans les fibres musculaires dystrophiques. Grâce à la description de ces courants, deux principales caractéristiques des canaux impliqués dans la

SPCa se sont dégagées. Il s'agit (i) des canaux pouvant être activés par l'étirement, appelés canaux SAC (Stretch-Activated-Calcium), (ii) ou/et de canaux pouvant être activés par la déplétion des stocks intracellulaires en calcium, appelés canaux SOC (Store-Operated Calcium). Parmi les canaux identifiés à ce jour, certains appartenant à la famille des canaux TRP (Transient Receptor Potential) possèdent ces propriétés. Ils sont effectivement capables d'être activés à des degrés divers par l'étirement et/ou la déplétion en calcium des stocks intracellulaires (Krüger *et al.*, 2008; Sabourin *et al.*, 2016; Lorin *et al.*, 2015). C'est donc dans le cadre de la recherche de candidats à l'augmentation de la SPCa dans un contexte DMD, que nous nous sommes intéressés aux canaux TRP lors de ces travaux de thèse. Dans le but d'étudier leur potentielle implication dans les dérégulations calciques des muscles dystrophiques, il est important de présenter les différentes protéines appartenant à la famille des canaux TRP.

IV. La super famille des canaux Transient Receptor Potential

Avec l'évolution, les organismes se sont adaptés pour percevoir rapidement et précisément l'environnement qui les entoure. Un groupe de molécules jouant un rôle clé dans l'interprétation de ces stimuli environnementaux est une classe de protéines membranaires appelées canaux TRP (Samanta *et al.*, 2018). Les canaux TRP forment une famille de canaux cationiques agissant comme transducteur de signal en modifiant le potentiel membranaire ou la concentration calcique intracellulaire. La découverte de ces canaux a débuté en 1969 avec les recherches des professeurs Cosens et Manning. Ces derniers ont généré des lignées de drosophiles mutantes dans le but d'étudier les fonctions du système nerveux. L'une de ces lignées présentait un comportement anormal à l'exposition d'une forte lumière, évoquant une cécité (Cosens and Manning, 1969). Les électrorétinogrammes enregistrés étaient anormaux, ce qui indiquait un dysfonctionnement de la rétine. Cette lignée fut nommée *trp* pour transient receptor potential et le clonage du gène *trp* muté a permis d'identifier le premier membre de la superfamille des TRP, le canal TRPC1 (Samanta *et al.*, 2018).

La superfamille des canaux TRP regroupe une grande diversité de canaux ioniques assez conservés entre les espèces, des nématodes aux humains (Figure 20.A) (Palmer *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 2000). D'après les homologues de séquences, les canaux TRP ont été classés en six sous-familles : les canaux TRPC (Transient Receptor Potential Canonical), les canaux TRPV

(Transient Receptor Potential Vanilloid), les canaux TRPM (Transient Receptor Potential Melastatin), les canaux TRPA (Transient Receptor Potential Ankyrin), les canaux TRPML (Transient Receptor Potential Mucolipin), et les canaux TRPP (Transient Receptor Potential Polycystic). D'autres sous familles de canaux TRP ont été identifiées mais ne sont pas exprimées chez les mammifères, il s'agit des canaux TRPY (Yeast) présents chez les levures et champignons, et les canaux TRPN (NOMP-C homologues), identifiés chez les invertébrés comme les mouches et les vers. Tous les canaux TRP sont organisés en six segments transmembranaires, avec une région hydrophobe appelée P-loop (pore loop) responsable de la perméabilité ionique située entre les cinquième et sixième segments transmembranaires (Wang *et al.*, 2020). Les canaux TRPC, TRPV, et TRPA possèdent des répétitions de motif ankyrine dans le fragment intracellulaire N-terminal (sauf pour TRPM), qui facilitent l'ancrage membranaire et l'interaction avec d'autres protéines. Dans le domaine C-terminal, les canaux TRPM, TRPV et TRPC possèdent un motif appelé motif TRP très conservé. Il est impliqué dans la multimérisation des canaux et la perméabilité du canal (Caterina, 2015; Moran, 2017). Ils forment un canal fonctionnel après homo ou hétérotétramérisation comme illustré sur la Figure 20.B. La composition de ces tétramères n'est pas connue de manière exhaustive mais permettrait de faire varier les modes de régulation des canaux. Cette composition des canaux TRP semble également varier selon le type cellulaire ou le processus cellulaire dans lequel il est impliqué.

A. Revue des sous-familles de canaux TRP

Les canaux TRPV

Le membre fondateur de la famille des canaux TRPV a été TRPV1, qui a été identifié en 1997 dans les neurones en raison de sa sensibilité à la fois à la chaleur, mais également à la capsaïcine (composé chimique de la famille des alcaloïdes et composant actif du piment responsable de la sensation de brûlure) (Caterina *et al.*, 1997; Pumroy *et al.*, 2020). Après la découverte des cinq autres canaux TRPV, une classification en deux sous-groupes a été établie. Ainsi, les canaux TRPV1, TRPV2 et TRPV4 ont été regroupés du fait de leurs caractéristiques thermosensibles (Patapoutian *et al.*, 2003). Par ailleurs, les canaux TRPV5 et TRPV6 formeraient un second groupe en raison de leur homologie de séquence et de leur insensibilité à la température (van Goor *et al.*, 2017; Peng, 2011).

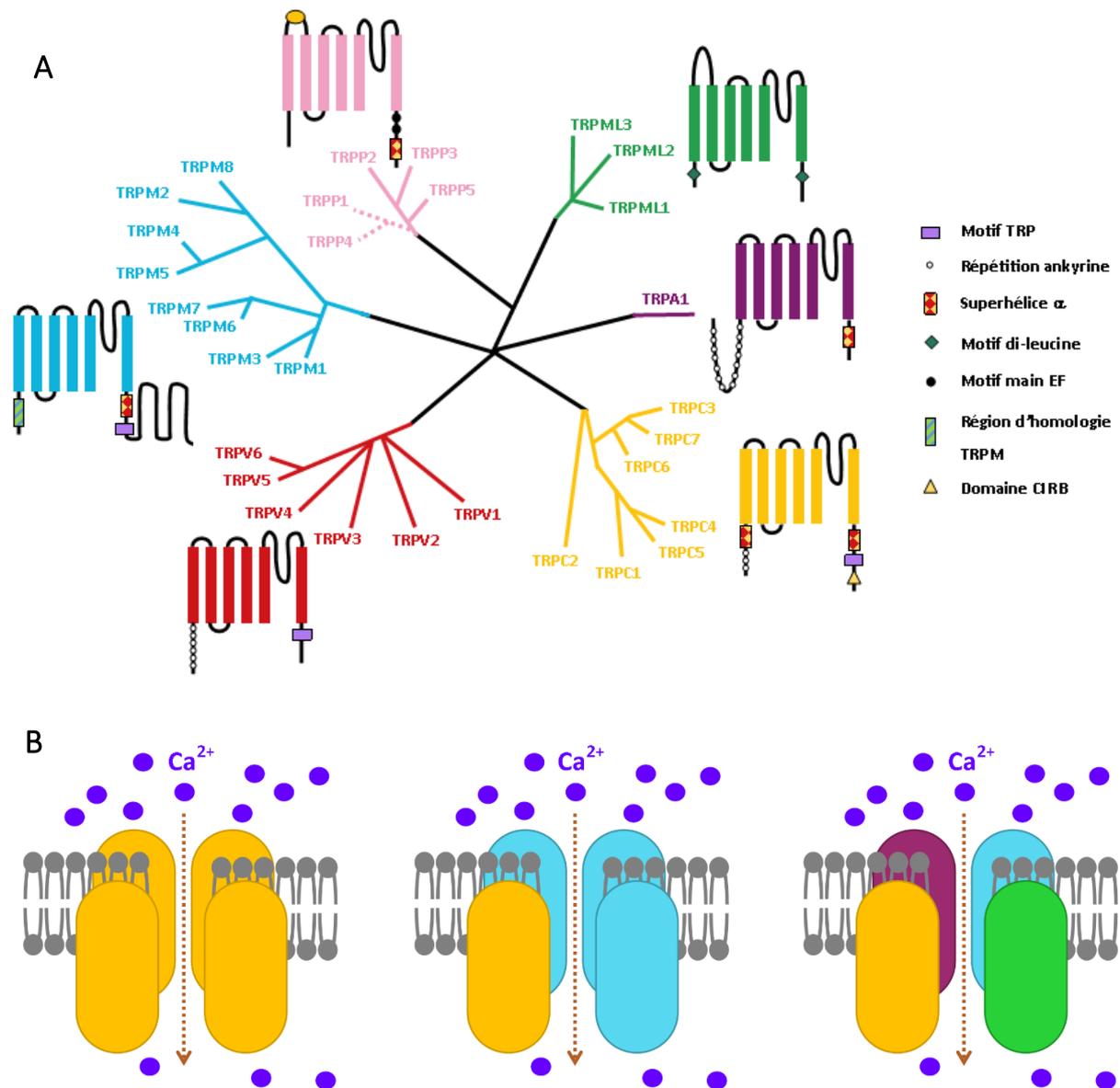


Figure 20 : Les canaux Transient Receptor Potential

A. Représentation phylogénétique de la superfamille des canaux TRP. Chaque branche représente une sous-famille de canaux chez les mammifères. Adapté de Samanta et al., 2018

B. Schéma illustrant les sous unités de canaux TRP formant un canal ionique perméable au calcium à la membrane plasmique. Chaque couleur code pour une sous-unité différente. Les différents complexes formés par les TRP schématisent les différentes possibilités de multimérisation : homotétramères, ou hétérotétramères à la composition variable.

Les travaux initiaux ont déterminé que les canaux TRPV thermosensibles seraient activés par une chaleur allant de 37°C à plus de 50°C dans des systèmes hétérologues (Caterina et al., 1997, 1999; Liedtke et al., 2000; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002). Au cours des vingt dernières années, il a été démontré que les canaux TRPV sont exprimés dans de nombreux types tissulaires. Ils joueraient un rôle important dans le développement neuronal et la douleur

neuropathique, l'inflammation, l'immunité, le diabète, les maladies neuromusculaires et le cancer (Montell, 2005; Samanta *et al.*, 2018).

Les canaux TRPV5 et TRPV6 sont exprimés sur la surface apicale des cellules épithéliales et sont très sélectifs du calcium (van Goor *et al.*, 2017; Peng, 2011). TRPV5 joue un rôle clé dans l'homéostasie calcique du rein et du côlon, tandis que TRPV6 assure ce rôle dans la prostate, le pancréas et d'autres tissus épithéliaux. Leur dysfonctionnement est d'ailleurs associé à un développement d'ostéoporose et la formation de calculs rénaux (Dang *et al.*, 2019; Peng, 2011).

Les canaux TRPM

La famille des canaux TRPM est la plus vaste et la plus diversifiée des sous-familles de canaux TRP (Fleig and Penner, 2004). En 1998 le canal TRPM1 a été identifié et cloné, ouvrant le groupe des canaux TRPM (Duncan *et al.*, 1998). Par la suite, sept autres canaux TRPM ont été identifiés (Huang *et al.*, 2020). Malgré des caractéristiques structurelles communes, les membres des canaux TRPM présentent une conservation de séquence moindre que celle des autres sous-familles de canaux TRP, et sont divisés en quatre sous-groupes en fonction d'homologie de séquences. Ainsi on distingue les canaux TRPM1 et TRPM3, puis les canaux TRPM2 et TRPM8, les canaux TRPM4 et TRPM5 et enfin les canaux TRPM6 et TRPM7 (Huang *et al.*, 2020).

Les canaux TRPM sont largement exprimés dans différents types cellulaires. Ils fonctionnent de manière polymodale, sont non sélectifs et sont perméables au calcium, exceptés les canaux TRPM4 et TRPM5 (Hofmann *et al.*, 2003; Launay *et al.*, 2002). Ils contribuent à la signalisation calcique cellulaire en favorisant l'entrée du calcium dans le cytosol en réponse à des stimuli comme des variations de tension ou des variations de température (Huang *et al.*, 2020). Des travaux ont montré que TRPM8 pouvait être activé par des températures froides et réagissait à l'agent réfrigérant menthol (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002). Par la suite, des études ont montré que les canaux TRPM couvraient une large gamme de températures, allant des températures froides pour TRPM8 (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002), aux tempérées pour TRPM2, TRPM4 et TRPM5 (Talavera *et al.*, 2005; Togashi *et al.*, 2006), puis chaudes pour TRPM3 (Vriens *et al.*, 2011). Ces canaux ioniques peuvent

induire directement ou indirectement des courants calciques. Pour les canaux TRPM1, TRPM2, TRPM3, TRPM6, TRPM7 et TRPM8, les courants calciques résultent directement de l'activation de ces canaux, qui présentent une perméabilité calcique. Les canaux TRPM4 et TRPM5 n'étant perméables qu'aux ions monovalents, ils assureraient un rôle de dépolarisation membranaire, et ainsi activeraient indirectement des canaux ioniques dépendant du voltage VGCC (Voltage-Gated Calcium Channel) (Fleig and Penner, 2004). Les modifications du potentiel membranaire ou de l'activité électrique cellulaire induite via les canaux TRPM peuvent affecter différents processus biologiques comme la détection du stress oxydatif, la mort cellulaire, ou la réponse myogénique (Earley *et al.*, 2004; McNulty and Fonfria, 2005; Simon *et al.*, 2013). Au vue de ces observations, les canaux TRPM ont attiré une attention croissante au cours de la dernière décennie en tant que cibles thérapeutiques pour le traitement de troubles neurodégénératifs (Sun *et al.*, 2015b), de maladies cardiovasculaires (Abriel *et al.*, 2012), du diabète de type II (Vennekens *et al.*, 2018), de l'inflammation et des douleurs inflammatoires (Zierler *et al.*, 2017).

Les canaux TRPA

La découverte des canaux TRPA a débuté lors de l'identification du canal ANKTM1. Son nom initial était lié au fait qu'il présente de nombreuses répétitions ankyrines (Li, 2017). Renommé TRPA1, c'est le seul canal de la famille TRPA présent chez l'homme, tandis que deux et quatre canaux TRPA sont respectivement exprimés chez *C.elegans* et la drosophile (Venkatachalam and Montell, 2007).

Il existe une controverse à savoir si TRPA1 est un canal régulé de manière mécanique ou par la température (Venkatachalam and Montell, 2007). Dans un système hétérologue, il a été montré que le canal TRPA1 est activé par le froid douloureux avec une température inférieure à 17°C (Bandell *et al.*, 2004; Story *et al.*, 2003). Il a par ailleurs été suggéré qu'il puisse aussi être régulé mécaniquement, grâce aux nombreuses répétitions ankyrines qui lui procurent une forme de ressort à l'extrémité N-terminale du canal, capable de transduire une force mécanique (Venkatachalam and Montell, 2007). Chez la drosophile, les 3 canaux TRPA peuvent être régulés par le froid, mais également par des températures modérées et chaudes (Lee *et al.*, 2005; Rosenzweig *et al.*, 2005; Viswanath *et al.*, 2003). TRPA1 peut également être activé par des molécules comme le composant psychoactif du cannabis (tetrahydrocannabinol)

(Jordt *et al.*, 2004), et la voie de la PLC (voir paragraphe « La voie de la phospholipase C », page 99) (Bandell *et al.*, 2004).

TRPA1 est localisé à la membrane plasmique des nerfs sensoriels détectant la douleur. Il joue un rôle dans le déclenchement des comportements d'évitement, et intervient dans des voies favorisant les réponses durables comme l'inflammation (Bautista *et al.*, 2006; Talavera *et al.*, 2005).

Les canaux TRPML

La sous-famille des canaux TRP est constituée de trois membres, TRPML1, TRPML2 et TRPML3 (Venkatachalam and Montell, 2007). Contrairement aux autres canaux TRP qui sont principalement exprimés à la membrane plasmique ou du réticulum, les canaux TRPML sont exprimés dans le système endolysosomal, c'est-à-dire dans les endosomes précoces et tardifs (Spix *et al.*, 2020). Les trois canaux peuvent être activés par le PIP₂, ainsi que par le pH luminal (Chen *et al.*, 2014, 2017; Dong *et al.*, 2008; Plesch *et al.*, 2018). TRPML1 est plus sensible aux pH très acides comme dans les lysosomes puis devient moins actif lorsque le pH est neutre, tandis que TRPML2 et TRPML3 sont activés par les pH plus basiques comme dans les endosomes précoces et de recyclage (Chen *et al.*, 2014).

Plusieurs implications fonctionnelles sont proposées pour TRPML1. Il serait notamment impliqué dans les mécanismes de sécrétions d'acides gastriques par les cellules pariétales (Chandra *et al.*, 2011; Sahoo *et al.*, 2017). Il agirait aussi comme senseur de ROS dans les lysosomes pour la régulation de l'autophagie (Coblentz *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016), ainsi que dans les processus de réparation membranaire (Cheng *et al.*, 2014). Le dysfonctionnement de TRPML1 induit une maladie rare et létale appelée mucopolysaccharidose de type IV. Les principales caractéristiques de cette pathologie sont une sévère dégénérescence neurologique et rétinienne, un retard mental et psychomoteur, et une hypotonie (Spix *et al.*, 2020). Le canal TRPML1 a été d'avantage étudié que les canaux TRPML2 et TRPML3, en raison de son association avec la mucopolysaccharidose. Chez la souris, la mutation gain de fonction du canal TRPML3 induit une surdité et une dilution de la couleur du pelage en raison de la perte des cellules ciliées et des mélanocytes de l'oreille interne suite à une surcharge en calcium intracellulaire (Di Palma *et al.*, 2002; Grimm *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Nagata *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2007).

Les souris TRPML2^{-/-} et TRPML3^{-/-} sont viables, et d'après les données génomiques, les mutations délétères pour les gènes codants TRPML2 et TRPML3 chez l'homme existent également, sans que des problèmes de santé puissent y être associés (Spix *et al.*, 2020). Contrairement à TRPML1, exprimé de manière ubiquitaire, les canaux TRPML2 et TRPML3 sont plus particulièrement exprimés dans certains types cellulaires, comme les cellules immunitaires. Les canaux TRPML auraient des rôles dans plusieurs processus physiologiques (Spix *et al.*, 2020). TRPML1 serait impliqué dans la phagocytose de grosses particules (Samie *et al.*, 2013), la migration des cellules dendritiques (Bretou *et al.*, 2017) ou encore le potentiel fonctionnel des cellules NK (Natural Killer) (Goodridge *et al.*, 2019). TRPML2, quant à lui, jouerait un rôle dans la sécrétion de chimiokines et cytokines par les macrophages (Plesch *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2015a).

Les canaux TRPP

Le premier canal TRPP identifié fut TRPP2, alors appelé PKD2 car impliqué dans l'ADPKD (polykystose rénale autosomique dominante) (Mochizuki *et al.*, 1996). Ils présentent peu d'homologie de séquences avec les autres canaux TRP (Venkatachalam and Montell, 2007). Ils partagent cependant une caractéristique commune aux canaux TRPML par leur grande boucle entre le segment transmembranaire S1 et S2. Les TRPP pourraient être la sous-famille la plus primitive des canaux TRP car des homologues microbiens de TRPP2 ont été retrouvés chez la levure (Palmer *et al.*, 2005). Les 3 TRPP exprimés chez l'homme sont TRPP2, TRPP3 et TRPP5, et fonctionnent comme des canaux ioniques non sélectifs perméables au calcium (Li, 2017). Ils sont régulés par la polycystine-1, avec lequel ils s'assemblent pour former des complexes canaux-récepteurs. Ils forment ainsi une entité de signalisation calcique où l'ion calcium joue le rôle de second messenger (Hofherr and Köttgen, 2011). TRPP2 peut également être activé de manière mécanique par la voie des PIP₂ lors de son activation par l'EGF (Ma *et al.*, 2005; Venkatachalam and Montell, 2007).

En plus de servir de canal pour l'entrée du calcium extracellulaire à la membrane plasmique, TRPP2 est également localisé à la membrane du RE, où il est suggéré qu'il servirait de canal de libération du calcium (Koulen *et al.*, 2002). Chez *C.elegans*, le canal homologue de TRPP2 assure une fonction de libération du calcium des stocks intracellulaires, médiée par l'IP₃ (voir paragraphe « La voie du récepteur à l'IP₃ », page 100) et la ryanodine (Koulen *et al.*, 2002).

Chez les mammifères, la localisation de TRPP2 est liée à l'interaction de son l'extrémité C-terminale avec PACS-2 (Phosphofurin acidic cluster sorting protein-2) (Köttgen *et al.*, 2005). TRPP3, quant à lui, est un canal cationique non sélectif, perméable au calcium et activé de manière voltage dépendant (Liu *et al.*, 2002).

B. Les canaux TRPC

Les premiers membres de la superfamille de canaux TRP étudiés ont été les canaux TRPC. Le gène du canal TRPC1 a été cloné, il y a 25 ans sur la base de son homologie de séquence avec le gène *trp* identifié chez la drosophile (Wes *et al.*, 1995). Par la suite, sept membres ont été identifiés, regroupés en quatre groupes suivant leurs similitudes structurales. Les canaux TRPC3, TRPC6 et TRPC7 constituent un premier groupe, tandis que les canaux TRPC4 et TRPC5 en constituent un deuxième. Les canaux TRPC1 et TRPC2 (ce dernier n'étant pas exprimé chez l'homme) sont isolés dans les deux derniers groupes (Chen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). Ils sont exprimés dans de nombreux types cellulaires et tissus comme le cerveau, le placenta, les glandes surrénales, la rétine ou les muscles (Li *et al.*, 2019).

1. La sélectivité des canaux TRPC

Tous les canaux TRPC ne présentent pas la même perméabilité ionique en fonction des ions considérés. La perméabilité ionique est calculée grâce à l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz (Goldman, 1943). Cette équation est une généralisation de l'équation de Nernst, permettant de calculer le potentiel d'une membrane renfermant plusieurs types de conductances. TRPC1 est un canal non sélectif, perméable aux ions calcium, césium et sodium (Zitt *et al.*, 1996). Le canal TRPC2 montre une sélectivité croissante pour les ions calcium, césium puis sodium avec respectivement un ratio de perméabilité de 2,7 pour P_{Ca}/P_{Na} , et 1,5 pour P_{Cs}/P_{Na} (Lucas *et al.*, 2003). Le canal TRPC3 est plus sélectif aux ions calcium, puis aux ions sodium, et pour finir aux ions césium de manière équivalente avec les ions potassium ($P_{Ca}/P_{Na} = 1,6$) (Kamouchi *et al.*, 1999). TRPC4 est plus sélectif au calcium, puis au sodium à égalité avec le césium ($P_{Ca}/P_{Na} = 7$) (Feng, 2017). Le canal TRPC5 est plus sélectif au calcium, puis au sodium et au césium ($P_{Ca}/P_{Na} = 9,5$) (Okada *et al.*, 1998). TRPC6 est plus sélectif aux ions calcium, puis aux ions césium et enfin aux ions sodium ($P_{Ca}/P_{Na} = 5$) (Hofmann *et al.*, 1999). Pour finir, le canal

TRPC7 est plus perméable au calcium, puis au sodium et au césium de manière équivalente ($P_{Ca}/P_{Na} = 1,9$) (Okada *et al.*, 1999).

2. La structure des canaux TRPC

En 2018, il a été possible d'étudier la structure des TRPC en haute résolution grâce à l'avènement de la microscopie électronique cryogénique à particule unique (cryo-EM) (Duan *et al.*, 2018, 2019; Fan *et al.*; Tang *et al.*, 2018; Vinayagam *et al.*, 2018). Les canaux TRPC possèdent en région N-terminale trois à quatre répétitions ankryne et un domaine superhélice. Les quatre premiers segments transmembranaires contiennent plusieurs résidus chargés positivement et forment un domaine de type sensible au voltage similaire aux domaines des canaux potassiques, sodiques et calciques dépendants du voltage. Les deux derniers segments transmembranaires forment la P-loop commune à tous les canaux TRP, canaux voltage-dépendants et canaux potassiques et sodiques bactériens (Wang *et al.*, 2020). Lorsque les canaux TRPC se tétramérisent, les domaines ressemblants au capteur de voltage permutent pour interagir avec les domaines des protomères voisins. Ainsi, les quatre P-loop se rejoignent au centre du complexe tétramérique pour former le pore ionique. Cette disposition est très conservée au sein de la superfamille des canaux TRP, ainsi que pour les canaux voltage-dépendants plus généralement. Tous les canaux TRPC partagent un motif conservé constitué des acides aminés LFW (leucine, phénylalanine, tryptophane), situé dans la pore loop qui interagit avec les segments transmembranaires S5 et S6 (Chen *et al.*, 2020). L'extrémité C-terminale des canaux TRPC est riche en prolines et présente le motif TRP très conservé, composé de vingt-cinq acides aminés dont la « TRP box » : EWKFAR (acide glutamique, tryptophane, lysine, phénylalanine, Alanine et Arginine). Il y existe également un domaine de liaison à la calmoduline et au récepteur à l'IP3, nommé domaine CIRB (CaM/IP3 Receptor Binding). Enfin, comme pour l'extrémité N-terminale, le segment C-terminal est constitué d'un domaine superhélice (Figure 21) (Fan *et al.*; Li *et al.*, 2019).

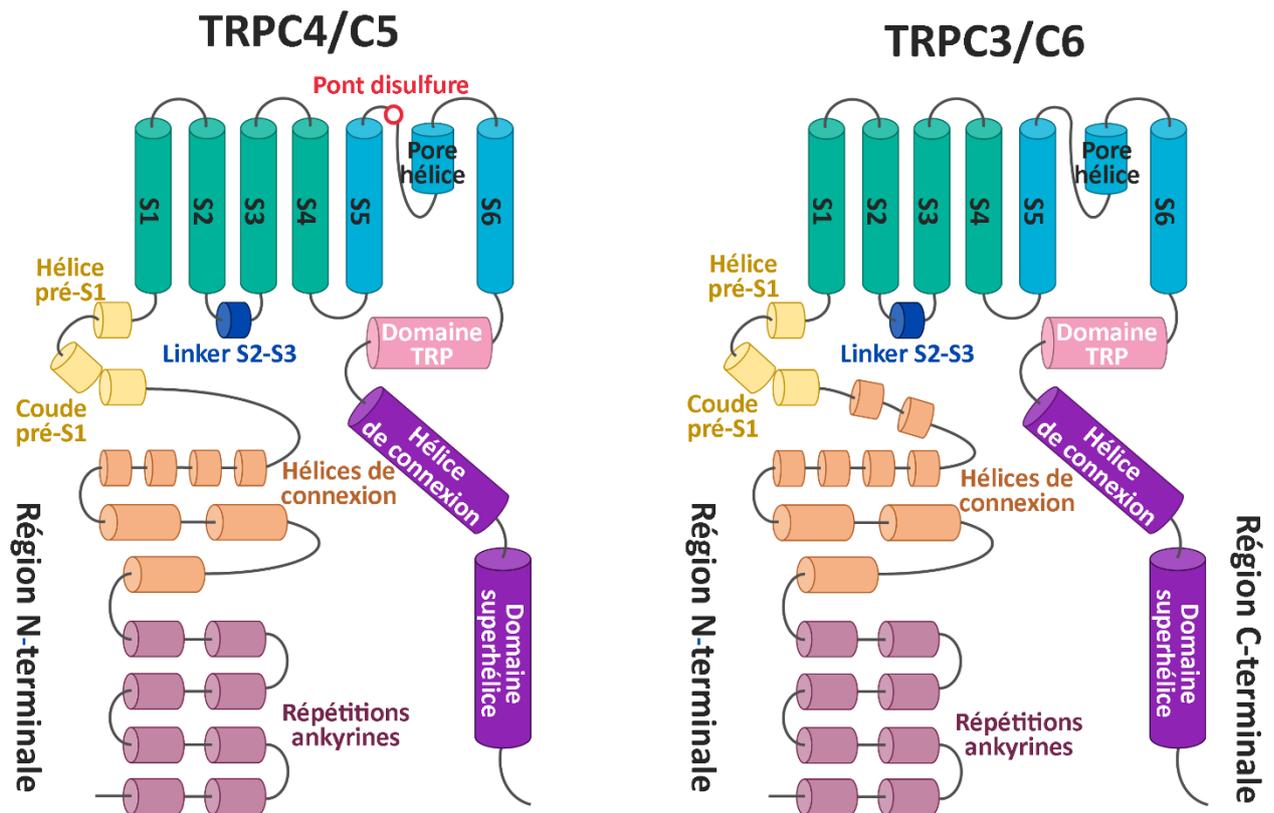


Figure 21: Représentation schématique des principaux domaines structuraux des canaux TRPC

Les canaux TRPC4 et TRPC5 possèdent une structure très similaire. Les canaux TRPC3 et TRPC6 sont également très similaires et sont schématisés avec la même structure. En région N-terminale, l'ensemble des canaux TRPC possèdent des répétitions ankyrines et des hélices linker. Avant le premier segment transmembranaire S1 des canaux, se trouvent le coude pré-S1, et l'hélice pré-S1. Entre les segments transmembranaires S2 et S3 se situe une hélice linker S2-S3. La région essentielle à la perméabilité ionique des canaux se situe dans la région de la Pore hélice, entre les segments transmembranaires S5 et S6. Dans cette région nommé pore-loop, les canaux TRPC4 et TRPC5 ont un pont disulfure. Le domaine C-terminal des canaux possède le domaine TRP très conservé ainsi qu'une hélice de connexion et le domaine super hélice

Adapté de Li et al, 2019

3. Les mécanismes d'activation des canaux TRPC

La voie de la phospholipase C

La PLC (phospholipase C), est un récepteur couplé à la protéine G. Dans des conditions physiologiques, la voie des PLC peut être déclenchée par l'activation de la protéine G. La voie de signalisation de la PLC conduit à l'hydrolyse de la molécule PIP₂ (phosphatidylinositol biphosphate) à la membrane plasmique. Ceci libère de l'IP₃ (inositol 1, 4, 5, triphosphate) et du DAG (diacylglycérol). L'IP₃ libéré va ensuite pouvoir servir d'activateur aux récepteurs IP₃ du réticulum endoplasmique et déclencher une sortie du calcium du réticulum, et une

augmentation du $[Ca^{2+}]_c$ (concentration calcique cytoplasmique) (Deist and Capiod, 2011). Au début des années 2000, des recherches ont montré que les canaux TRPC sont directement activés par le DAG et son analogue synthétique l'OAG (Hofmann *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 1999; Storch *et al.*, 2017).

La voie du récepteur à l'IP₃

Plusieurs études ont montré que le récepteur à l'IP₃ pouvait également activer directement les canaux TRPC par liaison physique via le domaine CIRB (domaine de liaison à l'IP₃ et à la calmoduline) situé à leur extrémité C-terminale (Boulay *et al.*, 1999; Kanki *et al.*, 2001; Kiselyov *et al.*, 1998, 1999; Tang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Il a également été montré sur les canaux TRPC1, TRPC3 et TRPC4 que l'IP₃ était en compétition avec la calmoduline pour le domaine CIRB (Kiselyov *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2001; Vaca and Sampieri, 2002; Zhang *et al.*, 2001). La calmoduline est une protéine senseur du calcium. Elle présente des motifs de « main EF » ayant une affinité pour cet ion. Elle inhibe le canal TRPC lorsqu'il se lie à son domaine CIRB (Wang *et al.*, 2020).

Par ailleurs, il a été montré que les canaux TRPC2, TRPC3 et TRPC5 interagissaient avec la protéine junctate, une protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique capable de se lier également avec les récepteurs à l'IP₃ (Stambouljian *et al.*, 2005; Treves *et al.*, 2004, 2010). Junctate fait partie du complexe STIM1-Orai1 à la jonction du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique. Il joue un rôle majeur dans les courants SOCE en agissant comme un senseur des stocks intracellulaires en calcium dans la lumière du RE (Srikanth *et al.*, 2012; Treves *et al.*, 2004, 2010).

La voie des protons

L'hydrolyse de PIP₂ par la PLC, produit également des protons (H⁺), conduisant à l'acidification locale dans la région cytoplasmique sous membranaire (Wang *et al.*, 2020). L'effet de cette acidification intracellulaire a été étudiée chez la drosophile pour les canaux TRP endogènes. L'effet de cette acidification faciliterait l'activation des canaux (Huang *et al.*, 2010). Plus récemment, l'acidification du milieu a confirmé la facilitation d'activation du canal TRPC4 (Thakur *et al.*, 2020). Il est donc possible que les protons, en tant que produits de l'hydrolyse

du PIP₂ et seconds messagers de la signalisation PLC, contribuent également à l'activation de la plupart des canaux TRPC (Wang *et al.*, 2020).

La voie calcique

L'augmentation du [Ca²⁺]_c affecte différemment l'ensemble des canaux TRPC (Wang *et al.*, 2020). Dans la voie de signalisation de la PLC, le signal calcique provient initialement de la vidange des stocks intracellulaires en calcium du RE, induite par l'IP₃ (Chen *et al.*, 2020). Puis, l'influx calcique provenant des canaux TRP et Orai, activés par l'épuisement des réserves du RE, pourrait encore induire une activation supplémentaire des canaux TRPC (Cheng *et al.*, 2008; Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006). La liaison à la calmoduline (CaM) participerait à l'accélération de l'activation du canal TRPC5 (Ordaz *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été montré que la potentialisation de l'activité TRPC6 par le calcium cytosolique dépendait de sa phosphorylation par la kinase II CaM-dépendante (CaMKII) (Shi *et al.*, 2004, 2013).

Le calcium peut aussi induire l'inhibition des canaux TRP (Wang *et al.*, 2020). Dans des conditions expérimentales similaires, TRPC7 serait inhibé par le calcium, tandis que TRPC6 serait à la fois inhibé et potentialisé par cet ion divalent (Shi *et al.*, 2004). Ces mécanismes d'inhibition dépendants du calcium peuvent impliquer à la fois des processus dépendants et indépendants de la CaM (Polat *et al.*, 2019; Shi *et al.*, 2004). Pour le canal TRPC1, l'activation est facilitée par l'influx calcique médié par les canaux associés à Orai1 (Cheng *et al.*, 2008). Cependant, le calcium inhibe également le canal TRPC1 par la liaison de la CaM au CIRB C-terminal de la protéine (Singh *et al.*, 2002). Ainsi, pour plusieurs groupes de canaux TRPC, le calcium exerce à la fois des rôles d'activation et d'inhibition via divers mécanismes, comme notamment la liaison directe du calcium, la CaM ou la CaMKII (Wang *et al.*, 2020).

Très récemment, une étude réalisée par cryo-EM a identifié trois sites de liaison directe des canaux TRPC3 et TRPC6, nommé CBS1, CBS2 et CBS3 (Guo *et al.*, 2022). Ces domaines sont formés par la multimérisation des isoformes hTRPC3 et hTRPC6 dans des régions chargées négativement. Ainsi, un homotétramère de hTRPC3 par exemple, possède 4 copies identiques des domaines CBS1 à CBS3. Dans cette étude, ils ont montré que la liaison au calcium du domaine CBS1 inhiberait le canal TRPC3. La liaison du calcium au domaine CIRB3, quant à lui, jouerait un rôle d'activation du canal (Guo *et al.*, 2022).

Chaque canal TRPC possède sa propre sensibilité au calcium en fonction de ses multimérisations mais aussi des systèmes expérimentaux dans lesquels ils sont observés. Cela rend très délicates les études pour affiner les descriptions du fonctionnement de ces canaux.

L'activation dépendante des stocks intracellulaire en Ca²⁺

Un grand nombre d'études ont été consacrées à l'établissement du lien entre l'épuisement des stocks intracellulaires en calcium du RE, et l'activation des canaux TRPC (Wang *et al.*, 2020). Dans un premier temps, ils ont été considérés comme les meilleurs candidats moléculaires impliqués dans les courants SOCE. Il s'agit du processus de remplissage des stocks intracellulaires en calcium à partir du compartiment extracellulaire de manière consécutive à la vidange du RE. Ce processus permet de réguler les niveaux de réserve de calcium intracellulaire (Wang *et al.*, 2020). Ce concept a été initialement proposé par Putney il y a plus de 30 ans (Putney, 1986, 2005; Vazquez *et al.*, 2004). Ce mécanisme nécessite la présence d'un canal à la membrane plasmique, perméable au calcium, qui s'active en réponse à l'épuisement du réticulum endoplasmique en calcium (Wang *et al.*, 2020).

Avec l'identification des canaux TRPC chez les mammifères, les premières caractérisations ont été réalisées par des protocoles de mesure calcique avec la sonde fluorescente Fura-2 (Zhu *et al.*, 1996, 1998). Des cellules en culture surexprimant les canaux TRPC ont été stimulées pour induire une déplétion en calcium du RE, dépendamment ou indépendamment de l'activation de récepteurs. Cette déplétion du RE en calcium a été médiée soit par activation de la voie des PLC ou via l'ajout de thapsigargine. La thapsigargine est une molécule qui inhibe la pompe Ca²⁺-ATPase du réticulum sarco/endoplasmique SERCA, ce qui a pour effet de bloquer le remplissage en calcium du RE. Dans ces travaux, la voie des PLC a induit une augmentation de l'entrée calcique dépendante du [Ca²⁺]_c. L'activation de courants SOC consécutifs à l'ajout de thapsigargine a été observée pour TRPC1, TRPC3, TRPC4 et TRPC5, (Liu *et al.*, 2000; Philipp *et al.*, 1996, 1998; Thyagarajan *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1996, 1998) mais pas pour TRPC6 et TRPC7 (Boulay *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 1999). D'autres études employant de la thapsigargine, ont montré *a contrario* que les canaux TRPC3 et TRPC5 ne seraient pas impliqués dans les courants SOC (Okada *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998). Malgré de nombreuses études, les propriétés SOC des canaux TRPC est controversée (Hurst *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2009; Zitt *et al.*, 1996). En effet, les propriétés SOC des canaux

TRPC seraient dépendantes de la composition du tétramère de canal TRP, ainsi que de ses associations avec des protéines auxiliaires (Vazquez *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 1998).

La découverte dans les années 2005 et 2006 des protéines STIM1 et Orai1 a changé la donne en démontrant l'induction d'un courant de type SOC lors de l'expression dans un système hétérologue de Orai1 et STIM1 (Feske *et al.*, 2006; Liou *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2005; Vig *et al.*, 2006). Depuis, de plus en plus de preuves s'accumulent quant à l'association de STIM1 avec Orai1, mais également avec les TRPC, ainsi que de Orai1 avec les canaux TRPC eux-mêmes (Wang *et al.*, 2020). Il a été observé que STIM1 pouvait s'associer à TRPC1, TRPC2, TRPC4, TRPC5 et TRPC6 en réponse à l'épuisement des réserves calciques intracellulaires, mais pas à TRPC3 ni TRPC7 (Albarrán *et al.*, 2014; El Boustany *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010; López *et al.*, 2006). STIM1 peut également médier l'hétéromérisation entre TRPC1 et TRPC3 (Yuan *et al.*, 2007). Pour TRPC1, la liaison avec STIM1 pourrait impliquer une association des régions super hélice des extrémités N- et C-terminales de TRPC1 avec le domaine SOAR (STIM-Orai1 activating region) de STIM1 (Ong and Ambudkar, 2017). Ce domaine SOAR serait tout aussi important pour l'activation de Orai1 que des canaux TRPC (Lee *et al.*, 2014). La capacité du domaine SOAR à activer les courants TRPC a été testée à l'aide de la technique de patch-clamp en mode « inside out ». Le patch clamp est une technique d'isolement électrique de canaux membranaire et de mesures électrophysiologiques. Dans le cas du patch-clamp « inside out », le fragment membranaire contenant le canal étudié dans la pipette est séparé du reste de la cellule de manière à ouvrir le milieu intracellulaire et à en maîtriser la composition (Teulon, 2004). Ces expérimentations ont permis de montrer que lors de l'expression du fragment recombinant SOAR seul, il y avait une activation directe des courants induits par TRPC1, TRPC4 et TRPC5, mais pas pour TRPC3, et TRPC6 (Asanov *et al.*, 2015).

Plusieurs études soutiennent que l'interaction avec STIM confèrerait son aptitude aux canaux TRPC à devenir sensibles à l'activation par la déplétion des stocks intracellulaires en calcium (Asanov *et al.*, 2015; Desai *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2014; Ong *et al.*, 2007; Saul *et al.*, 2014; Sundivakkam *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2008). Cela pourrait expliquer pourquoi dans des systèmes hétérologues, l'activation des canaux TRPC, généralement exprimés sans co-expression de STIM1, est indépendante des stocks intracellulaire de calcium (Wang *et al.*,

2020). Il est également plausible, que Orai1 et les TRPC rentrent en compétition pour la liaison à STIM1. Cela déterminerait si l'entrée du calcium dépendante des stocks intracellulaires est gérée par les canaux SOC (formés par Orai1), ou par les canaux cationiques non sélectifs formés par les TRPC (Desai *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2014; Saul *et al.*, 2014; de Souza *et al.*, 2015). Dans les myotubes humains, l'interaction de STIM1L (variant d'épissage de STIM1) avec TRPC1 et TRPC4 favorise les courants SOCE, permet des transitoires répétitifs rapides et soutient la myogenèse (Antigny *et al.*, 2017). Tandis que pour TRPC6, il a été rapporté que son association avec STIM1 induirait sa translocation de la membrane plasmique au RE, réduisant l'entrée extracellulaire de calcium par TRPC6 mais augmentant la libération de calcium du RE (Albarrán *et al.*, 2014).

Il a aussi été rapporté que Orai1 et TRPC pourraient s'associer dans un complexe de canaux membranaires (Liao *et al.*, 2008). Des études ont montré que la suppression de l'expression endogène de Orai1 induit la suppression simultanée des courants portés par TRPC1 et les courants SOC (Cheng *et al.*, 2008). Inversement, la surexpression de Orai1 augmente ces phénomènes. Contrairement à l'exemple précédemment cité, dans des cellules musculaires lisses vasculaires, les courants SOC nécessitaient TRPC1 mais pas Orai1 (Shi *et al.*, 2017). Il est d'ailleurs suggéré que STIM1, Orai1 et TRPC pourraient co-exister dans un complexe nommé SOCIC pour store-operated calcium influx complex (Vaca, 2010). Dans ce complexe s'assembleraient et se désassembleraient les canaux composés à la fois de Orai1 associé aux TRPC et les canaux composés de TRPC ou Orai1 indépendamment, et cela de manière dynamique en réponse aux différents scénarios d'épuisement des réserves et/ou d'activation des récepteurs (Vaca, 2010).

Quel que soit le mode d'activation des canaux impliqués, elle se produit dans des régions spécialisées de la membrane plasmique, dans des régions en interaction avec STIM1 situées à la membrane du réticulum, comme par exemple au niveau des radeaux lipidiques (Vaca, 2010). Malgré l'interdépendance des protéines TRPC et Orai1, de nombreuses études ont montré des fonctions cellulaires et physiologiques distinctes entre les canaux formés par les Orai1 et les TRPC (Cheng *et al.*, 2013; Ong *et al.*, 2012). La variabilité des caractéristiques des canaux TRPC observée ne permet pas d'établir un consensus. C'est pourquoi les recherches

sur les interactions protéiques des canaux TRPC avec Orai1 et STIM1, ainsi que leur contribution aux courants SOC sont encore d'actualité (Wang *et al.*, 2020) (Figure 22).

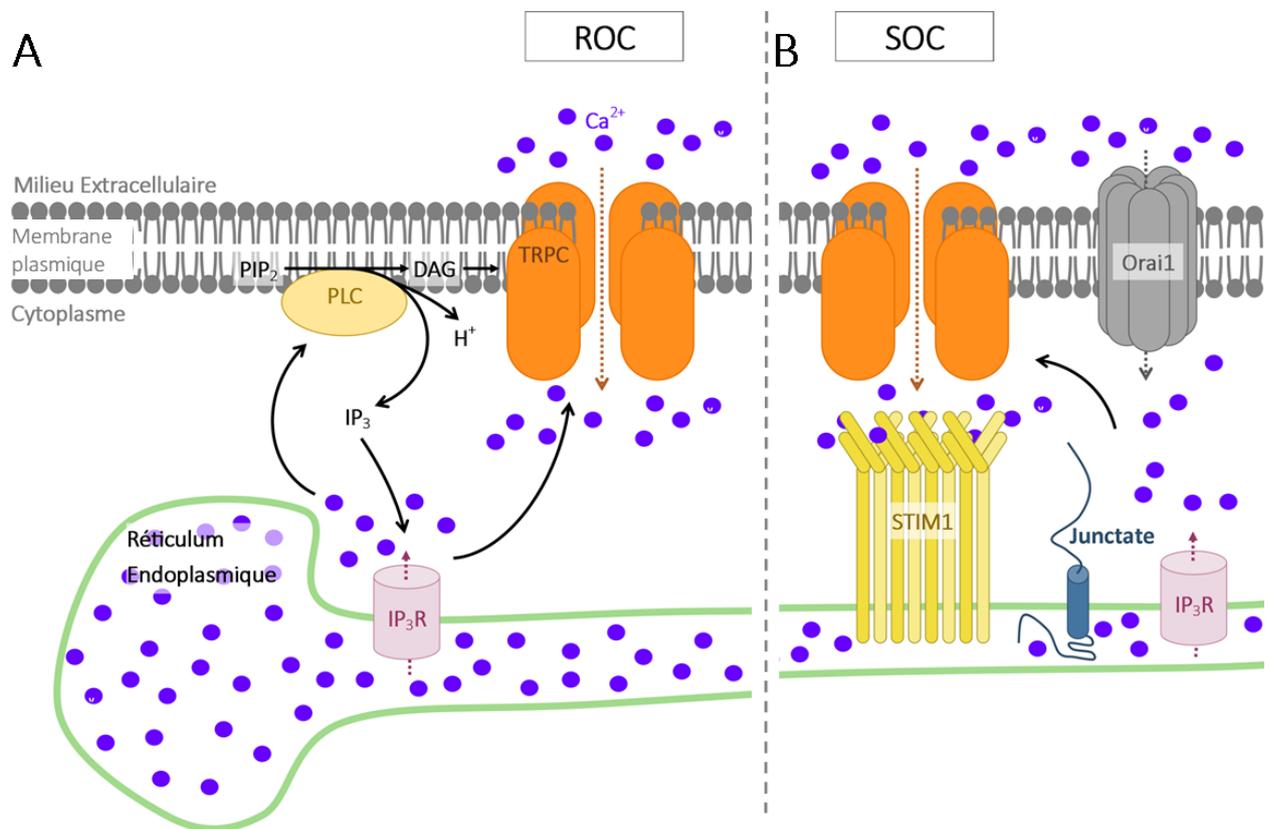


Figure 22 : Mécanismes d'activation des canaux TRPC

A. Activation des canaux TRPC médiée par les récepteurs (ROC). Indépendamment de STIM1, l'activation des récepteurs conduit à l'hydrolyse par la PLC du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) et à la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃), de diacylglycérols (DAG) et de protons (H⁺). De plus IP₃ active les récepteurs à l'IP₃ (IP₃R) à la membrane du réticulum pour libérer le Ca²⁺ stocké, provoquant une augmentation du [Ca²⁺]_c.

B. Activation des canaux TRPC médiée par les stocks intracellulaires en calcium (SOC). Il est démontré que TRPC1/C4 et C5 sont directement activés par STIM1 qui détecte l'épuisement des stocks intracellulaires en calcium dans le réticulum en s'oligomérisant pour se déplacer vers la membrane plasmique. Cela peut être facilité par le juncate, qui interagit avec les IP₃R, les TRPC et STIM1, ainsi que par le flux calcique médié par Orai1.

Adapté de Wang *et al.*, 2020

4. Les canaux TRPC dans les pathogénèses

Les canaux TRPC interviennent dans de nombreux processus physiologiques et dans la pathogénèse de diverses maladies humaines (Selvaraj *et al.*, 2010). Pour exemple, le canal TRPC6 associé à l'augmentation du calcium intracellulaire est impliqué dans la susceptibilité aux dommages cellulaires des podocytes dans les maladies rénales (Ilatovskaya and

Staruschenko, 2015). Le canal TRPC3 est, quant à lui, associé au développement des tumeurs cancéreuses de l'ovaire. L'inhibition de TRPC3 dans ce contexte aboutit à l'inhibition des transitoires calciques induites par l'EGF, connus pour moduler la croissance et la migration tumorale via la modulation calcique (Bryant *et al.*, 2004). L'inhibition de TRPC3 peut aussi bloquer la croissance de cellules ovariennes cancéreuses (Yang *et al.*, 2009). Une dérégulation de l'activité des canaux TRPC1 et TRPC3 serait aussi impliquée dans l'apparition et le développement de maladies neurologiques, comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, le trouble bipolaire et la maladie de Huntington (Bading *et al.*, 1993; Marambaud *et al.*, 2009; Schrank *et al.*, 2020). Toutes ces maladies sont connues pour être associées à des altérations de l'homéostasie calcique. L'inhibition des TRPC1 induirait l'inhibition de la prolifération neuronale et la neurodégénérescence (Chen *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2012; Selvaraj *et al.*, 2010). *A contrario*, l'inhibition de TRPC3 permettrait d'améliorer l'efficacité synaptique lors de dépression synaptique à long terme (Kim, 2013), et améliorerait les troubles de la mémoire (Neuner *et al.*, 2015). Des travaux suggèrent également que des altérations de l'expression et de la localisation de TRPC1 à la membrane plasmique seraient associées à l'apparition de symptômes similaires à la maladie de Parkinson. D'autre part, la surexpression de TRPC1 serait associée à une diminution de la neurotoxicité causée par la neurotoxine MPP⁺ (1-méthyl-4-phenylpyridinium) (Selvaraj *et al.*, 2010). Cette molécule est retrouvée par exemple dans des herbicides, ou produit de dégradation de la drogue MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine, produit accidentel de la synthèse de la substance illicite opioïde de synthèse MPPP). Elle est connue pour détruire des neurones producteurs de dopamine dans la *substantia nigra*, et induire les symptômes permanents de la maladie de Parkinson (Goldman *et al.*, 2017). TRPC3 quant à lui serait impliqué dans la pathogénèse de l'ataxie cérébelleuse (Selvaraj *et al.*, 2010). Dans un modèle de souris, une mutation « gain de fonction » de TRPC3 dans la région de la pore loop (T635A) serait associé à une dégénérescence des cellules de Purkinje avec le développement d'une ataxie cérébelleuse (Becker *et al.*, 2009, 2011).

5. Les canaux TRPC dans le muscle squelettique

Le premier article étudiant l'expression des canaux TRPC dans le muscle squelettique de la souris a été publié en 2002 (Vandebrouck *et al.*, 2002). Dans cette étude, les profils

d'expression de différents canaux TRP chez la souris ont été évalués par des techniques d'hybridation *in situ* et de Real-Time qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) (Kunert-Keil *et al.*, 2006). Il a ainsi été établi que l'expression des canaux TRPC variait entre les souches de souris étudiées, en particulier entre les souris NOD, C57Bl/10 et Balb/c. Cependant, les muscles squelettiques de souris, exprimeraient principalement les canaux TRPC3 et TRPC6 (Krüger *et al.*, 2008; Riccio *et al.*, 2002). Chez l'homme, une étude transcriptionnelle dans le muscle squelettique a montré que les ARNm principalement exprimés seraient ceux de TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5 et TRPC6. Plus récemment, une étude protéique dans des myotubes humains suggérait une similarité d'expression pour tous les canaux, excepté TRPC5 (Antigny *et al.*, 2013).

a. TRPC1 dans le muscle squelettique

Dans les fibres musculaires de souris adultes, plusieurs études ont montré que TRPC1 serait localisé au sarcolemme, soit par des approches électrophysiologiques (Ducret *et al.*, 2006; Vandebrouck *et al.*, 2007, 2002; Zanou *et al.*, 2010), soit à l'aide de techniques d'immunomarquage (Stiber *et al.*, 2008b; Vandebrouck *et al.*, 2002). *A contrario*, en 2009, une étude proposait une localisation de TRPC1 principalement à la membrane du réticulum sarcoplasmique, où il se comporterait comme canal de fuite du RS (Berbey *et al.*, 2009). Cette hypothèse a été remise en cause dans une lettre aux éditeurs dans laquelle les auteurs suggéraient que la détection de TRPC1 au RS résultait de l'utilisation d'anticorps non spécifiques (Tajeddine *et al.*, 2010). Dans d'autres tissus, TRPC1 a été localisé de manière intracellulaire (Nesin and Tsiokas, 2014), et dans le muscle squelettique, d'autres TRPC, comme le TRPC3 ont été trouvés dans des compartiments intracellulaires (Vandebrouck *et al.*, 2002). Malgré les divergences, il apparaît qu'une fraction importante de TRPC1 est localisée au sarcolemme et assure un rôle dans l'entrée du calcium extracellulaire (Saüc and Frieden, 2017). Dans le muscle, plusieurs études employant des techniques de patch-clamp ou d'imagerie calcique ont montré que TRPC1 peut être mécanosensible, notamment activé par l'étirement du sarcolemme (Ducret *et al.*, 2006; Formigli *et al.*, 2009; Louis *et al.*, 2008). Cependant, d'autres études ont remis en question cette propriété après avoir montré que TRPC1 ne possédait pas de propriété mécanosensible dans le muscle squelettique natif (Gottlieb *et al.*, 2008; Zanou *et al.*, 2010). En utilisant la technique de l'extinction de fluorescence du Fura-2 au

manganèse, les auteurs ont confirmé l'absence d'altération des courants SAC dans les muscles TRPC1^{-/-}. La taille des muscles de ces animaux était cependant plus petite, montrant une implication de TRPC1 dans la myogenèse, hypothèse en accord avec d'autres observations (Saüc and Frieden, 2017; Zanou *et al.*, 2010). De plus, si ces animaux présentaient un comportement semblable aux animaux sains lorsqu'ils étaient soumis à une course libre, ils étaient plus fatigables lors d'un exercice intense. Cette diminution de résistance à la fatigue musculaire était retrouvée lors des mesures de force isométrique sur des muscles soléaires *ex vivo* (Zanou *et al.*, 2010). La susceptibilité à la fatigue des animaux TRPC1^{-/-} est particulièrement intéressante parce que le phénotype des animaux rappelle celui des animaux déficients pour STIM1 ou Orai1 (Ambudkar, 2014). Cela suggèrerait que ces molécules travaillent ensemble dans la même voie de signalisation, comme cela a été montré dans les glandes salivaires. Plus récemment, de nouvelles expériences ont permis de montrer que STIM1 activerait bien Orai1 mais également TRPC1. Les modes d'activation et de régulation de TRPC1 dans les fibres musculaires humaines différenciées, ainsi que ses partenaires, restent encore à affiner (Saüc and Frieden, 2017).

Dans les myotubes murins, il a été rapporté que TRPC1 forme un complexe stable avec la dystrophine et l' α 1-syntrophine (protéine du complexe protéique associé à la dystrophine) (Vandebrouck *et al.*, 2007). Par la suite, il a été proposé que TRPC4 soit un membre de ce complexe (Sabourin *et al.*, 2009). L'inhibition de l'expression de TRPC1 et TRPC4, était associée à une réduction des courants SOCE dans les myotubes, alors que l'expression de l' α 1-syntrophine induisait une augmentation de l'influx calcique.

b. TRPC3 dans le muscle squelettique

Le premier article décrivant TRPC3 dans le muscle a montré une localisation intracellulaire du canal dans les myotubes (Vandebrouck *et al.*, 2002). Plus tard, il a été rapporté que TRPC3 était plus exprimé dans les fibres musculaires lentes par rapport aux fibres musculaires rapides et qu'il participerait à l'entrée du calcium extracellulaire, suggérant une localisation au sarcolemme (Rosenberg *et al.*, 2004). L'expression de TRPC3 serait augmentée chez la souris après un exercice de course libre seulement dans les fibres lentes qui sont celles préférentiellement activées lors de ce type d'exercice (Saüc and Frieden, 2017). Il a donc été proposé que l'activité neuromusculaire dans les fibres lentes favoriserait l'expression de TRPC3

en activant la voie calcineurine-NFAT, participant au maintien du phénotype oxydatif lent (Rosenberg *et al.*, 2004). La surexpression du canal n'était cependant pas associée à l'augmentation des courants SOCE, ni à l'altération du couplage excitation-contraction. Cette observation rentre en contradiction avec des observations réalisées dans des myoblastes murins, où l'utilisation de siTRPC3 altérerait le couplage excitation-contraction (Woo *et al.*, 2008). Il serait donc possible qu'au cours de la maturation des fibres musculaires, TRPC3 module le couplage excitation-contraction, alors que dans les fibres adultes la fonction de TRPC3 soit différente (Saüc and Frieden, 2017). Pour exemple, une étude a permis de proposer que l'entrée de calcium induite par TRPC3 régulerait l'absorption de glucose médiée par l'insuline dans les muscles adultes (Lanner *et al.*, 2009). Il a d'ailleurs été observé que TRPC3 et GLUT4 (transporteur de glucose 4) colocalisent aux tubules T, site préférentiel de captation du glucose dans les muscles squelettiques (Lauritzen *et al.*, 2006).

Concernant la régulation de TRPC3, il a été rapporté que TRPC1 et TRPC3 sont associés dans le muscle squelettique (Cheung *et al.*, 2011; Woo *et al.*, 2014). L'association de TRPC1 et TRPC3 se ferait grâce au site d'interaction protéique dans la région de répétition d'ankyrine de TRPC3. La perturbation de cette interaction entrainerait une diminution du niveau basal de calcium dans les myotubes (Woo *et al.*, 2014). Le niveau d'expression de TRPC3 serait relativement bas dans les myoblastes, et augmenterait rapidement à l'initiation de la différenciation, pour décliner et se stabiliser ensuite au stade myotube (Cheung *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2006b; Woo *et al.*, 2008). Ces profils d'expression différentiels pourraient permettre de comprendre la régulation des processus de régénération musculaire et le rôle des canaux TRPC1 et TRPC3 dans ces phénomènes (Cheung *et al.*, 2011; Saüc and Frieden, 2017). Plusieurs études ont été réalisées afin d'établir l'évolution de l'expression des canaux TRPC1 et TRPC3 au cours de la différenciation musculaire et ont permis de montrer l'implication de ces canaux dans les courants SOC lors de la myogenèse (Antigny *et al.*, 2013, 2017; Cheung *et al.*, 2011).

6. Les canaux TRPC dans les dystrophies musculaires

L'entrée de calcium extracellulaire dans les myotubes chez la souris *mdx* est environ deux fois plus élevée que dans des myotubes sains (Tutdibi *et al.*, 1999). Il a été montré que le canal TRPC1 serait lié à l' α 1-syntrophine et à la dystrophine dans les cellules musculaires

(Vandebrouck *et al.*, 2007). La perturbation de ces interactions chez la souris *mdx* promouvrait l'activité du canal TRPC1. L'implication de ce canal dans l'augmentation de la SPCa et de la $[Ca^{2+}]_c$ a été proposée, en lien avec l'activité exacerbée de TRPC1 lors de la perturbation du DAPC dans les myotubes dystrophique (Franco and Lansman, 1990; Maroto *et al.*, 2005; Tutdibi *et al.*, 1999; Vandebrouck *et al.*, 2006, 2007, 2001, 2002).

TRPC1 jouerait ainsi un rôle dans la pathogénèse de la DMD, en association avec d'autres protéines (Choi *et al.*, 2020). La cavéoline-3 serait également une protéine impliquée dans la pathogénèse de la DMD. Dans le tissu musculaire de souris *mdx*, il a été montré que l'expression de la cavéoline-3, de TRPC1 et de la src kinase, est augmentée avec une distribution membranaire irrégulière (Gervásio *et al.*, 2008; Shibuya *et al.*, 2002; Vaghy *et al.*, 1998; Venema *et al.*, 1997). Ces trois protéines sont connues pour être capables de se lier les unes aux autres. TRPC3 est une cible connue pour la phosphorylation par la tyrosine kinase src (Kawasaki *et al.*, 2006). Sous l'effet du stress oxydatif survenant dans les fibres dystrophiques, la NADPH oxydase (source majeure de ROS de la cellule) influe sur l'activité de TRPC1 en l'activant majoritairement de manière mécanique, plutôt que par le processus SOC (Vandebrouck *et al.*, 2002; Whitehead *et al.*, 2010). Ce phénomène est suspecté d'être un mécanisme clé des lésions musculaires et troubles fonctionnels dans la pathogénèse de la DMD. TRPC1 se liant également à Homer1, il a été montré que les souris déficientes en protéine Homer1 présentent une myopathie caractérisée par une diminution du diamètre des fibres musculaires et de la force en raison de l'augmentation d'entrée calcique médiée par TRPC1 (en tant que canal SAC) (Stiber *et al.*, 2008b).

En plus de l'augmentation d'expression de TRPC1, le canal TRPC3 serait surexprimé chez la souris *mdx* (Krüger *et al.*, 2008). La surexpression induite de TRPC3 suffisait à induire des dérégulations calciques responsables de l'apparition d'un phénotype dystrophique (Millay *et al.*, 2009).

TRPC4, contribue également aux dérégulations calciques survenant dans les muscles squelettiques de souris *mdx* (Vandebrouck *et al.*, 2002). Le canal TRPC4 s'hétéromérise avec TRPC1 dans les myotubes de souris, et fonctionne ainsi comme un canal SOC. Dans un contexte de souris déficientes en α 1-syntrophine, l'activité accrue du canal TRPC1/TRPC4 est inhibée par la répression du canal TRPC1 ou TRPC4 (Sabourin *et al.*, 2009). Le canal TRPC6 en tant que canal

SOC est également lié à la dystrophie musculaire (Choi *et al.*, 2020). La surexpression d'un mutant négatif de TRPC6 dans les modèles murins de dystrophie musculaire *mdx* ou déficients en sarcoglycanes, atténue le phénotype dystrophique en inhibant les courants SOC portés par TRPC6 (Millay *et al.*, 2009).

Enfin, le canal TRPV2 a aussi été suspecté d'être impliqué dans les dérégulations calciques survenant dans la DMD (Matsumura *et al.*, 2019). Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition de TRPV2 permettait de prévenir de la dégénérescence des cardiomyocytes et la fibrose cardiaque dans deux modèles animaux de dystrophie musculaire : la souris *mdx* et le hamster déficient en δ -sarcoglycan BIO14.6 (Iwata *et al.*, 2003, 2009; Zanou *et al.*, 2009). Un essai clinique japonais ciblant l'inhibition de TRPV2 par la molécule tranilast (médicament antihistaminique) a été mené sur deux patients DMD avec objectif de réduire l'atteinte cardiaque (Matsumura *et al.*, 2018). Les résultats n'ont pas montré d'amélioration nette de la fonction cardiaque. Un essai clinique pour inclure d'avantage de patients a été lancé afin d'étayer les résultats (Matsumura *et al.*, 2019). Cet essai est enregistré à l'UMIN-CTR au numéro UMIN000031, ainsi qu'au registre japonais des essais cliniques jRCT au numéro jRCTs03118003.

Bien qu'il existe plusieurs études pour étudier l'implication des canaux TRP dans les dystrophies musculaires, leur rôle dans les anomalies calciques reste discuté pour différentes raisons. De nombreuses incertitudes persistent concernant les modes d'activation SOC et SAC des canaux TRP, très variables en fonction des systèmes observés. De plus le fonctionnement en homo ou hétérotétramères de ces canaux, ainsi que ces associations avec des protéines régulatrices comme STIM1 ou même d'autres canaux comme Orai1, complexifient l'étude de leur régulation et de leur expression. Par ailleurs, les études des canaux TRPC dans un contexte dystrophique sont principalement réalisées sur le modèle animal de la souris *mdx*. Ce modèle présente un phénotype dystrophique assez éloigné de celui des patients DMD, avec une légère atteinte des muscles striés, associé à un fort taux de régénération musculaire, et une atteinte cardiaque absente ou tardive (voir paragraphe 1 « La souris *mdx* », page 32). Cela réduit la projection des résultats obtenus chez la souris *mdx* à la compréhension de la maladie humaine et au développement de traitements pour le patient DMD.

Chapitre IV : Objectif de la thèse : Evaluation d'une nouvelle approche thérapeutique pour cibler les anomalies calciques impliquées dans la DMD

Parmi les stratégies thérapeutiques en études pour traiter la DMD, l'une des plus prometteuses est la thérapie génique AAVr-MD qui est l'objet aujourd'hui de quatre essais cliniques chez les patients DMD. Cependant, avec les différentes limites de cette approche thérapeutique (voir paragraphe 3 « Les limites des vecteurs AAVr en application thérapeutique », page 60), notamment la capacité d'encapsulation limitée des vecteurs AAVr, réduisent les espoirs de guérison complète. C'est une atténuation du phénotype pathologique qui est attendue. Les patients souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne auront probablement une atteinte similaire à celle des patients atteints par la dystrophie musculaire de Becker. Ainsi la recherche se poursuit pour proposer des traitements alternatifs et complémentaires. C'est pourquoi les mécanismes physiopathologiques de la dystrophie musculaire de Duchenne et en particulier la perturbation de l'homéostasie calcique sont toujours étudiés.

La perturbation de l'homéostasie calcique dans les fibres musculaires des patients DMD est un phénomène clé qui participe au développement de la fibrose et qui induit la dégénérescence cellulaire. Bien que le lien entre l'absence de la dystrophine chez les patients et l'augmentation de la SPCa ne soit pas clairement expliqué, il a été démontré que les dérégulations calciques sont capable à elles seules d'induire les cascades de mécanismes cellulaires responsables du phénotype dystrophique dans des modèles animaux (Millay *et al.*, 2009). Malgré l'incertitude autour de l'identité moléculaire des canaux responsables de l'augmentation de la SPCa dans les muscles dystrophiques, les études portent principalement sur les canaux de la famille des canaux TRP, et en particulier des canaux TRPC.

Les canaux TRPC sont les canaux les plus étudiés de la famille des canaux TRP. Ils ont été décrits dans de nombreux organes comme les reins, le cerveau, ou encore les cellules du système immunitaire, et associés à différentes maladies humaines (voir paragraphe 4 « Les canaux TRPC dans les pathogénèses », page 105). Les canaux TRPC1 et TRPC3 ont notamment été décrits dans le muscle où ils participeraient à la régulation de l'homéostasie calcique ainsi

qu'à la différenciation myogénique (Antigny *et al.*, 2013, 2017; Cheung *et al.*, 2011). De plus, TRPC1 a été décrit comme protéine associée à la dystrophine (Vandebrouck *et al.*, 2007), ainsi qu'à TRPC3 qui serait quant à lui localisé aux tubules-T (Lauritzen *et al.*, 2006), région cellulaire spécialisée dans la gestion de l'influx calcique.

Dans le but d'identifier une nouvelle cible thérapeutique pour lutter contre l'augmentation de la SPCa dans les muscles dystrophiques, nous avons donc choisit d'étudier les canaux TRPC1 et TRPC3. Pour l'étude de la DMD, ces canaux avaient été majoritairement étudiés dans le modèle de la souris *mdx*, peu pertinent par rapport son évolution physiopathologique. Notre équipe a participé à la génération du modèle de rat *DMD^{mdx}* (Larcher *et al.*, 2014), qui reproduit plus fidèlement la maladie DMD humaine avec un remplacement progressif et sévère du muscle squelettique par fibrose, une réduction significative de la force musculaire, une diminution de l'activité motrice spontanée et une atteinte cardiaque. Nous avons donc choisi ce modèle animal pour l'étude des canaux TRPC1 et TRPC3. L'objectif de cette thèse a été d'identifier parmi les canaux TRPC1 et TRPC3, ceux qui pourrait être candidats à l'augmentation de la SPCa dans la DMD en utilisant le modèle animal du rat *DMD^{mdx}*. Cette thèse se compose de trois parties :

- Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si les canaux TRPC1 et/ou TRPC3 pouvaient être impliqués dans les altérations de la SPCa du muscle squelettique chez le rat *DMD^{mdx}* et s'ils pouvaient représenter des cibles thérapeutiques. Cette partie fait l'objet d'un article scientifique publié dans le Journal of Translational Medicine.
- Une étude préliminaire a été faite sur l'évaluation de l'expression génétique et protéique de TRPC3 dans des biopsies musculaires de patients DMD.
- Nous avons conçu et généré des stratégies thérapeutiques afin d'inhiber le canal TRPC3. Ces stratégies dont l'efficacité doit encore être validée *in vitro*, ont pour objectif d'être transposées *in vivo* en essai préclinique dans le modèle animal de la DMD, le rat *DMD^{mdx}*.

RÉSULTATS

I. Matériels et Méthodes

Analyse de la distribution cellulaire de TRPC1 et TRPC3 par immunofluorescence

Afin d'étudier le marquage des canaux TRPC dans les EDL, nous avons mis au point un co-marquage des canaux TRPC1 et TRPC3 avec une protéine des citernes terminales du RS, et du sarcolemme, respectivement le RyR et la Cavéoline 3. De cette manière, nous avons cherché à identifier dans quel compartiment intracellulaire pouvaient être exprimé les canaux TRPC. Nous avons cherché à déterminer si la localisation subcellulaire de ces canaux diffère dans un contexte dystrophique par rapport aux muscles EDL sains.

L'un des enjeux techniques lors de l'étude des fibres musculaires, a été de discerner les différents compartiments intracellulaires, enchevêtrés de manière très dense et structurée. Cette organisation structurelle est dépendante de la tension naturellement subie par les fibres musculaires dans l'organisme. Pour améliorer la distinction de ces structures en microscopie, nous avons souhaité maintenir une tension des fibres musculaires toute la durée du protocole d'immunofluorescence, du prélèvement sur l'animal jusqu'à l'acquisition des images. Pour ce faire, les EDL prélevés ont été maintenus tendus par des minuties dans des supports siliconés. Ils ont été disséqués en faisceaux de fibres musculaires de dix à quinze fibres en les maintenant toujours tendus. Les faisceaux ont ensuite été transférés dans des cuves expérimentales designés par Bodvaël Fraysse et moi-même (Figure 23). Ces cuves permettent l'immersion des fibres musculaires tendues lors d'un protocole de marquage fluorescent. Dans ces cuves, les extrémités des faisceaux étaient pincées de part et d'autre dans les travées de silicone. La tension des fibres était adaptée pour obtenir une longueur des sarcomères d'environ 2,5 μm . Cette longueur de sarcomère correspond à une longueur optimale de repos des sarcomères (Power, 2012).

Cuve expérimentale pour l'immunofluorescence

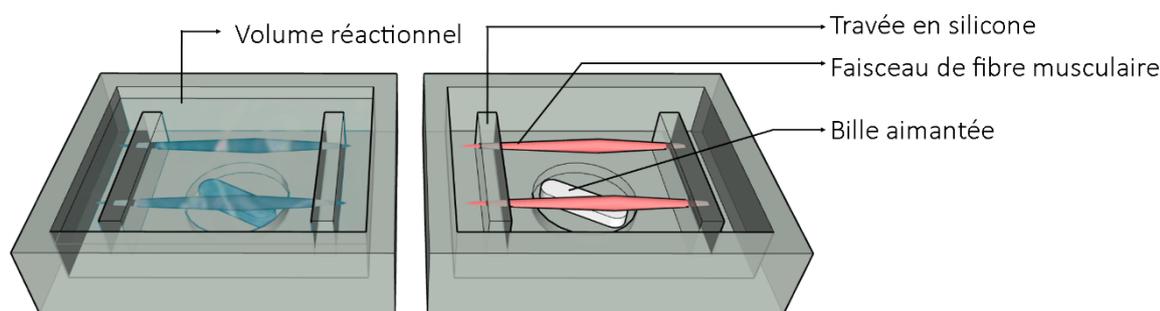


Figure 23 : Schéma de la cuve expérimentale de marquage pour l'immunofluorescence

La cuve expérimentale pour le marquage d'immunofluorescence a été conçue pour permettre de maintenir des fibres musculaires disséquées manuellement, tendue entre deux travées de silicone afin de placer les fibres musculaires dans les conditions les plus proches de celles *in vivo*. Elles ont été moulées avec de l'élastomère de silicone Sylgard 184 à partir de moules conçus par monsieur Fraysse et imprimés en 3D.

Analyse qPCR de l'efficacité du transfert de gène dans les EDL des animaux injectés

A partir des EDL de rats injectés, prélevés au sacrifice des animaux (à 4 mois d'âge, soit 3 mois après l'injection des vecteurs AAVr), l'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit Genra Puregene (Qiagen) et TissueLyser II (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. Des analyses qPCR duplex ont été réalisées sur un thermocycleur tactile C1000 (Bio-Rad) en analysant 50 ng d'ADNg en duplicat. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 20 μ l contenant 5 μ l d'ADN matrice, 10 μ l de Premix Ex taq (Ozyme), 0,3 μ l de colorant de référence ROX (Ozyme), 0,2 μ M de chaque amorce (Sigma-Aldrich) et 0,1 μ M de sonde Taqman (Sigma-Aldrich). Le nombre de copies de vecteurs a été déterminé à l'aide d'amorces et d'une sonde spécialement conçues pour amplifier les transgènes MD1 et MD3 (Bourdon *et al.*, 2022) :

- Amorce sens MD : 5' - CCAACAAAGTGCCCTACTACATC – 3'
- Amorce anti-sens MD : 5' – GGTTGTGCTGGTCCAGGGCGT – 3'
- Sonde MD : 5' - FAM-CCGAGCTGTACCAGAGCCTGGCC-BHQ2 – 3'

Des amorces et une sonde, conçues pour amplifier la séquence HPRT1 de rat ont été utilisées pour déterminer le nombre de copie d'ADNg :

- Amorce sens rHPRT1 : 5' - GCGAAAGTGAAAAGCCAAGT – 3'
- Amorce anti-sens rHPRT1 : 5' – GCCACATCAACAGGACTCTGTAG – 3'

- Sonde rHPRT1 : 5' - Cy5-CAAAGCCTAAAAGACAGCGGCAAGTTGAAT-BHQ1- 3'

Pour chaque échantillon, les valeurs de seuil de cycle (Cq) ont été comparées à celles obtenues avec différentes dilutions de plasmides standards linéarisés (contenant soit la cassette d'expression mMD1/3, soit le gène HPRT1 de rat). Les résultats sont exprimés en nombre de copies du génome du vecteur par génome diploïde (vg/dg).

Analyse qPCR de l'efficacité du transfert de gène dans les EDL des animaux injectés

A partir des EDL de rats injectés, prélevés au sacrifice des animaux (à 4 mois d'âge, soit 3 mois après l'injection des vecteurs AAVr), l'ARN a été extrait avec le réactif Qiazol (Qiagen) et le TissueLyser II (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. Les échantillons ont été traités avec de la DNase (ezDNase, ThermoFisher), puis 1000 ng d'ARN ont été reverse transcrits en ADNc dans un volume final de 20 µl avec l'enzyme SuperScript Vilo IV et des amorces aléatoires (ThermoFisher). Des analyses qPCR duplex ont été réalisées sur un thermocycleur tactile C1000 (Bio-Rad) en analysant les ADNc dilués au 1/15^e en duplicat. Les réactions ont été réalisées dans un volume final de 20 µl contenant 5 µl d'ADN matrice, 10 µl de Premix Ex taq (Ozyme), 0,3 µl de colorant de référence ROX (Ozyme), 0,2 µM de chaque amorce (Sigma-Aldrich) et 0,1 µM de sonde Taqman (Sigma-Aldrich). Les amorces utilisées sont présentées dans le paragraphe précédent. Les résultats ont été exprimés en quantités relatives (QR) : $QR=2^{-\Delta Ct}=2^{-(Ct_{\text{cible}}-Ct_{\text{contrôle endogène}})}$. Pour chaque échantillon d'ARN, l'absence de contamination par l'ADN a également été confirmée par l'analyse échantillons non transcrits.

Évaluation par Western-blot de l'expression protéique de TRPC3 dans les animaux injectés

L'analyse de l'expression protéique de TRPC3 dans les EDL des rats injectés avec les traitements MD a été réalisée de la même manière que présenté dans l'article publié. Les protocoles d'extraction et de dosage protéique, de Western-blot et d'analyse d'images sont décrits dans l'article (Creisméas *et al.*, 2021).

Échantillons de patients DMD et d'hommes sains

Les biopsies humaines ont été obtenues auprès de la Myobank – AFM (Institut de Myologie, Paris). Les échantillons étaient extraits des muscles striés squelettiques paravertébraux. L'ensemble des patients étaient des hommes âgés de 15 à 17 ans. La quantité de tissu obtenu nous a permis de réaliser une extraction protéique sur les six échantillons obtenus, cependant seulement cinq échantillons ont pu servir à l'extraction ARN, les échantillons Sain 1, Sain 2, Sain 3, DMD 2 et DMD 3.

Quantification relative de l'expression génétique de TRPC3

L'extraction d'ARN, et la reverse transcription des échantillons humains se sont faites de la même manière que pour les échantillons de rats, décrits dans l'article (Creisméas *et al.*, 2021). Une analyse qPCR en SYBR Green a ensuite été réalisée sur les ADNc dilués au 1/40^e pour TRPC3 à l'aide des amorces suivantes :

- Amorce sens hTRPC3 : 5' – TAGTGGGTGTGCTGGATCTCTG – 3'
- Amorce anti-sens hTRPC3 : 5' – AGCACAACGAGACACTTGATAGC – 3'

La valeur de seuil de la PCR sur les gènes d'intérêt est normalisée par la détection du gène ubiquitaire endogène hRPOL2, en qPCR Taqman grâce aux amorces suivantes :

- Amorce sens hRPOL2 : 5' – CCTGGAGAAGTGACCACGCT – 3'
- Amorce anti-sens hRPOL2 : 5' – AATTCGGGGCAGGACGCTCAG – 3'
- Sonde : 5' – CACCCACCCGCTGTGCTGACCAT – 3'

Comme précédemment, les résultats ont été exprimés en quantités relatives (QR) : $QR = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ cible} - Ct \text{ contrôle endogène})}$. Pour chaque échantillon d'ARN, l'absence de contamination par l'ADN a également été confirmée par l'analyse échantillons non transcrits.

Western-blot

Les résultats ont été obtenus grâce au même protocole d'extraction protéique et de Western-blot que pour les échantillons de rats, qui sont décrits dans l'article (Creisméas *et al.*, 2021).

II. TRPC3, but not TRPC1, as a good therapeutic target for standalone or complementary treatment of DMD

L'article publié lors de cette thèse regroupe l'ensemble des travaux réalisés au sujet de la problématique calcique chez le rat *DMD^{mdx}*, et l'identification de cibles thérapeutiques pour palier à ces anomalies.

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si le rat *DMD^{mdx}*, par rapport au rat sain, présente des dérégulations calciques décrites dans la physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ces travaux avaient initialement été réalisés par l'équipe de Thibaut Larcher pour les analyses histologiques et par Bodvaël Fraysse et Claire Gazaille pour l'ensemble des mesures calciques de $[Ca^{2+}]_c$ et de SPCa. Sachant que nous suspectons que les canaux TRPC1 et TRPC3 puissent être des candidats susceptibles participant à l'augmentation de la SPCa dans un contexte dystrophique. J'ai donc ensuite évalué les niveaux d'expression de ces deux canaux chez les rats *DMD^{mdx}* en comparaison avec des rats sains. Les mesures calciques et l'étude de l'expression des canaux TRPC ont été réalisées sur le muscle squelettique EDL (*Extensor Digitorum Longus*) dont les résultats sont présentés dans l'article publié, ainsi que sur le cœur dont les résultats sont présentés en résultats complémentaires. L'EDL a été choisi car il s'agit d'un muscle de type rapide, constitué à plus de 90% de fibres musculaires de type 2 (Soukup *et al.*, 2002). Ce sont des muscles précocement impactés par la dégénérescence musculaire dans la progression de la DMD (Webster *et al.*, 1988). Le cœur a été choisi car, que ce soit chez les patients DMD ou chez le rat *DMD^{mdx}*, il subit tout d'abord un remodelage, puis une cardiomyopathie dilatée s'installe et devient l'une des principales causes de décès chez les patients. L'ensemble des analyses chez le rat *DMD^{mdx}* ont été réalisées aux âges de 1,5 mois, 3 mois, 4,5 mois et 7 mois d'âge des rats, afin de suivre l'évolution des dérégulations calciques et l'expression des canaux en parallèle de l'évolution de la pathologie. Chez le rat *DMD^{mdx}* l'évolution de la pathologie est représentée par la Figure 24. Le rat *DMD^{mdx}* se distingue du rat sain dès 4 semaines de vie par une prise de poids significativement inférieure. Par la suite, dès 1,5 mois d'âge, les animaux présentent des lésions musculaires, un déficit moteur significatif et un remodelage du myocarde qui précède la mise en place de la

cardiomyopathie dilatée aux alentours de 7 mois d'âge (Larcher *et al.*, 2014)(Huchet, Le Guiner *et al.*, WMS meeting, 2017). Établir le profil d'expression des canaux TRPC1 et TRPC3 chez le rat DMD^{mdx} en comparaison du rat sain nous a permis d'affiner la chronologie des évènements moléculaires impliquant les dérégulations calciques décrite dans la pathogénèse de la DMD.

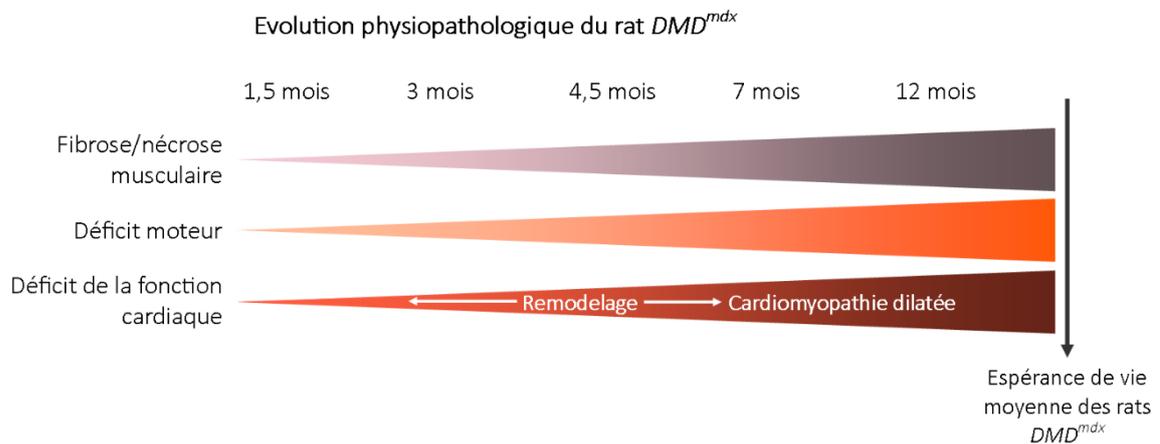


Figure 24 : Schéma illustrant l'évolution physiopathologique de la dystrophie musculaire de Duchenne chez le rat DMD^{mdx}
Adapté de Larcher *et al.*, 2014 ; Huchet, Le Guiner *et al.*, WMS meeting, 2017

Selon la littérature, les canaux TRPC, sont exprimés dans de nombreux types cellulaires et sont généralement décrit comme étant localisés à la membrane plasmique (Wang *et al.*, 2020). Cependant, dans le muscle squelettique, des divergences persistent quant à la localisation des canaux TRPC au sarcolemme ou au réticulum sarcoplasmique (Berbey *et al.*, 2009; Tajeddine *et al.*, 2010). Notre hypothèse proposant les canaux TRPC impliqués dans l'augmentation de la SPCa lors de la DMD sous-tend une expression des canaux TRPC1 et TRPC3 ne sont pas exprimés au sarcolemme des rats sains et dystrophiques. J'ai donc étudié la localisation subcellulaire de TRPC1 et TRPC3 dans les EDL du modèle du rat DMD^{mdx} en comparaison du rat sain.

L'implication des canaux TRPC dans l'augmentation de la SPCa dans les muscles dystrophiques pourrait résulter soit d'une surexpression des canaux TRPC au sarcolemme, et/ou d'une augmentation de l'activité des canaux. J'ai donc également mené des expériences afin d'étudier les niveaux de glycosylation et phosphorylation du canal TRPC3. De plus chez le rat, la présence d'isoforme du canal TRPC3 qui résulteraient d'un épissage alternatif est discuté dans la littérature (Kim *et al.*, 2012). En théorie, le rat ne possède qu'une seule forme du canal TRPC3, mais l'épissage alternatif de TRPC3 chez l'homme permet l'expression de trois

isoformes. Nous avons donc émis l'hypothèse de la présence d'une isoforme alternative de TRPC3 qui s'exprimerait différemment dans les EDL de rats dystrophiques par rapport aux sains. Cette isoforme serait susceptible d'avoir un mode de régulation et une activité différente du canal historique murin et pourrait être impliqué dans l'augmentation de la SPCa.

Lors d'une étude menée avec Audrey Bourdon, étudiante en thèse au laboratoire (Bourdon *et al.*, 2022), nous avons obtenus des échantillons musculaires de rats dystrophiques injectés avec des AAVr-MD. Ces échantillons sont issus des animaux utilisés dans l'étude publiée par Audrey Bourdon intitulée « Evaluation of the dystrophin carboxy-terminal domain for micro-dystrophin gene therapy in cardiac and skeletal muscles in the *DMD^{mdx}* rat model » en Janvier 2022 dans le journal « Gene Therapy » à laquelle je suis co-auteur. Cette thérapie très prometteuse est l'objet de quatre essais cliniques actuellement qui visent à améliorer le phénotype dystrophique des patients, sans pour autant promettre de les soigner complètement. Nous avons souhaité évaluer l'impact de ces thérapies sur les dérégulations de l'homéostasie calcique musculaire, ainsi que sur l'expression du canal TRPC3 chez les rats *DMD^{mdx}*. L'équipe de Corinne Huchet a évalué la fonction musculaire des rats, et Bodvaël Fraysse a évalué la $[Ca^{2+}]_c$ et la SPCa. J'ai évalué l'expression protéique et génétique de TRPC3 dans les EDL des rats injectés en comparaison des groupes contrôles.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article « TRPC3, but not TRPC1, as a good therapeutic target for standalone or complementary treatment of DMD », qui a été publié en décembre 2021 dans « Journal of Translational Medicine », article sur lequel je figure en 1^{er} auteur et qui est présenté ci-après.

RESEARCH

Open Access



TRPC3, but not TRPC1, as a good therapeutic target for standalone or complementary treatment of DMD

Anna Creisméas¹, Claire Gazaille¹, Audrey Bourdon¹, Marc-Antoine Lallemand¹, Virginie François¹, Marine Allais¹, Mireille Ledevin², Thibaut Larcher², Gilles Toumaniantz³, Aude Lafoux⁴, Corinne Huchet¹, Ignacio Anegón⁵, Oumeya Adjali¹, Caroline Le Guiner¹ and Bodvaël Fraysse^{1*} 

Abstract

Background: Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked inherited disease caused by mutations in the gene encoding dystrophin that leads to a severe and ultimately life limiting muscle-wasting condition. Recombinant adeno-associated vector (rAAV)-based gene therapy is promising, but the size of the full-length dystrophin cDNA exceeds the packaging capacity of a rAAV. Alternative or complementary strategies that could treat DMD patients are thus needed. Intracellular calcium overload due to a sarcolemma permeability to calcium (SPCa) increase is an early and critical step of the DMD pathogenesis. We assessed herein whether TRPC1 and TRPC3 calcium channels may be involved in skeletal muscle SPCa alterations and could represent therapeutic targets to treat DMD.

Methods: All experiments were conducted in the *DMD^{mdx}* rat, an animal model that closely reproduces the human DMD disease. We measured the cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) and SPCa in EDL (*Extensor Digitorum Longus*) muscle fibers from age-matched WT and *DMD^{mdx}* rats of 1.5 to 7 months old. TRPC1 and TRPC3 expressions were measured in the EDL muscles at both the mRNA and protein levels, by RT-qPCR, western blot and immunocytofluorescence analysis.

Results: As expected from the malignant hyperthermia like episodes observed in several *DMD^{mdx}* rats, calcium homeostasis alterations were confirmed by measurements of early increases in $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa in muscle fibers. TRPC3 and TRPC1 protein levels were increased in *DMD^{mdx}* rats. This was observed as soon as 1.5 months of age for TRPC3 but only at 7 months of age for TRPC1. A slight but reliable shift of the TRPC3 apparent molecular weight was observed in *DMD^{mdx}* rat muscles. Intracellular localization of both channels was not altered. We thus focused our attention on TRPC3. Application of Pyr10, a specific inhibitor of TRPC3, abolished the differences between SPCa values measured in WT and *DMD^{mdx}*. Finally, we showed that a rAAV-microdystrophin based treatment induced a high microdystrophin expression but only partial prevention of calcium homeostasis alterations, skeletal muscle force and TRPC3 protein increase.

Conclusions: All together our results show that correcting TRPC3 channel expression and/or activity appear to be a promising approach as a single or as a rAAV-based complementary therapy to treat DMD.

*Correspondence: bodvael.fraysse@univ-nantes.fr

¹ Nantes Gene Therapy Laboratory, Université de Nantes, INSERM UMR 1089, IRS 2 Nantes Biotech, CHU de Nantes, 22, Boulevard Béhoni Goullin, 44200 Nantes, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords: DMD, Calcium, TRPC1, TRPC3, *DMD*^{mdx} rat, Gene therapy, Skeletal muscle

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked inherited disease affecting ~1:5000 male births and leading to a severe, highly debilitating and ultimately life limiting muscle-wasting condition [1]. DMD is caused by mutations in the gene encoding dystrophin, a critical protein for the stability and function of skeletal myofibers and cardiomyocytes [2, 3]. Dystrophin establishes a mechanical link between the actin cytoskeleton and the extracellular matrix in muscle fibers through the dystrophin-associated protein complex. DMD-affected boys develop muscle weakness during the first years of life. During teenagehood, they generally become wheelchair-bound and exhibit life-threatening complications caused by respiratory muscle wasting and dilated cardiomyopathy. DMD patients rarely survive into their fourth decade [4]. Gene therapy to restore dystrophin expression is a promising approach for the treatment of DMD. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors are particularly efficient in transducing skeletal muscle fibers and cardiomyocytes when packaged with the appropriate capsid [5–7], and allow long-term in vivo transgene expression [8]. However, the full-length dystrophin complementary DNA (cDNA) is 14 kb in length and greatly exceeds the packaging capacity of a single rAAV vector (<5 kb) [9]. Therefore, shortened transgenes, coding for partially functional microdystrophins (MD) that contain essential domains of the dystrophin protein have been generated. The principle of using MDs as therapeutic transgenes arose from the concept that Becker Muscular Dystrophy (BMD) patients with natural in-frame deletions/mutations in their *DMD* gene exhibit a milder dystrophinopathy [10]. Our group participated in the first study describing long-term functional rescue after a gene therapy treatment based on rAAV-MD systemic delivery in the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog, a large animal model of DMD [11]. Three clinical trials using this strategy have been launched in 2018, and the first reported results are very promising [12]. In BMD patients, the disease is milder and more heterogeneous compared to DMD patients. Nevertheless, muscle weakness is often noticed in adolescence or young adulthood [13]. Additionally, current rAAV-MD trials are based on MDs that are ~40% smaller than the smallest naturally truncated dystrophin reported in a patient with BMD [14]. It is thus urgent to find alternative or complementary therapeutic strategies for MD-based gene therapy that could treat both DMD and BMD patients. Such

strategies have to target significant and primordial events of the DMD pathogenesis.

Calcium plays a critical role in the pathogenesis of DMD as skeletal muscle necrosis is mainly caused by intracellular Ca²⁺ overload [15]. Calcium alterations are very early events: they have been detected in muscle fibers of DMD boy fetuses and measured in not fully differentiated human DMD myotubes [16, 17]. Intracellular Ca²⁺ overload in DMD is mainly related to an increase of the sarcolemma permeability to Ca²⁺ (SPCa) through the accumulation of Ca²⁺ permeable ion channels [18]. The identity of the channels involved in the SPCa increase is still unclear but members of the Transient Receptor Potential (TRP) family have been proposed as possible candidates [18]. The mammalian TRP channel superfamily encompasses 28 members that are subdivided into 6 subfamilies according to their sequence homology [19]. Two TRP channels caught our attention in the context of the DMD: TRPC1 and TRPC3. The expression of these channels is increased in skeletal, cardiac and smooth muscles in absence of dystrophin expression in the *mdx* mouse [20–22]. TRPC3 acts as a positive regulator of reactive oxygen species, its increased expression leading to a fibrotic response in cardiomyocytes [20]. TRPC3 has also been proposed to participate in the massive and sustained cytosolic Ca²⁺ increase that takes place in skeletal muscle cells during malignant hyperthermia (MH) with numerous MH like episodes having been reported in human DMD patients [23, 24]. The two channels are involved in myogenesis and regulate cytosolic Ca²⁺ levels in skeletal muscle fibers [25, 26]. Targeting TRPC1 and TRPC3 to reduce Ca²⁺ alterations in DMD muscles could thus represent relevant targets for alternative or complementary treatment to MD-based gene therapy.

Nevertheless, most of the studies concerning the involvement of Ca²⁺ homeostasis alterations and the TRP channels in the pathogenesis of DMD were conducted in the *mdx* mouse. This animal model of DMD exhibits a very mild muscle dystrophy as compared to DMD patients [27, 28]. This reduces the scope of the results obtained in *mdx* mice in the understanding of the disease and the development of treatments in human DMD patients. Our team participated to the generation of the *DMD*^{mdx} rat model [27], which more closely reproduces the human DMD disease with progressive and severe skeletal muscle replacement by fibrosis, significant reduction in muscle strength, a decrease in spontaneous motor activity and cardiac involvement.

In the present study, we aimed to determine whether TRPC1 and/or TRPC3 channels may be involved in skeletal muscle SPCa alterations in the *DMD^{mdx}* rat and may represent therapeutic targets. We assessed $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa in mechanically isolated and fura-2 loaded fibers of the EDL (*Extensor Digitorum Longus*) fast-twitch muscle from age-match wild-type (WT) and *DMD^{mdx}* rats of 1.5–7 months old. Within this time window, rats undergo puberty and reach adulthood [29] and, most importantly, *DMD^{mdx}* animals progressively display necrosis and regeneration in limb and diaphragm muscles that evolves to severe fibrosis and adipose tissue infiltration [27]. TRPC1 and TRPC3 expressions were measured in the EDL muscles at both the mRNA and protein levels, by RT-qPCR and western blot analysis, respectively. The subcellular localization of the two channels was assessed by immunocytofluorescence and confocal microscopy. Finally, we determined the impact of a rAAV-MD based treatment on Ca^{2+} homeostasis, force development and TRPC expression in *DMD^{mdx}* rat skeletal muscles.

Materials and methods

Animals

A total of 69 *DMD^{mdx}* rats and 59 Sprague Dawley WT rats (littermates) were used in this study. They were obtained, handled and housed from the UTE IRS-UN (University de Nantes, France) and the Boisbonne Center for Gene Therapy (ONIRIS, Nantes, France). The Institutional Animal Care and Use Committee of the Région des Pays de la Loire (University of Angers, France) as well as the French Ministry for National Education, Higher Education and Research approved the protocol (authorizations #2016070618053653 and 2017040616371353). Before sacrifice, animals received a subcutaneous injection of buprenorphine (0.04 mg/kg, Vetergesic, Ceva Santé Animale, Libourne, France), after 30 min rats were anesthetized by intraperitoneal injection with etomidate (16 mg/kg, Hypnomidate, Janssen-Cilag, Issy Les Moulineaux, France), delivered in 2 or 3 injections separated by 3 min, and ketamine (20 mg/kg, Imalgene 1000, Merial, Lyon, France). Animals dedicated to ex vivo skeletal muscle contractility analysis and Ca^{2+} measurements were euthanized by heart excision. Other animals were euthanized by intravenous injection of pentobarbital sodium (Dolethal, Vetoquinol, Paris, France).

Histology

Some rats that died prematurely during this study were necropsied. A few tissues and organs (including heart, lung, kidney, liver, spleen, skeletal muscle and brain) were then obtained for immediate fixation in formalin. After paraffin embedding, 4 μ m-thick sections were further stained using Hematoxylin–Eosin–Saffran routine

protocol. Additional tissue staining (Picrosirius red and von Kossa for Ca^{2+}) was performed on skeletal muscle tissues when needed. These tissue samples were observed by a veterinary pathologist to determine the cause of death.

Ex-vivo skeletal muscle contractility

Isometric contractile properties of the EDL muscles were evaluated according to methods previously described [30]. Briefly, muscles were removed from the hindlimb of anesthetized rats and mounted in an in vitro muscle test system (1205A model; Aurora Scientific, Aurora, Canada). Muscles were placed between two platinum electrodes in a muscle bath containing 100 ml of bubbled mammalian Ringer solution at 25 °C. After a 5 min equilibration period, optimum muscle length was determined by gradual muscle length adjustments and eliciting isometric contractions (supramaximal square-wave pulses of 0.2 ms duration) until the maximum twitch tension was reached. After 5 min of rest, muscles were stimulated at 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 Hz for 500 ms at each frequency. Stimulus trains were separated by 1-min intervals. Maximum isometric tetanic force was determined from the plateau of this force frequency curve. Following force testing, muscles were removed from the bath, trimmed of tendons, and weighed. Muscle mass was then be used to calculate maximum tetanic specific force in g/g.

Dissection of native muscle fibers

For in vitro experiments, EDL muscles were removed from the animal under deep anesthesia and were pinned in a dissecting dish containing normal physiological solution (NPS) at room temperature (22 °C) for further dissection. NPS contained the following: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ (all from VWR International, Fontenay sous Bois, France), 10 mM HEPES, 10 mM glucose, and 1.8 mM $CaCl_2$ (all from Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at pH 7.35. Contralateral EDL muscles of some animals were snap-frozen and stored at -80 °C for biochemical and molecular biology as described below. Skeletal muscle fibers from EDL muscle of the different groups of rats were dissected intact. Small bundles of 10–15 fibers arranged in a single layer were dissected lengthwise, tendon to tendon, with the use of microscissors, as described elsewhere [31]. Part of the bundles were used for Ca^{2+} measurements and the remainder kept for immunofluorescence experiments.

Cytosolic Ca^{2+} and sarcolemmal permeability to divalent cation measurements

EDL muscle bundles were incubated in NPS containing 5 μ mol/l Fura-2 AM (Molecular Probes, OR, USA) for

1 h at room temperature, rinsed twice, and left 30 min before use to ensure complete de-esterification. Ratiometric Fura-2 fluorescence measurements were made using an integrated IonOptix (IonOptix, Amsterdam, Netherlands) device and excitation filters of 360 and 380 nm. Emitted fluorescence (510 nm) was background subtracted. The cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) was calculated from ratiometric measurements according to a modified method from Grynkiewicz and colleagues [31, 32].

The manganese quenching technique was used to determine the sarcolemmal permeability to divalent cations (SPCa). Muscle preparations were first perfused for 2 min with NPS containing 0.5 mM Mn^{2+} as a surrogate of Ca^{2+} (quenching solution). Then, the quenching solution was applied to muscle fibers for 2–4 min. During the whole quenching protocol, the fluorescence of Fura-2 excited at 360 nm was acquired at 1 Hz. The quench rates were determined using linear regression analysis of fluorescence signal and expressed as the decline per minute of the initial fluorescence intensity. For experiments dedicated to evaluate Pyr10 (–N-(4-(3,5-bis(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-1-yl)phenyl)-4-methylbenzenesulfonamide), quench rate was first measured in quenching solution. Muscle fibers were washed and then incubated 10 min in NPS without Ca^{2+} but containing 3 μM of Pyr10 [33]. Quench rate was then newly measured in previous fibers in quenching solution containing 3 μM Pyr10.

TRPC1 and TRPC3 submembrane distribution analysis by immunofluorescence

EDL muscle fiber bundles containing 5 to 10 fibers were dissected with microscissors in skinning solution and were immunolabelled according to a method adapted from Liu and colleagues [34]. Briefly, muscle fiber bundles were stretched in Sylgard 184 silicone elastomer (Sigma, France) molded chambers designed to maintain the muscle fibers at tension allowing to obtain a sarcomere length close to that found in vivo (~2.5 μm) during the whole immunolabelling process. Muscle bundles were then fixed using PBS containing 4% PFA (ThermoFisher, Massachusetts, USA) for 1 h, then permeabilized using 2% TritonX 100 diluted in PBS for another hour under agitation. After washing, muscle bundles were incubated during 48 h under agitation in a PBS solution containing goat polyclonal anti-caveoline-3 (1:50, Bio-Techne, Minnesota, USA) and mouse anti-ryanodine receptor (1:100, DSHB, Iowa, USA) antibodies. Donkey serum was added at 5% in this latter solution. After washing muscle bundles were newly incubated for 48 h under agitation in a PBS solution containing 5% of donkey serum, donkey anti-goat Alexa Fluor 647 conjugated (1:400) and donkey

anti-mouse cyanine-3 conjugated (1:400) (Jackson ImmunoResearch, UK). After a new wash, muscle fibers were newly fixed using 4% PFA PBS for 15 min. Finally, muscle fibers were incubated in a PBS solution containing mouse anti-TRPC1 or anti-TRPC3 antibodies Alexa Fluor 488 conjugated (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) for 48 h under agitation. After final wash, muscle preparations were mounted in ProlonGold (ThermoFisher, Massachusetts, USA) between glass cover slip and slide. Image Z-stacks were acquired using a Nikon confocal A1 N-SIM microscope with a Plan Apo X60 objective (Nikon France Sas, Champigny-Marne, France).

Images of the acquired stack corresponding to the center of muscle fibers were used for analysis. A macro was written under ImageJ macro language to routinely and semi-automatically analyze the images. Briefly, the experimenter was asked to enter the number of the cells to analyze in a rectangle Region Of Interest (ROI) and to delimitate the peaks corresponding to Cav-3 labelling. A maximum peak was then automatically calculated and defined as sarcolemma reference position. This position was then used to calculate into the stack, for each channel corresponding to TRPC1 or TRPC3 labeling, the areas of the fiber corresponding to the 5 μm spaces beneath sarcolemma and the cell center, and their corresponding integrated signal density.

Relative quantification of TRPC1, TRPC3 and MD messengers by RT-qPCR

Total RNA was extracted from pieces of EDL muscles from the different groups of rats with QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. Then, 1000 ng of total RNA was treated with RNase-free DNase I (ezDNase from ThermoFisher, Massachusetts, USA) and reverse transcribed using SuperScript IV Vilo reverse transcriptase and random primers (ThermoFisher, Massachusetts, USA) in a final volume of 20 μL . qPCR analysis was then performed on cDNA (diluted 1/40 for TRPC1 and 1/80 for TRPC3) using different primers designed to amplify a specific region of the TRPC1 messenger (Forward: TTCCAAAGAGCAGAA GGACTG and Reverse: AGGTGCCAATGAACGAGTG according to Sabourin and collaborators [35]), the TRPC3 messenger (Forward: ACGTTCTCACCTGACATCA and Reverse: CTGGACAGCGACAAGTATGC) or the MD messenger (Forward: CCAACAAAGTGCCCTACT ACATC, Reverse: GGTTGTGCTGGTCCAGGGCGT, and Probe: CCGAGCTGTACCAGAGCCTGGCC). As an internal control, HPRT1 messenger was used to normalize the mRNA concentration (Forward: GCGAAAGTG GAAAAGCCAAGT, Reverse: GCCACATCAACAGGA CTCTTGTAG, Probe: CAAAGCCTAAAAGACAGC GGCAAGTTGAAT). Results were expressed in relative

quantities (RQ): $RQ = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{endogenous control}})}$. For each RNA sample, the absence of DNA contamination was also confirmed by analysis of “cDNA liked samples” obtained without addition of reverse transcriptase in the reaction mix.

rTRPC3 cDNA amplification and sequencing

PCR amplification of the coding region around the exon 9 of the TRPC3 cDNA was performed on total cDNA from EDL of WT and *DMD^{mdx}* rats. PCR was performed using LA Taq polymerase (Takara, Kusatsu, Japan) and the primers published by Kim and collaborators [36]: Forward: CAGTGATGTAGAGTGGAAAGTTTGC, Reverse: CTCCCTCATTCACACCTCAGC. The amplification products were loaded on a 2% agarose gel. The amplification of the full-size cDNA of TRPC3 was performed using the following primers: Forward: ACGCAGTACGGCAACATCC, and Reverse: CATTACACCTCAGCGCACT. The amplification products were then sequenced with Sanger method (Genewiz, South Plainfield, USA).

Western blot analysis of TRPC1 and TRPC3 expression

In order to extract EDL muscle total proteins, muscles were homogenized using TissueLyser II (Qiagen, Germany) in RIPA buffer containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). 50 µg of protein extracts, denatured 10 min at 70 °C with Laemmli (Biorad, California, USA), were loaded on a 10% Tris-Glycine Precast polyacrylamide gels (ThermoFisher, Missouri, USA). After 2 h of migration at 100 V, and Red Ponceau staining, membranes were blocked over-night at 4 °C (PBS-Tween 0.1%, non-fat dry milk 5% and NP40 1%). Then, membranes were incubated 1 h at room temperature with mouse anti-TRPC1 antibody (1:50 000, sc-133076; Sant Cruz Biotechnology, Texas, USA), mouse anti-TRPC3 (1:500, sc-514670; Sant Cruz Biotechnology, Texas, USA) or goat anti-GAPDH (1:10,000, Novus Biologicals, Colorado, USA). After washing with PBS Tween 0.1% membranes were incubated with secondary rabbit anti-mouse HRP (1:5000) or rabbit anti-goat HRP (1:2000; Agilent Technology, California, USA). After washing with PBS Tween 0.1%, ECL (ThermoFisher, Massachusetts, USA) was applied on membranes and films (Amersham Hyperfilm™) were exposed to it. MD protein expression in EDL was analyzed as previously published [11]. Relative protein expressions were calculated by normalizing signal intensity measured using ImageJ software by GAPDH signal of the corresponding lane and the signal of an experimental sample that was loaded on every gels (ImageJ). This latter allowed us the comparison between gels.

TRPC3 post-translational analysis

Deglycosylation analysis of the TRPC 3 protein was performed using Protein Deglycosylation Mix II kit (New England Biolabs, Ipswich, USA). Briefly, 40 µg of total protein extract were diluted in water. Then, 2 µL of Deglycosylation Mix Buffer 2 were added to the proteins and the mix was incubated at 75 °C for 10 min. Next, 2 µL of the enzyme Protein Deglycosylation Mix II were added to the proteins, followed by incubations 30 min at room temperature and 1 h at 37 °C. Positive control (Fetuin) was provided in the kit. The results were analyzed by western blot as described previously. Dephosphorylation analysis of the TRPC3 protein was performed using Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase kit (ThermoFisher, Massachusetts, USA). The reaction was performed on 30 µg of total protein extract diluted in water. Briefly, a mix of 8 µL of 10X FastAP buffer and 60 µL of FastAP Phosphatase were added to proteins. The reaction mix was incubated 1 h at 37 °C. The proteins were then concentrated by adding 320 µL of acetone to the reaction mix, followed by an overnight incubation at -20 °C, and a centrifugation at 13,000 rpm during 15 min at 4 °C. The pellet was then resuspended in water, and analyzed by western blot as described above.

In order to accurately calculate the apparent molecular weight (AMW) and allows comparison between lanes a dedicated macro was built under ImageJ and dedicated for selected western blots. In each gel four experimental samples were flanked by two ladder samples to allow robust size determination and limit separation artefacts. The ImageJ macro was designed to automatically determine the relation between distance of migration and ladder sizes surrounding the size of interest according to a Boltzmann curve fit. The parameters of the Boltzmann equation were then used to calculate the AMW protein of interest starting from distance migration.

rAAV-MD injection in *DMD^{mdx}* rats

Murine-specific cDNA sequences of optimized MD version 1 have been previously described [37, 38]. This MD cDNA is deleted of spectrin-like repeat domain 4–23 and CT domain (exons 71–78) and contains the last three amino acids of exon 79 of dystrophin followed by three stop codons [37]. MD cDNA sequence was subcloned into a pAAV plasmid that contained the 323 bp muscle-synthetic Spc5.12 promoter [39], a synthetic polyadenylation signal of 49 bp obtained from the pCI-neo plasmid (Promega, Madison, WI), and two flanking inverted terminal repeat (ITR) sequences of 130 pb from AAV serotype 2. The size of the resulting MD expression cassette (including Spc5.12 promoter, pCI-Neo polyA, and ITRs) was 4538 bp. Recombinant pseudo typed AAV2/9-MD vectors were produced by the Vector Core of the UMR

1089 (CPV, INSERM and University of Nantes) by transient transfection of HEK293 cells followed by purification on cesium chloride density gradients. Final vectors were concentrated and formulated in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Fisher Scientific, Illkirsch, France), sterile filtered, aliquoted and frozen at $\leq -70^\circ\text{C}$. Vector genome titers (vg/mL) were determined using a qPCR assay specific for ITR264 [40].

Prior to injection, the rAAV vectors were diluted in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) vehicle solution to obtain a fixed total volume corresponding to 15 mL of perfusate per kg of animal. Injections were performed without anesthesia but under analgesic pre-medication, performed at least 30 min before injection by subcutaneous injection of buprenorphine at 0.04 mg/kg. Vector or its vehicle was administered at the age of 1 month by the intravenous route in a tail vein at a fixed flow rate of 0.5 mL/min. Animals were sacrificed after 3 months of follow-up.

Diaphragm ultrasonography in vivo

The technique was adapted from Whitehead and colleagues [41]. Briefly, ultrasonography was performed using a Vivid 7 ultrasound unit (GE Healthcare, Velizy Villacoublay, France) associated to a 14 MHz M12L probe. First, animals received a subcutaneous injection of buprenorphine, after 30 min rats were anesthetized by intraperitoneal injection with etomidate (16 mg/kg, Hypnomidate, Janssen-Cilag, Issy Les Moulineaux, France), the hair on the chest and abdomen was removed using hair-removal cream. Once anaesthetized, the rat was placed supine on the imaging platform and the four limbs. The platform was pre-heated to maintain the core body temperature at 37°C , which was monitored with a temperature-sensitive rectal probe. Ultrasound gel was applied to the area overlying the diaphragm and liver. The probe was manually positioned 120° relative to the rat platform. The probe was placed along the transverse mid-sternal axis of the rat, in order to locate the diaphragm on both sides of the body. According to Whitehead and colleagues in the mouse the liver and portal vessels were used as landmarks [41]. M-mode was used to measure the diaphragm movement during normal breathing cycles. The M-mode image window was positioned on the left side of the sternum, over a flat region of diaphragm. Images were then recorded during at least 15 breathing cycles. In order to avoid experimenter and probe positioning artifacts, the probe was removed and replaced 2 times to allow acquisition of 3 records. A semi-automatic analysis method was then applied to measure the amplitude of the diaphragm movement during each inspiration. Each recorded image was filtered using ImageJ (Gaussian Blur > Threshold > Find Edges)

and transformed in (x, y) calibrated curves using GetData Graph Digitizer 2.26. A macro was built under ImageJ to automatically calculate the amplitude of diaphragm contraction (the difference in mm between baseline and the peak of the contraction) of 5 consecutive cycles.

Statistics

All statistical analyses were performed using XLStat software (Addinsoft, Paris, France). P-values < 0.05 were considered statistically significant. The statistical tests were specified in the text and were chosen depending on data number in each group and the number of groups to be tested for a given parameter.

Results

Malignant hyperthermia episode

At the beginning of this study, some few *DMD^{mdx}* rats were anesthetized using a halogenated agent (isoflurane) in order to obtain control blood samples. Unexpectedly, 3 out of 16 rats died during the course of anesthesia. These rats were necropsied and main organs and tissues were analyzed by a pathologist to determine the cause of death. All these rats typically exhibited similar myopathic lesions typical of the model [27]. These lesions included isolated hyalin fibers, small clusters of degenerative fibers associated with muscle fiber regeneration foci, centro-nucleated fibers and anisocytosis with a few inflammatory cells in a slightly increased endomy-sial space corresponding to mild fibrosis. In addition to these classical DMD lesions, these rats displayed (1) large clusters of round hyper eosinophilic fibers (hypercontracted fibers) corresponding globally to half of the total number of fibers. Some of them displayed fragmented cytoplasm and/or hyperchromatic condensed or fragmented nucleus indicative of necrosis (severe rhabdomyolysis), (2) huge optically empty space between fibers corresponding to massive edema. Using Picrosirius and von Kossa stainings, both specific for Ca^{2+} , an increased concentration of Ca^{2+} was identified in hypercontracted fibers (Fig. 1). The association of these lesions are typical of malignant hyperthermia (MH) or MH-like reaction. This syndrome is responsible for the immediate death of the animal notably due to neuronal death associated to severe hyperthermia, as evidenced in some of these animals in which brain tissue conservation was good. Interestingly, similar findings were observed in 5 rats of another study that were found dead during or immediately after an experiment requiring long-lasting posture constraint. As developed in the discussion, these MH events were first clues indicating muscle Ca^{2+} homeostasis alterations in the *DMD^{mdx}* rats.

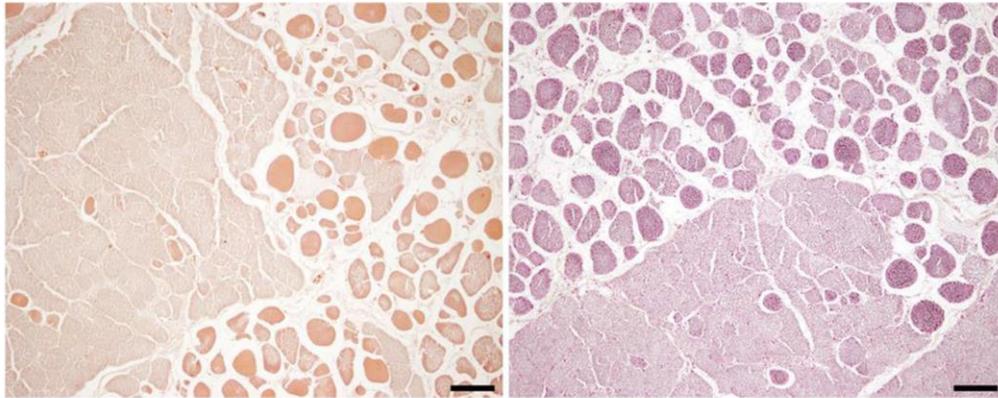
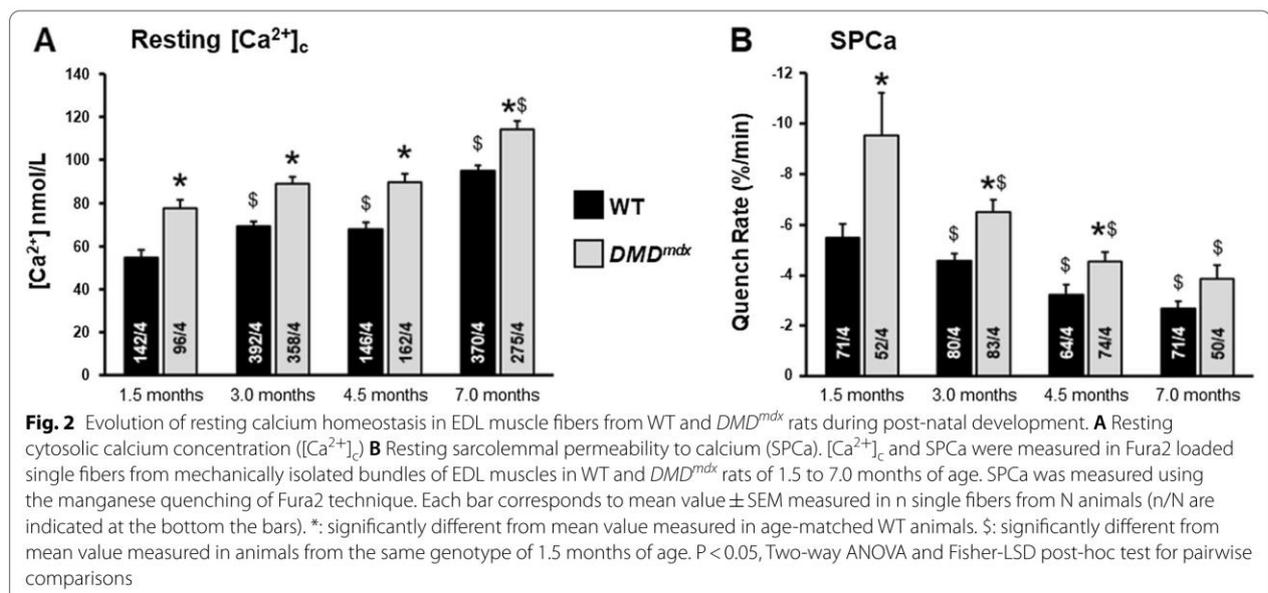


Fig. 1 Histopathological evaluation of skeletal muscles from *DMD^{mdx}* rats deceased following malignant hyperthermia syndrome. After specific staining for calcium (left panel: alizarin red and right panel: von Kossa), we observed differences of dye affinity between normal fibers and round hypercontracted fibers that highlighted disruption of calcium concentrations between intracellular and extracellular compartments. Note the severe endomysial edema typical of hyperthermia syndrome. Bar = 100 μ m

Ca²⁺ homeostasis is dysregulated in *DMD^{mdx}* EDL muscles

From the age of 1.5 to 7 months, resting $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa were determined in each single fura-2-loaded fiber constituting the bundles dissected from the EDL muscles of WT and *DMD^{mdx}* rats. During this period, resting $[Ca^{2+}]_c$ levels showed slight but significant increase in WT EDL muscle fibers (Fig. 2A). A similar increase was observed in *DMD^{mdx}* muscles, but at each time-point the mean $[Ca^{2+}]_c$ was ~20 to 30% significantly higher than in WT muscle fibers. In the same muscle bundles, we used the Mn²⁺ quenching technique in order to determine whether resting $[Ca^{2+}]_c$ rise was associated with an increase in the sarcolemmal permeability to Ca²⁺ (SPCa).

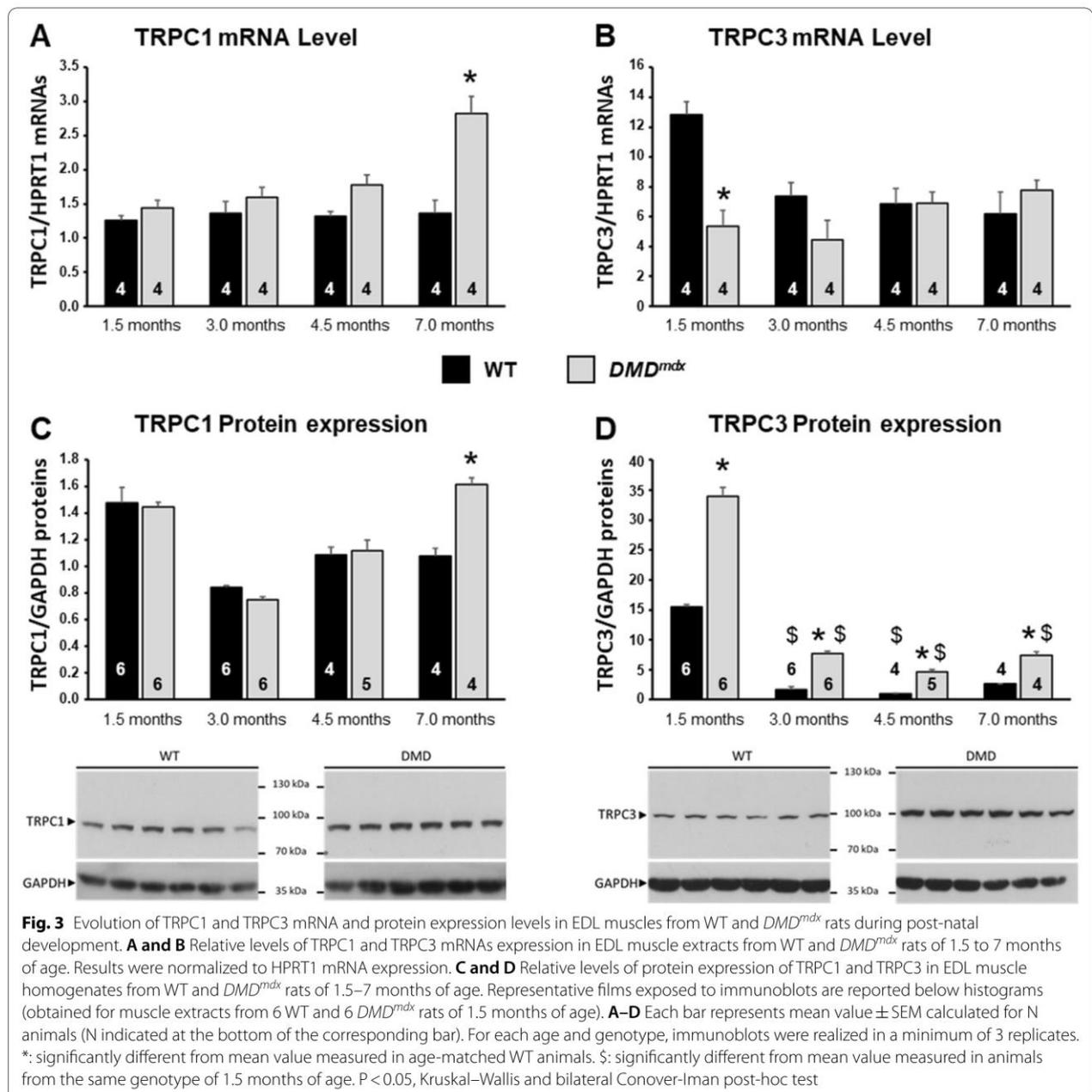
In contrast with $[Ca^{2+}]_c$, SPCa progressively and significantly decreased in muscle fibers from WT rats from 1.5 to 7 months of age (Fig. 2B). Age-dependent decrease of SPCa was also observed in *DMD^{mdx}* muscle fibers but the mean values were always significantly higher in dystrophic fibers than in age-matched WT controls. This difference was particularly high at 1.5 months of age (~50%) and progressively decreased to reach ~35% at 7 months. In order to assess whether the elevation of $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa in *DMD^{mdx}* EDL were associated with changes in TRPC1 and/or TRPC3 expression we conducted a series of experiments to measure mRNA and protein levels of the two channels.



Expression of TRPC1 and TRPC3 channels are modified over the course of the DMD pathology in *DMD^{mdx}* rats

Muscle homogenates from WT and *DMD^{mdx}* rats of 1.5–7 months of age were analyzed by RT-qPCR and western blot (Fig. 3). In WT rats, TRPC1 mRNA expression level was stable all over ages tested (Fig. 3A). TRPC1 protein expression level was heterogeneous among ages with a tendency at overexpression at 1.5 months of age, but without statistical significance (Fig. 3C). Similar results were obtained for *DMD^{mdx}* rats except

at 7 months of age, where TRPC1 mRNA and protein expression levels were significantly higher than in WT controls (Fig. 3A–C). Results were quite different for TRPC3 (Fig. 3B–D). In WT EDL muscles, both mRNA and protein expression levels were the highest at 1.5 months of age and significantly decreased thereafter to reach a steady-state level at 3 months of age. In *DMD^{mdx}* EDL muscles, TRPC3 mRNA expression levels were significantly lower to that of WT ones at 1.5 months of age. From 3 to 7 months of age, TRPC3 mRNA



expression level was stable and similar to that measured in WT animals. In contrast to mRNA, TRPC3 protein expression level was ~twofold higher in *DMD^{mdx}* than in WT rats at 1.5 months of age (Fig. 3D). Although TRPC3 protein expression decreased with age in both *DMD^{mdx}* and WT rats, it always remained ~twofold higher in dystrophic animals. It is notable that TRPC translocation from intracellular membrane compartments (e.g., sarcoplasmic reticulum) to the sarcolemma could lead to an increase in SPCa. This prompted us to examine the TRPC subcellular localization in muscle.

Subcellular localization of TRPC1 and TRPC3 is not modified in *DMD^{mdx}* muscles

We investigated the subcellular localization of TRPC1 and TRPC3 proteins in WT and *DMD^{mdx}* muscle fibers by immunofluorescence and confocal microscopy to determine the proportion of TRPC channels expressed at the peripheral sarcolemma compared to the center of the cells. Caveoline-3 (Cav-3) and the Ryanodine Receptors (RyR) were used as sarcolemma and sarcoplasmic reticulum markers, respectively (Fig. 4A, B). Despite a heterogeneous and partly punctiform location, TRPC1 was mostly observed at the peripheral sarcolemma where it seemed to colocalize with Cav-3 (Fig. 4A). Similar sarcolemmal location was seen for TRPC3 with a more homogeneous labelling (Fig. 4B). In the center of the cells, the immunofluorescence signals for both channels appeared in a typical striated pattern. Comparison of Cav-3 and RyR immunolabeling to that of TRPC1 and TRPC3 did not allow us to clearly determine the cellular membrane compartments where TRPCs were expressed. This may be due to the high entanglement of t-tubules and sarcoplasmic reticulum (SR) terminal cisternae that form highly specialized ultrastructure in muscle fiber cells, called triads [42]. In order to further analyze the potential difference in location between WT and *DMD^{mdx}* muscle fibers, the density signal ratios of TRPC1 and TRPC3 between the peripheral sarcolemma and the center of the cells were calculated (Fig. 4C, D, see “[Material and methods](#)” section for details). No significant difference was observed between dystrophic and healthy muscle fibers. Considering the late expression alteration of TRPC1 and the earliest one for TRPC3, and that no significant change in location change is observed for the two channels, we focused our attention on TRPC3.

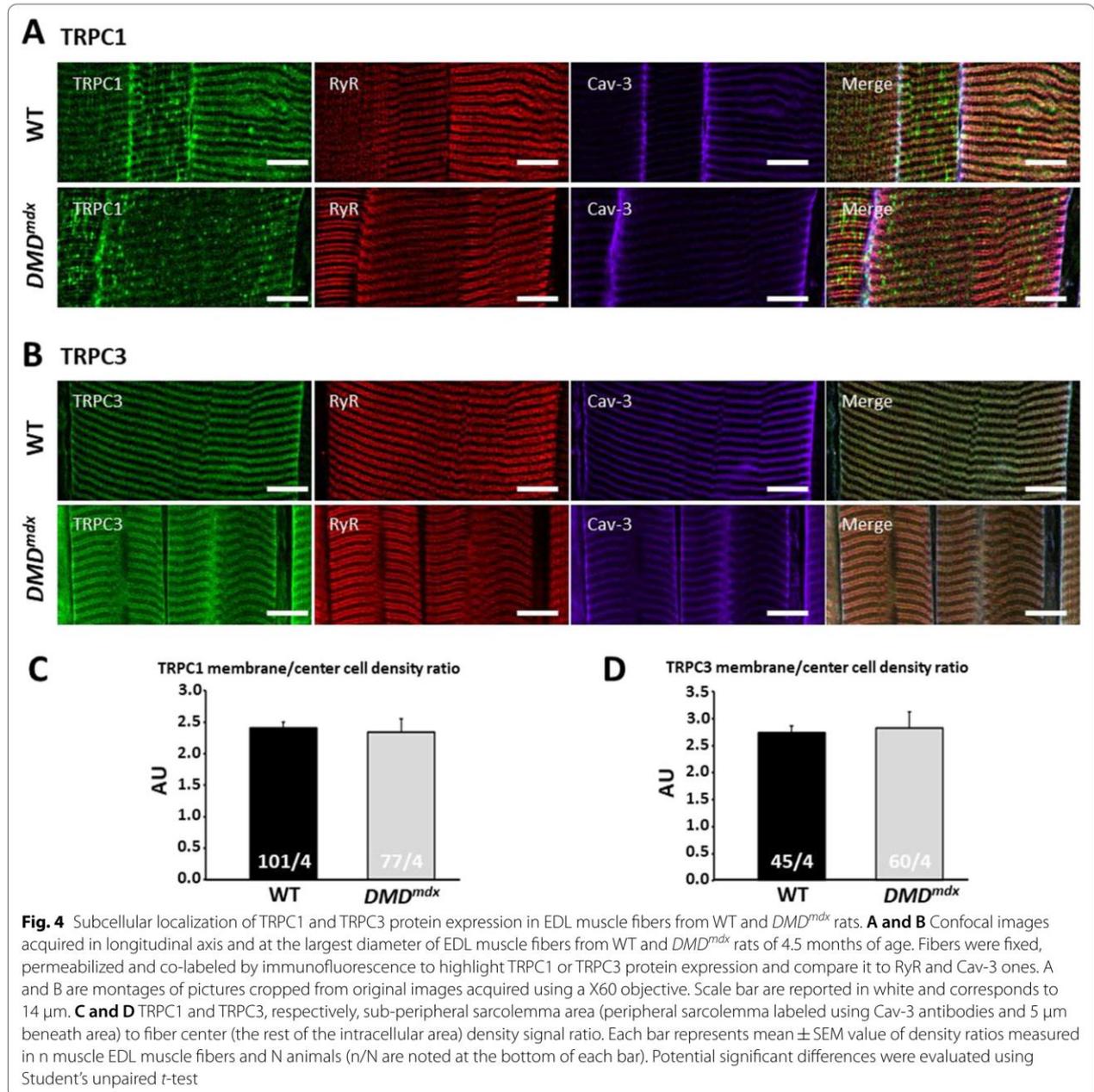
Post-translational TRPC3 modification changes in *DMD^{mdx}* rat skeletal muscle

TRPC3 protein expression was increased in *DMD^{mdx}* muscles whereas the mRNA expression level was rather decreased as compared to WT. This apparent discrepancy may rely on post-translational modifications

altering TRPC3 protein turn-over. As shown in Fig. 5A, we observed a slight but reliable increase in the apparent molecular weight (AMW) of TRPC3 bands revealed on the western blot for *DMD^{mdx}* rats. This was observed at the four ages tested (data not shown). We performed additional western blots specifically designed to measure the AMW. Two consecutive lanes containing WT and *DMD^{mdx}* EDL muscle homogenates were surrounded by lanes in which a pre-stained protein standard was loaded. After blotting and revelation the AMW of the bands was determined using scanned blots and a homemade ImageJ macro. As shown in Fig. 5C, we found that TRPC3 AMW was ~2 kDa higher in *DMD^{mdx}* EDL muscles than in WT control muscles. This may be the result of different mRNA transcript variants generated by alternative splicing, or of post-transcriptional modifications. Interestingly, Kim and colleagues reported the alternative splicing of the TRPC3 mRNA exon 9 in the brain of mice, rats, and guinea pigs [36]. They showed that the resulting protein was around 3 kDa smaller than the full-length protein. We compared the size of the amplicons corresponding to a region surrounding TRPC3 exon 9 by RT-PCR (Fig. 5D). There was no significant difference between the amplicons of the two genotypes. We also amplified and sequenced the whole TRPC3 cDNA obtained from EDL, and saw no difference between *DMD^{mdx}* and WT rats (data not shown), suggesting that no differential splicing of the TRPC3 mRNA occurs in *DMD^{mdx}* rats. Beside mRNA alternative splicing TRPC3 AMW differences between WT and *DMD^{mdx}* rats may be due to post-transcriptional modifications. It has been reported that TRPC3 presents one N-glycosylation and several phosphorylation sites [43]. After enzymatic N-deglycosylation treatment, no significant change in TRPC3 AMW was observed in EDL muscle homogenates from *DMD^{mdx}* rats. However, in these conditions, TRPC3 AMW in WT rats was shifted towards higher molecular weight values, such that the difference in TRPC3 AMW between the two genotypes was no longer observed (Fig. 5B). We also assessed the possibility that TRPC3 may be differentially phosphorylated in WT and *DMD^{mdx}* muscles. As the experimental kit we used needed high protein concentration, we used the acetone method to concentrate our muscle homogenate. This treatment led to a similar TRPC3 shift in WT muscle homogenates as observed after deglycosylation treatment. The dephosphorylation treatment per se did not further modified TRPC3 AMW (Fig. 5B).

SPCa inhibition by Pyr10, a TRPC3 specific inhibitor

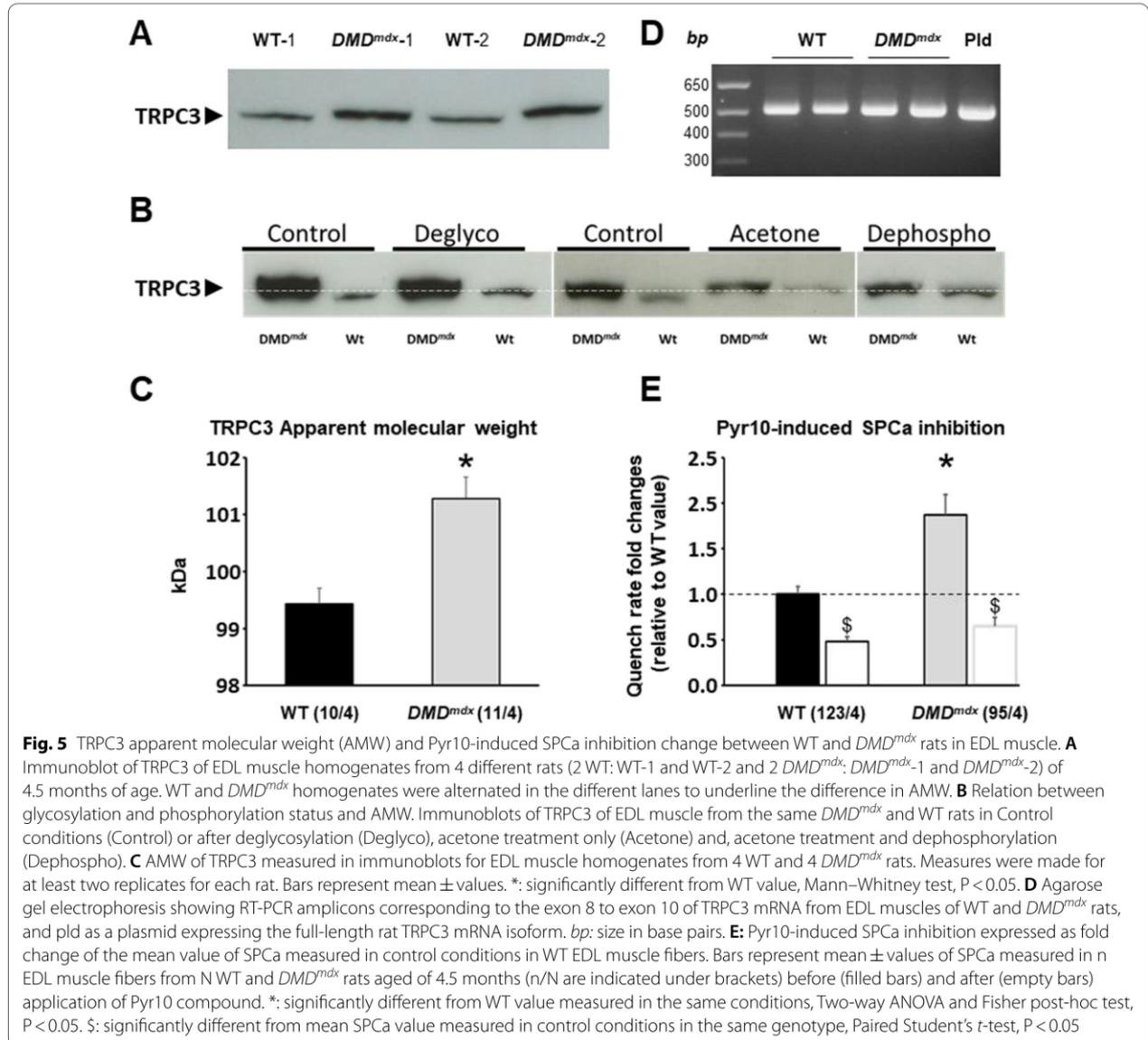
In order to further assess the possibility that TRPC3 was involved in the SPCa increased in the *DMD^{mdx}* EDL muscle fibers, Pyr10, a specific inhibitor of



the channel was applied during SPCa measurements (Fig. 5D). For both WT and *DMD^{mdx}* application of NPS containing 3 μM of Pyr10 led to a significant inhibition of SPCa. This was more pronounced in dystrophic fibers though the residual mean SPCa values measured in WT and *DMD^{mdx}* EDL muscle fibers were not significantly different.

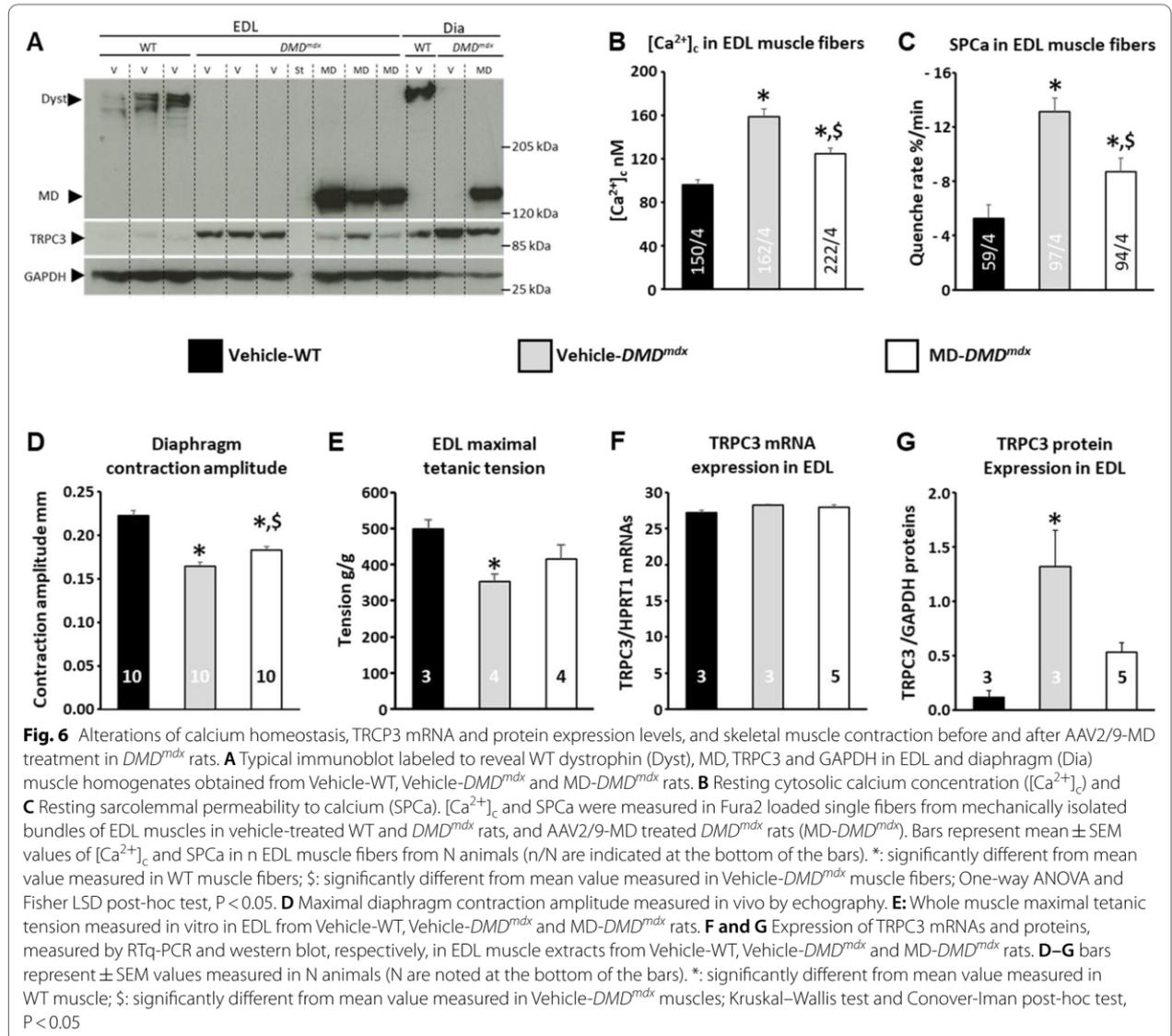
rAAV microdystrophin gene transfer leads to benefits in Ca^{2+} alterations, TRPC3 expression and skeletal muscle force

One main objective of the present study was to determine whether TRPC3 could be a therapeutic target to sustain rAAV-MD treatment. In order to assess this hypothesis a series of experiments was conducted in



4 months old *DMD^{mdx}* rats that received systemic IV injections of a therapeutic dose of rAAV2/9-MD (3E13 vg/kg; MD-*DMD^{mdx}*) at 1 month of age. Results obtained were compared to age-matched WT (Vehicle-WT) and *DMD^{mdx}* (Vehicle-*DMD^{mdx}*) littermate rats treated in the same conditions though injected with vector formulation buffer (vehicle). As previously observed in untreated animals, when compared to Vehicle-WT, EDL muscle of Vehicle-*DMD^{mdx}* rats exhibited fibers with higher resting $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa, similar TRPC3 mRNA level and higher TRPC3 protein expression (Fig. 6B, C). In EDL and diaphragm muscles endogenous dystrophin was detected by western blot in Vehicle-WT rats but not

in Vehicle-*DMD^{mdx}* nor MD-*DMD^{mdx}* animals (Fig. 6A). As expected, MD protein was highly expressed in EDL and diaphragm muscles of MD-*DMD^{mdx}* rats 3 months after rAAV2/9-MD injection (Fig. 6A). MD expression in EDL muscle was associated with a significant preservation of $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa at the fiber level (Fig. 6B, C). Nevertheless, MD-associated preservation of Ca^{2+} homeostasis was only partial and the $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa mean values were still significantly higher in MD-*DMD^{mdx}* EDLs compared to Vehicle-WT controls. We next assessed the impact of rAAV-MD injection on skeletal muscle function in vivo Diaphragm contraction amplitude was measured by ultrasound in the three groups of



rats prior to sacrifice, together with in vitro EDL maximal isometric tension (Fig. 6D, E). When compared to Vehicle-WT counterparts, a significant decrease of diaphragm contraction amplitude and EDL maximal isometric tension were observed in Vehicle-*DMD^{mdx}* rats. In MD-*DMD^{mdx}* rats, diaphragm contraction amplitude was significantly preserved as compared to Vehicle-*DMD^{mdx}* animals, although it was still lower than that of Vehicle-WT rats (Fig. 6D). We confirmed by western blot that the diaphragm contraction amplitude preservation was associated with a significant MD expression in MD-*DMD^{mdx}* rats (Fig. 6A). Similar results were observed for EDL maximal isometric tension (Fig. 6E). Both parameters were significantly decreased in Vehicle-*DMD^{mdx}*

rats compared to Vehicle-WT controls, and this was partially corrected by MD gene therapy (Fig. 6D, E). In parallel, the increase in TRPC3 protein levels was also partly prevented in MD-*DMD^{mdx}* EDL, without a significant change in TRPC3 mRNA (Fig. 6F, G).

Discussion

The main aims of the present study were to assess the involvement of TRPC1 and TRPC3 channels in the DMD pathogenesis by participating in the Ca^{2+} homeostasis alterations taking place in the skeletal muscles. The experiments were conducted during the post-natal development of the *DMD^{mdx}* rat, an animal model that closely reproduces the human DMD disease with, in particular, a

progressive and severe skeletal muscle necrosis and fibrosis, with significant reduction in muscle strength, and a decrease in spontaneous motor activity [27]. Considering that the rAAV-MD based treatments of DMD are currently promising but would rather lead to a milder BMD-like muscular dystrophy, we evaluated the potential of TRPC1 and TRPC3 to represent alternative or complementary therapeutic targets to rAAV-MD based treatments of DMD.

The *DMD^{mdx}* rat model exhibits skeletal muscle calcium homeostasis alterations

Most of the pathogenesis and the preclinical studies concerning DMD were carried out in the *mdx* mouse. This animal model presents a much milder muscular dystrophic phenotype than human DMD patients [28]. This could be part of the reason for the poor translation of the findings achieved with these animals and this is why the *DMD^{mdx}* rat was generated [27]. The milder phenotype of the *mdx* mouse model probably depends on scale and cell proliferation differences allowing a better compensation of muscle fibers necrosis [44]. On the other hand, the cascade of cellular events induced by the lack of dystrophin expression leading to muscle fiber necrosis likely follows a similar scheme in *mdx* mice and DMD patients. In particular, Ca^{2+} alterations have been reported to be very early events in the DMD pathology. Calcium overload has been reported in muscle fibers of DMD boy fetus, measured in not fully differentiated human DMD myotubes and observed in the *mdx* mouse [16, 17, 31]. The mechanisms leading to a Ca^{2+} overload have been mostly deciphered in the *mdx* mouse due to the difficulty to work with fully differentiated living human cells. It has been shown that intracellular Ca^{2+} overload is mainly related to an increase of the SPCa through the accumulation of Ca^{2+} permeable ion channels [18]. One of the first aims of the present study was thus to assess whether the dystrophic phenotype of the *DMD^{mdx}* was associated with $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and SPCa increases in skeletal muscle fibers. From 1.5 to 7 months of age, WT rats undergo puberty and reach adulthood [29]. Within this time window, we found that, in WT fast twitch muscle cells, the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and SPCa values were not fixed and varied over time. The progressive increase of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and the parallel decrease of SPCa in WT EDL muscle fibers sustain the important role of Ca^{2+} homeostasis in EDL muscle fibers during post-natal development. One may be surprised by the apparent lack of correlation between the two processes. Nevertheless, SPCa is solely related to Ca^{2+} influx through Ca^{2+} permeable channels whereas $[\text{Ca}^{2+}]_c$ is the snapshot of an equilibrium that depends not only on SPCa but also on numerous other processes, such as the balance between SR Ca^{2+} leaks and SR Ca^{2+}

re-uptake, mitochondria or Ca^{2+} -pumps and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger at the sarcolemma [45]. Interestingly, *DMD^{mdx}* rat model can experience MH-like episodes upon isoflurane-induced anesthesia that has forced us to further adapt anesthesia protocols when using this animal model. Similar MH-like episodes were also observed in some animals that were submitted to a long-lasting posture constraint, which was a source of stress for the animals. MH is a pharmacogenetic disorder that manifests as a hypermetabolic cascade initiated at the skeletal muscle cell mainly on exposure to halogenated anesthetics, like isoflurane [46]. Numerous MH like episodes have been reported in human patients after exposure to inhaled halogenated anesthetics including isoflurane, halothane, and sevoflurane [24], but that can be also triggered by stress. MH is mainly due to mutations in RYR1 and CACNA1S genes, that code for crucial Ca^{2+} channels, the ryanodine receptor from the sarcoplasmic reticulum and the Ca^{2+} voltage-gated channel subunit alpha1S located at the sarcolemma, respectively. No mutation in those genes have been reported in DMD patients exhibiting MH-like syndrome and although the underlying mechanisms are still not clear they likely depend on Ca^{2+} handling alterations [24]. MH-like events observed in the *DMD^{mdx}* rats were thus clues sustaining a Ca^{2+} homeostasis alteration in *DMD^{mdx}* skeletal muscle fibers. In order to further assess this hypothesis, we compared $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and SPCa of EDL muscle fibers from the *DMD^{mdx}* rats to that of the WT ones. As early as 1.5 months of age, both characteristics were significantly higher in the *DMD^{mdx}* rats. In particular, the SPCa was found to be around the value of WT in *DMD^{mdx}* rat muscle fibers. From 1.5 to 7 months of age, $[\text{Ca}^{2+}]_c$ and SPCa progressively decreased in dystrophic muscle fibers as observed in WT muscle fibers, but were always higher in the *DMD^{mdx}* cells. These results demonstrated that in *DMD^{mdx}* rat skeletal muscle fibers Ca^{2+} homeostasis is altered with a higher Ca^{2+} influx through the sarcolemma and intracellular Ca^{2+} overload.

An increase in the TRPC3 protein accompanies early alterations in calcium homeostasis, while the TRPC1 channel exhibited late overexpression

One of the main objectives of the present work was to determine whether TRPC1 and TRPC3 channels could represent alternative or complementary therapeutic targets to rAAV-MD based treatments of DMD. TRPC1 protein expression was increased after 7 months of age in the dystrophic rats, when animals already exhibit a marked phenotype [27]. On the other hand, as early as 1.5 months of age, when the dystrophic phenotype is milder, *DMD^{mdx}* rat muscle TRPC3 protein expression was already twofold higher than in WT rats. Interestingly, in both genotypes TRPC3 protein level decreased

and stabilized between 3 and 7 months of age. During this period of age, the expression of TRPC3 was still around twofold higher in dystrophic rats than in healthy ones. These results showed, firstly that TRPC3 plays an important role in the post-natal development of the rat EDL muscle, and secondly that TRPC3 is involved in the SPCa increase we observed in EDL muscle fibers from the *DMD^{mdx}* rat model. This is reinforced by the very similar evolution of the SPCa and TRPC3 protein expression in WT and *DMD^{mdx}* rats aged between 1.5 and 7 months. It is well documented that trafficking is a critical mode by which plasma membrane localization and surface expression of TRPC channels are regulated [47]. Thus, beside expression modification, involvement of TRPCs in SPCa increase may depend on TRPCs subcellular translocations from intracellular compartments. However, conflicting results have been obtained concerning the subcellular localization of TRPCs in striated muscles [48, 49]. Moreover, in striated muscle cells the plasma membrane is not restricted to the periphery but also forms intracellular invaginations called T-tubules. Therefore, in immunofluorescent confocal images, a channel revealed solely in the center of the cell could be expressed in the T-tubule walls and be directly involved in ion influx. In the present study, we focused our analysis on the comparison between WT and *DMD^{mdx}* muscle fibers. The objective was to determine if there was a difference between the 2 genotypes in the proportion of TRPC channels expressed at the level of the peripheral sarcolemma compared to the center of the cells. But we did not find any subcellular localization differences of TRPC1 nor TRPC3 between dystrophic and healthy EDL muscle fibers.

SPCa increase is mainly related to TRPC3 channel activity in muscle fibers lacking dystrophin expression

Thus, SPCa increase may not be due to translocation of TRPC3 from intracellular vesicles to sarcolemma, but rather relies mainly on TRPC3 protein level and/or activity increases. The involvement of TRPC3 in SPCa was reinforced by the inhibition of divalent cation entrance by the specific inhibitor Pyr10 [33]. Although SPCa was more than twofold higher in dystrophic muscle fibers as compared to WT ones at 4 months of age, a similar SPCa proportion was inhibited in both genotypes. This indicated that the main part of SPCa increase in *DMD^{mdx}* rat muscle fibers was related to TRPC3. This leads us to propose that TRPC3 channels are involved in the pathogenic process itself. This is reinforced by the noteworthy work published by Millay and colleagues in 2009, showing that overexpression of TRPC3 specifically in skeletal muscle induced muscular dystrophy in WT mouse [50]. Therefore, inhibition of TRPC3 activity and/

or expression could minimize the dystrophic process in DMD.

TRPC3 protein increase in *DMD^{mdx}* rat muscles likely relies on post-translational mechanisms

One striking result of the present study was that TRPC3 protein expression increased in *DMD^{mdx}* rat skeletal muscles whereas the level of the mRNA coding for this channel decreased, particularly at 1.5 months of age. Although further experiments are needed to clarify this apparent discrepancy, it may be explained by 2 main but nonexclusive hypotheses: (1) the expression of different isoforms that may be detected at the protein level but not at the mRNA level, and (2) the existence of post-translational protein changes that may modify TRPC3 turn-over. Importantly, the primers we used for RT-qPCR analysis were designed to amplify part of exon 2 of the TRPC3 mRNA from rat. This part of the unspliced TRPC3 mRNA is fully retrieved in predicted and isolated TRPC3 mRNA isoforms that have been reported up to now [36, 51, 52]. Similarly, the monoclonal antibody that was used in our study is directed to a peptide constituted of the first hundred amino acids in the N-terminal of the human TRPC3 protein. This part of the protein is highly conserved between humans and rats whatever the splicing of the coding mRNA. It is therefore likely that in the present study all the TRPC3 isoforms were measured, at both the mRNA and the protein levels. Our results clearly demonstrated that the *DMD^{mdx}* TRPC3 apparent MW (AMW) was 2 kDa higher than the WT one. This difference of AMW may be due to the expression of different TRPC3 isoforms. In the cerebellum from humans, guinea pigs, mice and rats, the team of Gary D Housley identified a short isoform of TRPC3 (TRPC3c), resulting from alternative splicing of exon 9 [36, 51]. They showed that TRPC3c mRNA was predominant in the cerebellum of these species as compared to the full TRPC3 mRNA (TRPC3b). Interestingly, recombinant TRPC3c and TRPC3b proteins expressed in HEK293 cells exhibited AMWs that were different about 3 to 4 kDa, a difference value of apparent AMW that is very closed to that we measured herein between *DMD^{mdx}* and WT. However, gel electrophoresis of the amplicon corresponding to the 8–10 exons showed that TRPC3 mRNA transcripts from *DMD^{mdx}* and WT rat muscles both conserved the exon 9. Thus, the difference in AMW of TRPC3 in *DMD^{mdx}* and WT muscles did not depend on exon 9 splicing. Moreover, we saw no difference between EDL TRPC3 whole cDNA *DMD^{mdx}* and WT rats, suggesting that the variation in AMW was not related to differential TRPC3 mRNA splicing.

Post-translational modifications, such glycosylation and phosphorylation, may influence the stability of

proteins as well as their western blot AMW. One N-glycosylation site and several phosphorylation sites have been identified in TRPC3 protein [43]. Such modifications may influence TRPC3 stability, but they rather seem to regulate the channel basal activity [43]. Although further experiments are needed, the results obtained in the present study suggest that TRPC3 is N-glycosylated in healthy muscle rat fibers and un-glycosylated in the *DMD^{mdx}* ones. The higher AMW observed after the deglycosylation may be surprising at first glance, since one may expect a decrease in protein weight. Nevertheless, western blot protein separation not only depends on the protein size but also on its conformation. Indeed, it has been previously reported that adding N-glycosylation may induce a decrease in the AMW of a protein despite an increased molecular weight [53]. As TRPC3 unglycosylation has been reported to increase channel activity [54]. This supports the increased expression of TRPC3 and the subsequent dysregulations of Ca^{2+} homeostasis in EDL muscle fibers lacking dystrophin expression.

rAAV-based MD only partially prevents Ca^{2+} homeostasis alterations, skeletal muscle force and TRPC3 protein increase

One key objective of the present study was to determine whether TRPC3 could be a therapeutic target for a complementary DMD treatment to rAAV-based MD therapy. In such a case, the incomplete correction of TRPC3 expression and activity by the rAAV-based MD therapy is a necessary condition to observe additive benefits. Gene transfer therapy based on rAAV-MD systemic delivery is a promising approach and clinical trials using this strategy are ongoing [12]. The MD transgene we used in the present study is very closely related to those used in the three ongoing clinical trials. For instance, both MD and the Sarepta micro-dystrophin transgenes contain N-terminus for binding to F-actin; spectrin repeats 1–3 and 24; hinges 1, 2, and 4; and the cysteine-rich domain [12]. Both transgenes use skeletal muscle specific promoters, and systemic injections of rAAV2/9.SP5.12-MD in the *DMD^{mdx}* rat used here, and rAAVrh74.MHCK7. micro-dystrophin, in humans for Sarepta clinical trials, resulted in a MD expression in 80–90% of skeletal muscle fibers. Therefore, it can be concluded that the rAAV-MD based treatment we used, is very close to those used in ongoing clinical trials. In the present study, we assessed for the first time the benefits of a rAAV-MD systemic delivery on the Ca^{2+} homeostasis in skeletal muscle fibers lacking dystrophin expression. As expected based on the intimate role of Ca^{2+} homeostasis alterations in DMD pathogenesis, we found that rAAV-MD systemic injections significantly counteracted $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa in skeletal muscle fibers. Nevertheless, the benefit

was only partial, and both $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa remained at higher levels despite MD expression. Interestingly, similar results were observed when comparing TRPC3 expression level between WT skeletal muscle fibers, MD skeletal muscle fibers and skeletal muscle fibers lacking dystrophin. In particular, TRPC3 expression was still elevated in skeletal muscle fibers transfected by rAAV-MD. These results first reinforced the relation between DMD pathogenesis and TRPC3 expression alteration. They further suggest that pharmacological or molecular strategies dedicated to inhibit TRPC3 channel expression and/or activity could be effective after MD expression.

Conclusion

In the present study, we demonstrated early increases of $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa in the EDL fast-twitch muscles from *DMD^{mdx}* rats. This was accompanied by an increase in TRPC3 expression at the protein level. Finally, we showed that rAAV-MD based treatment induced a high MD expression level which was accompanied with significant but partial prevention of calcium homeostasis alterations, increase in skeletal muscle force and TRPC3 protein overexpression. These results show that correcting TRPC3 channel expression and/or activity appears to be a promising approach as a single or as a rAAV-based complementary therapy to treat DMD.

Abbreviations

$[Ca^{2+}]_c$: Cytosolic calcium concentration; AM: Acetyl-methyl ester; AMW: Apparent molecular weight; BMD: Becker muscular dystrophy; Cav-3: Caveoline 3; cDNA: Complementary DNA; DMD: Duchenne muscular dystrophy; EDL: *Extensor digitorum longus*; MD: Microdystrophin; MH: Malignant hyperthermia; mRNA: Messenger ribonucleic acid; NPS: Normal physiological solution; PBS: Phosphate buffer saline; PFA: Paraformaldehyde; Pyr10: N-(4-(3,5-bis(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-1-yl)phenyl)-4- methylbenzenesulfonamide; rAAV: Recombinant adeno-associated virus; RT-qPCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; RyR: Ryanodine receptor; SPCa: Sarcolemmal permeability to calcium; SR: Sarcoplasmic reticulum; TRP: Transient receptor potential; TRPC: Canonical transient receptor potential; WT: Wild-type.

Acknowledgements

We thank all the personnel of the Boissonne Center for Gene Therapy (ONIRIS, INSERM, Nantes, France) and of the UTE IRS UN & IRS2 (University of Nantes, France) for the handling and care of the rats included in this study. We also thank the vector core of UMR 1089 (CPV, INSERM and University of Nantes) for the cloning of the MD pAAV plasmids and the production of the rAAV vector used in this study. We thank Dr. Jean-Baptiste Dupont for his critical reading of the manuscript.

Authors' contributions

Conceptualization: AC, CLG, and BF; Formal analysis: AC, CG, GT, AL, and BF; Funding acquisition: OA, CLG, and BF; Experimental investigation: AC, CG, AB, MAL, VF, MA, ML, GT, AL, and BF; Methodology: AC and BF; Project administration: AC, CLG, and BF; Software: BF; Resources: IA; Supervision: TL, CH, CLG and BF; Validation: CLG and BF; Visualization: AC and BF; Writing—original draft: AC, CLG and BF; Writing—review & editing: all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This project was supported by the MDA (Muscular Dystrophy Association, Research Grant ID #513878), the AFM-Téléthon (Association Française contre

les Myopathies), the “Fondation d’entreprise pour la thérapie génique en Pays de la Loire”, INSERM, INRA, the University of Nantes and the University Hospital of Nantes.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Nantes Gene Therapy Laboratory, Université de Nantes, INSERM UMR 1089, IRS 2 Nantes Biotech, CHU de Nantes, 22, Boulevard Bénoni Goullin, 44200 Nantes, France. ²INRAE, ONIRIS, PAnTher, Nantes, France. ³Institut du Thorax, Université de Nantes, CNRS, INSERM UMR 1087, Nantes, France. ⁴Therassay Platform, Capacités, Université de Nantes, Nantes, France. ⁵INSERM, UMR 1064-Center for Research in Transplantation and Immunology, ITUN, CHU Nantes, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

Received: 7 October 2021 Accepted: 9 December 2021

Published online: 20 December 2021

References

- Mendell JR, Lloyd-Puryear M. Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2013;48(1):21–6.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50(3):509–17.
- Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 2002;82(2):291–329.
- Eagle M, Bourke J, Bullock R, Gibson M, Mehta J, Giddings D, et al. Managing Duchenne muscular dystrophy—the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(6):470–5.
- Blankinship MJ, Gregorevic P, Chamberlain JS. Gene therapy strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther*. 2006;13(2):241–9.
- Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol*. 1996;70(11):8098–108.
- Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther*. 2008;16(6):1073–80.
- Rivera VM, Gao GP, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW, et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*. 2005;105(4):1424–30.
- Athanasopoulos T, Graham IR, Foster H, Dickson G. Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther*. 2004;11(Suppl 1):S109–21.
- Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, Duan D, Crawford RW, Phelps SF, et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med*. 2002;8(3):253–61.
- Le Guiner C, Servais L, Montus M, Larcher T, Fraysse B, Moullec S, et al. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*. 2017;8:16105.
- Mendell JR, Sahenk Z, Lehman K, Nease C, Lowes LP, Miller NF, et al. Assessment of systemic delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in children with Duchenne muscular dystrophy: a nonrandomized controlled trial. *JAMA Neurol*. 2020;77(9):1122–31.
- Bushby KM, Goodship JA, Nicholson LV, Johnson MA, Haggerty ID, Gardner-Medwin D. Variability in clinical, genetic and protein abnormalities in manifesting carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 1993;3(1):57–64.
- Verhaart IEC, Aartsma-Rus A. Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(7):373–86.
- Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC. Absence of dystrophin disrupts skeletal muscle signaling: roles of Ca²⁺, reactive oxygen species, and nitric oxide in the development of muscular dystrophy. *Physiol Rev*. 2016;96(1):253–305.
- Emery AE, Burt D. Intracellular calcium and pathogenesis and antenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Br Med J*. 1980;280(6211):355–7.
- Harisseh R, Chatelier A, Magaud C, Deliot N, Constantin B. Involvement of TRPV2 and SOCE in calcium influx disorder in DMD primary human myotubes with a specific contribution of alpha1-syntrophin and PLC/PKC in SOCE regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(9):C881–94.
- Gailly P. TRP channels in normal and dystrophic skeletal muscle. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(3):326–34.
- Inoue R, Kurahara L-H, Hiraishi K. TRP channels in cardiac and intestinal fibrosis. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;94:40–9.
- Numaga-Tomita T, Oda S, Shimauchi T, Nishimura A, Mangmool S, Nishida M. TRPC3 channels in cardiac fibrosis. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:56.
- Gervasio OL, Whitehead NP, Yeung EW, Phillips WD, Allen DG. TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase—role in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 13):2246–55.
- Lopez JR, Uryash A, Faury G, Esteve E, Adams JA. Contribution of TRPC channels to intracellular Ca²⁺ homeostasis in smooth muscle from mdx Mice. *Front Physiol*. 2020;11:126.
- Lopez JR, Kaura V, Hopkins P, Liu X, Uryach A, Adams J, et al. Transient receptor potential cation channels and calcium dyshomeostasis in a mouse model relevant to malignant hyperthermia. *Anesthesiology*. 2020;133(2):364–76.
- Gurnaney H, Brown A, Litman RS. Malignant hyperthermia and muscular dystrophies. *Anesth Analg*. 2009;109(4):1043–8.
- Cheung KK, Yeung SS, Au SW, Lam LS, Dai ZQ, Li YH, et al. Expression and association of TRPC1 with TRPC3 during skeletal myogenesis. *Muscle Nerve*. 2011;44(3):358–65.
- Woo JS, Lee KJ, Huang M, Cho CH, Lee EH. Heteromeric TRPC3 with TRPC1 formed via its ankyrin repeats regulates the resting cytosolic Ca²⁺ levels in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(2):454–9.
- Larcher T, Lafoux A, Tesson L, Remy S, Thepenier V, Francois V, et al. Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e110371.
- Kornegay JN. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2017;7(1):9.
- Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human’s. *Int J Prev Med*. 2013;4(6):624–30.
- Moorwood C, Liu M, Tian Z, Barton ER. Isometric and eccentric force generation assessment of skeletal muscles isolated from murine models of muscular dystrophies. *J Vis Exp*. 2013(71):e50036.
- Frayssé B, Liantonio A, Cetrone M, Burdi R, Pierno S, Frigeri A, et al. The alteration of calcium homeostasis in adult dystrophic mdx muscle fibers is worsened by a chronic exercise in vivo. *Neurobiol Dis*. 2004;17(2):144–54.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260(6):3440–50.
- Schleifer H, Doleschal B, Lichtenegger M, Oppenrieder R, Derler I, Frischauf I, et al. Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca²⁺ entry pathways. *Br J Pharmacol*. 2012;167(8):1712–22.
- Liu JX, Hoglund AS, Karlsson P, Lindblad J, Qaisar R, Aare S, et al. Myonuclear domain size and myosin isoform expression in muscle fibres from mammals representing a 100,000-fold difference in body size. *Exp Physiol*. 2009;94(1):117–29.

35. Sabourin J, Bartoli F, Antigny F, Gomez AM, Benitah JP. Transient receptor potential canonical (TRPC)/Orai1-dependent Store-operated Ca²⁺ Channels: new targets of aldosterone in cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2016;291(25):13394–409.
36. Kim Y, Wong AC, Power JM, Tadros SF, Klugmann M, Moorhouse AJ, et al. Alternative splicing of the TRPC3 ion channel calmodulin/IP3 receptor-binding domain in the hindbrain enhances cation flux. *J Neurosci*. 2012;32(33):11414–23.
37. Foster H, Sharp PS, Athanasopoulos T, Trollet C, Graham IR, Foster K, et al. Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. *Mol Ther*. 2008;16(11):1825–32.
38. Koo T, Malerba A, Athanasopoulos T, Trollet C, Boldrin L, Ferry A, et al. Delivery of AAV2/9-microdystrophin genes incorporating helix 1 of the coiled-coil motif in the C-terminal domain of dystrophin improves muscle pathology and restores the level of alpha1-syntrophin and alpha-dystrobrevin in skeletal muscles of mdx mice. *Hum Gene Ther*. 2011;22(11):1379–88.
39. Li X, Eastman EM, Schwartz RJ, Draghia-Akli R. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol*. 1999;17(3):241–5.
40. D'Costa S, Blouin V, Broucque F, Penaud-Budloo M, Francois A, Perez IC, et al. Practical utilization of recombinant AAV vector reference standards: focus on vector genomes titration by free ITR qPCR. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;5:16019.
41. Whitehead NP, Bible KL, Kim MJ, Odom GL, Adams ME, Froehner SC. Validation of ultrasonography for non-invasive assessment of diaphragm function in muscular dystrophy. *J Physiol*. 2016;594(24):7215–27.
42. Treves S, Jungbluth H, Voermans N, Muntoni F, Zorzato F. Ca²⁺ handling abnormalities in early-onset muscle diseases: novel concepts and perspectives. *Semin Cell Dev Biol*. 2017;64:201–12.
43. Liu X, Yao X, Tsang SY. Post-translational modification and natural mutation of TRPC channels. *Cells*. 2020;9(1).
44. Partridge TA. The mdx mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy. *FEBS J*. 2013;280(17):4177–86.
45. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev*. 2000;80(3):1215–65.
46. Rosenberg H, Pollock N, Schiemann A, Bulger T, Stowell K. Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet J Rare Dis*. 2015;10:93.
47. Souza LBd, Ambudkar IS. Trafficking mechanisms and regulation of TRPC channels. *Cell Calcium*. 2014;56(2):43–50.
48. Berbey C, Weiss N, Legrand C, Allard B. Transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) operates as a sarcoplasmic reticulum calcium leak channel in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2009;284(52):36387–94.
49. Tajeddine N, Zanou N, Van Schoor M, Lebacqz J, Gailly P. TRPC1: subcellular localization? *J Biol Chem*. 2010;285(5):1e1.
50. Millay DP, Goonasekera SA, Sargent MA, Maillet M, Aronow BJ, Molkentin JD. Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(45):19023–8.
51. Cederholm JME, Kim Y, von Jonquieres G, Housley GD. Human brain region-specific alternative splicing of TRPC3, the type 3 canonical transient receptor potential non-selective cation channel. *Cerebellum*. 2019;18(3):536–43.
52. Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Ostell J, Pruitt KD, Karsch-Mizrachi I. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2019;48(D1):D84–6.
53. Tams JW, Vind J, Welinder KG. Adapting protein solubility by glycosylation. N-glycosylation mutants of Coprinus cinereus peroxidase in salt and organic solutions. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1432(2):214–21.
54. Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Guder-mann T. N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem*. 2003;278(48):47842–52.

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



Résultats complémentaires

A. Étude de l'expression des canaux TRPC dans le cœur des rats *DMD^{mdx}*

Grâce à la corticothérapie et une meilleure prise en charge des problèmes respiratoires l'espérance de vie des patients DMD est aujourd'hui améliorée (Saito *et al.*, 2017). Cependant, cette dernière reste particulièrement impactée du fait du développement d'une cardiomyopathie qui est devenue la principale cause de mortalité. Contrairement à la plupart des modèles animaux le rat *DMD^{mdx}* développe une cardiomyopathie proche de celle des patients DMD (Larcher *et al.*, 2014). Dans la physiopathologie de la DMD, les dérégulations calciques sont également délétères pour les cardiomyocytes (Law *et al.*, 2020). Elles participent à l'apparition de la fibrose et aux dysfonctions métaboliques mitochondriales précédant le développement de la cardiomyopathie dilatée, souvent létale pour les patients. Afin d'étayer l'étude de l'expression de TRPC3 en tant que potentiel candidat à l'augmentation de la SPCa dans un contexte dystrophique, nous avons choisi d'étudier son expression dans le cœur des rats *DMD^{mdx}*.

Expression de TRPC3 dans le cœur des rats *DMD^{mdx}*

Dans le cadre du stage de master 1 de Marc-Antoine Lallemand, nous avons étudié l'expression génétique par RTqPCR et protéique par Western-blot de TRPC3 dans les cœurs des rats *DMD^{mdx}* par rapport aux rats sains. Nous avons choisi d'étudier cette expression aux mêmes âges que pour l'étude sur les EDL, c'est-à-dire aux âges 1,5 mois, 3 mois, 4,5 mois et 7 mois des rats. Les cœurs sont issus des mêmes rats étudiés pour l'analyse de TRPC3 dans les EDL. Les cœurs ont été prélevés à l'euthanasie, puis congelés pour réaliser des coupes histologiques. Les extractions ARNm et protéiques ont été faites sur des coupes congelées de ces cœurs. Les protocoles réalisés sont les mêmes que ceux décrits dans l'article publié, et les résultats sont présentés sur la Figure 25.

L'expression génétique de TRPC3 dans le cœur, semble similaire entre les animaux sains et dystrophiques à chaque âge, excepté à 4,5 mois. A cet âge, les rats *DMD^{mdx}* sous-expriment significativement TRPC3, puis à 7 mois ils expriment à nouveau le même taux d'ARNm TRPC3 que les rats sains (Figure 25.A).

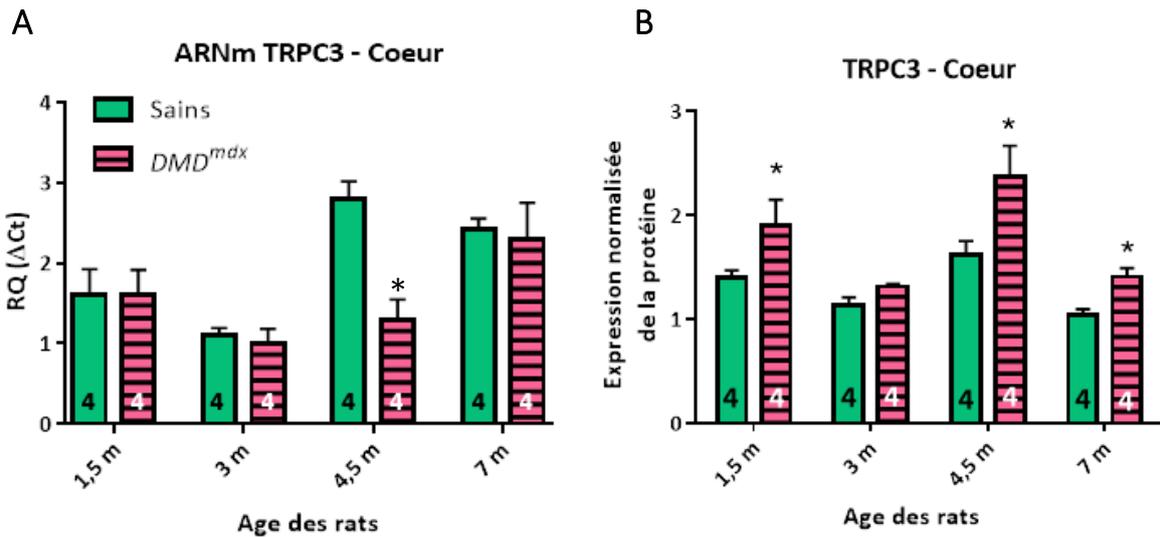


Figure 25 : Représentation en histogramme de l'expression de TRPC3 dans les cœurs de rats DMD^{mdx} comparé aux rats sains

A. Niveaux relatifs d'expression des ARNm TRPC3 dans des extraits cardiaques de rats sains et DMD^{mdx} âgés de 1,5 à 7 mois. Les résultats ont été normalisés à l'expression de l'ARNm de HPRT1.

B. Niveau Représentation en histogramme de l'expression protéique relative de TRPC3 dans le cœur de rats sains et DMD^{mdx} âgés de 1,5 à 7 mois. Les résultats ont été normalisés à l'expression de la GAPDH.

Chaque barre représente la valeur moyenne \pm SEM calculée pour N animaux (N indiqué en bas de la barre correspondante) * : significativement différent de la valeur moyenne mesurée chez les animaux sains appariés selon l'âge. $P < 0,05$, test post-hoc de Kruskal-Wallis et bilatéral de Conover-Iman.

L'expression protéique de TRPC3 chez les rats sains semble stable en fonction des âges étudiés. Chez les rats DMD^{mdx}, TRPC3 est surexprimé à chaque âge par rapport aux rats sains, excepté à 3 mois. A cet âge, l'expression protéique de TRPC3 n'est pas significativement différente chez les rats dystrophiques comparée à celle mesurée chez les rats sains (Figure 25.B).

Malgré peu de dérégulation génétique de TPC3 dans les cœurs de rats dystrophiques par rapport aux rats sains, la protéine TRPC3 y est surexprimée dès le plus jeune âge, avant l'apparition de la cardiomyopathie dilatée. L'étude de la caractérisation du modèle du rat DMD^{mdx} précise que la fibrose cardiaque est visible dès 1,5 mois d'âge avec un remodelage du myocarde et une dysfonction diastolique (Larcher *et al.*, 2014)(Huchet, Le Guiner *et al*, WMS meeting, 2017).

B. Étude de l'expression de TRPC3 chez des rats DMD^{mdx} traités par des microdystrophines

En complément des informations fournies dans l'article, des analyses supplémentaires ont été réalisées pour évaluer l'expression du canal TRPC3 chez des rats DMD^{mdx} ayant reçu différents types de traitements AAVr-MD.

Lors d'une étude menée par Audrey Bourdon au laboratoire (Bourdon *et al.*, 2022), nous avons prélevé des EDL pour évaluer l'expression de TRPC3 dans différents groupes de rats DMD^{mdx} de 4 mois injectés avec deux traitements AAVr-MD différents et à différentes doses. Les groupes étudiés sont présentés ci-dessous :

- Un groupe de trois rats sains injectés avec du tampon
- Un groupe de trois rats DMD^{mdx} injectés avec du tampon
- Un groupe de cinq rats DMD^{mdx} injectés avec une faible dose (1.10^{13} VG/kg) d'un AAVr-mMD1 codant pour une microdystrophine appelée MD1
- Un groupe de cinq rats DMD^{mdx} injectés avec une plus forte dose (3.10^{13} VG/kg) de cet AAVr-mMD1
- Un groupe de cinq rats DMD^{mdx} injectés avec une dose de 1.10^{13} VG/kg d'un AAVr-mMD3 codant pour une microdystrophine appelée MD3

La composition des microdystrophines MD1 et MD3 ne diffèrent que par la taille de leur domaine C-ter : MD1 possède un domaine C-ter très réduit n'incluant pas les sites d'interactions avec les protéines du DAPC : syntrophine et dystrobrevine, alors que MD3 contient cette partie du domaine C-ter de la dystrophine native. Les deux MD sont composées du domaine N-ter entier, de trois domaines charnières, de cinq répétitions « spectrine-like » et d'un domaine riche en cystéine réduit par rapport à celui de la dystrophine complète (Figure 26).

Après évaluation de l'expression du produit thérapeutique microdystrophine dans les EDL analysés, nous avons évalué l'expression de TRPC3 dans les différents groupes.

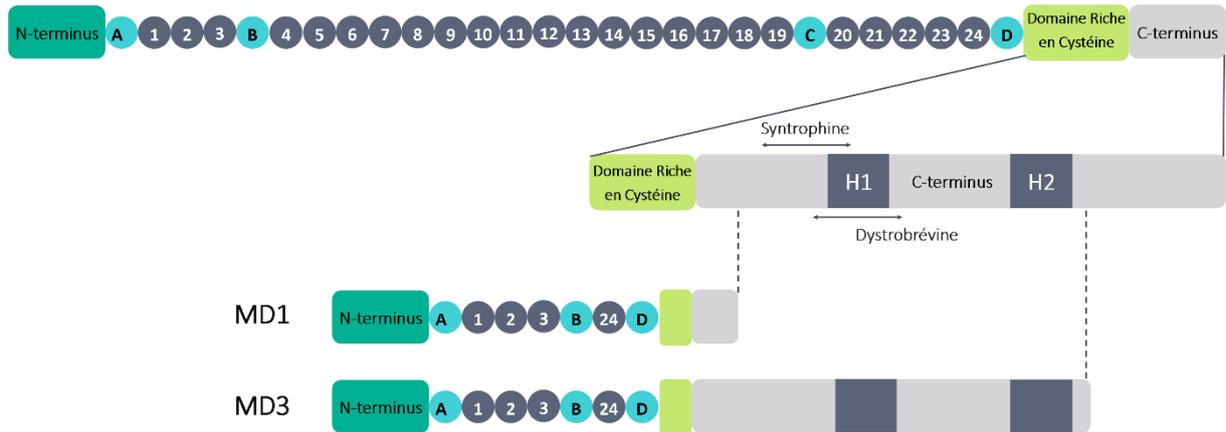


Figure 26 : Schéma représentant la structure de MD1 et MD3 évaluées dans l'étude de Audrey Bourdon

La représentation structurelle des domaines composant MD1 et MD3 est focalisée sur le domaine C-terminal. MD1 est déléetée de la quasi-totalité du domaine C-terminal. Le domaine C-terminal de MD3 contient les deux motifs super hélices H1 et H2 et conserve les domaines de liaison connus de la syntrophine et de la dystrobrevine, protéines du DAPC.

Adapté de Bourdon et al, 2022

Analyse de l'efficacité du transfert de gène dans les EDL des animaux injectés

Dans un premier temps, nous avons évalué la distribution du vecteur dans les EDL de chaque groupe de rats injectés. Pour cela, nous avons extrait l'ADN génomique pour réaliser une qPCR en duplex pour quantifier le nombre de copie de transgène (microdystrophine 1 et 3) du vecteur rapporté au nombre de copie ADN du génome des rats (gène HPRT1). Les résultats sont exprimés en nombre de copies du génome du vecteur par génome diploïde (vg/dg). Cette évaluation permet de savoir combien de copies du transgène thérapeutique sont présentes par rapport au nombre de noyaux dans les fibres musculaires, qui seraient susceptibles de faire exprimer le produit thérapeutique.

Les résultats de ces analyses sont présentés sur la Figure 27. Conformément aux attentes, on ne détecte pas de séquence génétique MD1 ni MD3 chez les deux groupes contrôles de rats sains et dystrophiques injectés avec du tampon. Pour tous les groupes de rats injectés avec les vecteurs, on détecte bien les séquences des transgènes microdystrophines. Les deux groupes de rats injectés aux doses faibles d'AAVr mMD1 et mMD3 ont un nombre équivalent de copies microdystrophine par noyau cellulaire. Le groupe de rats injecté à forte dose possède un plus grand nombre de copies de microdystrophine mais les résultats sont très hétérogènes entre les rats.

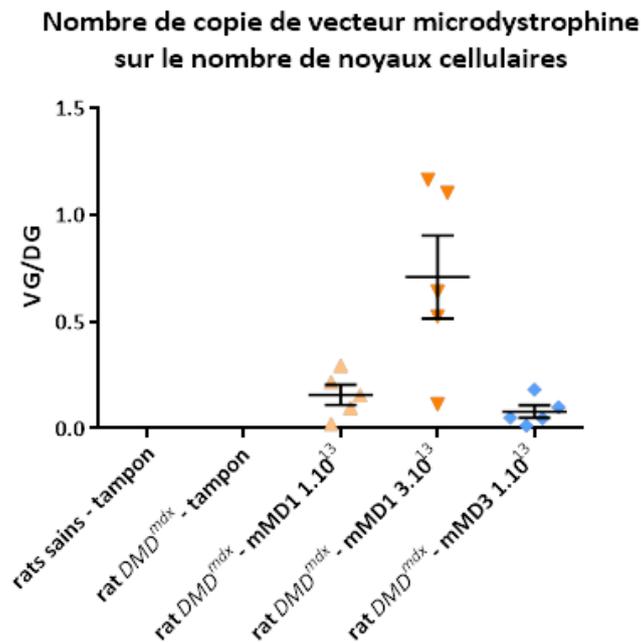


Figure 27: Analyse de l'efficacité du transfert de gène dans les EDL des rats DMD^{mdx} injectés

Représentation en nuage de point du nombre de VG/DG mesurés dans les EDL des différents groupes de rats sains, et DMD^{mdx} injectés par les traitements AAVr mMD1 1.10¹³, mMD1 3.10¹³ ou mMD3 1.10¹³. Les VG/DG ont été mesuré par qPCR et représentent le nombre de copie ADN de microdystrophine sur le nombre de copie de gène endogène HPRT1. Chaque barre représente la moyenne ± SEM

Analyse de l'expression des transgènes microdystrophines

Suite à l'évaluation de l'efficacité de transduction des vecteurs AAVr, et pour valider l'impact de ces thérapies sur l'expression de TRPC3, nous avons évalué l'expression des transgènes microdystrophines chez les rats injectés (Figure 28). Les rats injectés avec du tampon servant de contrôles n'expriment pas l'ARN microdystrophine, tandis que les groupes injectés avec le vecteur mMD1 faible et forte dose, et le vecteur mMD3 forte dose expriment le messager microdystrophine, de façon dose dépendante.

Évaluation de l'expression protéique de TRPC3 dans les animaux injectés

Après s'être assuré que le produit thérapeutique s'exprimait dans le muscle EDL des rats dystrophiques, nous avons évalué l'impact de ces thérapies sur l'expression protéique de TRPC3 (Figure 29). L'expression protéique de TRPC3 dans les groupes contrôles sains et dystrophiques correspond à ce que nous avons constaté précédemment (Creisméas *et al.*, 2021) : le canal TRPC3 est largement surexprimé chez les rats dystrophiques contrôles par

rapport aux rats sains contrôles. Chez les trois groupes rats injectés avec un traitement AAVr microdystrophine, un niveau équivalent d'expression du canal TRPC3 est détecté. Ce niveau est intermédiaire au niveau détecté chez les animaux sains et les animaux contrôles DMD^{mdx} . Les rats dystrophiques injectés exprimant une microdystrophine surexpriment toujours significativement le canal TRPC3 par rapport aux rats sains contrôle. Le niveau d'expression de TRPC3 chez les rats traités est cependant significativement réduit par rapport aux rats DMD^{mdx} contrôle.

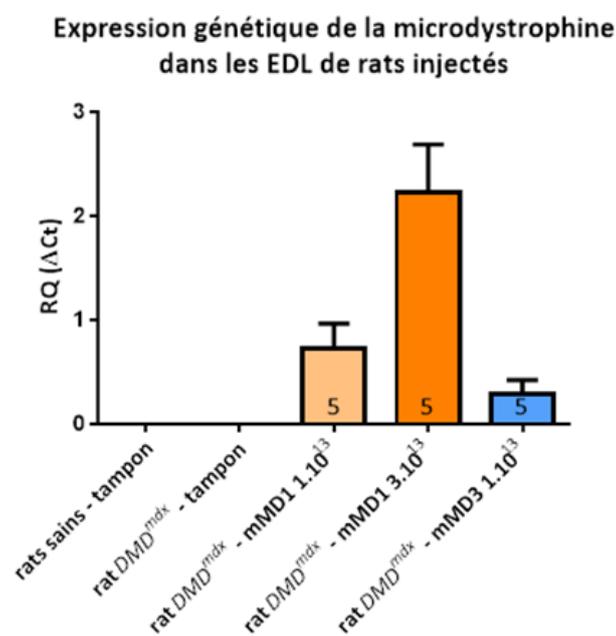


Figure 28 : Analyse de l'expression des transgènes microdystrophines dans les EDL des rats DMD^{mdx} injectés

Représentation en histogramme de l'expression génétique relative des microdystrophines dans les EDL des différents groupes de rats sains, et DMD^{mdx} injectés par les traitements AAVr mMD1 1.10^{13} , mMD1 3.10^{13} ou mMD3 1.10^{13} . Les résultats ont été obtenus par RTqPCR en normalisant sur le gène endogène de l'HPRT1. Chaque barre représente la moyenne \pm SEM.

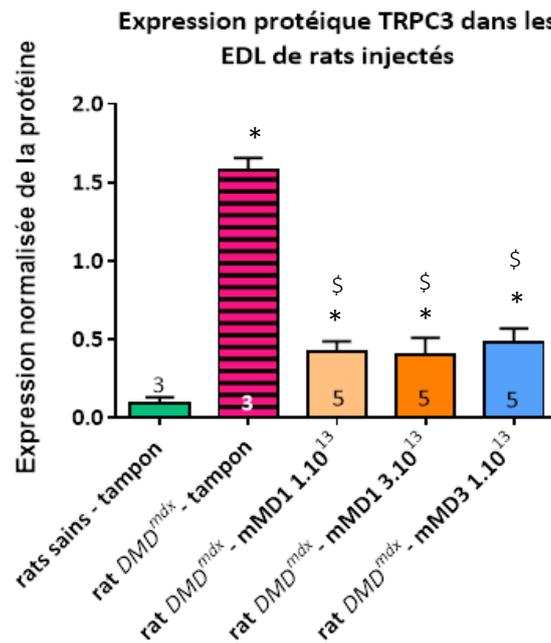


Figure 29 : Evaluation de l'expression protéique de TRPC3 dans les EDL des rats DMD^{mdx} injectés

Représentation en histogramme de l'expression protéique relative de TRPC3 dans les EDL des différents groupes de rats sains, et DMD^{mdx} injectés par les traitements AAVr mMD1 1.10^{13} , mMD1 3.10^{13} ou mMD3 1.10^{13} . Les résultats ont été obtenu par Western-blot en normalisant sur la protéine endogène GAPDH. Chaque barre représente la moyenne \pm SEM calculée pour N animaux (N indiqué en bas de la barre correspondante) * : significativement différent de la valeur moyenne mesurée chez les animaux sains, \$: significativement différent de la valeur moyenne mesurée chez les animaux DMD^{mdx} injectés avec le tampon. $P < 0,05$, test post-hoc de Kruskal-Wallis et bilatéral de Conover-Iman.

C. Discussion préliminaire

Les résultats que nous avons obtenus tendent à montrer une relation entre la pathogénèse de la DMD et l'altération de l'expression du canal TRPC3. Ce canal est surexprimé chez les rats DMD^{mdx} , dès 1,5 mois. La surexpression de TRPC3 corrèle avec l'apparition des déficits moteurs, mais précèdent le remodelage cardiaque et la mise en place de la cardiomyopathie dilatée (Figure 24, page 119). En plus de cette surexpression protéique, les anomalies calciques observées dans la pathogénèse du rat dystrophique perdurent dans le muscle squelettique malgré un traitement de thérapie génique AAVr-microdystrophine. L'ensemble de ces observations nous permet de conclure que malgré l'amélioration de la fonction musculaire observés chez rats DMD^{mdx} traités avec un AAVr-MD (Bourdon *et al.*, 2022), ces traitements ne semblent pas suffisants pour restaurer une homéostasie calcique saine dans les EDL étudiés. De même, le canal TRPC3 reste surexprimé dans les EDL de rats dystrophiques en dépit des traitements AAVr-MD. Il est important de noter que l'inclusion d'un domaine C-

terminal plus ou moins long dans les microdystrophines n'influe pas sur l'expression de TRPC3 dans les EDL de rats dystrophiques par rapport aux rats sains. Les différentes structures protéiques et domaines de liaisons codés au domaine C-terminal des MD ne semblent donc pas influencer sur l'expression de TRPC3 au sarcolemme des fibres dystrophiques.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que des stratégies pharmacologiques ou moléculaires dédiées à l'inhibition de l'expression et/ou de l'activité du canal TRPC3 pourraient être efficaces contre la DMD lorsqu'administrées seules ou en complément des thérapies MD.

III. Étude de l'expression de TRPC3 chez le patient DMD

Le modèle du rat *DMD^{mdx}*, très pertinent dans l'étude de la DMD, nous a permis d'identifier une nouvelle cible thérapeutique, TRPC3, dans la lutte contre les anomalies calciques survenant dans la DMD. Cependant, dans l'idée de lutter contre les anomalies calciques chez les patients DMD, il est important de vérifier si ces résultats sont transposables à l'homme. Afin de savoir si l'expression du canal TRPC3 est également dérégulée chez les patients Duchenne, nous avons commandé des échantillons musculaires humains d'individus sains et de patients DMD à la banque de tissus Myobank-AFM (Institut de Myologie, Paris). Au total, trois biopsies de muscles paravertébraux d'hommes sains et trois autres de patients DMD ont été obtenues. Cela nous a permis de réaliser une étude préliminaire de l'expression de TRPC3 chez les patients DMD. Les caractéristiques des échantillons sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 3) :

ID échantillon	Sain 1	Sain 2	Sain 3	DMD 1	DMD 2	DMD 3
Type de mutation	N/A	N/A	N/A	Délétion exon 3 à 43	Délétion exon 49 à 50	Délétion exon 48 à 52
Age	16 ans	17 ans	17 ans	17 ans	15 ans	15 ans
Note	Encéphalopathie	N/A	N/A	Pas de corticoïde	N/A	N/A
Quantité de tissus	63 mg	48 mg	95 mg	26 mg	N/A	315 mg

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des échantillons humains obtenus auprès de la Myobank-AFM et leurs caractéristiques

A. Évaluation de l'expression génétique et protéique de TRPC3 chez le patient DMD

Du fait de la petite taille des échantillons ou de la composition apparente en tissu musculaire des biopsies, nous avons été amenés à exclure certaines données. D'une part la biopsie du patient DMD 1 n'a pas pu être analysée par RTqPCR par manque de matériel biologique afin de privilégier l'extraction protéique. D'autre part, si l'expression de la GAPDH était bien détectée dans l'extrait protéique issu de la biopsie du patient Sain 2, ce n'était pas le cas de celle de la dystrophine, ni celle de l' α -tubuline (Figure 30.B). Ce résultat nous a amené à

considérer que la biopsie du patient Sain 2 n'était pas constituée de tissu musculaire et retirer ce patient des analyses génétiques et protéiques.

L'analyse de l'expression génétique de TRPC3 a été réalisée par RTqPCR, et est représentée dans un schéma en nuage de points (Figure 30.A). Dans un premier temps, on observe que les deux échantillons sains expriment des niveaux similaires d'ARNm TRPC3. Chez les patients DMD, l'expression génétique de TRPC3 est hétérogène entre les deux échantillons dystrophiques. Il semble tout de même que le niveau moyen d'expression génétique de TRPC3 dans les muscles paravertébraux des deux patients DMD tend vers celui des échantillons sains.

Concernant l'expression protéique de TRPC3 dans les échantillons humains, les six échantillons en notre possession ont été étudiés en Western-blot (Figure 30.B). Nous avons étudié l'expression protéique de TRPC3 rapportée à l'expression de la protéine musculaire α -tubuline. La dystrophine a également été marquée afin de s'assurer de l'identité et du phénotype des échantillons. Le marquage Western-blot a été analysé puis les résultats ont été représentés sous forme de nuage de points pour suivre les différents échantillons entre l'analyse protéique et génétique de TRPC3. Après analyse en quantification relative de TRPC3 dans les échantillons musculaires humains, on remarque que les échantillons sains présentent des résultats très homogènes. L'expression du canal TRPC3 entre les trois patients dystrophiques est à contrario très hétérogène. Un patient DMD (DMD 1) exprime très fortement TRPC3 tandis que les deux autres patients (DMD 2 et DMD 3) expriment un niveau de TRPC3 similaire à celui détecté chez les personnes saines.

Les conclusions de cette étude préliminaire de l'expression de TRPC3 tendent vers une dérégulation de ce canal chez les patients DMD par rapport aux hommes sains. Cette première étude nécessite d'être complétée en augmentant le nombre d'échantillons étudiés afin d'obtenir des résultats robustes. Ces premières observations restent cependant encourageantes car la surexpression du canal TRPC3 se confirme au moins chez un patient DMD. Dans le cas où ces résultats se confirmaient, ils renforceraient l'intérêt thérapeutique de cibler TRPC3 dans le traitement des anomalies calciques de la DMD.

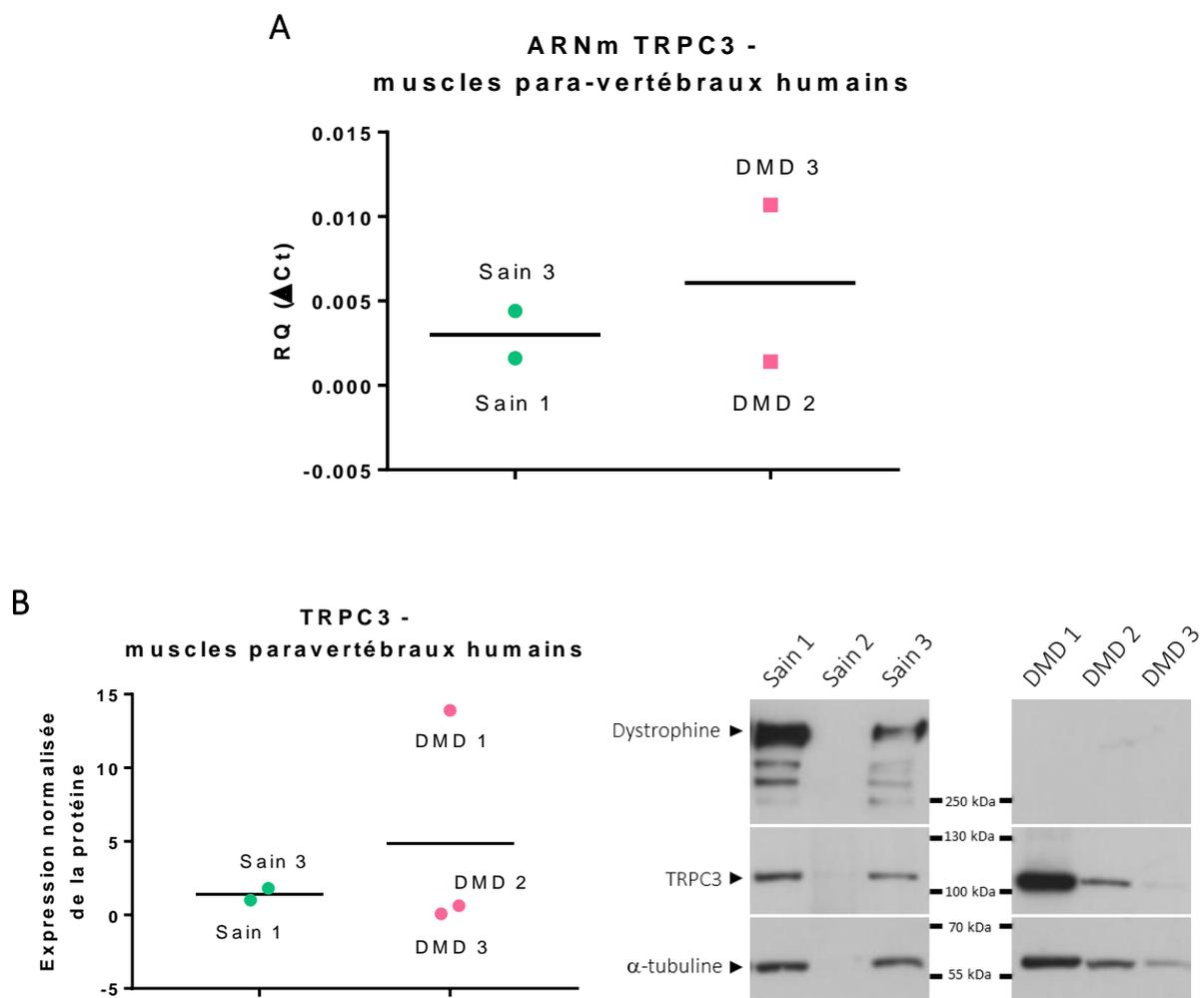


Figure 30 : Histogramme représentant l'expression génétique et protéique de TRPC3 dans les muscles paravertébraux d'hommes sains et de patients DMD

A. Niveaux relatifs d'expression des ARNm TRPC3 dans des extraits musculaires paravertébraux d'hommes sains et de patients DMD âgés de 15 à 17 ans. Les résultats ont été normalisés à l'expression de l'ARNm de hRPOL2L.

B. Niveaux relatifs d'expression protéique de TRPC3 dans les homogénats de muscles paravertébraux de patients DMD et d'hommes sains. Des immunoblots représentatifs du marquage TRPC3 de la dystrophine sont présentés à côté de l'histogramme (obtenus pour des extraits musculaires de 3 hommes sains et de 3 patients DMD). Les résultats ont été normalisés à l'expression de la protéine α -tubuline. Chaque barre représente la valeur moyenne \pm SEM

B. Discussion

Notre étude semble montrer que l'expression du canal TRPC3 chez les jeunes adultes atteints par la maladie de Duchenne est hétérogène, aussi bien au niveau génétique que protéique. Sur les trois patients DMD dont nous avons étudié les échantillons musculaires, le premier présentait une surexpression du canal TRPC3, tandis que les deux autres patients DMD présentaient une expression protéique du canal comparable à celle des hommes sains. Ces résultats précoces sont encourageants pour étoffer l'étude par l'augmentation significative du nombre d'échantillons.

En plus d'augmenter le nombre d'échantillons, il serait également intéressant d'étudier la localisation de TRPC3 dans les fibres musculaires de patients DMD par immunofluorescence. L'étude du profil de répartition du canal TRPC3 n'a pas montré de différence chez le rat entre la condition dystrophique et saine. Il est cependant nécessaire d'effectuer cette étude chez l'homme pour vérifier l'expression de TRPC3 au sarcolemme. La confirmation de son expression au sarcolemme chez l'homme serait un argument supplémentaire à son implication dans l'augmentation de la SPCa. De plus, cette étude de profil d'expression subcellulaire permettrait de savoir s'il y a d'avantages de canaux recrutés au sarcolemme des fibres DMD par rapport aux fibres saines.

Dans la bibliographie, l'étude de la régulation du canal TRPC3 ainsi que ses partenaires reste floue. Plusieurs protéines comme Orai 1 et Stim1 ont été proposées, et leurs associations avec TRPC3 pourraient être étudiées par des co-marquages en immunofluorescence. Les informations recueillies pourraient mettre en lumière de nouveaux moyens de cibler TRPC3 via ses partenaires.

De plus il est à noter que les échantillons musculaires proviennent de jeunes adultes, et bien que les individus aient moins de vingt ans, ils sont à un stade avancé de la maladie de Duchenne et présentent des anomalies de l'homéostasie calcique importantes. Ces anomalies calciques sont également présentes dans le phénotype DMB, vers lequel les thérapies géniques microdystrophine tendent à amener les patients DMD. Nous avons d'ailleurs observé que les canaux TRPC3 restaient surexprimés chez les rats *DMD^{mdx}* malgré un traitement AAVr-MD ayant

amélioré leurs fonctions motrices (Creisméas *et al.*, 2021). C'est pourquoi il serait également intéressant d'évaluer le profil d'expression du canal TRPC3 chez les patients DMB.

Dans cette étude, nous avons confirmé la persistance à la fois de l'augmentation de la SPCa chez le rat *DMD^{mdx}* et de la surexpression du canal TRPC3, malgré le traitement AAVr-microdystrophine. Nous envisageons donc l'inhibition de TRPC3 comme traitement simultané et complémentaire aux approches microdystrophines. Ces thérapies géniques microdystrophines visent à atténuer la sévérité de la maladie en étant administrées avant que la dégénérescence musculaire ne soit trop avancée, et avant la perte de l'ambulation. C'est pourquoi il serait intéressant d'évaluer l'expression du canal dans des biopsies humaines de patients plus jeunes, au même âge que celui d'inclusion des plus jeunes patients dans les essais cliniques AAVr-MD, c'est-à-dire environ 4 ans.

IV. Les stratégies d'inhibition du canal TRPC3

Dans le modèle animal de la dystrophie musculaire de Duchenne, le rat *DMD^{mdx}*, nous avons démontré que des anomalies calciques survenaient. Il s'agit de l'augmentation de la perméabilité du sarcolemme au calcium, ainsi que l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Dans notre cas, ces anomalies calciques sont accompagnées d'une surexpression très précoce du canal TRPC3 dans les EDL des rats dystrophiques. Elles surviennent avant même l'apparition de la fibrose, de la nécrose, et avant qu'un déficit moteur ou cardiaque soit décelable (Figure 24, page 119).

Nous avons montré que l'inhibition du canal TRPC3 par la molécule pharmacologique Pyr10 réduisait la SPCa à un niveau normal dans un contexte dystrophique.

Nous avons également montré que les altérations calciques et la surexpression du canal TRPC3 persistaient dans les muscles ELD de rats *DMD^{mdx}* après un traitement de thérapie génique microdystrophine.

Dans cette partie, nous présentons les stratégies thérapeutiques choisies et conçues pour l'inhibition de TRPC3 dans les EDL de rats *DMD^{mdx}*.

A. Choix des stratégies d'inhibition de TRPC3

1. Les inhibiteurs pharmacologiques

Les inhibiteurs pharmacologiques de canaux ioniques perméables au calcium ont été étudiés et développés historiquement pour approfondir la compréhension des espèces protéiques ou complexes de canaux dans les voies de signalisations calciques (Schleifer *et al.*, 2012). Des bloqueurs inorganiques comme le Gd^{3+} et le La^{3+} ont été largement utilisés dans cet objectif car ils sont considérés comme interagissant avec les pores du canal TRPC (Trebak *et al.*, 2002). Des composés organiques ont également été employés en raison de leurs effets inhibiteurs des canaux TRPC, comme le SKF-96365 (Harteneck and Gollasch, 2011), le 2-APB (DeHaven *et al.*, 2008), et le SK66 (Ng *et al.*, 2008). Tous ces outils partagent des inconvénients en termes de spécificité pour bloquer un canal TRPC en particulier (Harteneck and Gollasch,

2011), mais également en influant sur les courants SOCE médiés par Orai1/Stim1 (DeHaven *et al.*, 2008).

Par la suite, Pyr3, un dérivé du pyrazole, a été proposé comme inhibiteur hautement spécifique de TRPC3 (Kiyonaka *et al.*, 2009). Sa spécificité pour TRPC3 a été montrée dans des systèmes hétérologues *in vitro* de HEK293 transfectées. Il a également été montré qu'il était un puissant inhibiteur des courants SOCE dans des expérimentations *ex vivo* et sur culture cellulaire issues de biopsies (Kim *et al.*, 2011; Salmon and Ahluwalia, 2010).

Les travaux de Schleifer et collaborateurs ont en partie remis en cause la spécificité de Pyr3 (Schleifer *et al.*, 2012). Ces auteurs ont synthétisé de nouveaux dérivés du pyrazole et ont caractérisé de nouvelles structures, le Pyr10 (N-[4-[3,5-Bis(trifluorométhyl)-1H-pyrazol-1-yl]phényl]-4-méthyl-benzenesulfonamide, Figure 31). Leurs études en systèmes hétérologues et sur cultures cellulaires natives ont montré que le Pyr10 pouvait inhiber spécifiquement la voie de signalisation calcique médiée par TRPC3, indépendamment de celles médiées par Orai1. Cet outil permet l'exploration plus fine des voies de signalisation calcique.

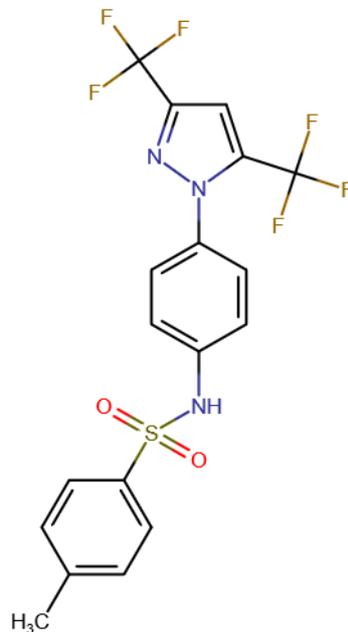


Figure 31 : Schéma de la composition et structure chimique du Pyr10

Dans notre étude sur le rat *DMD^{mdx}*, nous avons utilisé Pyr10 sur muscles EDL *ex vivo*. Nous proposons également d'employer cet inhibiteur de TRPC3 pour cibler les anomalies calciques survenant dans la DMD. Il serait question de traiter des rats sains, et *DMD^{mdx}* avec Pyr10, puis de mesurer le calcium intracellulaire des fibres musculaire ainsi que la SPCa en comparant les résultats avec des groupes de rats contrôle. Cet essai pré-clinique serait complété de suivi des animaux sur des critères cliniques de masse corporelle, de tests musculaires, et évaluations respiratoires et cardiaques. L'ensemble de ces résultats permettraient une mise en relation d'un score clinique des rats, avec les caractéristiques calciques musculaires observées sous l'effet du Pyr10. Cette étude pré-clinique dans le but d'évaluer le rapport bénéfice/risque de Pyr10 dans un contexte DMD pourrait se diviser en deux étapes :

Dans notre étude sur le rat *DMD^{mdx}*, nous avons utilisé Pyr10 *in vitro* sur des fibres musculaires isolées. Nous proposons de tester cet inhibiteur de TRPC3 dans un traitement *in vivo* destiné à cibler les anomalies calciques survenant dans la DMD. Il serait question de traiter des rats sains et *DMD^{mdx}* avec Pyr10, puis de mesurer les effets sur le calcium intracellulaire et la SPCa des fibres musculaires. Comme les altérations calciques apparaissent précocement, nous proposons d'inclure des rats de 1,5 mois, présentant déjà des dérégulations calciques, mais peu de lésions histologiques (Creisméas *et al.*, 2021, Larcher *et al.*, 2014, Le Guiner *et al.*, WMS 2017). Une première étude exploratoire pourrait être lancée avec de petits groupes d'animaux (3 à 5) pour une période de traitement assez courte. En effet, contrairement à un traitement à base d'AAVr par exemple, Pyr10 devrait être actif dès sa diffusion aux abords des fibres musculaires. Si Pyr10 est efficace, une semaine de traitement devrait donc être suffisante pour que la concentration calcique intracellulaire soit affectée. L'objectif de cette première phase serait de tester différentes doses de l'agent pharmacologique, administré via des injections intraveineuses quotidiennes ou via l'utilisation de pompes osmotiques, en partant des travaux publiés à propos de traitements basés sur Pyr3, un pyrazole dont Pyr10 est dérivé (Lu *et al.*, 2020). Une deuxième évaluation à plus long terme pourra être réalisée en fonction des résultats de la première étude. En effet, les dérégulations calciques qui précèdent les dysfonctions cardiaques et musculaires perdurent dans le temps avec la progression de la maladie. Nous imaginons donc que ces anomalies calciques doivent être régulées sur le long terme pour lutter contre la DMD. En conséquence, il s'agira d'évaluer l'effet de l'administration

à moyen terme de Pyr10 sur la fonction motrice et cardiaque des rats DMDmdx. Ce protocole inclurait un plus grand nombre d'animaux par groupe (5 à 10), avec une administration quotidienne pendant 2 mois de Pyr10, à partir de 1,5 mois d'âge des rats jusqu'à 3 mois. Le suivi de la force musculaire, de la fonction cardiaque et de la prise de poids des animaux pourra être évalué de manière hebdomadaire. Une euthanasie de fin de protocole permettra de collecter les différents muscles afin de réaliser des évaluations histologiques et calciques en comparaison des groupes contrôles. Il sera important d'étudier l'impact de l'administration de Pyr10 sur des organes vitaux comme le cerveau, le foie et les reins afin d'évaluer la potentielle toxicité de la molécule.

2. Les transgènes dominants négatifs

Le ciblage spécifique de TRPC3 est un objectif qui peut être atteint grâce à des techniques de thérapie génique. Différents travaux ont montré que l'expression d'un transgène codant pour une fraction d'un canal TRPC, où portant une mutation spécifique était associé à une inhibition du canal TRPC endogène. Ces constructions moléculaires sont appelées transgènes dominants négatifs.

Une première stratégie de transgène dominant négatif du canal TRPC6 a été étudiée par plusieurs équipes (Hofmann *et al.*, 2002; Millay *et al.*, 2009). L'équipe de Hofmann a généré ce transgène dominant négatif dans le but de déterminer si l'interaction des différentes sous-unités de canaux TRPC contribuaient à la formation d'un pore de canal commun fonctionnel (Hofmann *et al.*, 2002). Ils cherchaient également à déterminer le degré de coopérativité des sous-unités TRPC dans le complexe formant le canal fonctionnel. Cette équipe a ainsi généré une construction TRPC6 dominant négative, en échangeant trois résidus : leucine, phénylalanine et tryptophane, très conservés au sein des canaux TRP dans la région de la pore-loop. Ce triplet d'acides aminés jouerait un rôle de stabilisation de la structure de la P-loop (Li *et al.*, 2019). Cette construction TRPC6^{DN} a été transfectée dans la lignée cellulaire HEK293 surexprimant le canal TRPC6. Ils ont montré que l'expression de TRPC6^{DN} a permis de presque complètement inhiber les courants dépendants de TRPC6. Ils ont également montré qu'une seule protéine TRPC6 dominante négative était suffisante pour inhiber les courants calciques dépendants de TRPC6 et TRPC3, mais n'était pas efficace sur TRPC4 et TRPC5. C'est dans un

contexte d'étude des anomalies calciques survenant dans la pathogénèse des dystrophies musculaires que l'équipe de Millay a également utilisé le TRPC6^{DN} (Millay *et al.*, 2009). Dans cette étude, ils ont également démontré que la surexpression de TRPC3 dans une lignée de souris, suffisait à induire un phénotype dystrophique. Ils y ont décrit des lésions musculaires et anomalies calciques similaires à celles retrouvées dans les dystrophies musculaires impliquant un déficit de protéine du DAPC. Pour rétablir l'homéostasie calcique dérégulée dans leur modèle murin, l'équipe a croisé des souris transgéniques déficientes en δ -sarcoglycan et une lignée stable exprimant le TRPC6^{DN}. Le transgène TRPC6^{DN} a significativement atténué tous les aspects de la maladie associés à la surexpression de TRPC3, tels que l'histopathologie, l'augmentation du nombre de fibres plus petites et le nombre de noyaux centraux dans les fibres musculaires.

Un autre mutant dominant négatif a également été décrit pour le canal TRPC3. Ce transgène code pour le fragment N-terminal du canal humain, composé des 302 premiers acides aminés que nous appellerons TRPC3^{Nter} (Balzer, 1999; Sabourin *et al.*, 2012). Les travaux ont montré la capacité de ce TRPC3^{Nter} à bloquer la multimérisation du canal endogène et à inhiber la fonction des canaux TRPC3. Ces travaux ont été menés avec des cultures primaires de cellules endothéliales aortiques (Balzer, 1999) et de cardiomyocytes isolés d'embryons de poulets (Sabourin *et al.*, 2012).

Comme décrit précédemment, il y a une forte similarité de structure entre les canaux TRPC3 et TRPC6 (voir paragraphe 2, « La structure des canaux TRPC », page 98). La construction du mutant TRPC6^{DN} décrit dans les travaux de Hofmann et Millay ciblent la mutation du triplet LFW de la pore-loop, qui est également retrouvé dans le canal TRPC3. Nous avons donc choisi de concevoir un premier mutant dominant négatif TRPC3 sur la même stratégie thérapeutique que pour le mutant TRPC6^{DN}. Nous allons comparer ce premier mutant dominant négatif au second constitué du fragment N-terminal du canal décrit dans les études de Balzer et Sabourin (Balzer, 1999; Sabourin *et al.*, 2012), que nous nommons TRPC3^{Nter}. Notre stratégie consiste à évaluer les effets de l'expression des mutants TRPC3^{DN} et TRPC3^{Nter} (Figure 32) chez le rat *DMD^{mdx}*, à l'aide de l'injection d'AAVr portant des transgènes codant pour ces canaux mutés. Par la suite, nous envisageons d'évaluer les bénéfices de ces AAVr en complément de thérapies AAVr-microdystrophine.

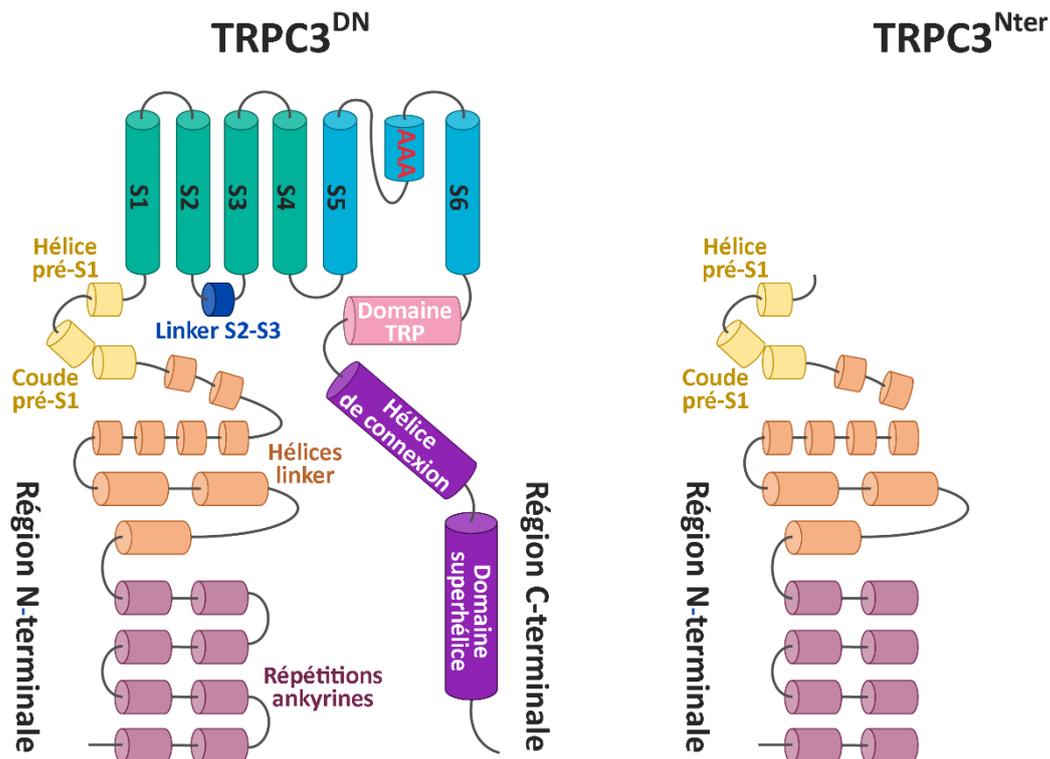


Figure 32 : Représentation schématique des canaux TRPC3 dominants négatifs conçus pour l'étude de l'inhibition de TRPC3. Le mutant TRPC3^{DN} est muté dans la pore hélice, les trois acides aminés LFW sont remplacés par un triplet AAA. Le mutant TRPC3^{Nter} est composé des 302 premiers acides aminés du fragment N-ter de la protéine.

B. Conception des outils de biologie moléculaire pour les transgènes dominants négatifs

L'obtention préalable de la preuve de concept *in vitro* de notre produit thérapeutique est nécessaire avant de pouvoir passer aux essais précliniques sur modèle animal. La construction des transgènes dominants négatifs TRPC3^{DN} et TRPC3^{Nter}, a été adaptée de manière à obtenir une preuve de concept par transfection *in vitro* de cellules HEK293. L'objectif *in fine* étant de réaliser des essais pré-cliniques par injection dans le modèle animal du rat *DMD^{mdx}*. Nous avons choisi les séquences génétique TRPC3 de l'espèce du rat pour optimiser l'expression des mutants dans le modèle animal rat *DMD^{mdx}*, qui seraient traités par des vecteurs AAVr-rTRPC3^{DN} ou AAVr-rTRPC3^{Nter}.

Chez l'homme il existe trois variants d'épissage du canal TRPC3 qui ont un poids moléculaire respectif de 105,4 kDa (kilo Dalton), 102 kDa et 97,2 kDa. L'isoforme unique de TRPC3 du rat que nous avons choisi d'utiliser, a un poids moléculaire de 95,5 kDa (Figure 33). Le mutant rTRPC3^{DN}, n'a qu'une mutation ponctuelle de trois bases par rapport à la version sauvage de rTRPC3, en conséquence le poids moléculaire inchangé de 95,5 kDa le rend indissociable en Western-blot de l'isoforme 3 hTRPC3 (Figure 34). Ce problème ne se pose pas pour le mutant TRPC3^{Nter} qui a un poids moléculaire de 33,6 kDa du fait de sa taille réduite aux 302 premiers acides aminés de la protéine.

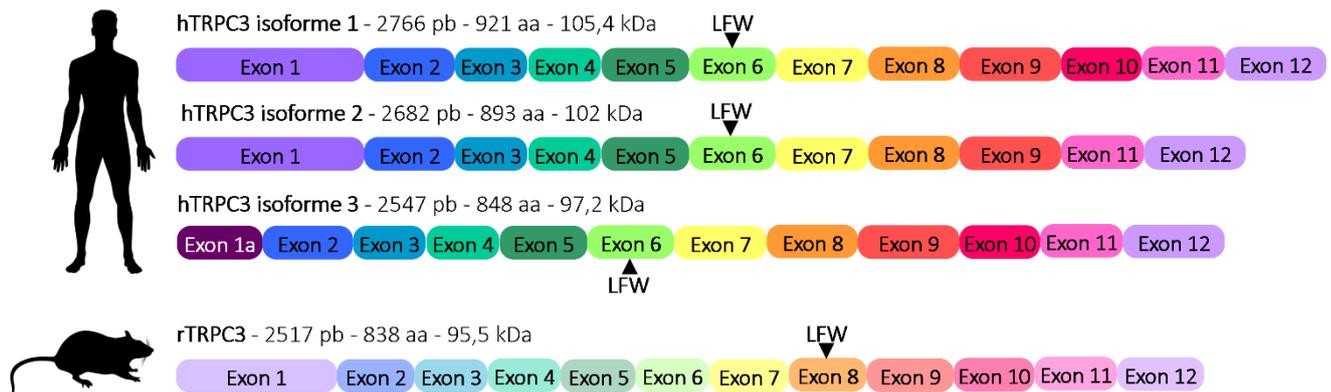


Figure 33 : Représentation schématique des isoformes ADNc de hTRPC3 et de rTRPC3

Le nom de chaque isoforme ADNc de TRPC3 est suivi du nombre de paires de base le composant, ainsi que du nombre d'acide aminés traduits et le poids moléculaire de la protéine résultante. Le triplet LFW très conservé est représenté sur l'exon correspondant.

Pour dissocier l'expression protéique des transgènes dominants négatifs rTRPC3, de la forme courte endogène de hTRPC3 dans les HEK293, nous avons généré une autre séquence rTRPC3^{DN}. Il s'agit d'une version rTRPC3^{DN} qui possède un tag HA (Hemagglutinine) en phase du cadre de lecture à l'extrémité C-ter. Grâce à un anticorps spécifique ciblant le tag HA nous pouvons cibler uniquement le mutant rTRPC3^{DN}-HA et valider l'expression et la localisation de rTRPC3^{DN} par Western-blot ou immunofluorescence. Ce transgène rTRPC3^{DN}-HA est réservé exclusivement à l'évaluation de l'expression du mutant car le tag HA est susceptible de modifier les interactions des sous-unités rTRPC3 avec les canaux endogènes ainsi que l'adressage et la fonctionnalité du canal à la membrane.

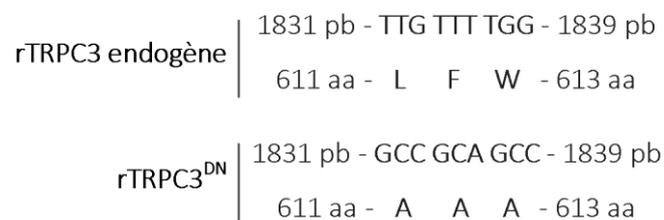


Figure 34 : Schéma représentant la mutation de rTRPC3^{DN}

La séquence génétique de rTRPC3 codant pour les acides aminés LFW est représenté en parallèle de la séquence génétique de rTRPC3^{DN} optimisée pour coder les acides aminés AAA. La position des nucléotides est indiquée en pb, pour paire de bases, et la position des acides aminés est renseignée sous le sigle aa.

Les mesures de courants calciques pour valider la fonctionnalité des mutants a aussi nécessité la conception de différents outils moléculaires. Dans un premier temps, avant d'effectuer les tests de fonctionnalité des canaux dominants négatifs, nous devons amplifier les courants calciques imputables aux hTRPC3 endogènes dans les cellules HEK293. Ces courants exacerbés nous permettraient d'améliorer la mesure de l'influx calciques par hTRPC3 et de mieux en évaluer l'inhibition. Pour exacerber les courants calciques impliquant TRPC3, nous avons généré un transgène rTRPC3 codant pour la protéine endogène TRPC3 de rat. Nous réalisons les mesures calciques avec la technique d'imagerie Ionoptix. Il s'agit d'un système conçu pour l'acquisition numérique simultanée de fluorescence et de données de géométrie cellulaire. Composé d'un microscope inversé à fluorescence et d'une interface d'acquisition des données il permet entre autres, de réaliser des mesures de flux calciques grâce à la sonde fura2, ainsi que de mesurer la contractilité des myocytes. La configuration de notre système Ionoptix permet de mesurer la fluorescence sur champs large. C'est-à-dire que la fluorescence de

l'ensemble des cellules du champ est enregistrée lors des mesures calciques. La transfection cellulaire n'étant pas efficace à 100%, toutes les cellules du champ d'observation peuvent ne pas exprimer le transgène. Dans ces conditions, le Ionoptix ne permet pas de faire une distinction du signal fluorescent provenant de cellules exprimant ou non la protéine dominante négative après transfection. Sans tri cellulaire préalable sur critère d'expression du transgène, les mesures calciques pourraient être faussées par l'observation de cellules qui n'expriment pas rTRPC3^{DN} ou rTRPC3^{Nter}. Ainsi, l'impact des transgènes sur les flux calciques induits par TRPC3 et son inhibition pourrait être sous-évalué. C'est pourquoi nous avons ajouté une séquence codant pour un fluorophore mCherry avec les transgènes rTRPC3^{DN} et rTRPC3^{Nter}. Ce fluorophore est codé à la suite d'une séquence P2A (Peptide autoclivant A2) en phase du cadre de lecture de rTRPC3^{DN} ou rTRPC3^{Nter}. Ce peptide permet la transcription d'un seul et même ARNm codant pour plusieurs protéines. La traduction de cette séquence ARNm par les ribosomes induit le clivage des protéines de part et d'autre du motif P2A. L'expression et la détection du fluorophore mCherry est donc dépendante de l'expression des transgènes rTRPC3. Grâce à la présence de la mCherry nous pouvons évaluer le taux d'expression des mutants dominants négatifs de rTRPC3 et du rTRPC3 sauvage dans les HEK293. Cela nous permet de réaliser un tri cellulaire et récupérer uniquement les cellules exprimant le transgène pour réaliser les mesures calciques avec le Ionoptix. Une double vérification de la fluorescence mCherry des cellules est possible avec le Ionoptix car il est composé d'un microscope à fluorescence et possède les filtres d'excitation et d'émission permettant de détecter la mCherry. Le choix de la mCherry a été motivé par la compatibilité de ses spectres d'excitation et d'émission de fluorescence, compatibles avec ceux du Fura2 pour les mesures calciques.

L'ensemble des constructions de transgènes évoquées codant pour les séquences sauvages rTRPC3 et dominantes négatives rTRPC3^{DN} ou rTRPC3^{Nter} ont été placées sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CMV (Cytomégalovirus). Le signal de polyadénylation est le BGH et l'ensemble des constructions ont été clonées dans des plasmides AAV. C'est-à-dire qu'ils possèdent des séquences ITR de part et d'autre de la cassette d'expression pour permettre une production de vecteurs AAVr. L'ensemble des transgènes designés et conçus sont présentés dans le Tableau 4.

La validation de ces outils d'inhibition de TRPC3 par analyse d'expression et de fonctionnalité n'a pas pu être réalisée durant cette thèse mais sera poursuivie par la suite.

Schéma des éléments du transgène	Rôle des outils moléculaires
	Amplification du signal calcique induit par hTRPC3 endogène en HEK293
	Evaluation de l'expression des transgènes en HEK293 par Western-blot
	
	
	Evaluation fonctionnelle des transgènes en HEK293 par mesure calciques
	
	

Tableau 4 : Récapitulatif des différents transgènes designés et conçus, de leur composition et de leur rôle dans la stratégie de validation *in vitro*.

CMV : promoteur Cytomégalo virus, PolyA : Signal de polyadénylation de transcription, P2A : Peptide autoclivant A2, mCherry : fluorophore.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique létale pour laquelle de nombreuses stratégies thérapeutiques sont étudiées aujourd'hui avec près de quatre-vingt essais cliniques dans le monde dont onze en France (clinicaltrials.gov). Parmi les plus prometteuses, la thérapie génique AAVr-MD fait aujourd'hui l'objet de quatre essais cliniques : GNT 0004, SRP-9001, PF-06939926 et SGT-001. Ces produits thérapeutiques visent à faire exprimer des MD dont le design de la séquence et de la structure varie en fonction des essais cliniques (Mendell *et al.*, 2021). En vue de remplacer la dystrophine manquante des patients DMD, ces MDs contiennent des domaines de la dystrophine qui sont essentielles à sa fonction. Cependant, ces MDs sont de tailles réduites en raison de la capacité restreinte d'encapsulation du vecteur AAVr (Wu *et al.*, 2010). Les MDs ne représentent qu'environ 30% de la dystrophine complète (Duan, 2018). Elles se rapprochent d'avantage des dystrophines tronquées retrouvées chez les patients DMB, chez qui on retrouve des protéines jusqu'à 50% plus petites que la dystrophine native (Duan, 2018). Malgré les premiers résultats encourageants de ces essais, l'expression de MDs chez les patients DMD ne peut, au mieux, qu'améliorer leur état pathologique, le rapprochant de celui des patients DMB. Les patients Becker présentent un phénotype variable en fonction de la mutation de leur gène de la dystrophine. En règle générale, les patients DMB présentent également une espérance de vie réduite. Ils développent une faiblesse musculaire qui apparaît dans l'enfance ou l'adolescence, et souffrent d'une cardiomyopathie, comme les patients DMD (Aartsma-Rus *et al.*, 2016). C'est pourquoi il est nécessaire de mettre au point des traitements alternatifs et complémentaires aux stratégies AAVr-MD. Nous avons choisi de cibler les anomalies calciques survenant dans la pathogénèse de la DMD. Ces anomalies calciques sont délétères chez les patients DMD et DMB car elles sont associées à une cascade de mécanismes moléculaires induisant la mort cellulaire, ainsi que l'apparition de fibrose et nécrose tissulaire (Bushby *et al.*, 2010a).

Dans le but de cibler les anomalies calciques survenant dans la DMD, nous avons cherché à identifier les canaux impliqués dans l'augmentation de la SPCa. Malgré l'incertitude autour de l'identité moléculaire de ces canaux, les études portent principalement sur les canaux de la famille des canaux TRP, et en particulier des canaux TRPC. Les canaux TRPC1 et TRPC3 ont

notamment été décrits dans le muscle où ils participeraient à la régulation de l'homéostasie calcique ainsi qu'à la différenciation myogénique (Antigny *et al.*, 2013, 2017; Cheung *et al.*, 2011). De plus, TRPC1 a été décrit comme protéine associée à la dystrophine (Vandebrouck *et al.*, 2007), ainsi qu'à TRPC3 qui serait quant à lui localisé aux tubules-T (Lauritzen *et al.*, 2006), région cellulaire spécialisée dans la gestion de l'influx calcique. Pour l'étude de la DMD, ces canaux avaient été majoritairement étudiés dans le modèle de la souris *mdx*, peu pertinent par rapport à son évolution physiopathologique. L'un des principaux objectifs de ce travail de thèse a donc été d'évaluer l'implication des canaux TRPC1 et TRPC3 dans les altérations de l'homéostasie calcique survenant dans les muscles squelettiques dans un modèle animal de la DMD plus pertinent que la souris *mdx*, le rat *DMD^{mdx}*. Le rat *DMD^{mdx}* est un modèle animal de la DMD qui a été développé en collaboration avec notre équipe (Larcher *et al.*, 2014). Son évolution physiopathologique est très similaire à celle de la maladie humaine, car il développe progressivement une nécrose et une fibrose musculaire associées à une diminution significative de la force musculaire, de l'activité motrice spontanée et de la fonction cardiaque.

L'ensemble des travaux réalisés lors de ce travail de thèse a permis de montrer que les rats *DMD^{mdx}* étaient bien sujets à des dérégulations de l'homéostasie calcique. Elles ont été observées de manière très précoce chez le rat *DMD^{mdx}*, ce qui corrèle avec les observations réalisées chez l'homme, avec la description de dépôts calciques dans les cellules d'un fœtus masculin atteint par la DMD (Bertorini *et al.*, 1984; Emery and Burt, 1980). Une surcharge calcique cytosolique avait également été mesurée chez les souris *mdx*, autre modèle animal de la DMD (Emery and Burt, 1980; Fraysse *et al.*, 2004; Harisseh *et al.*, 2013). Dans ce modèle, il avait été montré que la surcharge intracellulaire en Ca^{2+} est principalement liée à une augmentation de la perméabilité calcique du sarcolemme, SPCa. La perméabilité calcique membranaire serait due à une augmentation de courants calciques induits par des canaux ioniques (Gailly, 2012). Nous avons étudié la concentration calcique intracellulaire $[Ca^{2+}]_c$ et la SPCa des fibres de muscle squelettique de type rapide des rats *DMD^{mdx}* en comparaison avec des rats sains, âgés de 1,5 à 7 mois. C'est dans cette tranche d'âge que les rats dystrophiques connaissent la puberté, atteignent l'âge adulte, et pendant laquelle la maladie atteint progressivement un stade sévère.

Dans le but d'évaluer l'intérêt thérapeutique de cibler les canaux TRPC1 et TRPC3 pour lutter contre la DMD en complément des approches AAVr-microdystrophine, nous avons évalué l'expression ces canaux chez le rat *DMD^{mdx}*. Le canal TRPC1 est surexprimé à 7 mois d'âge chez les rats *DMD^{mdx}* adultes sévèrement atteints par la DMD. Le canal TRPC3 quant à lui est fortement surexprimé (environ deux fois plus que chez les rats sains) chez les rats dystrophiques dès 1,5 mois alors que le phénotype dystrophique est encore dans ses phases précoces. La surexpression de TRPC3 reste très marquée chez les rats dystrophiques par rapport aux rats sains jusqu'à 7 mois d'âge. Lorsqu'on observe l'évolution de l'expression de TRPC3 chez les rats sains et *DMD^{mdx}* sur toute la période étudiée, la même tendance se dessine. Le canal TRPC3 est d'avantage exprimé à 1,5 mois d'âge pour chaque groupe de rats, pour diminuer et se stabiliser ensuite entre 3 et 7 mois d'âge. Ces résultats montrent que le canal TRPC3 chez le rat, joue un rôle important dans le développement post-natal normal du muscle EDL. D'autre part, l'inhibition de la SPCa dans l'EDL induite par Pyr10, inhibiteur spécifique de TRPC3, montre que ce canal serait bien impliqué dans les dérégulations calciques observées dans ce modèle animal.

Pour revenir plus en détails sur l'étude fondamentale de l'expression de TRPC3 dans un contexte dystrophique, il est important de souligner que nous avons observé une expression génétique et protéique inversement proportionnelle de ce canal dans les EDL de rats dystrophiques, en particulier à l'âge de 1,5 mois d'âge des rats. Comme décrit dans l'article « TRPC3, but not TRPC1, as a good therapeutic target for standalone or complementary treatment of DMD » publié en 2021, ce phénomène pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses non exclusives. Premièrement il pourrait s'agir d'une détection protéique de plusieurs isoformes de TRPC3 chez le rat, tandis que seules certaines d'entre elles seraient quantifiées au niveau génétique. La seconde hypothèse serait que des modifications post-traductionnelles des canaux TRPC3 modifient le renouvellement des protéines aux membranes. Concernant la première hypothèse sur l'existence d'isoformes TRPC3 chez le rat qui ne seraient pas détectées en RTqPCR, plusieurs arguments tendent à l'écarter. Malgré l'existence chez l'homme de trois isoformes protéique de TRPC3 et la grande homologie de séquence avec le rat (95% d'homologie protéique entre le canal TRPC3 du rat et l'isoforme courte de TRPC3 chez l'homme), aucun épissage alternatif n'a été certifié chez le rat. A notre connaissance une seule étude a décrit un épissage alternatif de l'exon 10 du gène rTRPC3 dans le cervelet du rat (Kim

et al., 2012). Nous avons reproduit leur protocole PCR pour identifier cette isoforme de TRPC3 dans les mêmes conditions expérimentales, suivi d'un séquençage des amplicons générés. L'amplification de l'ensemble des ARNm codant pour TRPC3 des EDL et du cervelet de rats ont été reverse transcrits. Les ADNc séquencés codaient tous pour la même forme de TRPC3, une forme non épissée du canal incluant l'exon 10, contrairement à ce qui est décrit par l'équipe de Housley (Kim *et al.*, 2012). L'anticorps monoclonal utilisé en Western-blot est dirigé contre l'épitope constitué des cent premiers acides aminés du fragment N-ter du canal TRPC3 humain. Cet épitope est hautement conservé chez l'homme et le rat quelle que soit l'isoforme protéique humaine. Il est donc probable que dans notre étude, l'ensemble des isoformes du canal TRPC3 du rat (si différentes isoformes existent en effet) ait été détecté à la fois en RTqPCR et en Western-blot.

Une autre différence importante observée entre les rats *DMD^{mdx}* et les rats sains est que le poids moléculaire de la protéine TRPC3 détectée dans les EDL de rats dystrophiques est d'environ 2 kDa supérieur à celui du TRPC3 détecté chez les rats sains. Cette différence de poids moléculaire pourrait correspondre à l'épissage alternatif d'un exon. Cependant, à nouveau, l'analyse par RT-PCR et séquençage des ADNc de TRPC3 ont permis d'écarter cette hypothèse. Nous nous sommes donc posé la question de savoir si les canaux TRPC3 portaient différentes modifications post-traductionnelles en fonction du phénotype des rats. Ces modifications comme les glycosylations, les phosphorylations ou les méthylations peuvent influencer sur la stabilité et l'activité du canal ionique. Plusieurs sites de phosphorylation ainsi qu'un site de glycosylation ont été identifiés dans la protéine TRPC3 (Liu *et al.*, 2020). Nous avons réalisé des expériences préliminaires afin de déterminer si la différence de poids moléculaire observée de TRPC3 dans le contexte sain ou dystrophique était due à une différence de glycosylation ou de méthylation. Nos résultats, bien qu'ils nécessitent des études supplémentaires, suggèrent que TRPC3 serait N-glycosylé dans les fibres musculaires EDL de rats sains et non glycosylées dans celles du rat *DMD^{mdx}*. Le poids moléculaire apparent plus élevé après déglycosylation peut être surprenant à première vue. En effet, on pourrait plutôt s'attendre à une diminution du poids des protéines une fois un groupement glycosyl enlevé. Cependant la technique de Western-blot, qui permet une séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire, est aussi influencée par la conformation des protéines. Il a déjà été rapporté que l'ajout de N-glycosylation pouvait induire une diminution du poids moléculaire apparent d'une protéine

malgré l'augmentation de son poids moléculaire réel (Tams *et al.*, 1999). Si la déglycosylation de TRPC3 chez les animaux dystrophiques était avérée, il est intéressant de noter qu'une telle modification post-traductionnelle augmenterait l'activité du canal (Dietrich *et al.*, 2003). Dans ce cas, TRPC3 serait suractivé en plus d'être surexprimé en absence d'expression de la dystrophine, les deux phénomènes concourant à l'augmentation de la SPCa. Plusieurs techniques permettraient de compléter ces premières analyses des modifications post-traductionnelles du canal TRPC3, comme la spectrométrie de masse par exemple. Une autre technique pourrait être l'immunoprécipitation des protéines TRPC3 avec billes couplées à des anticorps ciblant les phosphorylations, méthylations ou glycosylations.

En tant que canal membranaire, l'adressage de TRPC3 au sarcolemme est nécessaire à son implication dans la SPCa. Or, différentes études montrent des résultats contradictoires concernant la localisation des canaux TRPC dans les muscles striés squelettiques (Berbey *et al.*, 2009; Tajeddine *et al.*, 2010). L'étude de la localisation au sarcolemme ou au réticulum sarcoplasmique est rendue difficile dans les fibres musculaires par l'étroite proximité entre leurs deux membranes au niveau des triades. Ainsi, lors d'observations d'images de fluorescence acquises en microscopie confocale, un signal considéré au centre de la fibre peut en réalité correspondre à un signal localisé aux tubules T du sarcolemme. Un canal ionique situé aux tubules T pourrait être directement impliqué dans l'influx calcique extracellulaire, contrairement à un canal situé au réticulum sarcoplasmique. C'est pourquoi notre étude s'est focalisée sur l'analyse de la comparaison de répartition des canaux TRPC1 et TRPC3 entre des fibres dystrophiques et saines. Notre objectif consistait à déterminer s'il existait une différence de proportions des canaux TRPC exprimés à la membrane périphérique par rapport au centre des cellules. La description du centre de la cellule ne fait pas de distinction entre le RS ou les tubules T. Nos observations n'ont pas mis en lumière une différence de localisation subcellulaire des canaux TRPC1, ni TRPC3 dans les EDL de rats dystrophiques par rapport aux rats sains.

Nous constatons donc que la surexpression précoce de TRPC3 chez le rat dystrophique n'est pas associée à une translocation exacerbée du canal depuis des vésicules intracellulaires vers le sarcolemme. Cela laisse envisager que l'implication de TRPC3 dans l'augmentation de la SPCa serait dû à la surexpression du canal et/ou à une augmentation de son activité. Cette

hypothèse est appuyée par le fait que Pyr10, inhibiteur très spécifique de TRPC3, inhibe la SPCa dans des fibres musculaires de rats dystrophiques. L'implication de TRPC3 dans les dérégulations calciques observées dans les muscles dystrophiques est appuyée par les travaux de Millay, qui a montré que la surexpression du canal TRPC3 dans les muscles, suffisaient à induire un phénotype dystrophique chez des souris saines (Millay *et al.*, 2009). C'est pourquoi nous proposons de cibler TRPC3 dans la DMD pour rétablir ou atténuer les dérégulations calciques délétères pour les patients souffrant de DMD.

Afin d'asseoir l'intérêt thérapeutique de cibler TRPC3 dans la lutte contre la DMD, nous avons initié l'étude de l'expression de ce canal chez les patients DMD. Bien qu'hétérogènes entre les trois échantillons de patients myopathes obtenus, les résultats montrent une surexpression du canal TRPC3 chez au moins un patient DMD. Ces résultats précoces sont encourageants pour étoffer l'étude par l'augmentation significative du nombre d'échantillons. En plus d'augmenter du nombre d'échantillons, il serait également intéressant d'étudier la localisation de TRPC3 dans les fibres musculaires de patients DMD par immunofluorescence. La confirmation de son expression au sarcolemme chez l'homme serait un argument supplémentaire à son implication dans l'augmentation de la SPCa. De plus, cette étude de profil d'expression subcellulaire permettrait de savoir s'il y a d'avantages de canaux recrutés au sarcolemme des fibres DMD par rapport aux fibres saines. De plus il est à noter que les échantillons musculaires proviennent de jeunes adultes, et bien que les individus aient moins de vingt ans, ils sont à un stade avancé de la maladie de Duchenne et présentent des anomalies de l'homéostasie calcique importantes. Ces anomalies calciques sont également présentes dans le phénotype DMB, vers lequel les thérapies géniques microdystrophine tendent à amener les patients DMD. Nous avons d'ailleurs observé que les canaux TRPC3 restaient surexprimés chez les rats *DMD^{mdx}* malgré un traitement AAVr-MD ayant amélioré leurs fonctions motrices (Creisméas *et al.*, 2021). C'est pourquoi il serait également intéressant d'évaluer le profil d'expression du canal TRPC3 chez les patients DMB.

Nous avons choisi d'évaluer trois stratégies d'inhibition de TRPC3 sur une lignée cellulaire HEK293 avant d'envisager des essais chez le modèle animal du rat *DMD^{mdx}*. Nous nous proposons de comparer l'inhibition pharmacologique médiée par Pyr10 à l'expression de deux transgènes dominants négatifs différents. Le premier mutant TRPC3^{DN} possède une mutation

invalidant la perméabilité calcique du canal, tandis que le mutant TRPC3^{Nter} n'est constitué que du fragment N-terminal de la protéine. Bien que ces outils restent à valider dans un contexte dystrophique, nous pouvons déjà discuter de leurs avantages et inconvénients. L'inhibition pharmacologique de TRPC3 présente l'avantage d'être facilement administrable aux rats *DMD^{mdx}*, avec un mode d'action relativement rapide qui ne dépend que du délai que va mettre la molécule à atteindre sa cible dans les organes et tissus. D'autres questions peuvent se poser quant aux propriétés pharmacocinétiques de Pyr10. Il sera nécessaire de les établir si la molécule devait passer en essai préclinique ou cliniques. Ce principe thérapeutique, malgré ces avantages, présente un inconvénient majeur. L'administration d'une molécule pharmacologique, qu'elle soit orale ou intraveineuse, ne permet pas de cibler spécifiquement un organe ou une population cellulaire. Le Pyr10 administré peut cibler l'ensemble des canaux TRPC3 rencontrés dans tout l'organisme, or nous ne cherchons à cibler spécifiquement que les muscles squelettiques. Une inhibition de TRPC3 de manière aspécifique dans les organes peut présenter des risques majeurs d'effet secondaires. TRPC3 est un canal ionique impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires, notamment du système nerveux et immunitaire (Aslam and Alvi, 2022; Parenti *et al.*, 2016). L'inhibition de ce canal et de ses partenaires hors des organes cibles pourrait avoir de graves effets sur le modèle animal et, à terme, sur les patients DMD. C'est pourquoi nous avons également choisi une stratégie de thérapie génique par vecteur AAVr. L'outil AAVr permet de cibler préférentiellement la transduction de certains tissus et peut être combiné avec le placement du gène médicament sous contrôle d'un promoteur tissu spécifique (Li *et al.*, 1999; Martari *et al.*, 2009; Salva *et al.*, 2007). Cette double stratégie permet de minimiser le risque d'effets secondaires par atteinte « hors cible » du produit thérapeutique. Cependant, il est important de souligner que les vecteurs AAVr ne sont pas totalement sans risque, puisqu'ils sont notamment connus pour être immunogènes (Ronzitti *et al.*, 2020). Un autre inconvénient majeur de l'utilisation de vecteurs AAVr est son coût de production très élevé. On peut citer à ce sujet le Glybera qui a été récemment retiré du marché en raison à la fois du faible nombre de patients et de son coût de production très élevé (1,2 M\$). Le vecteur AAVr reste malgré tout le vecteur viral aujourd'hui le plus prometteur pour effectuer un transfert de gène direct *in vivo*, et a permis la commercialisation de plusieurs médicaments sur le marché (Glybera, Luxturna, Zolgensma), et le lancement de plus de 130 essais cliniques dans le monde (clinicaltrials.gov).

La pertinence de la validation des stratégies d'inhibition rTRPC3^{DN} et rTRPC3^{Nter} pourra être améliorée en utilisant d'autres modèles cellulaires que les HEK293. Les cellules HEK293 sont très pratiques à l'emploi mais restent les cellules embryonnaires immortalisées, qui ne se comportent pas comme des cellules musculaires, que nous voulons cibler. Nous possédons au laboratoire une banque de cellules immortalisées de myoblastes de rats, les cellules L6. Ces cellules peuvent être placées dans des conditions induisant la différenciation pour fusionner et former des myotubes. Cela nous permettrait de réaliser les tests d'inhibitions sur des cellules plus proches des cellules musculaires que nous souhaitons traiter à terme. Un autre type de cellules est disponible depuis peu au laboratoire, il s'agit de cellules iPS de patients DMD et d'individus sains. Ce modèle cellulaire est actuellement en cours d'étude dans l'équipe de Jean-Baptiste Dupont. Son objectif est de mettre au point des organoïdes *in vitro* idéalement pour simuler des muscles squelettiques en trois dimensions. Cet outil constituerait un excellent modèle pour les essais de stratégies thérapeutiques du muscle squelettique, en particulier sur la DMD grâce aux souches d'iPS issues de patients Duchenne. Avec la mise au point de ces organoïdes contractiles, nous pourrions valider nos transgènes dominants négatifs sur fond génétique sain et dystrophique. L'intérêt majeur que pourrait présenter ces organoïdes, au-delà d'être constitués de cellules humaines, serait d'améliorer la différenciation *in vitro* et peut-être de pouvoir ainsi y retrouver les anomalies calciques de la DMD. Un tel modèle serait idéal pour obtenir la preuve de concept de nos outils d'inhibition sans utiliser un modèle animal, dans un premier temps. Il reste cependant à ce jour à les obtenir de façon reproductible et à évaluer quelle méthode utiliser pour les transfecter ou transduire.

Après la validation des transgènes dominants négatifs *in vitro*, nous pourrions produire des vecteurs AAVr-TRPC3^{mut} (AAVr-TRPC3^{DN} ou AAVr-TRPC3^{Nter}) et démarrer des essais précliniques sur le modèle du rat *DMD^{mdx}*. Compte tenu des limites rencontrées avec les traitements AAVr-MD sur le rat *DMD^{mdx}* concernant la persistance des anomalies calciques, nous envisageons également de les combiner avec la stratégie d'inhibition de TRPC3. Une première stratégie qui peut être envisagée est la double injection d'AAVr-TRPC3^{mut} avec des AAVr-MD. Cette stratégie présente cependant l'inconvénient de devoir doubler la dose thérapeutique de vecteur AAVr administrée, et ainsi d'exacerber la réponse immunitaire anti-capside. Comme décrit précédemment, les essais cliniques utilisant les vecteurs AAVr ont permis d'établir une corrélation entre les réactions du système immunitaire et la dose de

vecteurs injectée et pouvaient être dangereuses pour les patients (Mingozzi *et al.*, 2009; Nathwani *et al.*, 2011). Cela nous amène à proposer la conception d'un vecteur AAVr codant à la fois pour une MD et un transgène dominant négatif TRPC3. Conscients de la limite d'encapsulation des vecteurs AAVr, le design de la séquence à inclure dans la cassette d'expression doit être travaillé. Une possibilité serait de choisir une MD dont la taille optimisée de la séquence codante permet l'inclusion du transgène dominant négatif TRPC3^{Nter}, seul mutant assez court (909 kb) pour être co-inclus dans une cassette d'expression AAVr. Les travaux de thèse de Audrey Bourdon au laboratoire ont permis de générer une cassette d'expression MD1 optimisée de 4256 pb (Thèse Bourdon 2020 « Impact de l'inclusion du domaine C-terminal de la dystrophine sur l'efficacité d'une microdystrophine dans le cadre d'une thérapie génique de la Dystrophie Musculaire de Duchenne », figure 28, page 110). Cette cassette est constituée des deux ITR codés par 260 pb, du promoteur synthétique muscle spécifique spc5.12 mesurant 323 pb, de la MD1 3612 pb et du signal de polyadénylation pCI-Neo de 49 pb (Figure 35). Une cassette hypothétique d'expression de MD1 et TRPC3^{Nter} peut être imaginée en utilisant la séquence P2a et pourrait mesurer 5 219 pb en conservant le promoteur spc5.12. Cette longueur de cassette d'expression est théoriquement trop élevée pour permettre une encapsulation dans le vecteur AAVr, mais reste optimisable. Une première stratégie pourrait viser l'optimisation de la taille du promoteur spc5.12 ou d'un autre promoteur muscle spécifique, comme ceux dérivés du promoteur Mck par exemple (Skopenkova *et al.*, 2021). L'autre possibilité serait de déterminer la taille minimale permettant de conserver l'efficacité de TRPC3^{Nter}. Une telle approche pourrait permettre de réduire la taille du transgène codant pour le canal mutant dominant négatif ce qui faciliterait son encapsulation. Une autre approche consisterait en la conception d'un vecteur codant pour un shRNA (small hairpin ARN). Cette technique permet d'induire, par ARN interférence, une inhibition stable ou transitoire du gène cible serait adaptée pour l'inhibition de TRPC3. Les shRNA ont l'avantage de ne coder que de courtes séquences nucléotidiques de moins de 30 paires de bases. Lors de la transcription de ces shRNA, la forme double brin de l'ARN est reconnue par la machinerie cellulaire et va être prise en charge par les protéines Dicer et Drosha pour cliver et maturer le siRNA (small interference ARN). Le complexe protéique RISC se complexe alors au siRNA et peut aller cliver les ARNm complémentaires à la séquence siRNA (Svoboda, 2020). En raison du peu de place que nécessite les shRNA dans une cassette

d'expression, nous pouvons imaginer que cet outil peut aisément être ajouté en supplément d'une MD dans un vecteur AAVr.

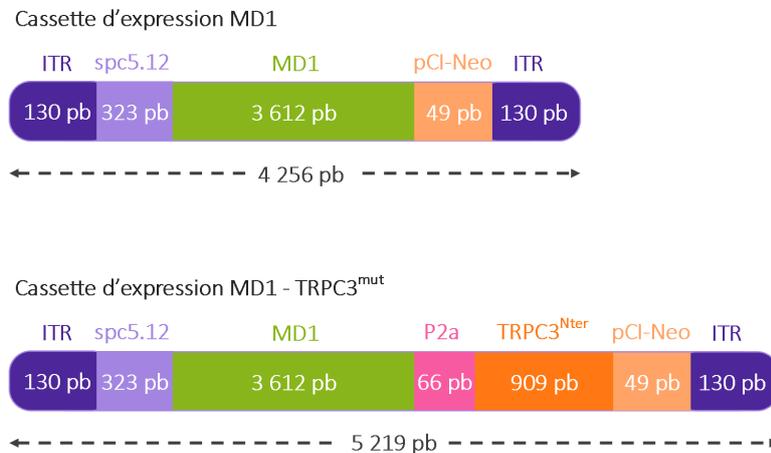


Figure 35 : Schéma représentant la taille cassette d'expression de l'AAVr-MD1, et de l'AAVr-MD1-TRPC3^{mut} hypothétique. La taille de la cassette d'expression MD1 est de 4 256 pb, et la taille de la cassette d'expression hypothétique de MD1 - TRPC3^{mut} est de 5 219 pb. ITR : Inverted-Terminal Repeat, P2a : Peptide autocloquant 2, spc5.12 : promoteur synthétique spécifique du muscle. Adapté de la Thèse Bourdon 2020 « Impact de l'inclusion du domaine C-terminal de la dystrophine sur l'efficacité d'une microdystrophine dans le cadre d'une thérapie génique de la Dystrophie Musculaire de Duchenne », figure 28, page 110

Dans l'équipe, et toujours en rapport avec son inhibition, nous étudions l'expression et l'interaction de TRPC3 avec Nox2. Dans les cardiomyocytes, des travaux ont montré que l'association Nox2 et TRPC3 était exacerbée dans un contexte de lésion cardiaque (Kitajima *et al.*, 2016; Oda *et al.*, 2017). Cette association exacerberait la production de ROS dans les cardiomyocytes et protégerait TRPC3 de la dégradation par le protéasome, favorisant ainsi son accumulation aux membranes. Ce mécanisme pourrait expliquer la surexpression apparente du canal TRPC3 dans les muscles EDL de rat *DMD*^{mdx} sans que l'expression des ARNm soit modifiée. La protéine Nox2 est une des principales sources de ROS lors des contractions musculaires et son activité est exacerbée dans les muscles dystrophiques (Pal *et al.*, 2014; Whitehead *et al.*, 2010). Des études ont ciblé l'inhibition de Nox2 chez la souris *mdx* avec l'objectif de diminuer la SPCa (Loehr *et al.*, 2016; Pal *et al.*, 2014). Pour cela ils ont généré un modèle de souris *mdx* dont le gène codant pour la sous-unité p47^{phox} de Nox2 est inactivé. Ils ont montré que la diminution de ROS produits par Nox2 permettait la réduction de l'influx calcique extracellulaire. La réduction de production de ROS par Nox2 protégerait également la fonction musculaire chez les souris dystrophiques. C'est pourquoi il est intéressant d'étudier l'expression de Nox2 dans

le modèle du rat *DMD^{mdx}*, plus pertinent pour l'étude de la DMD que la souris *mdx*. Si les dérégulations de Nox2 se confirment chez le rat dystrophique, il serait intéressant d'étudier son interaction avec TRPC3 dans le muscle squelettique, qui n'a jamais été vérifié dans ce contexte. De plus si l'expression de Nox2 est exacerbée dans le muscle dystrophique de rat et qu'elle perdure malgré un traitement AAVr-MD, il pourrait devenir la cible de nouvelles stratégies d'inhibition. Des outils d'inhibition de Nox2 existent, comme l'inhibiteur pharmacologique apocynin (Khairallah *et al.*, 2012), et le transgène dominant négatif de p22^{phox} qui est une sous unité de Nox2, mais d'autres peuvent être conçus comme via l'utilisation de shRNA, par exemple. De la même manière que pour TRPC3 afin de cibler les anomalies calciques dans le contexte DMD, nous pouvons imaginer un vecteur AAVr codant à la fois pour une MD ainsi que pour l'un des outils d'inhibition de Nox2. Ces pistes de recherche sont actuellement prises en charge par Arthur Cens qui effectue actuellement son stage de Master 2 au laboratoire et que j'ai formé en partie.

Bien que nous ayons montré qu'un inhibiteur spécifique de TRPC3, Pyr10, permet de rétablir un influx calcique normal dans les EDL de rats dystrophiques, nous ne pouvons rejeter la possibilité que d'autres canaux puissent être impliqués dans ces dérégulations calciques. Nous pensons d'abord aux autres canaux TRPC décrits dans les muscles striés qui s'hétéromérisent avec TRPC3, comme TRPC1, TRPC6 ou TRPC7, ou d'autres protéines impliquées dans l'homéostasie calcique, comme l'échangeur NCX1 (Alvarez *et al.*, 2008; Álvarez-Miguel *et al.*, 2017; Doleschal *et al.*, 2015). D'autres part, des travaux ont remis en question la spécificité du Pyr10, en montrant qu'il serait en réalité un inhibiteur de TRPC6 plutôt que de TRPC3 (Álvarez-Miguel *et al.*, 2017). Dans ces travaux, il est précisé que Pyr10 serait plus sélectif des hétérotétramères contenant TRPC6 que des homotétramères TRPC3, contrairement à ce que d'autres études ont décrit (Alkhani *et al.*, 2014; Schleifer *et al.*, 2012). L'offre d'inhibiteurs spécifiques des TRP pouvant s'associer à TRPC3 pour former un canal fonctionnel reste par ailleurs faible. D'autre part, comme nous avons pu en faire l'expérience, les anticorps commerciaux disponibles pour révéler les différents TRP sont souvent peu fiables. Il est donc nécessaire d'essayer les différents anticorps de plusieurs fournisseurs si on veut étudier l'expression d'un canal TRP donné et de multiplier les contrôles, positifs comme négatifs. Cet aspect est particulièrement prégnant lors de l'étude de l'expression de canaux TRP, même s'il ne lui est pas spécifique. L'étude de ces canaux dans des systèmes

principalement hétérologues, où les canaux sont surexprimés, rend aussi difficile l'extrapolation des conclusions sur le rôle de ces canaux TRPC endogènes dans l'organisme. Tous ces éléments expliquent les nombreuses ambiguïtés qui persistent concernant la régulation par la multimérisation des canaux TRPC, et TRP en général. Dans le contexte de la DMD, des phénomènes restent à éclaircir, notamment en ce qui concerne la cascade de mécanismes moléculaires liée à l'absence de dystrophine. Comprendre la relation précise entre l'absence de la dystrophine et les dérégulations calciques qu'elle induit, permettrait d'imaginer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer la santé des patients DMD, tant que nous ne pouvons pas les guérir. Une étude exhaustive sur les partenaires des canaux TRPC dans le muscle squelettique et le cœur dans un contexte dystrophique serait intéressante dans ce but, et pourrait aider à la compréhension d'autres maladies musculaire concernées par des dérégulations calciques.

L'ensemble des travaux dans lesquels s'inscrit cette thèse, participe à la recherche et à l'optimisation des stratégies thérapeutiques pour améliorer la vie des patients DMD. Les thérapies AAVr-MD prometteuses, peuvent être associées à des stratégies thérapeutiques ciblant les anomalies calciques délétères pour les muscles et le cœur chez les patients atteints par la dystrophie musculaire de Duchenne. Nous proposons de réaliser la preuve de concept de ces stratégies thérapeutiques en ciblant l'inhibition du canal calcique TRPC3.

ANNEXE

ARTICLE



Evaluation of the dystrophin carboxy-terminal domain for micro-dystrophin gene therapy in cardiac and skeletal muscles in the DMD^{mdx} rat model

Audrey Bourdon¹, Virginie François¹, Liwen Zhang², Aude Lafoux³, Bodvaël Fraysse¹, Gilles Toumaniantz⁴, Thibaut Larcher⁵, Tiphaine Girard¹, Mireille Ledevin⁵, Cyrielle Lebreton¹, Agnès Hivonnait⁴, Anna Creisneas¹, Marine Allais¹, Basile Marie¹, Justine Guguin¹, Véronique Blouin¹, Séverine Remy⁶, Ignacio Anegón⁶, Corinne Huchet^{1,3}, Alberto Malerba⁷, Betty Kao⁷, Anita Le Heron⁷, Philippe Moullier^{1,8}, George Dickson⁷, Linda Popplewell⁷, Oumeya Adjali¹, Federica Montanaro⁹ and Caroline Le Guiner¹ 

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2022

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a muscle wasting disorder caused by mutations in the gene encoding dystrophin. Gene therapy using micro-dystrophin (MD) transgenes and recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors hold great promise. To overcome the limited packaging capacity of rAAV vectors, most MD do not include dystrophin carboxy-terminal (CT) domain. Yet, the CT domain is known to recruit α 1- and β 1-syntrophins and α -dystrobrevin, a part of the dystrophin-associated protein complex (DAPC), which is a signaling and structural mediator of muscle cells. In this study, we explored the impact of inclusion of the dystrophin CT domain on Δ R4-23/ Δ CT MD (MD1), in DMD^{mdx} rats, which allows for relevant evaluations at muscular and cardiac levels. We showed by LC-MS/MS that MD1 expression is sufficient to restore the interactions at a physiological level of most DAPC partners in skeletal and cardiac muscles, and that inclusion of the CT domain increases the recruitment of some DAPC partners at supra-physiological levels. In parallel, we demonstrated that inclusion of the CT domain does not improve MD1 therapeutic efficacy on DMD muscle and cardiac pathologies. Our work highlights new evidences of the therapeutic potential of MD1 and strengthens the relevance of this candidate for gene therapy of DMD.

Gene Therapy; <https://doi.org/10.1038/s41434-022-00317-6>

INTRODUCTION

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a fatal X-linked degenerative neuromuscular disease affecting \approx 1:5,000 male births [1]. DMD is caused by mutations in the *DMD* gene coding for dystrophin, a large sub-sarcolemmal protein (427 kDa) essential for the integrity of muscular fibers in skeletal and cardiac muscles [2]. Dystrophin comprises four structural regions: an actin-binding N-terminal (NT) domain, a central rod domain with 24 spectrin-like repeats and four hinges, a cysteine rich (CR) domain, and a carboxy-terminal (CT) domain. In myofibers, dystrophin plays a central role in the dystrophin-associated protein complex (DAPC) by maintaining the structural link between the actin cytoskeleton and the extracellular matrix, and by recruiting regulatory and signaling proteins (Fig. 1A) [3]. Its loss leads to DAPC disruption [4], susceptibility to contraction-induced injuries and replacement of muscle cells by connective (fibrosis) and adipose tissue, resulting in progressive loss of muscle function and cardiac involvement [5].

Recombinant adeno-associated virus vectors (rAAVs) hold great promise for DMD gene therapy, as they allow efficient

transduction of skeletal and cardiac muscles [6] and a long-term in vivo transgene expression [7]. One caveat is that rAAVs have limited packaging capacity of <5 kb [8] while full-length dystrophin cDNA is >14 kb in length. To overcome this DNA packaging limitation of rAAVs, several micro-dystrophin (MD) transgenes containing essential dystrophin functional domains have been developed [9, 10]. The rationale for the use of MDs to treat DMD patients is that Becker Muscular Dystrophy (BMD) patients who carry in-frame deletions that naturally produce MDs, exhibit a milder dystrophinopathy [11]. Several studies have shown body-wide expression and therapeutic efficacy of MDs in DMD animal models (*mdx* mice, DMD^{mdx} rats and DMD dogs) following a single systemic administration of rAAV-MD vectors [12–24]. Based on these data, three clinical trials of systemic rAAV-MD gene therapy were initiated in DMD patients in the USA in 2017/2018. Three different MD transgenes are used in these clinical trials: Δ R4-23/ Δ CT, Δ R3/ Δ R4-21/ Δ CT and Δ R2-15/ Δ R18-22/ Δ CT [18]. First results of the clinical trials using the Δ R4-23/ Δ CT MD and the Δ R3/ Δ R4-21/ Δ CT MD showed safe and efficient expression of the transgene,

¹Translational Gene Therapy Laboratory, Nantes Université, CHU Nantes, INSERM UMR, 1089 Nantes, France. ²Mass Spectrometry and Proteomics Facility, Campus Chemical Instrument Center, The Ohio State University, Columbus, OH, USA. ³Therassay platform, Capacités, Nantes Université, Nantes, France. ⁴L'Institut du Thorax, Nantes Université, CNRS, INSERM UMR, 1087 Nantes, France. ⁵INRAE, Oniris, PAnTher, APEX, Nantes, France. ⁶Center for Research in Transplantation and Immunology, INSERM UMR, 1064 Nantes, France. ⁷Department of Biological Sciences, Centre of Biomedical Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, UK. ⁸Asklepios BioPharmaceutical, Inc, Research Triangle Park, NC, USA. ⁹UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, Developmental Neurosciences Program, London, UK. email: caroline.le-guiner@univ-nantes.fr

Received: 12 April 2021 Revised: 9 December 2021 Accepted: 13 January 2022

Published online: 01 February 2022

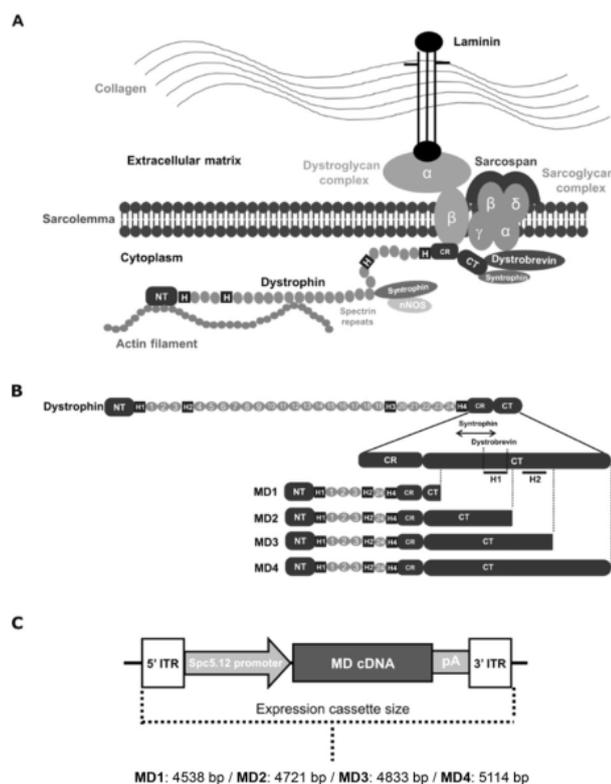


Fig. 1 Structure of the dystrophin associated protein complex and of the different micro-dystrophin constructs evaluated in this study. **A** Schematic representation of the Dystrophin Associated Protein Complex (DAPC). Dystrophin plays a central role in the maintenance of muscle membrane integrity and the recruitment of regulatory and signaling proteins. **B** Schematic representation of the dystrophin protein structure (with focus on the CT domain) and of the different micro-dystrophin (MD) constructs evaluated in this study. MD1 is deleted of CT domain (exons 71–78) except that it contains the last three amino acids of exon 79 of dystrophin. MD2 contains helix 1 (H1) of the coiled-coil motif of CT domain, with the interaction domains for α 1- and β 1- SNT and α -DTN, MD3 contains the entire coiled-coil motif (H1 + H2) of CT domain, and MD4 contains the entire dystrophin CT domain. **C** Schematic representation of the structure and size of the expression cassettes generated to produce rAAV2/9-MD vectors. Each MD cDNA sequence was subcloned into a pAAV plasmid that contained the 323 bp muscle-synthetic Spc5.12 promoter, a synthetic polyadenylation signal of 49 bp, and two flanking inverted terminal repeat (ITR) sequences of 130 pb from AAV serotype 2. The size of the resulting MD1, MD2, MD3 and MD4 expression cassettes were 4538 bp, 4721 bp, 4833 bp and 5114 bp, respectively.

associated with clinical improvements at one year post-injection [25, 26].

Notably, none of these constructs contain the dystrophin CT domain, which constitutes a large portion of the native protein (325 aa long and \approx 36 kDa), and which is highly conserved between species [27]. It is known to interact directly with α 1- and β 1-syntrophins [28] (SNT) (binding site encoded by exon 74 of the *DMD* gene) and α -dystrobrevins [29] (α -DTN) (binding site on the helix 1 of the coiled-coil domain encoded by exons 74 and 75 of the *DMD* gene). These proteins play a major role in DAPC as α -DTN helps to strengthen the link between dystrophin and the sarcolemma through the sarcoglycan complex [30], while the SNT adaptor proteins help localize intracellular signaling proteins [31] such as sodium voltage-gated (NaV) [32] channels, transient receptor potential (TRP) [33–35] channels and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) [36] (Fig. 1A). However, it was shown that the expression of a mini-dystrophin without CT domain in a

transgenic *mdx* mouse allows restoration of expression of SNT and α -DTN at the sarcolemma of skeletal muscles, even in the absence of a direct link to dystrophin [37]. As a consequence, and due to the DNA packaging limitation of rAAV, inclusion of the 975 bp CT coding sequence in MD transgenes was dropped early in the development of many variants. However, regions in the CT domain encoded by exons 71–74 seem required to restore a normal expression level of α 1- SNT [37]. In addition, one study showed that inclusion of helix 1 of the CT coiled-coil domain in MD1 facilitates increased expression of α 1-SNT and α -DTN at the sarcolemma of skeletal muscle and increased muscle resistance to lesions induced by contraction [38]. To date, investigations on the role of the dystrophin CT domain has focused on skeletal muscles as the DMD animal model for these studies was the common *mdx* mouse, which shows minimal and late cardiac pathology [39]. Nevertheless, a recent genotype/phenotype correlation study conducted in 274 patients raised the possibility that the dystrophin CT domain may have a cardioprotective role [40]. Proteomics analysis also showed differences in DAPC composition, especially for some SNT and DTN isoforms, between skeletal muscle and heart in mouse [41]. Therefore, the precise impact of the inclusion of the dystrophin CT domain in a MD construct, remains to be explored, especially in the heart. The efficacy of MD expression on the DAPC recovery is classically evaluated by immunolabeling of the known DAPC partners. However, this method only provides information on the sarcolemmal colocalization of known proteins of the DAPC. Mass spectrometry (MS) analysis of MD enriched fractions by co-immunoprecipitation (co-IP) allows the identification of the MD interactome with DAPC partners whether known or not [41].

Moreover, the availability of the newly developed DMD^{mdx} rat model, which exhibits systematic and stepwise severe phenotypes in both skeletal and cardiac muscles, close to what occurs in DMD patients [42], enables the functional exploration of new MD variants in a relevant model of DMD.

In this study, we evaluated for the first time the impact of inclusion of the dystrophin CT domain to Δ R4-23/ Δ CT MD (also called “MD1”) when using rAAV-based gene transfer. Specifically, we evaluated, in both skeletal and cardiac muscles, (i) the DAPC composition and (ii) the therapeutic efficacy after injection of rAAV-MD1 +/- CT in DMD^{mdx} rats. We show by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis that, despite the absence of the dystrophin CT domain, MD1 can restore a normal level of interaction with most DAPC partners (including SNT and α -DTN) in both skeletal and cardiac muscles of DMD^{mdx} rats. Surprisingly, the partial or complete inclusion of the CT domain to MD1 results in a supra-physiological association with some of these partners. At the functional level, we were unable to demonstrate that incorporation of the coil-coiled motif of the dystrophin CT provides a therapeutic benefit to MD1 in DMD^{mdx} rats. This work strengthens the highly therapeutic potential of MD1 for systemic rAAV-MD gene therapy for DMD.

MATERIALS AND METHODS

Vector design and production

Murine-specific cDNA sequences of optimized MD version 1 and 2 (MD1 and MD2) have been previously described [13, 38]. The versions 3 and 4 (MD3 and MD4) were generated from these previous constructs [27]. The MD1 cDNA is deleted of spectrin-like repeat domain 4 to 23 and CT domain (exons 71–78) and contains the last three amino acids of exon 79 of dystrophin followed by three stop codons [13]. Based on this MD1 construct, the MD2 cDNA contains helix 1 of the coiled-coil motif of the CT domain of dystrophin [38], the MD3 cDNA contains the entire coiled-coil motif (helix 1 and 2) and the MD4 cDNA contains the entire CT domain of dystrophin. Each murine MD cDNA sequence was subcloned into a pAAV plasmid that contained the 323 bp muscle-synthetic Spc5.12 promoter [43], a synthetic polyadenylation signal of 49 bp obtained from the pCl-neo plasmid (Promega, Madison, WI), and two flanking inverted terminal repeat (ITR)

sequences of 130 pb from AAV serotype 2. The sizes of the resulting MD1, MD2, MD3 and MD4 expression cassettes (including Spc5.12 promoter, pCI-Neo polyA, and ITRs) were 4538 bp, 4721 bp, 4833 bp and 5114 bp, respectively (Fig. 1C). Recombinant pseudotyped AAV2/9-MD vectors were produced by the Vector Core of the UMR 1089 (CPV, INSERM and University of Nantes) by transient transfection of HEK293 cells followed by purification on cesium chloride density gradients. Final vectors were concentrated and formulated in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Fisher Scientific, Illkirsch, France), sterile filtered, aliquoted and frozen at $\leq 70^\circ\text{C}$. Vector genome titers (vg/mL) were determined using a qPCR assay specific for ITR2 [44]. Infectious particles (ip) titer (ip/mL) were determined using an Infectious Center Assay (ICA) [45].

Animals and vector delivery protocols

Study to assess the impact of the dystrophin CT domain on the DAPC composition. A total of 21 DMD^{mdx} rats and 4 Sprague Dawley WT rats (littermates) were used in this study. Animals were randomly assigned to the different experimental groups. They were obtained from the UTE IRS2 (University of Nantes, France). They were handled and housed in the UTE IRS2. The Institutional Animal Care and Use Committee of the Région des Pays de la Loire (University of Angers, France) as well as the French Ministry for National Education, Higher Education and Research approved the protocol (authorization #2018102616384887). Each vector (MD1, MD2, MD3 and MD4) was administrated without anesthesia to 4 newborn DMD^{mdx} rats (between 4 and 6 days of age) by intraperitoneal (IP) injection of 1.2E14 vg/kg (for rAAV-MD1, MD2 and MD3 vectors) or 2.4E14 vg/kg (for rAAV-MD4 vector). Prior injection, the rAAV vectors were diluted in DPBS vehicle solution to obtain a fixed total volume corresponding to 20 mL of perfusate per kg of animal. These animals were euthanized 4.5 months post-injection by CO₂ inhalation. Three 2-month-old DMD^{mdx} rats were also injected intramuscularly in the *tibialis anterior* muscle with a total of 1E12 vg of the rAAV-MD4 vector, after anesthesia. These animals were euthanized 7.5 months post-injection by CO₂ inhalation.

Study to assess the impact of the coil-coiled motif of the CT domain of dystrophin in DMD^{mdx} rats. A total of 40 DMD^{mdx} rats and 10 Sprague Dawley WT rats (littermates) were used in this study. Animals were randomly assigned to the different experimental groups. They were obtained from the Boisbonne Center for Gene Therapy (ONIRIS, Nantes, France). They were handled and housed in the Boisbonne Center for Gene Therapy. The Institutional Animal Care and Use Committee of the Région des Pays de la Loire (University of Angers, France) as well as the French Ministry for National Education, Higher Education and Research approved the protocol (authorization #2017040616371353). Prior injection, the rAAV vectors were diluted in DPBS vehicle solution to obtain a fixed total volume corresponding to 15 mL of perfusate per kg of animal. Injections were performed without anesthesia but under analgesic premedication. Vector or its vehicle was administered at the age of 1 month by the intravenous route in a tail vein. Animals were sacrificed after 3 months of follow-up. After anesthesia and incision of the abdomen, whole blood was obtained at the level of the vena cava and euthanasia was performed by intravenous injection of pentobarbital sodium (Dolethal, Vetoquinol, Paris, France). For animals dedicated to ex-vivo skeletal muscle contractility analysis and calcium measurements, euthanasia was performed by section of the heart, after anesthesia.

Co-immunoprecipitations

Antibody production from hybridomas (DSHB, University of Iowa), protein extractions and immunoprecipitations were performed as previously described [41]. Briefly, MANEX1011B (clone 1C7, developed by Glenn E. Morris, Center for Inherited Neuromuscular Disease, RJAH Orthopedic Hospital, Oswestry, UK) or control MW8 (developed by Paul H. Patterson, Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA) antibodies were incubated with magnetic Dynabeads protein G (Invitrogen, Illkirsch-Graffenstaden, France; 1.2 mg antibody per 1 mL beads) in 100 mM sodium phosphate (pH 5.0) overnight at 4 °C. Antibodies were cross-linked to the beads by incubation in 0.2 M Triethanolamine (Fisher Scientific, Illkirsch, France) containing 20 mM dimethyl pimelimidate (Fisher Scientific, Illkirsch, France) for 30 min at 20 °C.

Right after sacrifice, *pectoralis* muscles (for rats injected via the IP route and non-injected rats) or *tibialis anterior* muscles (for rats injected via the IM route) and heart were dissected and 100 mg of tissues were homogenized for protein extraction (Fig. S2). This amount of tissue provided enough material for one experimental co-IP and one control co-IP from the same protein homogenate. Tissues were homogenized 1:10 w/

v in ice cold extraction Buffer (1% digitonin (Fisher Scientific, Illkirsch, France), 0.05% NP-40 (IGEPAL CA-630, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), NaCl 150 mM (VWR International, Fontenay sous Bois, France), Tris 50 mM, pH 7.4 (VWR International, Fontenay sous Bois, France)) with Complete Protease Inhibitors and PhosSTOP (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the PowerGen 125 homogenizer (Fisher Scientific, Illkirsch, France). Proteins were extracted on ice for 1 h, centrifuged at 80,000 g for 30 min and supernatant was pre-cleared with protein G agarose beads (Invitrogen, Illkirsch-Graffenstaden, France). Protein concentration was determined with the DC Protein Assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Antibody conjugated beads were incubated with 2–2.5 mg protein at +4 °C for 3 h, washed in ice cold extraction buffer without digitonin, and proteins were eluted in 2% SDS (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 100 mM DTT (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS

A total of 15 μL of the eluents were taken for trypsin digestion. First, 9 μL of 10% SDS (Affymetrix, Cleveland, OH) in 100 mM TEAB (Triethylammonium bicarbonate, Sigma, Saint Louis, MO) was added to the samples to make the final concentration of SDS at 5%. 5 μL of 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DTT (FisherScientific, Pittsburg, PA) in 50 mM ammonium bicarbonate (ABC, J.T Baker, purchased through FisherScientific, Pittsburg, PA) solution was added and the sample was incubated at 65 °C for 15 min followed by addition of 5 μL of 50 mM ABC containing 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ iodoacetamide (Acros, purchased through FisherScientific, Pittsburg) followed by incubation at RT for 30 min in the dark. Samples were then acidified by adding 12% phosphoric acid (Sigma, St. Louis, MO) (1:10 v/v acid to sample). 165 μL of TEAB (Triethylammonium bicarbonate, 1 M)/MeOH (FisherScientific, Pittsburg, PA) (10:90 v/v) was added to the samples. Samples were then loaded to S-trap (Protifi, Farmingdale NY) and centrifuged at 4000 g for 3 min (at +4 °C) to remove supernatant. 150 μL of TEAB (Triethylammonium bicarbonate, 1 M)/MeOH (10:90 v/v) was added to the trap as wash solution and the trap was washed 5 times. After the final wash, 30 μL of sequencing grade trypsin (33 ng/ μL , Promega, Madison, WI) dissolved in 50 mM TEAB was added and the digestion was carried on O/N at 37 °C. The following day, peptides were eluted from the trap by adding 40 μL of 50 mM TEAB, 0.1% formic acid (FA, FisherScientific, Pittsburg, PA) in water and 0.1% FA in Acetonitrile (FisherScientific, Pittsburg, PA) (50:50), sequentially. The eluted peptides were pooled together and dried in a vacufuge and resuspended in 20 μL of 50 mM acetic acid solution (FisherScientific, Pittsburg, PA).

Nano-liquid chromatography-nanospray tandem mass spectrometry (Nano-LC/MS/MS) of protein identification was performed on a Thermo Scientific orbitrap Fusion mass spectrometer equipped with a nanospray FAIMS Pro™ Sources (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) operated in positive ion mode. Samples (6 μL) were separated on an easy spray nano column (PepmapTM RSLC, C18 3 μm 100 A, 75 μm x 150 mm Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) using a 2D RSLC HPLC system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Each sample was injected into the μ -Precolumn Cartridge (Thermo Scientific) and desalted with 0.1% Formic Acid in water for 5 min. The injector port was then switched to inject and the peptides were eluted off of the trap onto the column. Mobile phase A was 0.1% Formic Acid in water and acetonitrile (with 0.1% formic acid) was used as mobile phase B. Flow rate was set at 300 nL/min. mobile phase B was increased from 2% to 16% in 105 min and then increased from 16% to 25% in 10 min and again from 25% to 85% in 1 min and then kept at 95% for another 4 min before being brought back quickly to 2% in 1 min. The column was equilibrated at 2% of mobile phase B (or 98% A) for 15 min before the next sample injection.

MS/MS data was acquired with a spray voltage of 1.95 kV and a capillary temperature of 305 °C is used. The scan sequence of the mass spectrometer was based on the preview mode data dependent TopSpeed™ method: the analysis was programmed for a full scan recorded between m/z 375–1500 and a MS/MS scan to generate product ion spectra to determine amino acid sequence in consecutive scans starting from the most abundant peaks in the spectrum in the next 3 s. To achieve high mass accuracy MS determination, the full scan was performed at FT mode and the resolution was set at 120,000 with internal mass calibration. Three compensation voltage (cv = -50, -65 and -80 v) were used for samples acquisition. The AGC Target ion number for FT full scan was set at 4 x 10E5 ions, maximum ion injection time was set at 50 ms and micro scan number was set at 1. MSn was performed using HCD in ion trap mode to ensure the highest signal intensity of MSn spectra. The HCD collision energy was set at 32%. The AGC Target ion number for ion trap MSn scan was set at 3.0E4

ions, maximum ion injection time was set at 35 ms and micro scan number was set at 1. Dynamic exclusion is enabled with a repeat count of 1 within 60 s and a low mass width and high mass width of 10 ppm.

Peptide sequence analysis

Data were searched using Mascot Daemon by Matrix Science version 2.7.0 (Matrix Science, Boston, MA) via ProteomeDiscoverer (version 2.4 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) against the most recent Uniprot rat databases. Customized database was constructed by replacing dystrophin with the MD sequences to specifically identify and quantify the synthetic MD. The mass accuracy of the precursor ions was set to 10 ppm, accidental pick of 1 13C peaks was also included into the search. The fragment mass tolerance was set to 0.5 Da. Carbamidomethylation (Cys) was used as a fixed modification and considered variable modifications were oxidation (Met) and deamidation (N and Q). Four missed cleavages for the enzyme were permitted. A decoy database was also searched to determine the false discovery rate (FDR) and peptides were filtered according to 1% FDR. Proteins identified with at least two unique peptides were considered as reliable identification. Any modified peptides are manually checked for validation.

Label-free quantification

Label-free quantification was performed using the spectral count approach. Scaffold (Proteomic Software, Inc., Portland, OR) was used for data analysis and calculation of emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) values to estimate abundance of each identified protein within the total set of identified proteins [46, 47]. This index is an exponential form of the number of observed peptides divided by the number of all possible tryptic peptides from a particular protein.

Two Scaffold files were generated for DAPC selection and to remove contaminating proteins from the MS analysis of co-IP samples from skeletal muscles and heart. Control co-IP samples using the MW8 antibody were grouped in the IgG_co-IP category ($n = 20$ for skeletal muscle and $n = 19$ for heart). Co-IP samples from non-injected WT rats using MANEX1011B antibody were grouped in "WT_DYS_co-IP" category ($N = 4$). Finally, co-IP samples from rAAV9_MD injected DMD^{mdx} rats using MANEX1011B antibody were grouped in four categories: MD1_DYS_co-IP ($N = 4$), MD2_DYS_co-IP ($N = 4$), MD3_DYS_co-IP ($N = 4$) and MD4_DYS_co-IP ($N = 4$ for skeletal muscles and $N = 3$ for heart). In these two scaffold files, emPAIs (non-normalized) were calculated for each identified protein within the total set of identified proteins. Then, a quantitative profile was generated by a variance analysis (ANOVA). Proteins with no significant change of quantitative profile between the different categories and a significant enrichment in IgG_co-IP were considered as background proteins and removed from DAPC selection. Proteins with a significant enrichment in the WT_DYS_co-IP and/or MD_DYS_co-IP categories were selected as potential DAPC proteins. emPAI values of each selected protein were used to perform a 2-way ANOVA followed by a multiple comparison post-hoc "original FDR method of Benjamini and Hochberg" test between WT_DYS_co-IP and IgG_co-IP samples. Proteins with significant difference (Q-value or corrected $P \leq 0.05$) between WT_DYS_co-IP and IgG_co-IP categories were identified as specific DAPC proteins. Statistics were performed using GraphPad Prism 8.

Two new Scaffold files were generated for the comparison of selected DAPC proteins abundance between WT_DYS_co-IP, MD1_DYS_co-IP, MD2_DYS_co-IP, MD3_DYS_co-IP and MD4_DYS_co-IP experimental groups. In these files, IgG_co-IP samples were removed and normalized emPAI values were calculated for each previously selected DAPC proteins of WT_DYS_co-IP, MD1_DYS_co-IP, MD2_DYS_co-IP, MD3_DYS_co-IP and MD4_DYS_co-IP samples. Then, relative abundance of these DAPC partners were calculated using corresponding MD/dystrophin normalized emPAI. Relative abundances of each protein were compared between WT_DYS_co-IP, MD1_DYS_co-IP, MD2_DYS_co-IP, MD3_DYS_co-IP and MD4_DYS_co-IP experimental groups by a 2-way ANOVA followed by a multiple comparison post-hoc "original FDR method of Benjamini and Hochberg". Statistics were performed using GraphPad Prism 8. Q-values (corrected P value) ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Individual values of emPAI (non-normalized, normalized, and relative to MD/dystrophin normalized emPAI), as well as percentages of coverage, and numbers of unique peptides obtained for each analyzed sample, are available in Tables S4–S7.

Vector biodistribution analysis

Just before sacrifice, whole blood was collected from anesthetized rats in tubes containing EDTA as an anticoagulant, aliquoted in human DNA-free,

RNase/DNase-free, and PCR inhibitor-free certified microtubes, and stored at $\leq -70^\circ\text{C}$ before DNA extraction. Genomic DNA (gDNA) was extracted from 200 μL of whole blood using the NucleoSpin[®] Blood kit (Macherey Nagel, Hoerdt, France) according to the manufacturer's instructions, which were adapted for a MicroLab STAR Line liquid handling workstation (Hamilton, Villebon sur Yvette, France). gDNA was extracted from snap-frozen *biceps femoris*, *pectoralis* and EDL muscles, heart, diaphragm and liver as previously described [16]. Duplex Q-PCR analyses were conducted on a C1000 touch thermal cycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using 50 ng of gDNA in duplicate and premix Ex taq (Ozyme, Saint-Cyr-L'Ecole, France). Vector copy numbers were determined using primers and probe specifically designed to amplify both MD1 and MD3 transgenes. Primers and probe designed to amplify the rat *HPRT1* sequence were used to determine the endogenous gDNA copy numbers. For each sample, cycle threshold (Cq) values were compared with those obtained with different dilutions of linearized standard plasmids (containing either the mMD1 expression cassette or the rat *HPRT1* gene).

Western blot analysis

Total proteins extraction from snap-frozen *biceps femoris* and heart samples, and MD1/MD3 expression analysis by western blot were performed as previously described [16]. Protein loading control analysis was assessed using a mouse anti-rat α -tubulin antibody (1:10,000, Sigma-Aldrich T5168, Saint Quentin Fallavier, France) and a secondary anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (1:5,000, Dako P0447, Les Ulis, France).

Histopathological analysis

Samples including *biceps femoris*, *pectoralis* and cardiac muscles were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin wax. Sections were cut and stained with hematoxylin eosin saffron (HES) for histopathological evaluation. To avoid bias in the analysis, experiments were done in a blind fashion. Muscular lesions were then semi-quantitatively scored (as described in Fig. 4 legend), to identify any improvement of the histopathological pattern between the different experimental groups.

MD/dystrophin positive fibers and connective tissue quantification

Samples including *biceps femoris*, *pectoralis* and cardiac muscles were snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at $\leq -70^\circ\text{C}$ until processing. Sections of 10 μm from frozen samples were permeabilized in PBS tween 0.2% (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and saturated in 5% goat serum (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in PBS tween 0.2%. Sections were then immunolabelled for detection of MD/dystrophin and connective tissue using the mouse monoclonal anti-dystrophin antibody NCL-DYSB (1:50, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK) and Alexa Fluor 555 Wheat Germ Agglutinin (WGA) conjugate (1:500, Molecular Probes, Eugene, OR), diluted in 5% rat serum (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in PBS tween 0.2%. Goat anti-mouse Alexa 488 IgG (H + L) (1:300, Invitrogen A28175, Illkirsch-Graffenstaden, France) was used as secondary antibody, diluted in 5% rat serum in PBS tween 0.2%. Nuclei were stained with DAPI (1:1000, Invitrogen, Illkirsch-Graffenstaden, France). Fluorescent acquisitions of the entire sections were performed using the slide scanner Axio Scan.Z1 (Zeiss, Marly le Roi, France). For each section, 3 captures were randomly chosen to finally observe a minimum of 250 fibers. In these 3 captures, DYSB positive fibers and WGA positive areas (except for the heart) were quantified using ImageJ open-source image processing software (v 2.0.0-rc-49/1.51a). Additional sections from paraffin embedded samples of heart was stained with picosirius red F3B (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for collagen visualization. Picosirius-positive areas in heart sections were quantified using Nikon Imaging software (Nikon, Champigny sur Marne, France).

Calcium measurements

Cell isolation. EDL muscles were harvested from animals just after euthanasia. Small bundles were dissected longwise tendon to tendon as described previously [48]. Cardiomyocytes were isolated by using the retrograde perfusion method through the aorta with enzyme-containing solutions [49]. Briefly, hearts were excised from heparinized (5000 U/kg body, Heparine choay, Sanofi, Gentilly, France) and anesthetized rats, mounted in a Langendorff perfusion apparatus, and perfused with a Ca^{2+} -free NPS (Normal Physiological Solution) at 37°C for 3 min. Perfusion

was then switched to the same solution containing 300 U/ml Collagenase type 2 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) for 20 min. The left ventricular tissue was excised, minced, and gently pipette dissociated. Collagenase activity was stopped by the addition of 4% bovine serum albumin (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). At this stage, cardiomyocytes were photographed with an inverted microscope, in bright field and with a X20 objective. Pictures were then used in ImageJ software to measure max and min Feret's diameters to calculate length and width of the cells. Cell suspension was then sequentially washed and resuspended in NPS of increasing $[Ca^{2+}]$ values.

Fura-2 loading and fluorescence measurements. EDL muscle bundles, pinned in polydimethylsiloxane coated petri dish (Dow France S.A.S., Saint Denis, France), were incubated with NPS containing 5 μ M Fura-2-AM (Molecular Probes, Illkirch-Graffenstaden, France) at room temperature for 1 h under gentle agitation before washing. Isolated cardiomyocytes were resuspended in NPS containing 3 μ M Fura-2-AM for 30 min before washing and Ca^{2+} measurements. Fura-2 fluorescence measurements were made using an integrated IonOptix device (Amsterdam, Netherlands) and excitation filters of 380 and 360 nm. Emitted fluorescence (510 nm) was background subtracted. For resting cytosolic $[Ca^{2+}]$ measurements, resting fluorescence ratios (360/380 nm) values were measured for each fiber composing EDL muscle bundles or isolated cardiomyocyte. $[Ca^{2+}]$ values were calculated from the Fura-2 fluorescence ratio using the Grynkiewicz's equation [50]. Main parameters of the equation were determined in situ [48].

Determination of sarcolemmal permeability to Ca^{2+} (SPCa). The manganese quenching technique was used to measure the SPCa in EDL muscle fibers [48]. Muscle preparations were perfused by NPS containing 0.5 mM Mn^{2+} as a surrogate of Ca^{2+} (quenching solution). During the whole quenching protocol, the fluorescence of Fura-2 excited at 360 nm was acquired at 1 Hz. The quench rates were calculated in each fiber of the preparations using linear regression analysis of fluorescence signal and expressed as the decline per minute of the initial fluorescence intensity.

All experiments were done at room temperature. Solutions: NPS contained the following: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, and 1.8 mM $CaCl_2$ (All chemicals from Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at pH 7.35.

Skeletal muscle force analysis

Ex-vivo skeletal muscle contractility. Isometric contractile properties of the EDL and soleus muscles were evaluated according to methods previously described [51, 52]. Briefly, muscles were removed from the hindlimb of anesthetized rats and mounted in an in vitro muscle test system (1205 A model; Aurora Scientific, Aurora, Canada). Muscles were placed between two platinum electrodes in a muscle bath containing 100 mL of bubbled mammalian Ringer solution (Na^+ 140 mM, K^+ 6 mM, Ca^{2+} 3 mM, Mg^{2+} 2 mM, Cl^- 156 mM, pH 7.4, HEPES-buffered) at 25 °C. After a 5 min equilibration period, optimum muscle length was determined by gradual muscle length adjustments and eliciting isometric contractions (supramaximal square-wave pulses of 0.2 ms duration) until the maximum twitch tension was reached. After 5 min of rest, muscles were stimulated at 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 Hz for 500 ms at each frequency. Stimulus trains were separated by one-min interval. Maximum isometric tetanic force was determined from the plateau of this force frequency curve. Following force testing, muscles were removed from the bath, trimmed of tendons, and weighed. Muscle mass was then be used to calculate maximum tetanic specific force in g/g. To avoid bias in the analysis, experiments were done in a blind fashion.

In vivo grip test. For all animals included in the study, the grip test was performed, as previously described [42], at least 3 days before the cardiac evaluation at 3 months post-injection. To avoid bias in the analysis, experiments were done in a blind fashion.

Assessment of cardiac function

Cardiac function was assessed on anesthetized animals using 2D echocardiography and pulsed Doppler measurements. For all animals included in the study, these tests were performed at least 3 days after grip test at 3 months post-injection.

2D-echocardiography and pulsed Doppler were performed, as previously described [42], using a Vivid 7 ultrasound unit (GE Healthcare,

Velizy Villacoublay, France). To avoid bias in the analysis, experiments were done in a blind fashion.

RESULTS

Assessment of the impact of the dystrophin CT domain on the DAPC composition: study design

In order to evaluate the impact of inclusion of the dystrophin CT domain on the efficacy of MD1 to recover the DAPC, we used 4 different murine-specific sequence-optimized MD constructs: MD1, MD2, MD3 and MD4. MD2 to 4 were derived from MD1 by progressively including the dystrophin CT domain sequence (Fig. 1B): (i) MD1 ($\Delta R4-23/\Delta CT$) is our reference, (ii) MD2 incorporates helix 1 (H1) of the coiled-coil motif, (iii) MD3 includes the entire coiled-coil motif (H1 + H2), and (iiii) MD4 ($\Delta R4-23$) has the entire dystrophin CT domain.

To obtain rat skeletal and cardiac muscles expressing these different MDs, we administered rAAV2/9 vectors encoding MD1, MD2, MD3 or MD4 cDNAs (Fig. 1C). Each vector was administered to 4 newborn DMD^{mdx} rats by intraperitoneal (IP) injection to achieve efficient transduction of skeletal muscles and heart [53, 54]. As expected, the expression of the different MDs was detected by western blot in the *pectoralis* and cardiac muscles, except for MD4 that was weakly expressed in *pectoralis* muscle in 3 out of 4 animals (Fig. S1). The rAAV-MD4 vector carries an expression cassette that exceeds the DNA packaging capacity of rAAV (<5 kb, Fig. 1C) [8] thus limiting its infectivity. Supplemental skeletal muscles expressing MD4 were obtained after intramuscular (IM) injection in the *tibialis anterior* muscles of 3 DMD^{mdx} rats at 2 months of age (Fig. S1).

Based on the methodology of Johnson et al. [41], we compared the composition of protein complexes assembled by full-length dystrophin ($N=4$), MD1 ($N=4$), MD2 ($N=4$), MD3 ($N=4$) and MD4 ($n=4$ and $N=3$ for skeletal muscle and for heart, respectively), in skeletal and cardiac muscles of wild-type (WT) and rAAV-MD treated DMD^{mdx} rats. To identify proteins that selectively associate with MD/dystrophin, we performed a co-IP on proteins extracted from 50 mg of muscle using the MANEX1011B monoclonal antibody (DYS_co-IP) or an isotype-matched control antibody (MW8 antibody) (IgG_co-IP) (Fig. S2). LC-MS/MS analysis was performed on all co-IP samples and the abundance of each identified protein within the total set of identified proteins was estimated in Scaffold (Proteomic Software, Inc., Portland, OR) by calculation of the emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) [46, 47].

Identification of dystrophin protein partners in rat skeletal and cardiac muscles

We first confirmed that we can reliably identify proteins known to associate with dystrophin in rat skeletal and cardiac muscles co-IPs by MS analysis. Proteins that specifically co-purify with full-length dystrophin were identified based on significantly higher emPAI values in WT_DYS_co-IP compared to IgG_co-IP (Table S1). We noticed that utrophin, a homolog of dystrophin, was also detected in WT_DYS_co-IP, indicating that the MANEX1011B antibody slightly cross-reacts with utrophin. Since utrophin and dystrophin can both bind to DAPC proteins, we cannot exclude that we might have detected some proteins that bind to utrophin in our MD/dystrophin co-IPs. However, utrophin abundance in WT_DYS_co-IP remained minimal when compared to dystrophin, with levels much lower than dystrophin for skeletal muscles and heart (39- and 18-fold, respectively) (Table S1). This means proteins detected in WT_DYS_co-IP were mainly associated with dystrophin. Furthermore, utrophin contamination was low in all co-IP samples and did not significantly differ between the WT co-IP and MD co-IP samples (one-way ANOVA, data not shown). Therefore, utrophin did not interfere with our analysis of DAPC composition.

Proteins found to be significantly enriched in WT_DYS_co-IP compared to IgG_co-IP are shown in Table S1. Known DAPC components such as dystrophin, dystroglycan, α -, β -, δ -, and γ -sarcoglycans, α 1- and β 1-SNT, α -DTN and sarcospan were consistently and specifically detected in WT_DYS_co-IPs from both skeletal and cardiac muscles. As previously described in mice [41], nNOS was found binding to dystrophin in skeletal muscle but not in heart, confirming that this protein is also not part of the DAPC in cardiac tissue of rats. Cavin-1 and β 2-SNT, that have been described as heart-specific DAPC partners [41], were detected here in association with both skeletal and cardiac muscle dystrophins. While we cannot rule out that these proteins may be present in skeletal muscle WT_DYS_co-IPs due to binding to utrophin, the fact that we are using LC-MS/MS instrumentation with higher sensitivity than in the previous study [41] could result in the detection of less abundant DAPC partners. Interestingly, additional proteins were specifically enriched in WT_DYS_co-IP compared to IgG_co-IP. Calmodulin-1 (known to associate with skeletal muscle dystrophin [55, 56]), pikachurin (a known extracellular ligand of dystroglycan [57]), β -DTN and perilipin-4 were all detected in skeletal muscle WT_DYS_co-IPs. The caveolar proteins caveolin-1 and cavin-2 were instead detected in cardiac muscle WT_DYS_co-IPs. Finally, cavin-3 was detected in association with both skeletal and cardiac muscle dystrophins.

Inclusion of the dystrophin CT domain in MD1 increases recruitment of some DAPC proteins

We next evaluated how the inclusion of progressively larger segments of the dystrophin CT domain impacted DAPC composition in DMD^{mdx} rats. We reasoned that addition of the coil-coiled domain H1, known to bind to SNT and DTN, should lead to improved binding of MD2, MD3 and MD4 to these proteins, when compared to MD1. Scaffold was used to generate normalized empAI values of each protein of the DAPC, within the total set of identified proteins for WT_DYS_co-IP, MD1_DYS_co-IP, MD2_DYS_co-IP, MD3_DYS_co-IP and MD4_DYS_co-IP experimental groups. We noticed that our western blot analyses indicated differences in abundance between MD/dystrophins (Fig. S1) that were also reflected in our mean empAI values for MD/dystrophins co-purified from 50 mg of starting material (Fig. S3). Therefore, to be able to compare DAPC protein abundance between experimental groups, we calculated the ratio of the empAI of each individual DAPC protein to the empAI of MD or dystrophin in the same sample.

As shown in Table 1 and Fig. 2, we found several significant differences in the abundance of DAPC proteins that co-purify with different MDs. Some protein associations were significantly disrupted with all MD constructs in cardiac and/or skeletal muscles, suggesting that they require domains absent in our MDs or that these associations are decreased below our limit of detection. Protein associations falling in this category include perilipin-4, cavin-3, and caveolin-1 and nNOS, whose binding to dystrophin is known to be absent in our MDs (R16/17) [19]. Interestingly, in cardiac muscle where cavin-1 strongly associates with full-length dystrophin, we saw a significantly impaired association with MD1 and MD2 that was progressively rescued with MD3 and MD4 suggesting that it requires an intact coil-coil CT domain.

Overall, in both skeletal and cardiac muscles, MD1 had a protein interaction profile that most closely matched that of full-length dystrophin. The only proteins that were significantly more abundant in MD1 co-IPs compared to full-length dystrophin were β - and γ -sarcoglycans in skeletal muscle (1.7- and 2.2-fold, respectively), and β -sarcoglycan (1.8-fold) in cardiac muscle. Interestingly, SNT and DTN that bind dystrophin's CT, co-purified in similar amounts with MD1 and full-length dystrophin. By contrast, sequential addition of parts of the CT sequence in MD2, MD3 and MD4 constructs resulted in significant increases in their

associations with several sarcoglycans, SNT and DTN compared to MD1 and to full-length dystrophin. In skeletal muscle, these involve α -, β -, δ - and γ -sarcoglycans, and α 1- and β 2-SNT. In cardiac muscles, proteins that are more abundant in MD2, MD3 and MD4 co-IPs are α - and β -sarcoglycans, and α 1- and β 1-SNT. Additionally, a few DAPC proteins were more abundant in co-IPs for specific MDs relative to all other MDs and to dystrophin. These are β 1-SNT in MD4 skeletal muscle co-IPs; α -DTN in MD3 skeletal muscle co-IPs; and γ -sarcoglycan in MD3 cardiac muscle co-IPs. In general, the significant differences we found in protein associations depend not only on the MD sequence but also on the type of muscle, suggesting tissue-specific differences in the regulation of protein associations with MDs.

Assessment of the impact of the coil-coiled motif of the dystrophin CT domain on the therapeutic efficacy of a MD transgene: study design

To evaluate the impact of the dystrophin CT domain on the therapeutic efficacy of MDs in both skeletal and cardiac muscles, 1 month old male DMD^{mdx} rats were treated systemically with the rAAV2/9-MD1, or the rAAV2/9-MD3 construct. MD3 was chosen because it contains the entire coil-coiled motif (H1 + H2) of the dystrophin CT domain, while not exceeding the <5 kb DNA packaging limitation of rAAV [8] (Fig. 1C). Both rAAV2/9-MD1 and -MD3 vector batches exhibited similar vg/mL and infectious titers (Table S2), implying that their efficacies can be confidently compared. The study design is summarized in Table S3. A group of 11 DMD^{mdx} rats were injected with rAAV2/9-MD1 at a dose of 3E13 vg/kg, which we know as therapeutic (Bourdon et al., unpublished data). To compare the potential therapeutic benefit between MD3 and MD1, additional DMD^{mdx} rats were injected with 1E13 vg/kg ($N = 9$ and $N = 11$ for rAAV2/9-MD1 and rAAV2/9-MD3, respectively). Groups of 10 WT and 10 DMD^{mdx} control rats were also included and received buffer. All rats were followed for 3 months. Right before euthanasia, muscle function (evaluated by grip test) and cardiac function (evaluated by electrocardiography, echocardiography and pulsed Doppler) were evaluated. After sacrifice, 4 animals from each group were dedicated to assessments of ex-vivo muscle contractility analysis and calcium measurements. The other animals were dedicated to post-mortem sampling required for histological and molecular/biochemical analyses.

The inclusion of the coil-coiled motif of the dystrophin CT domain in MD does not affect gene transfer efficacy and MD expression patterns

Using a quantitative PCR (qPCR) assay specific for both MD1 and MD3 sequences, vector genome copy numbers per diploid genome (vg/dg) were assessed in whole blood, skeletal muscles, heart, diaphragm and liver samples obtained at sacrifice (Fig. 3A). No qPCR signal was detected in whole blood, confirming that vector genome detection in rAAV-injected animals was restricted to the tissue itself. Both vectors had the same transduction pattern, with the highest vg/dg numbers detected in liver and heart, as expected after IV injection in rodents [58]. Lower vg/dg numbers levels (but similar between the different muscles) were detected in skeletal muscles. In correlation with the injected vector dose, significantly more vg/dg were found in tissues of rats injected with 3E13 vg/kg than with 1E13 vg/kg of rAAV2/9-MD1 (2.7- to 7.8-fold, respectively, depending on the tissue). Instead, the vg/dg values in tissues of rats injected with 1E13 vg/kg of rAAV2/9-MD1 or rAAV2/9-MD3 vector were similar, confirming that both vectors exhibited the same tropisms and infectivities. MD1/MD3 expression in skeletal muscles and heart was evaluated by both immunohistochemistry (IHC) staining (Fig. 3B, C) and western blot (Fig. 3D). Again, a dose effect between the two groups treated with 3E13 vg/kg or 1E13 vg/kg of rAAV2/9-MD1 was observed, with a mean of detected MD1-positive fibers of

Table 1. Comparison of the relative abundance of each DAPC partners in skeletal and heart samples expressing MD1, MD2, MD3, MD4 or dystrophin.

Uniprot ID	Protein Name	Skeletal muscles normalized emPAI relative to MD/dystrophin (means)					Heart muscles normalized emPAI relative to MD/dystrophin (means)				
		MD1_DYS co-IP	MD2_DYS co-IP	MD3_DYS co-IP	MD4_DYS co-IP	WT_DYS co-IP	MD1_DYS co-IP	MD2_DYS co-IP	MD3_DYS co-IP	MD4_DYS co-IP	WT_DYS co-IP
D3ZDQ9	α-Sarcoglycan	0.37 ^a	0.69 ^b	0.64 ^b	0.62 ^b	0.34 ^a	0.31 ^{a,c}	0.52 ^a	0.54 ^{a,b}	0.23 ^c	
D4A5E5	β-Sarcoglycan	0.68 ^a	1.05 ^b	0.79 ^a	0.95 ^b	0.41 ^c	0.65 ^a	0.62 ^a	0.52 ^{a,c}	0.37 ^c	
F1LYS7	δ-Sarcoglycan	0.34 ^{a,c}	0.55 ^b	0.56 ^b	0.41 ^{a,b}	0.22 ^c	0.21 ^a	0.30 ^a	0.24 ^a	0.20 ^a	
Q5XID6	γ-Sarcoglycan	0.35 ^a	0.35 ^a	0.35 ^a	0.32 ^a	0.16 ^b	0.33 ^a	0.60 ^b	0.37 ^{a,b}	0.25 ^a	
B5DFL0	α1-Syntrophin	0.36 ^a	0.62 ^b	0.69 ^b	0.56 ^b	0.30 ^a	0.26 ^a	0.53 ^b	0.47 ^{a,b}	0.23 ^a	
D3ZWC6	β1-Syntrophin	0.37 ^a	0.44 ^{a,b}	0.40 ^a	0.60 ^b	0.29 ^a	0.42 ^a	0.90 ^b	1.03 ^b	0.46 ^a	
F1M8K0	β2-Syntrophin	0.12 ^a	0.42 ^b	0.36 ^b	0.31 ^b	0.11 ^a	0.12 ^a	0.25 ^a	0.24 ^a	0.09 ^a	
D4A772	Dystroglycan	0.14 ^a	0.20 ^a	0.21 ^a	0.19 ^a	0.08 ^a	0.10 ^a	0.15 ^a	0.10 ^a	0.07 ^a	
P84060	α-Dystrobrevin	0.37 ^a	0.47 ^{a,b}	0.62 ^b	0.51 ^{a,b}	0.34 ^a	0.37 ^a	0.54 ^a	0.50 ^a	0.32 ^a	
D4ABT9	β-Dystrobrevin	0.08 ^a	0.09 ^a	0.22 ^a	0.04 ^a	0.06 ^a					
P29476	Sarcospan	0.17 ^a	0.21 ^a	0.19 ^a	0.19 ^a	0.07 ^a	0.11 ^a	0.20 ^a	0.12 ^a	0.05 ^a	
P0DP29	nNOS	ND	ND	ND	ND	0.05					
P0DP29	Cavin-1	ND	0.01	0.02	0.01	0.03	0.14	0.15	0.45	0.40 ^b	
P41350	Calmodulin-1	0.04	0.07	0.18	ND	0.05					
P41350	Caveolin-1						ND	ND	ND	0.04	
P85125	Cavin-2						0.04	0.06	0.11	0.14 ^a	
Q66H98	Cavin-3	ND	ND	ND	ND	0.04	0.03	0.10	0.06	0.19	
Q9Z1H9	Pikachurin	0.02 ^a	0.03 ^a	0.03 ^a	0.04 ^a	0.03 ^a	0.03	0.10	0.06		
D3ZMX6	Perilipin-4	ND	ND	ND	ND	0.02					

Data are presented as mean ± SEM. Statistics were done using a 2-way ANOVA followed by a multiple comparison post-hoc "original FDR method of Benjamini and Hochberg": Q-values (corrected P value) ≤0.05 were considered statistically significant. Values sharing the same letter ("a," "b" or "c") are not statistically different from each other. Blank cell = not include in statistics. ND not detected.

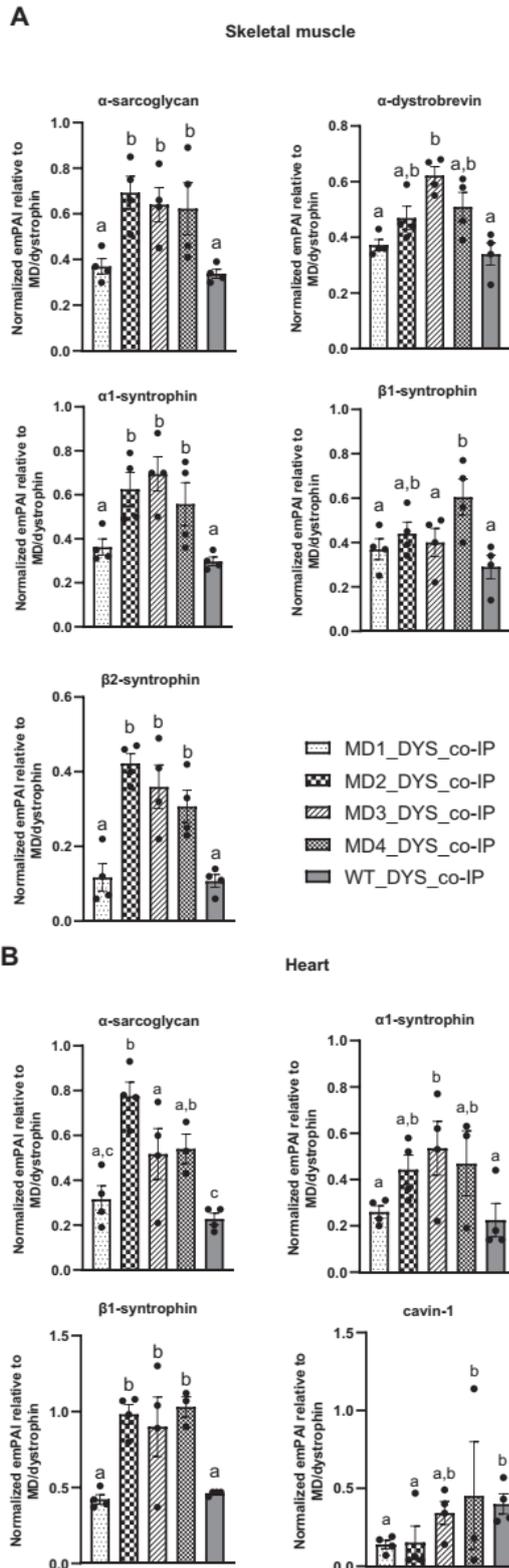


Fig. 2 Comparison of DAPC proteins abundance relative to MD/dystrophin between co-IP from rat skeletal and cardiac muscles obtained from the different experimental groups. Relative abundance to MD/dystrophin were calculated by dividing the normalized emPAI of each DAPC partner by the normalized emPAI of the MD/dystrophin expressed in the same sample. Relative abundances of (A) α -Sarcoglycan, α -DTN, α 1-, β 1- and β 2-SNT in co-IP from skeletal muscle, and of (B) α -Sarcoglycan, α 1-SNT and Cavin-1 in co-IP from heart were compared between MD1_DYS_co-IP ($N=4$), MD2_DYS_co-IP ($N=4$), MD3_DYS_co-IP ($N=4$), MD4_DYS_co-IP ($N=4$ for skeletal muscles and $N=3$ for heart) and WT_DYS_co-IP ($N=4$) experimental groups. Data are presented as mean \pm SEM. Statistics were done using a 2-way ANOVA followed by a multiple comparison post-hoc “original FDR method of Benjamini and Hochberg”. Q-values (corrected P value) ≤ 0.05 were considered statistically significant. Values sharing the same letter are not statistically different from each other.

4.8% to 43.5 \pm 6.4% of MD3-positive fibers in skeletal muscles, and 86 \pm 2.4% of MD1-positive fibers vs. 82 \pm 0.8% of MD3-positive fibers in heart). Immunolabeling confirmed the proper localization of both MD1 and MD3 at the sarcolemma in biceps femoris muscle (Fig. 3C) and correlated with the detection of the 138 kDa MD1 and 160 kDa MD3 protein bands by western blot analysis (Fig. 3D). Moreover, the RTqPCR analysis showed that the MD1 and MD3 mRNA are equally expressed in skeletal muscle and heart samples when the two vectors are injected at the same dose. Only low levels of MD mRNA were detected in liver despite the presence of high vg/dg values, confirming the muscle restrictive activity of the Spc5.12 promoter (Fig. S4). Taken together, these results confirm that both MD1 and MD3 are similarly and properly expressed in skeletal muscles and heart after systemic injection, meaning that their therapeutic efficacies can be compared in a relevant manner.

The inclusion of the coil-coiled motif of the dystrophin CT domain in MD1 does not improve its effectiveness to restore histopathological and calcium homeostasis alterations in DMD^{mdx} rats

Similar to muscle damage in DMD patients, the histopathological pattern of the DMD^{mdx} rats is characterized by increased variation in fiber size due to the simultaneous presence of hypertrophic fibers and small centronucleated regenerating fibers in skeletal muscles, and individual fiber necrosis associated with inflammatory cell infiltration and fibrosis in both skeletal muscle and heart [42]. To investigate the effect of MD1 and MD3 expression on skeletal and cardiac muscle histopathology, we performed a quantification of fibrotic connective tissue and a semi-quantification of muscle lesions in these tissues obtained at sacrifice. As shown in Fig. 4a, connective tissue represented 16.1 \pm 0.7 to 19.4 \pm 0.6% of skeletal muscle area in WT rats vs. 29.1 \pm 1.8% to 30.5 \pm 2.1% in untreated DMD^{mdx} rats, showing an increase in connective tissue that corresponded to fibrosis. In all rAAV-treated groups, connective tissue amount was significantly reduced between 20.1 \pm 0.4% and 23.7 \pm 1.1%. In heart, connective tissue levels were 2.7 \pm 0.5% in WT rats vs. 10.2 \pm 2.2% in untreated DMD^{mdx} rats and were also significantly reduced between 3.7 \pm 0.8% and 4.2 \pm 1% after rAAV2/9-MD administration. No significant difference was observed between the different rAAV-injected groups, whatever the injected dose or the nature of the transgene (MD1 or MD3). Semi-quantitative analysis of histological muscular lesions (scored according to Fig. S5) revealed typical myopathic lesions in both skeletal muscles and heart of untreated DMD^{mdx} rats, resulting in a significantly higher score compared to WT rats (Fig. 4B). This score was improved after injection of rAAV2/9-MD, except with the MD3 vector in the pectoralis muscle. The improvement reached

85.7 \pm 3.5% to 86.6 \pm 2.7% vs. 33.6 \pm 7.8% to 40.2 \pm 43%, respectively, in skeletal muscles, and of 96 \pm 0.8% vs. 86 \pm 2.4% in heart. Similar levels of MD1 or MD3 positive fibers were detected in animals injected with 1E13 vg/kg of rAAV2/9-MD1 or rAAV2/9-MD3 (33.6 \pm 7.8% to 40.2 \pm 43% of MD1-positive fibers vs. 28.5 \pm

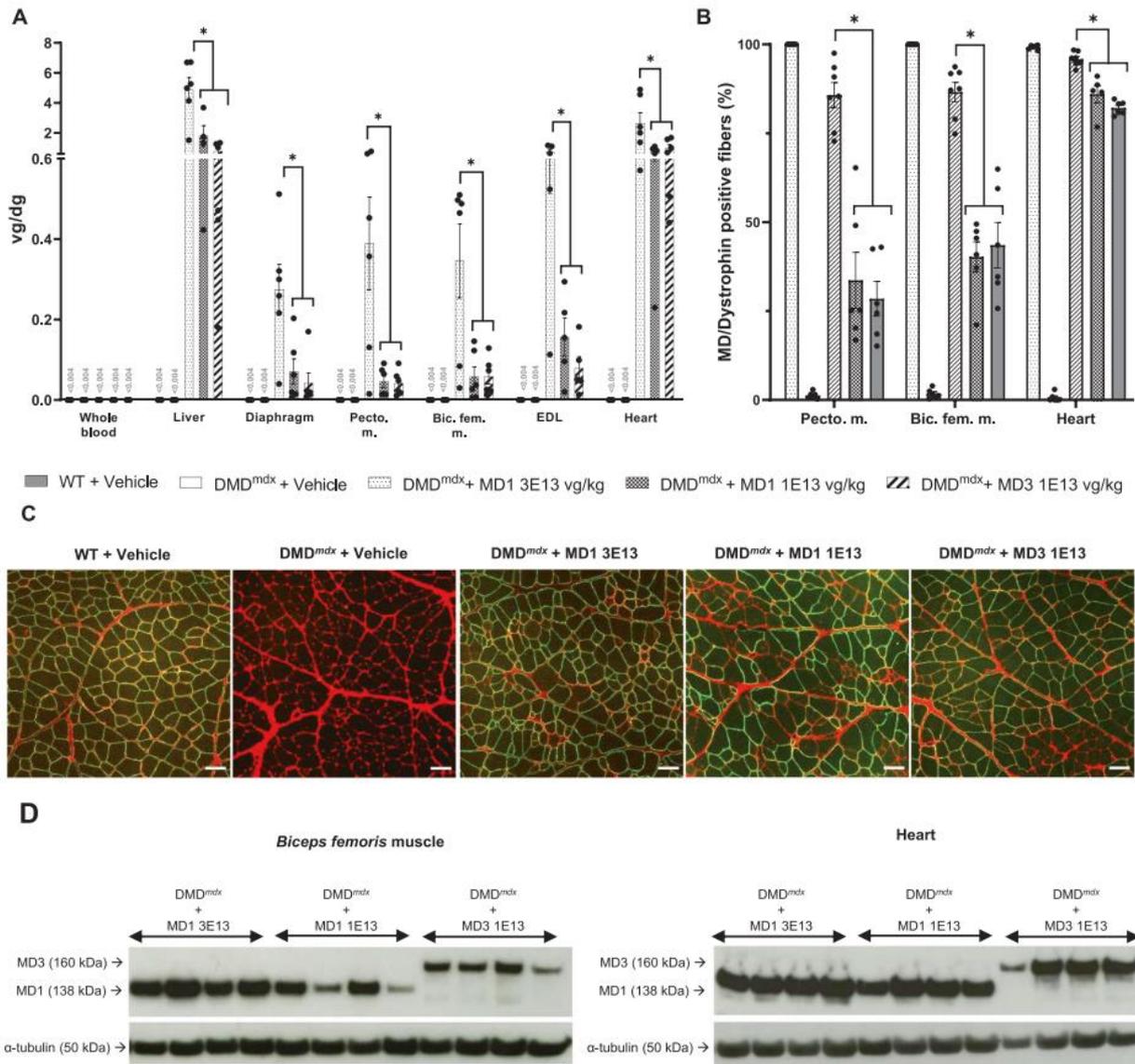


Fig. 3 Vector biodistribution and expression in tissues of DMD^{mdx} rats injected with rAAV2/9-MD1 and rAAV2/9-MD3 vectors. **A** Vector genome copy number per diploid genome (vg/dg) in tissues of the different experimental groups at euthanasia, determined by qPCR analysis. For each group, the analysis was performed on whole blood ($N = 6$ animals per group), liver ($N = 4$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 6$ animals for the other groups), diaphragm ($N = 6$ animals per group), heart ($N = 5$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 6$ animals for the other groups) and pectoralis ($N = 6$ animals per group), biceps femoris ($N = 6$ animals per group) and EDL ($N = 5$ animals per group) muscles. The limit of quantification (LOQ) was 0.004 vg/dg. Data are presented as mean \pm SEM. $*P < 0.05$ (ANOVA test, followed by post-hoc Tukey multiple comparison test). **B** Percentage of MD/Dystrophin positive fibers determined at euthanasia by immunolabelling in heart ($N = 5$ animals per group for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 7$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups), pectoralis muscle ($N = 7$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups), and biceps femoris muscle ($N = 7$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups). Data are presented as mean \pm SEM. $*p < 0.05$ (ANOVA test, followed by post-hoc Tukey multiple comparison test). **C** Immunolabelling of transverse sections of biceps femoris muscle with DY5B antibody for MD1/MD3/dystrophin staining (green) and with WGA conjugate for connective tissue (red). Representative images corresponding to samples collected at euthanasia for each experimental group. Scale bar, 100 μ m. **D** Western-blot analysis of total proteins (50 μ g) extracted from biceps femoris muscle and heart samples collected at euthanasia for each rAAV injected group ($N = 4$ animals per group). The blots were stained with MANEX-1011C to reveal the presence of the 138 kDa MD1 and the 160 kDa MD3 protein. α -tubulin antibody as a loading control.

statistical significance in biceps femoris and heart of animals injected with 3E13 vg/kg of the MD1 vector. When comparing the impact of MD1 and MD3 vectors injected at 1E13 vg/kg, no significant difference was observed between these groups. However and as reported in a previous study [59], we observed a few isolated ring fibers with sarcomere disorientation (Fig. S6) in the skeletal muscles of 6/12 rats expressing MD1 (2/5 rats treated

with 1E13 vg/kg and 4/7 rats treated with 3E13 vg/kg). None was observed in the muscles of the 6 rats expressing MD3.

In correlation with muscle degeneration and necrosis and with what was described in mdx mice [60], alterations in Ca²⁺ homeostasis were observed in skeletal muscles and isolated cardiomyocytes of DMD^{mdx} rats (Fig. 5; Fraysse et al., unpublished data). Lack of dystrophin expression in DMD^{mdx} rats was

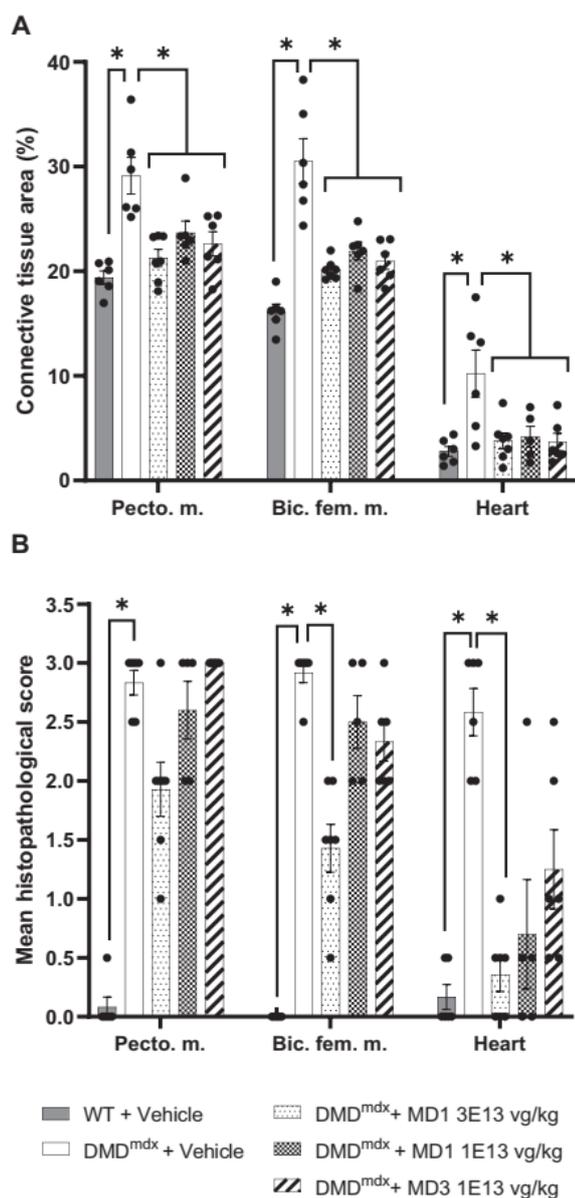


Fig. 4 Histopathological analysis in muscles of DMD^{mdx} rats injected with rAAV2/9-MD1 and rAAV2/9-MD3 vectors. **A** Connective tissue area (in %) was assessed using WGA for skeletal muscles and a specific picosirius staining for the heart. Analysis were performed at sacrifice on heart ($N = 5$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 7$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups), *pectoralis* muscle ($N = 7$ for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups) and *biceps femoris* muscle ($N = 7$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups). Data are presented as mean \pm SEM. $*p < 0.05$ (Parametric ANOVA test, followed by post-hoc Tukey multiple comparison test). **B** Muscle histopathological score in skeletal muscles and heart samples. Muscles lesions were scored during histopathological observation of the each muscle by a DVM, European-board certified anatomopathologist and using the following system: 0 = absence of lesions, 1 = presence of some regenerative activity as evidenced by centronucleated fibers, 2 = presence of degenerated/necrotic fibers, 3 = tissue remodeling and fiber replacement by fibrosis. In the heart, scoring was based on the presence of inflammatory and fibrotic areas (1 = 1 area, 2 = multiple isolated areas, 3 = extensive/coalescing multiple areas). Analysis were performed at sacrifice on heart ($N = 5$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 7$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups), *pectoralis* muscle ($N = 7$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups) and *biceps femoris* muscle ($N = 7$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 6$ animals for the other groups). Data are presented as mean \pm SEM. $*p < 0.05$ (Nonparametric Kruskal–Wallis test, followed by a post-hoc Dunn's multiple comparison test).

The inclusion of the coil-coiled motif of the dystrophin CT domain in MD1 doesn't improve its effectiveness to restore muscle and cardiac functions in DMD^{mdx} rat

Ex-vivo force measurements were performed on isolated EDL and *soleus* muscles obtained at sacrifice. We evaluated the maximum contractile response amplitude following a series of electrical stimulations (tetanic) (Fig. 6A, B). When compared to WT rats, both EDL and *soleus* muscles of DMD^{mdx} rats showed a decrease in maximum tetanic amplitude (decrease of $\approx 20\%$ in EDL and significant decrease of $\approx 56\%$ in *soleus*). In animals treated with rAAV2/9-MD1 at 3E13 vg/kg, a nearly complete normalization was observed in the EDL muscle and a partial one ($\approx 48\%$) in the *soleus*. No effect was observed for the two other experimental groups.

We also evaluated in vivo forelimb force using the grip test. Five trials were performed and the highest grip value obtained during these trials was defined as maximum forelimb grip force. As illustrated in Fig. 6C, a reduction in maximum forelimb grip force was observed for untreated DMD^{mdx} rats compared to WT rats. This value was fully normalized after injection of rAAV2/9-MD1 at 3E13 vg/kg, but only partially improved after injection of rAAV2/9-MD1 and rAAV2/9-MD3 at 1E13 vg/kg. The beneficial effect was slightly higher but not statistically significant with rAAV2/9-MD3 than with rAAV2/9-MD1.

Analysis of forelimb strength over the course of the test (Fig. 6D) showed progressive and marked decrease of forelimb strength in untreated DMD^{mdx} rats, contrary to WT rats and to DMD^{mdx} rats injected with rAAV2/9-MD1 at 3E13 vg/kg. This highlights the high efficiency of the MD1 vector when delivered at this dose. Animals treated with rAAV2/9-MD1 or rAAV2/9-MD3 vectors at 1E13 vg/kg show a delayed curve of force decrease. We can point out that, even if the final forelimb grip force at trial 5 is similar for these two groups, the significant difference of force compared to the WT rats appears later for the rats treated with the MD3 vector (trial 5) than for those treated with the MD1 vector (trial 4).

Since the majority of DMD patients die from heart failure [62], the cardiac dysfunction described in the DMD^{mdx} rat model [42, 63] is a critical feature to evaluate the therapeutic potential of

associated with significant higher resting cytosolic Ca^{2+} levels as compared to WT rats in both *extensor digitorum longus* (EDL) muscle (Fig. 5A) and cardiomyocytes (Fig. 5B; increase of $\approx 49\%$ in EDL muscle and of $\approx 31\%$ in isolated cardiomyocytes). Treatment with the rAAV2/9-MD1 vector at 3E13 vg/kg showed a significant decrease in resting $[Ca^{2+}]_i$, although not completely rescued to WT levels. No statistically significant decrease in resting $[Ca^{2+}]_i$ was observed after injection of rAAV2/9-MD1 or -MD3 at 1E13 vg/kg. We also evaluated the sarcolemmal permeability to Ca^{2+} (SpCa) in EDL muscles using the manganese quenching technique [61], to assess if resting Ca^{2+} overload could be related to a greater Ca^{2+} influx. As shown in Fig. 5C, the mean quench rate of untreated DMD^{mdx} rats was significantly higher than in WT rats, reflecting an increase in the permeability of the sarcolemma. This permeability was significantly decreased in the 3 rAAV2/9-MD treated groups, but without any difference between the different doses or transgenes. Overall, these data indicate that the inclusion of the coil-coiled motif of the dystrophin CT domain in MD1 doesn't improve its effectiveness to restore the histopathology and the calcium homeostasis alterations of the DMD^{mdx} rat.

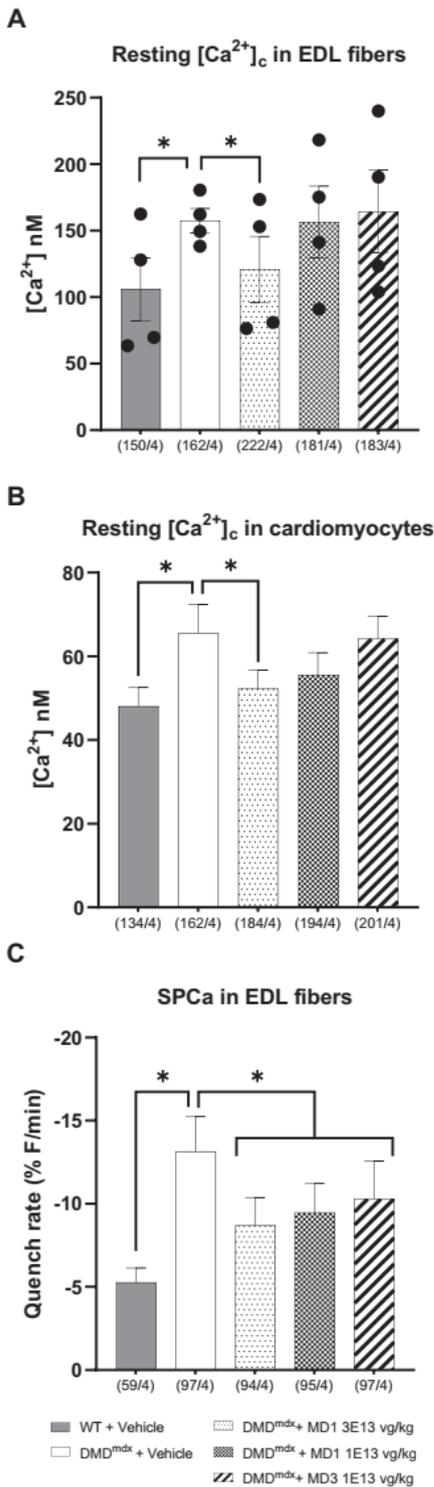


Fig. 5 Analysis of calcium homeostasis in skeletal muscles and isolated cardiomyocytes of DMD^{mdx} rats injected with rAAV2/9-MD1 and rAAV2/9-MD3 vectors. Resting intracellular-free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_c$) of EDL muscle fibers (A) and isolated cardiomyocytes (B) obtained from animals from the different experimental groups. $[Ca^{2+}]_c$ was calculated in fura-2-loaded isolated muscle fibers using calibration parameters of Grynkiewicz's equation determined in situ. A calibration was performed for each muscle used. Data are presented as mean \pm SEM from n muscle fibers and N animals (n/N). $*p < 0.05$ (ANOVA test, followed by post-hoc Bonferroni multiple comparison test). C Sarcolemma permeability to calcium ions (SPCa) in EDL muscle fibers obtained from animals of the different experimental groups. The sarcolemma permeability to Ca^{2+} was evaluated by measuring the quench rate of fura-2 fluorescence induced by Mn^{2+} influx. Data are presented as mean \pm SEM from n muscle fibers and N animals. $*p < 0.05$ (ANOVA test, followed by post-hoc Bonferroni multiple comparison test).

experimental group (data not shown). However, as shown in Fig. 7A, the left ventricular wall end-diastolic diameter measured by 2D-echocardiography tended to thicken in untreated DMD^{mdx} rats compared to WT rats and is associated with a decrease in left ventricular diameter, reflecting the concentric hypertrophy of the heart in DMD^{mdx} rats. This structural remodeling was prevented with injection of rAAV2/9-MD1 (whatever the dose), but not with rAAV2/9-MD3. The morphology of isolated cardiomyocytes was also assessed by measuring their length/width ratio. This ratio significantly decreased in untreated DMD^{mdx} rats compared to WT rats, indicating a thickening of the isolated cardiomyocytes and correlating with the concentric hypertrophy pattern observed by 2D-echocardiography. This ratio was normalized in rats treated with rAAV2/9-MD1 at both doses, but not modified in DMD^{mdx} rats treated with rAAV2/9-MD3 vector. As shown in Fig. 7B, ejection fraction, measured using pulsed Doppler, was significantly higher in untreated DMD^{mdx} rats than in WT rats, indicating an adaptation of the systolic function explained by the hypertrophic process previously described. This parameter was almost normalized in the 3 groups of treated animals. Finally, diastolic dysfunction of the untreated DMD^{mdx} rat was also shown in this study via the significant increase of deceleration time, the increase of IVRT and the decrease of E/A ratio, when compared to WT rats. Again, a clear trend of normalization of deceleration time and IVRT was observed in all the treated groups, whatever the injected dose and the transgene (Fig. 7C). This normalization was not observed with the E/A ratio parameter.

These data showed no clear impact of the inclusion of the coil-coiled motif in MD1 on its efficacy to improve muscle and cardiac function in DMD^{mdx} rats. Interestingly, MD3 expression in the heart do not seem to improve structural remodeling (in contrast to MD1) but still seems to prevent systolic and diastolic dysfunctions.

DISCUSSION

Report of $\approx 46\%$ shortened dystrophin in a 61-year-old ambulatory patient with Becker muscular dystrophy (BMD) [64] led to the design of MD transgenes that are compatible with additive gene therapy using rAAV vectors. Following preclinical success of systemic rAAV-MD gene therapy [12–20, 20–23], 3 independent clinical trials have been recently started [18]. However, due to the limitation of rAAV packaging capacity [8], current MD candidates cannot include all major domains of the full-length dystrophin. In this study, we evaluated if the inclusion of the dystrophin CT domain in MD1 could improve (i) its efficacy at recovering DAPC interactions, and (ii) its therapeutic potential, in both skeletal and cardiac muscles of DMD^{mdx} rats.

Using dystrophin co-IP and LC-MS/MS analyses, we were first able to identify in the rat model most of the DAPC components

MD. Rapid concentric remodeling associated to an alteration of diastolic function, which progressed unfavorably with age towards systolic dysfunction are characteristics of this model (Toumaniantz, Le Guiner et al., unpublished data). In this study, cardiac function was assessed on anesthetized animals using electrocardiography (ECG), 2D echocardiography and pulsed Doppler measurements at 3 months post-injection. ECG analysis revealed no significant electrical conduction abnormality whatever the

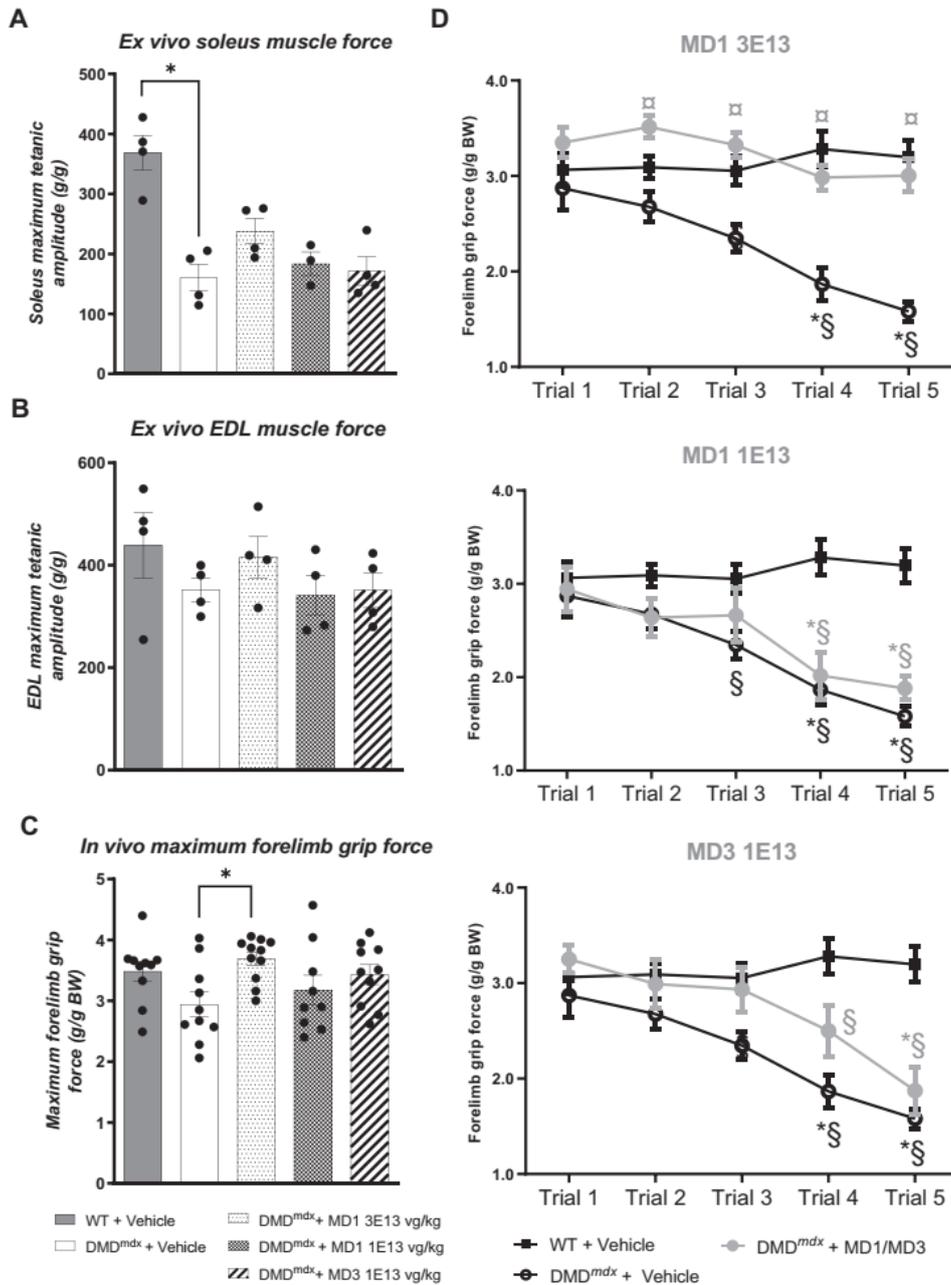


Fig. 6 Analysis of muscle force in DMD^{mdx} rats injected with rAAV2/9-MD1 and rAAV2/9-MD3 vectors. Maximum tetanic amplitude force of isolated *soleus* (A) and EDL (B) muscles of the different experimental groups at sacrifice ($N = 3$ animals for the *soleus* of the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 4$ animals for the other groups). Data are presented as mean \pm SEM in grams (g) normalized to the muscle weight (g/g). * $p < 0.05$ (Nonparametric Kruskal–Wallis test, followed by a post-hoc Dunn’s multiple comparison test). C Maximum forelimb grip force of the different experimental groups at 3 months post-injection ($N = 11$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 9$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 10$ animals for the other groups). Data are presented as mean \pm SEM in grams (g) normalized to the body weight (g/g BW). * $p < 0.05$ (Nonparametric Kruskal–Wallis test, followed by a post-hoc Dunn’s multiple comparison test). D Cross-trial evolution of forelimb grip force of the different experimental groups at 3 months post-injection ($N = 11$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 9$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 10$ animals for the other groups). Data are presented as mean \pm SEM in grams (g) normalized to the body weight (g/g). * $p < 0.05$ vs. WT + Vehicle group; $\#p < 0.05$ vs DMD^{mdx} + Vehicle group; $\$ p < 0.05$ vs trial 1 of the same group (Friedman test followed by Dunn’s post hoc test).

that were previously identified in a study done in mice [41]. Only CRYAB, isoform 3 of cypher and ahnak1 were not identified as specific DAPC partners in our study since they were also detected in IgG_{co}-IP control group. However, we found that Cavin-1 and β 2-SNT, previously described as heart specific DAPC partners, can be also detected at low levels in skeletal muscle DAPC, which is

likely due to an increased sensitivity of our MS-based approach compared to this previous study. Calmodulin-1, was not identified as part of the DAPC in the Johnson et al. study [41], but was found associated with dystrophin in skeletal muscle of rabbits [55, 56]. We confirmed here this association in skeletal muscle in the rat. Finally, new DAPC partners were identified: β -DTN, Pikachurin and

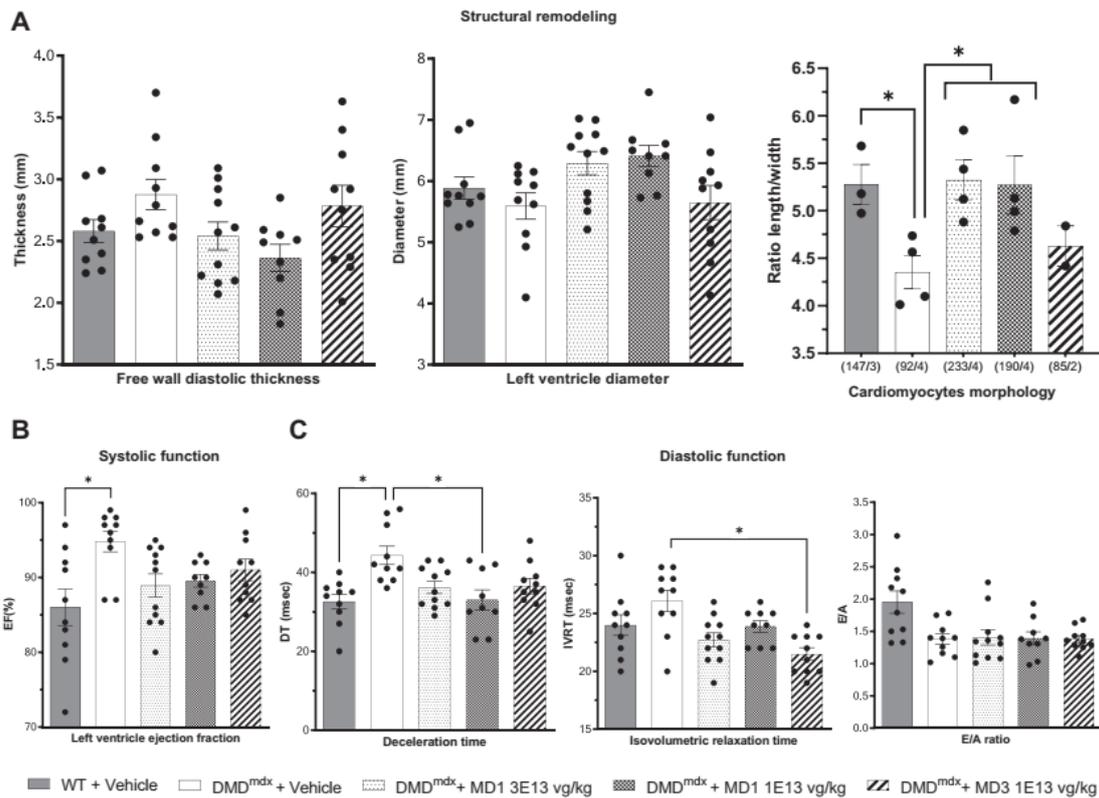


Fig. 7 Analysis of cardiac function in DMD^{mdx} rats injected with rAAV2/9-MD1 and rAAV2/9-MD3 vectors. **A** Structural remodeling of the heart: free wall diastolic thickness and left ventricle diameter were assessed by Two-dimensional (2-D) echocardiography in the different experimental groups at 3 months post-injection ($N = 11$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 9$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 10$ animals for the other group). Cardiomyocytes morphology was assessed by the measuring length/width ratio of isolated cardiomyocytes obtained at sacrifice. Data are presented as mean \pm SEM from n cardiomyocytes and N animals. $*p < 0.05$ (ANOVA test, followed by post-hoc Bonferroni multiple comparison test). **Systolic (B)** and **diastolic (C)** Functions of the heart: left ventricular ejection fraction, the early diastolic (E), the late diastolic (A), the E/A ratio, deceleration time and isovolumetric relaxation time was assessed by pulsed Doppler in the different experimental groups at 3 months post-injection ($N = 11$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 3E13 group; $N = 9$ animals for the DMD^{mdx} + MD1 1E13 group; $N = 10$ animals for the other group). Left ventricular end-diastolic and end-systolic volumes (LVEDV and LVESV, respectively) were calculated from bi-dimensional long-axis parasternal views by means of the single-plane area-length method. These indexes were calculated in accordance with the standard, widely accepted formulas to study left ventricular dysfunction [78]. LV ejection fraction (EF) was calculated as $[(LV \text{ end-diastolic volume} - LV \text{ end-systolic volume}) / LV \text{ end-diastolic volume}] \times 100$. Systolic function was further assessed by calculation of LVEF using averaged measurements from 3 to 5 consecutive cardiac cycles in accordance with the guidelines of the American Society of Echocardiography. Data are presented as mean \pm SEM. $*p < 0.05$ (Nonparametric Kruskal–Wallis test, followed by a post-hoc Dunn's multiple comparison test).

Perilipin-4 were specifically found in skeletal muscle DAPC; Caveolin-1 and Cavin-2 were specifically found in heart DAPC; and Cavin-3 was found in DAPC of both tissues.

We know from the literature that dystrophin CT domain is not critical for the expression of SNT and α -DTN partners at the membrane of skeletal muscle fibers [37]. In addition, always in skeletal muscle, MD1 ($\Delta R4-23/\Delta CT$) was shown to restore the expression of these proteins through the dystroglycan/sarcoglycan complex [37, 38, 65]. These observations agree with the fact that sarcoglycans interact with α -DTN [30] which itself interacts with SNT [29, 66], and that MD1 restores the dystroglycan/sarcoglycan complex through the ZZ domain present in the cysteine-rich domain [67]. Previous studies also shown that helix 1 of the CT coiled-coil domain is required to restore normal expression levels of SNT and α -DTN at the membrane of skeletal muscle fibers, suggesting a lower recruitment of these partners by MD1 compared to the full-length dystrophin [37, 38]. We hypothesized that addition of the dystrophin CT domain in MD1 should thus improve binding of these DAPC partners [29, 31]. In our study, we confirmed that MD1 is able to recruit SNT and α -DTN in skeletal muscle but also in heart. However, when compared to MD1, the

results also showed that MD2, MD3 and MD4 increase the recruitment of proteins on the sarcoglycan and of the SNT complexes in heart and skeletal muscles, and of α -DTN in heart. Surprisingly, this is also the case when compared to full-length dystrophin. The abundances of these partners are equivalent in the complex associated to MD1 or to dystrophin, meaning that MD1 is sufficient to restore the physiological interactions of SNT and α -DTN in skeletal and cardiac muscles, and that supra-physiological levels of these partners are obtained when expressing MD2, MD3 or MD4. These results raise the question about the true path for the recruitment of SNT and α -DTN by the full-length dystrophin and whether it is mediated via the CT domain, via the sarcoglycan complex or both? Due to the different structures of MD, the affinity between the sarcoglycan complex and DTN could be modified. It is also possible that a recruitment via the sarcoglycan complex occurs only in MD associated protein complex, due to structure modification of MD compared to the native dystrophin. In that case, the inclusion of the CT domain would add a recruitment site for SNT and α -DTN, explaining the supra-physiological levels observed with MD2, MD3 and MD4 variants. We also showed that the recruitment of cavin-1 in heart reached equivalent levels than

those observed with the full-length dystrophin only when the CT domain is present in MD, suggesting that this domain is required for an optimal recruitment of cavin-1 in heart. In skeletal muscle, it has been described that cavin-1 is rather a dystroglycan partner, independently to dystrophin, and that only a low amount of β -dystroglycan/cavin-1 complex is directly associated with dystrophin [68]. Such a mechanism probably occurs also in MD1-expressing heart, in which we observed partial recruitment of cavin-1 despite the absence of the dystrophin CT-domain. Knowing that the absence of cavin-1, which is required for caveolae formation [69], was linked to cardiomyopathic phenotypes [70, 71], further investigations are required to assess the functional consequence of a sub-physiological level of cavin-1 in MD1 associated protein complex in heart.

Beyond its efficacy to restore the DAPC, we further investigated the impact of the dystrophin CT domain through the comparison of the therapeutic efficacy between MD1 and MD3 (containing the coil-coiled motif of the dystrophin CT domain) in the DMD^{mdx} rat model. It is the first time that the therapeutic impact of the dystrophin CT domain has been assessed on both the muscular and cardiac pathology of a relevant DMD model and after the systemic administration of rAAV-MD. Crawford et al. showed that this domain was not critical for dystrophin functionality in the skeletal muscle of transgenic mice [37]. But this kind of approach did not allow evaluation of the therapeutic efficacy on an established pathology, representative to that which would be seen in DMD patients. In addition, until now, therapeutic efficacy of MD on the DMD related cardiomyopathy was only poorly described, as the most commonly used DMD animal models, shows minimal and late cardiac features [16, 22, 39, 72]. The recently developed DMD^{mdx} rat model gives now the opportunity to evaluate new MD designs on both skeletal muscles and cardiac features of the DMD pathology [42]. Since MD1 construct already shows a significant therapeutic effect on animal models [13, 16, 38], we chose to compare MD1 and MD3 at a known sub-therapeutic dose for MD1 (1E13 vg/dg), to evaluate and potentially highlight a difference in efficacy between these two products. Whereas the 1E13 vg/kg dose was found to be sub-therapeutic in skeletal muscle, this was not fully the case in the heart, because of the preferential tropism of AAV9 serotype for this organ in rodents [58]. Similar efficacy of the MD1 product was observed at the 1E13 and 3E13 vg/kg vector doses for some of the criteria assessed, such as heart fibrosis, heart remodeling and heart function. Therefore, it would have been interesting to compare our two vectors at a lower dose, in order to detect in a more refined way the potential benefits of the CT domain specifically in the heart. However, the relevance of the DMD^{mdx} rat model still allowed us to evaluate a wide range of parameters as the histological aspect, the calcium homeostasis in skeletal muscle and heart, the ex vivo and in vivo muscle strength and the cardiac function. Across all the assessed criteria, the inclusion of the coil-coiled motif of the dystrophin CT domain within MD1 did not show any clear therapeutic benefit. At the same dose, both MD constructs showed similar effects on fibrosis, histopathological scores and muscle force. One pointed difference is that cardiac structural parameters appeared to be less corrected with MD3 treatment than with MD1. Still, the DMD^{mdx} rats treated with rAAV2/9-MD3 showed improved systolic and diastolic functions, suggesting that MD1 and MD3 could act on the DMD cardiac pathology via different mechanisms. The potential involvement of cavin-1 in this mechanism could be further investigated. Finally, as previously described [59, 73, 74], we observed some isolated ring fibers in some skeletal muscles expressing MD1, but not in the ones expressing MD3. This is quite surprising considering that formation of ring-shaped myofibers have been associated to the presence of the polyproline site in hinge 2 in this MD [59, 73, 74]. Formation of these ring fibers could also be prevented in MD3

expressing fibers by a change of conformation compared to MD1. Given the fact that these ring fibers were not observed in all MD1-expressing muscles, we cannot exclude that we could have detected some if we had injected more animals with rAAV-MD3. In any case, these ring fibers, in a very low number compared to other myopathies in which they are also described (e.g., myotonic myopathy and some mitochondrial myopathies [75]), do not seem to have any deleterious impact on muscle function.

Taken together, our results indicate that the inclusion of the CT domain does not provide a therapeutic benefit to MD1, at least on skeletal and cardiac muscles functions and after 3 months of treatment in DMD^{mdx} rats. On the other hand, we cannot exclude that the dystrophin CT domain could be necessary to more effectively control disease progression at long-term, and/or useful in other organ like brain [76] and smooth muscles [77].

Importantly, this work also strengthened the evidence of the therapeutic efficacy of MD1. Our results indicate indeed that MD1 restores the DAPC at a physiological level, with the exception of Cavin-1 in the heart. We also confirmed in a relevant model of DMD (DMD^{mdx} rats) that systemic administration of a rAAV-MD1 vector at 3E13 vg/kg significantly improved histological pattern, muscle force and DMD-related cardiac pathology. We also showed for the first time that MD1 significantly improves DMD-related calcium homeostasis alterations in skeletal muscles and heart. Very recently, a phase 1/2a nonrandomized controlled trial testing the safety and biological efficacy of a single systemic infusion of rAAV-MD1 in 4 DMD patients revealed encouraging results with marked reductions in creatine kinase levels and improvement of muscle histological and functional patterns such as NSAA (North Star Ambulatory Assessment) score [25]. These results will obviously have to be confirmed in a randomized clinical trial including more DMD patients, but our study shows new evidence that despite the absence of the dystrophin CT domain, rAAV-MD1 offers high therapeutic potential for a systemic gene therapy for DMD, both at the muscle and cardiac levels.

DATA AVAILABILITY

The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors on reasonable request.

REFERENCES

- Mendell JR, Lloyd-Puryear M. Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2013;48:21–6.
- Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987;51:919–28.
- Bhat HF, Mir SS, Dar KB, Bhat ZF, Shah RA, Ganai NA. ABC of multifaceted dystrophin glycoprotein complex (DGC). *J Cell Physiol*. 2018;233:5142–59.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*. 1990;345:315–9.
- Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 2010;9:77–93.
- Wang D, Zhong L, Nahid MA, Gao G. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin Drug Deliv*. 2014;11:345–64.
- Rivera VM, Gao G, Grant RL, Schnell MA, Zoltick PW, Rozamus LW, et al. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*. 2005;105:1424–30.
- Wu Z, Yang H, Colosi P. Effect of genome size on AAV vector packaging. *Mol Ther Janv*. 2010;18:80–6.
- Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, Duan D, Crawford RW, Phelps SF, et al. Modular flexibility of dystrophin: Implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med*. 2002;8:253–61.
- Athanasopoulos T, Graham I, Foster H, Dickson G. Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther*. 2004;11:5109–21.

11. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2003;2:731–40.
12. Gregorevic P, Allen JM, Minami E, Blankinship MJ, Haraguchi M, Meuse L, et al. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med.* 2006;12:787–9.
13. Foster H, Sharp PS, Athanasopoulos T, Trollet C, Graham IR, Foster K, et al. Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 Gene Transfer. *Mol Ther.* 2008;16:1825–32.
14. Bostick B, Yue Y, Lai Y, Long C, Li D, Duan D. Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. *Hum Gene Ther.* 2008;19:851–6.
15. Yue Y, Pan X, Hakim CH, Kodippili K, Zhang K, Shin J-H, et al. Safe and bodywide muscle transduction in young adult Duchenne muscular dystrophy dogs with adeno-associated virus. *Hum Mol Genet.* 2015;24:5880–90.
16. Le Guiner C, Servais L, Montus M, Larcher T, Fraysse B, Moullec S, et al. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2017;8:16105.
17. Hakim CH, Wasala NB, Pan X, Kodippili K, Yue Y, Zhang K, et al. A five-repeat micro-dystrophin gene ameliorated dystrophic phenotype in the severe DBA/2J-mdx model of duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;6:216–30.
18. Duan D. Systemic AAV. Micro-dystrophin gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther.* 2018;26:2337–56.
19. Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT, Li D, Long C, et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 2009;119:624–35.
20. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Chamberlain JS. Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice. *Mol Ther.* 2008;16:657–64.
21. Shin J-H, Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Ohshima-Hosoyama S, Kinoshita K, Chiyo T, et al. Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther.* 2011;18:910–9.
22. Bostick B, Shin J-H, Yue Y, Duan D. AAV-microdystrophin therapy improves cardiac performance in aged female mdx mice. *Mol Ther.* 2011;19:1826–32.
23. Wang B, Li J, Fu FH, Xiao X. Systemic human minidystrophin gene transfer improves functions and life span of dystrophin and dystrophin/utrophin-deficient mice. *J Orthopaedic Res.* 2009;27:421–6.
24. Guiner CL, McIntyre M, Larcher T, Adjali O, Lafoux A, Toumaniantz G, et al. Dose finding study in the DMDmdx rat model to determine the efficacious dose of a rAAV9 vector encoding a human mini-dystrophin after IV administration. *Neuromuscular Disorders.* 2017;27:5188.
25. Mendell JR, Sahenk Z, Lehman K, Nease C, Lowes LP, Miller NF, et al. Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Neurol.* 2020;77:1122–31.
26. Moorehead T, Yong F, Neelakantan S, Beaverson K, Binks M. Safety and tolerability of PF-06939926 in ambulatory boys with duchenne muscular dystrophy: a phase 1b multicenter, open-label, dose ascending study. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2020;28:272.
27. Koo T. Studies on gene transfer in skeletal muscle cells and tissues using recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors. Thesis. 2010.
28. Suzuki A, Yoshida M, Ozawa E. Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J Cell Biol.* 1995;128:373–81.
29. Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:12413–8.
30. Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, et al. Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet.* 2000;9:1033–40.
31. Bhat HF, Adams ME, Khanday FA. Syntrophin proteins as Santa Claus: role(s) in cell signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:2533–54.
32. Matamoros M, Pérez-Hernández M, Guerrero-Serna G, Amorós I, Barana A, Núñez M, et al. Nav1.5 N-terminal domain binding to α 1-syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res.* 2016;110:279–90.
33. Leyva-Leyva M, Sandoval A, Felix R, González-Ramírez R. Biochemical and functional interplay between ion channels and the components of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *J Membr Biol.* 2018;251:535–50.
34. Sabourin J, Lamiche C, Vandebrouck A, Magaud C, Rivet J, Cognard C, et al. Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an α 1-syntrophin-dependent complex in skeletal mouse myotubes. *J Biol Chem.* 2009;284:36248–61.
35. Vandebrouck A, Sabourin J, Rivet J, Balghi H, Sebille S, Kitzis A, et al. Regulation of capacitance calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. *FASEB J.* 2007;21:608–17.
36. Dombrowsky NW, Ölmestig JNE, Witting N, Kruuse C. Role of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in Duchenne and Becker muscular dystrophies - Still a possible treatment modality? *Neuromuscul Disord.* 2018;28:914–26.
37. Crawford GE, Faulkner JA, Crosbie RH, Campbell KP, Froehner SC, Chamberlain JS. Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin cooh-terminal domain. *J Cell Biol.* 2000;150:1399–410.
38. Koo T, Malerba A, Athanasopoulos T, Trollet C, Boldrin L, Ferry A, et al. Delivery of AAV2/9-microdystrophin genes incorporating helix 1 of the coiled-coil motif in the C-Terminal domain of dystrophin improves muscle pathology and restores the level of α 1-syntrophin and α -dystrobrevin in skeletal muscles of mdx mice. *Hum Gene Ther.* 2011;22:1379–88.
39. McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech.* 2015;8:195–213.
40. Tandon A, Jefferies JL, Villa CR, Hor KN, Wong BL, Ware SM, et al. Dystrophin genotype-cardiac phenotype correlations in Duchenne and Becker muscular dystrophies using cardiac magnetic resonance imaging. *Am J Cardiol.* 2015;115:967–71.
41. Johnson EK, Zhang L, Adams ME, Phillips A, Freitas MA, Froehner SC, et al. Proteomic analysis reveals new cardiac-specific dystrophin-associated proteins. *PLoS ONE.* 2012;7:e43515.
42. Larcher T, Lafoux A, Tesson L, Remy S, Thepenier V, François V, et al. Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE.* 2014;9:e110371.
43. Li X, Eastman EM, Schwartz RJ, Draghia-Akli R. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol.* 1999;17:241–5.
44. D'Costa S, Blouin V, Broucque F, Penaud-Budloo M, François A, Perez IC, et al. Practical utilization of recombinant AAV vector reference standards: focus on vector genomes titration by free ITR qPCR. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;5:16019.
45. Salveti A, Orève S, Chadeuf G, Favre D, Cherel Y, Champion-Arnaud P, et al. Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther.* 1998;9:695–706.
46. Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y. emPAI Calc—for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bioinformatics.* 2010;26:576–7.
47. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, et al. Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4:1265–72.
48. Fraysse B, Desaphy J-F, Rolland J-F, Pierno S, Liantonio A, Giannuzzi V, et al. Fiber type-related changes in rat skeletal muscle calcium homeostasis during aging and restoration by growth hormone. *Neurobiol Dis.* 2006;21:372–80.
49. Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51:288–98.
50. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260:3440–50.
51. Dyle MC, Ebert SM, Cook DP, Kunkel SD, Fox DK, Bongers KS, et al. Systems-based discovery of tomatidine as a natural small molecule inhibitor of skeletal muscle atrophy. *J Biol Chem.* 2014;289:14913–24.
52. Moorwood C, Liu M, Tian Z, Barton ER. Isometric and eccentric force generation assessment of skeletal muscles isolated from murine models of muscular dystrophies. *J Vis Exp.* 2013;31:e50036.
53. Chapdelaine P, Gérard C, Sanchez N, Cherif K, Rousseau J, Ouellet DL, et al. Development of an AAV9 coding for a 3XFLAG-TALEfrat#8-VP64 able to increase in vivo the human frataxin in YG8R mice. *Gene Ther.* 2016;23:606–14.
54. Mayra A, Tomimitsu H, Kubodera T, Kobayashi M, Piao W, Sunaga F, et al. Intraperitoneal AAV9-shRNA inhibits target expression in neonatal skeletal and cardiac muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;405:204–9.
55. Madhavan R, Jarrett HW. Phosphorylation of dystrophin and alpha-syntrophin by Ca(2+)-calmodulin dependent protein kinase II. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1434:260–74.
56. Madhavan R, Jarrett HW. Calmodulin-activated phosphorylation of dystrophin. *Biochemistry.* 1994;33:5797–804.
57. Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, et al. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat Neurosci.* 2008;11:923–31.
58. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res.* 2006;99:e3–9.

59. Banks GB, Judge LM, Allen JM, Chamberlain JS. The polyproline site in hinge 2 influences the functional capacity of truncated dystrophins. *PLoS Genet.* 2010;6:e1000958.
60. Lorin C, Vögeli I, Niggli E. Dystrophic cardiomyopathy: role of TRPV2 channels in stretch-induced cell damage. *Cardiovasc Res.* 2015;106:153–62.
61. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 1997;77:901–30.
62. Hermans MCE, Pinto YM, Merkies ISJ, de Die-Smulders CEM, Crijns HJGM, Faber CG. Hereditary muscular dystrophies and the heart. *Neuromuscul Disord.* 2010;20:479–92.
63. Szabó PL, Ebner J, Koenig X, Hamza O, Watzinger S, Trojanek S, et al. Cardiovascular phenotype of the Dmdmdx rat - a suitable animal model for Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech.* 2021;22:14.
64. England SB, Nicholson LV, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-Gaarn EE, et al. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature.* 1990;343:180–2.
65. Yue Y, Liu M, Duan D. C-Terminal-Truncated microdystrophin recruits dystrobrevin and syntrophin to the dystrophin-associated glycoprotein complex and reduces muscular dystrophy in symptomatic utrophin/dystrophin double-knockout mice. *Mol Ther.* 2006;14:79–87.
66. Nakamori M, Takahashi MP. The role of α -dystrobrevin in striated muscle. *Int J Mol Sci.* 2011;12:1660–71.
67. Ishikawa-Sakurai M, Yoshida M, Imamura M, Davies KE, Ozawa EZZ. domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan. *Hum Mol Genet.* 2004;13:693–702.
68. Johnson EK, Li B, Yoon JH, Flanigan KM, Martin PT, Ervasti J, et al. Identification of new dystroglycan complexes in skeletal muscle. *PLoS ONE.* 2013;8:e73224.
69. Liu L. Lessons from cavin-1 deficiency. *Biochem Soc Trans.* 2020;48:147–54.
70. Taniguchi T, Maruyama N, Ogata T, Kasahara T, Nakanishi N, Miyagawa K, et al. PTRF/Cavin-1 deficiency causes cardiac dysfunction accompanied by cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibrosis. *PLoS ONE.* 2016;11:e0162513.
71. Kaakinen M, Reichelt ME, Ma Z, Ferguson C, Martel N, Porrello ER, et al. Cavin-1 deficiency modifies myocardial and coronary function, stretch responses and ischaemic tolerance: roles of NOS over-activity. *Basic Res Cardiol.* 2017;112:24.
72. Bostick B, Yue Y, Long C, Marschalk N, Fine DM, Chen J, et al. Cardiac expression of a mini-dystrophin that normalizes skeletal muscle force only partially restores heart function in aged mdx mice. *Mol Ther.* 2009;17:253–61.
73. Banks GB, Combs AC, Chamberlain JR, Chamberlain JS. Molecular and cellular adaptations to chronic myotendinous strain injury in mdx mice expressing a truncated dystrophin. *Hum Mol Genet.* 2008;17:3975–86.
74. Banks GB, Chamberlain JS, Froehner SC. Truncated dystrophins can influence neuromuscular synapse structure. *Mol Cell Neurosci.* 2009;40:433–41.
75. Sawicka E. Origin of the ring muscle fibers in neuromuscular diseases. *Neuropatologia Polska.* 1991;29:29–40.
76. Sekiguchi M. The role of dystrophin in the central nervous system: a mini review. *Acta Myol: Myopathies and Cardiomyopathies: Official Journal of the Mediterranean Society of Myology.* 2005;24:93–7.
77. Haenggi T, Fritschy J-M. Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cell Mol Life Sci: CMLS.* 2006;63:1614–31.
78. Chen L, Zhang J, Hu X, Philipson KD, Scharf SM. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-1 mediates left ventricular dysfunction in mice with chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* (1985). 2010;109:1675–85.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the personnel of the Boissonne Center for Gene Therapy (ONIRIS, INSERM, Nantes, France) and of the UTE IRS2 (University of Nantes, France) for the handling and care of the rats included in this study. We also thank the vector core of UMR 1089 (CPV, INSERM and University of Nantes) for the cloning of the MDs pAAV plasmids and the production of the rAAV vectors used in this study. We thank the Mass Spectrometry and Proteomics Facility (Ohio State University, Columbus, Ohio, USA), which performed the proteomics experiments. We thank E. Marrosu (UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London, United Kingdom) for providing MANEX1011B and MW8 antibodies for co-immunoprecipitation experiments. We thank G. Potier for his valuable help during the analyses of label free quantitation. We also thank T. Cronin for editing the English language of this manuscript. Finally, we thank the MDA Monoclonal Antibody Resource for providing the MANEX 1011 C antibody.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study design and reviewing of the data: AB, VF, FM, CLG. Experimental investigation: AB, LZ, AL, BF, GT, TL, TG, ML, CL, AH, AC. Resources: VF, MA, BM, JG, VB, SR, IA, CH, AM, BK, ALH, LP and FM. Writing – original draft: AB, LZ, AL, BF and CLG. Writing – Review & Editing: all authors. Supervision: CLG and OA. Funding acquisition: CLG, PM, GD and OA.

FUNDING

This project was supported by the MDA (Muscular Dystrophy Association, Research Grant ID #513878), the AFM-Téléthon (Association Française contre les Myopathies), the “Fondation d’entreprise pour la thérapie génique en Pays de la Loire”, INSERM, INRA, the University of Nantes and the University Hospital of Nantes. The Fusion Orbitrap instrument used for proteomics study was supported by NIH Award Number Grant S10 OD018056.

COMPETING INTERESTS

PM, GD and CLG are co-authors of a patent for systemic treatment of dystrophic pathologies (EP3044319A1, dated 27 June 2014). GD is an inventor on a PCT for production of large-sized micro-dystrophins in an AAV-based vector configuration (PCT/EP2016/060350, dated 17 May 2015). The remaining authors declare no competing financial interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41434-022-00317-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to CarolineLe Guiner.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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

BIBLIOGRAPHIE

- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C.T., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.-J.B., and Den Dunnen, J.T. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle & Nerve* 34, 135–144. <https://doi.org/10.1002/mus.20586>.
- Aartsma-Rus, A., Fokkema, I., Verschuuren, J., Ginjaar, I., van Deutekom, J., van Ommen, G.-J., and den Dunnen, J.T. (2009). Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Human Mutation* 30, 293–299. <https://doi.org/10.1002/humu.20918>.
- Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I.B., and Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics* 53, 145–151. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103387>.
- Abbas, A.K. (2020). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system* (Philadelphia, PA: Elsevier).
- Abriel, H., Syam, N., Sottas, V., Amarouch, M.Y., and Rougier, J.-S. (2012). TRPM4 channels in the cardiovascular system: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Biochemical Pharmacology* 84, 873–881. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.06.021>.
- Albarrán, L., Dionisio, N., Lopez, E., Salido, G.M., Redondo, P.C., and Rosado, J.A. (2014). STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location. *Biochemical Journal* 463, 373–381. <https://doi.org/10.1042/BJ20140523>.
- Alderton, J.M., and Steinhardt, R.A. (2000). Calcium Influx through Calcium Leak Channels Is Responsible for the Elevated Levels of Calcium-dependent Proteolysis in Dystrophic Myotubes. *J. Biol. Chem.* 275, 9452–9460. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9452>.
- Alkhani, H., Ase, A.R., Grant, R., O'Donnell, D., Groschner, K., and Séguéla, P. (2014). Contribution of TRPC3 to store-operated calcium entry and inflammatory transductions in primary nociceptors. *Mol Pain* 10, 43. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-10-43>.
- Allen, D.G., and Whitehead, N.P. (2011). Duchenne muscular dystrophy – What causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 290–294. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.11.005>.
- Allen, D.G., Lamb, G.D., and Westerblad, H. (2008). Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. *Physiological Reviews* 88, 287–332. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2007>.
- Alvarez, J., Coulombe, A., Cazorla, O., Ugur, M., Rauzier, J.-M., Magyar, J., Mathieu, E.-L., Boulay, G., Souto, R., Bideaux, P., *et al.* (2008). ATP/UTP activate cation-permeable channels with TRPC3/7 properties in rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295, H21–H28. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00135.2008>.
- Álvarez-Miguel, I., Ciudad, P., Pérez-García, M.T., and López-López, J.R. (2017). Differences in TRPC3 and TRPC6 channels assembly in mesenteric vascular smooth muscle cells in essential hypertension. *J Physiol* 595, 1497–1513. <https://doi.org/10.1113/JP273327>.
- Ambudkar, I.S. (2014). Ca²⁺ Signaling and Regulation of Fluid Secretion in Salivary Gland Acinar Cells. *Cell Calcium* 55, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.02.009>.
- Amosii, L., Long, C., Li, H., Mireault, A.A., Shelton, J.M., Sanchez-Ortiz, E., McAnally, J.R., Bhattacharyya, S., Schmidt, F., Grimm, D., *et al.* (2017). Single-cut genome editing restores dystrophin expression in a new mouse model of muscular dystrophy. *Science Translational Medicine* <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8081>.
- Amthor, H. (2015). Principes des approches thérapeutiques des DMD. *Archives de Pédiatrie* 22, 12S63-12S68. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(16\)30011-2](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(16)30011-2).

- Andersson, D.C., and Marks, A.R. (2010). Fixing ryanodine receptor Ca²⁺ leak - a novel therapeutic strategy for contractile failure in heart and skeletal muscle. *Drug Discov Today Dis Mech* 7, e151–e157. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2010.09.009>.
- Antigny, F., Koenig, S., Bernheim, L., and Frieden, M. (2013). During post-natal human myogenesis, normal myotube size requires TRPC1- and TRPC4-mediated Ca²⁺ entry. *Journal of Cell Science* 126, 2525–2533. <https://doi.org/10.1242/jcs.122911>.
- Antigny, F., Sabourin, J., Saüc, S., Bernheim, L., Koenig, S., and Frieden, M. (2017). TRPC1 and TRPC4 channels functionally interact with STIM1L to promote myogenesis and maintain fast repetitive Ca²⁺ release in human myotubes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.02.003>.
- Apkon, S.D., Alman, B., Birnkrant, D.J., Fitch, R., Lark, R., Mackenzie, W., Weidner, N., and Sussman, M. (2018). Orthopedic and Surgical Management of the Patient With Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatrics* 142, S82–S89. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-0333J>.
- Aponte-Ubillus, J.J., Barajas, D., Peltier, J., Bardliving, C., Shamlou, P., and Gold, D. (2018). Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 1045–1054. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8670-1>.
- Asanov, A., Sampieri, A., Moreno, C., Pacheco, J., Salgado, A., Sherry, R., and Vaca, L. (2015). Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels. *Cell Calcium* 57, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.10.011>.
- Ashley, S.N., Somanathan, S., Giles, A.R., and Wilson, J.M. (2019). TLR9 signaling mediates adaptive immunity following systemic AAV gene therapy. *Cell Immunol* 346, 103997. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2019.103997>.
- Aslam, N., and Alvi, F. (2022). TRPC3 Channel Activity and Viability of Purkinje Neurons can be Regulated by a Local Signalosome. *Frontiers in Molecular Biosciences* 9. .
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.149.3685.754>.
- Athanasopoulos, T., Graham, I.R., Foster, H., and Dickson, G. (2004). Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther* 11 Suppl 1, S109-121. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302379>.
- Au, H.K.E., Isalan, M., and Mielcarek, M. (2022). Gene Therapy Advances: A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. *Front. Med. O.* <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.809118>.
- Ayuso, E., Mingozzi, F., and Bosch, F. (2010). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* 10, 423–436. <https://doi.org/10.2174/156652310793797685>.
- Bading, H., Ginty, D.D., and Greenberg, M.E. (1993). Regulation of Gene Expression in Hippocampal Neurons by Distinct Calcium Signaling Pathways. *Science* 260, 181–186. <https://doi.org/10.1126/science.8097060>.
- Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther* 14, 86–100. <https://doi.org/10.2174/1566523214666140302193709>.
- Balzer, M. (1999). Evidence for a role of Trp proteins in the oxidative stress-induced membrane conductances of porcine aortic endothelial cells. *Cardiovascular Research* 42, 543–549. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00025-5).
- Bamaga, A.K., Riazi, S., Amburgey, K., Ong, S., Halliday, W., Diamandis, P., Guerguerian, A.-M., Dowling, J.J., and Yoon, G. (2016). Neuromuscular conditions associated with malignant hyperthermia in paediatric patients: A 25-year retrospective study. *Neuromuscul Disord* 26, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.02.007>.
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., and Patapoutian, A. (2004). Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 41, 849–857. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00150-3).

- Basner-Tschakarjan, E., and Mingozzi, F. (2014). Cell-Mediated Immunity to AAV Vectors, Evolving Concepts and Potential Solutions. *Front Immunol* 5, 350. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00350>.
- Bautista, D.M., Jordt, S.-E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I., and Julius, D. (2006). TRPA1 Mediates the Inflammatory Actions of Environmental Irritants and Proalgesic Agents. *Cell* 124, 1269–1282. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.023>.
- Becker, E.B.E., Oliver, P.L., Glitsch, M.D., Banks, G.T., Achilli, F., Hardy, A., Nolan, P.M., Fisher, E.M.C., and Davies, K.E. (2009). A point mutation in TRPC3 causes abnormal Purkinje cell development and cerebellar ataxia in moonwalker mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6706–6711. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810599106>.
- Becker, E.B.E., Fogel, B.L., Rajakulendran, S., Dulneva, A., Hanna, M.G., Perlman, S.L., Geschwind, D.H., and Davies, K.E. (2011). Candidate Screening of the TRPC3 Gene in Cerebellar Ataxia. *Cerebellum* 10, 296–299. <https://doi.org/10.1007/s12311-011-0253-6>.
- Bellinger, A.M., Reiken, S., Carlson, C., Mongillo, M., Liu, X., Rothman, L., Matecki, S., Lacampagne, A., and Marks, A.R. (2009). Hypernitrosylated ryanodine receptor/calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 15, 325–330. <https://doi.org/10.1038/nm.1916>.
- Bello, L., Gordish-Dressman, H., Morgenroth, L.P., Henricson, E.K., Duong, T., Hoffman, E.P., Cnaan, A., and McDonald, C.M. (2015). Prednisone/prednisolone and deflazacort regimens in the CINRG Duchenne Natural History Study. *Neurology* 85, 1048–1055. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001950>.
- Bello, L., Campadello, P., Barp, A., Fanin, M., Semplicini, C., Sorarù, G., Caumo, L., Calore, C., Angelini, C., and Pegoraro, E. (2016). Functional changes in Becker muscular dystrophy: implications for clinical trials in dystrophinopathies. *Sci Rep* 6, 32439. <https://doi.org/10.1038/srep32439>.
- Belus, A., and White, E. (2003). Streptomycin and intracellular calcium modulate the response of single guinea-pig ventricular myocytes to axial stretch. *J Physiol* 546, 501–509. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.027573>.
- Benchaouir, R., Merregalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., Battistelli, M., Bresolin, N., Bottinelli, R., Garcia, L., *et al.* (2007). Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 1, 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.09.016>.
- Benedetti, S., Uno, N., Hoshiya, H., Ragazzi, M., Ferrari, G., Kazuki, Y., Moyle, L.A., Tonlorenzi, R., Lombardo, A., Chaouch, S., *et al.* (2018). Reversible immortalisation enables genetic correction of human muscle progenitors and engineering of next-generation human artificial chromosomes for Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 10, 254–275. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607284>.
- Berbey, C., Weiss, N., Legrand, C., and Allard, B. (2009). Transient Receptor Potential Canonical Type 1 (TRPC1) Operates as a Sarcoplasmic Reticulum Calcium Leak Channel in Skeletal Muscle. *Journal of Biological Chemistry* 284, 36387–36394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.073221>.
- Bertin, B., Veron, P., Leborgne, C., Deschamps, J.-Y., Moullec, S., Fromes, Y., Collaud, F., Boutin, S., Latournerie, V., van Wittenberghe, L., *et al.* (2020). Capsid-specific removal of circulating antibodies to adeno-associated virus vectors. *Sci Rep* 10, 864. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57893-z>.
- Bertorini, T.E., Cornelio, F., Bhattacharya, S.K., Palmieri, G.M., Dones, I., Dworzak, F., and Brambati, B. (1984). Calcium and magnesium content in fetuses at risk and pre-necrotic Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 34, 1436–1440. .
- Bettica, P., Petrini, S., D'Oria, V., D'Amico, A., Catteruccia, M., Pane, M., Sivo, S., Magri, F., Brajkovic, S., Messina, S., *et al.* (2016). Histological effects of givinostat in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 26, 643–649. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.07.002>.
- Bijlani, S., Pang, K.M., Sivanandam, V., Singh, A., and Chatterjee, S. (2022). The Role of Recombinant AAV in Precise Genome Editing. *Front Genome Ed* 3, 799722. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.799722>.

- Biral, D., Jakubiec-Puka, A., Ciechomska, I., Sandri, M., Rossini, K., Carraro, U., and Betto, R. (2000). Loss of dystrophin and some dystrophin-associated proteins with concomitant signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension. *Acta Neuropathol* *100*, 618–626. <https://doi.org/10.1007/s004010000231>.
- Birnkrant, D.J., Bushby, K., Bann, C.M., Apkon, S.D., Blackwell, A., Brumbaugh, D., Case, L.E., Clemens, P.R., Hadjiyannakis, S., Pandya, S., *et al.* (2018a). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *The Lancet Neurology* *17*, 251–267. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30024-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30024-3).
- Birnkrant, D.J., Bushby, K., Bann, C.M., Alman, B.A., Apkon, S.D., Blackwell, A., Case, L.E., Cripe, L., Hadjiyannakis, S., Olson, A.K., *et al.* (2018b). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *The Lancet Neurology* *17*, 347–361. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30025-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30025-5).
- Birnkrant, D.J., Bushby, K., Bann, C.M., Apkon, S.D., Blackwell, A., Colvin, M.K., Cripe, L., Herron, A.R., Kennedy, A., Kinnett, K., *et al.* (2018c). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *The Lancet Neurology* *17*, 445–455. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30026-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30026-7).
- Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., and Rowe, W.P. (1967). Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proc Natl Acad Sci U S A* *58*, 1410–1415. .
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002). Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiological Reviews* *82*, 291–329. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2001>.
- Blankinship, M.J., Gregorevic, P., Allen, J.M., Harper, S.Q., Harper, H., Halbert, C.L., Miller, D.A., and Chamberlain, J.S. (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Molecular Therapy* *10*, 671–678. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.016>.
- Böhm, J., Bulla, M., Urquhart, J.E., Malfatti, E., Williams, S.G., O’Sullivan, J., Szlauder, A., Koch, C., Baranello, G., Mora, M., *et al.* (2017). ORAI1 Mutations with Distinct Channel Gating Defects in Tubular Aggregate Myopathy. *Human Mutation* *38*, 426–438. <https://doi.org/10.1002/humu.23172>.
- Bonfanti, C., Rossi, G., Tedesco, F.S., Giannotta, M., Benedetti, S., Tonlorenzi, R., Antonini, S., Marazzi, G., Dejana, E., Sassoon, D., *et al.* (2015). PW1/Peg3 expression regulates key properties that determine mesoangioblast stem cell competence. *Nat Commun* *6*, 6364. <https://doi.org/10.1038/ncomms7364>.
- Bostick, B., Yue, Y., Lai, Y., Long, C., Li, D., and Duan, D. (2008). Adeno-Associated Virus Serotype-9 Microdystrophin Gene Therapy Ameliorates Electrocardiographic Abnormalities in mdx Mice. *Hum Gene Ther* *19*, 851–856. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.058>.
- Bostick, B., Yue, Y., Long, C., Marschalk, N., Fine, D.M., Chen, J., and Duan, D. (2009). Cardiac Expression of a Mini-dystrophin That Normalizes Skeletal Muscle Force Only Partially Restores Heart Function in Aged Mdx Mice. *Molecular Therapy* *17*, 253–261. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.264>.
- Boulay, G., Zhu, X., Peyton, M., Jiang, M., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997). Cloning and Expression of a Novel Mammalian Homolog of Drosophila Transient Receptor Potential (Trp) Involved in Calcium Entry Secondary to Activation of Receptors Coupled by the Gq Class of G Protein*. *Journal of Biological Chemistry* *272*, 29672–29680. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.47.29672>.
- Boulay, G., Brown, D.M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M.X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K., and Birnbaumer, L. (1999). Modulation of Ca²⁺ entry by polypeptides of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): Evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca²⁺ entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 14955–14960. .
- Bourdon, A., François, V., Zhang, L., Lafoux, A., Fraysse, B., Toumaniantz, G., Larcher, T., Girard, T., Ledevin, M., Lebreton, C., *et al.* (2022). Evaluation of the dystrophin carboxy-terminal domain for micro-dystrophin gene therapy in cardiac and skeletal muscles in the DMDmdx rat model. *Gene Ther* <https://doi.org/10.1038/s41434-022-00317-6>.

- Bowles, D.E., McPhee, S.W.J., Li, C., Gray, S.J., Samulski, J.J., Camp, A.S., Li, J., Wang, B., Monahan, P.E., Rabinowitz, J.E., *et al.* (2012). Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol Ther* 20, 443–455. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.237>.
- Bravo-Sagua, R., Parra, V., Muñoz-Cordova, F., Sanchez-Aguilera, P., Garrido, V., Contreras-Ferrat, A., Chiong, M., and Lavandero, S. (2020). Sarcoplasmic reticulum and calcium signaling in muscle cells: Homeostasis and disease. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 197–264.
- Brennan, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K., and Bredt, D.S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743–752. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90471-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90471-9).
- Bretou, M., Sáez, P.J., Sanséau, D., Maurin, M., Lankar, D., Chabaud, M., Spampanato, C., Malbec, O., Barbier, L., Muallem, S., *et al.* (2017). Lysosome signaling controls the migration of dendritic cells. *Sci. Immunol.* 2, eaak9573. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aak9573>.
- van Bruggen, H.W., Van Den Engel-Hoek, L., Steenks, M. h., Bronkhorst, E. m., Creugers, N. h. j., de Groot, I. j. m., and Kalaykova, S. i. (2015). Reduced mandibular range of motion in Duchenne Muscular Dystrophy: predictive factors. *Journal of Oral Rehabilitation* 42, 430–438. <https://doi.org/10.1111/joor.12274>.
- Brun, C., Suter, D., Pauli, C., Dunant, P., Lochmüller, H., Burgunder, J.M., Schümperli, D., and Weis, J. (2003). U7 snRNAs induce correction of mutated dystrophin pre-mRNA by exon skipping. *Cell Mol Life Sci* 60, 557–566. <https://doi.org/10.1007/s000180300047>.
- Bryant, J.A., Finn, R.S., Slamon, D.J., Cloughesy, T.F., and Charles, A.C. (2004). EGF activates intracellular and intercellular calcium signaling by distinct pathways in tumor cells. *Cancer Biol Ther* 3, 1243–1249. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.12.1233>.
- Buddhe, S., Cripe, L., Friedland-Little, J., Kertesz, N., Eghtesady, P., Finder, J., Hor, K., Judge, D.P., Kinnett, K., McNally, E.M., *et al.* (2018). Cardiac Management of the Patient With Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatrics* 142, S72–S81. <https://doi.org/10.1542/peds.2018-03331>.
- Bulfield, G., Moore, E.A., and Kacser, H. (1978). Genetic Variation in Activity of the Enzymes of Glycolysis and Gluconeogenesis between Inbred Strains of Mice. *Genetics* 89, 551–561. .
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D.J., Case, L.E., Clemens, P.R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., *et al.* (2010a). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology* 9, 77–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6).
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D.J., Case, L.E., Clemens, P.R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., *et al.* (2010b). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *The Lancet Neurology* 9, 177–189. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70272-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70272-8).
- Butterfield, J.S.S., Biswas, M., Shirley, J.L., Kumar, S.R.P., Sherman, A., Terhorst, C., Ling, C., and Herzog, R.W. (2019). TLR9-Activating CpG-B ODN but Not TLR7 Agonists Triggers Antibody Formation to Factor IX in Muscle Gene Transfer. *Hum Gene Ther Methods* 30, 81–92. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2019.013>.
- Buyse, G.M., Van der Mieren, G., Erb, M., D’hooge, J., Herijgers, P., Verbeken, E., Jara, A., Van Den Bergh, A., Mertens, L., Courdier-Fruh, I., *et al.* (2009). Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance. *Eur Heart J* 30, 116–124. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn406>.
- Buyse, G.M., Goemans, N., van den Hauwe, M., Thijs, D., de Groot, I.J.M., Schara, U., Ceulemans, B., Meier, T., and Mertens, L. (2011). Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: Results from a 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Neuromuscular Disorders* 21, 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.02.016>.
- Buyse, G.M., Goemans, N., van den Hauwe, M., and Meier, T. (2013). Effects of glucocorticoids and idebenone on respiratory function in patients with duchenne muscular dystrophy. *Pediatric Pulmonology* 48, 912–920. <https://doi.org/10.1002/ppul.22688>.

- Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2016). AAV Natural Infection Induces Broad Cross-Neutralizing Antibody Responses to Multiple AAV Serotypes in Chimpanzees. *Hum Gene Ther Clin Dev* 27, 79–82. <https://doi.org/10.1089/humc.2016.048>.
- Campbell, N.J., and Maani, C.V. (2021). Histology, Muscle. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Capitano, D., Moriggi, M., Torretta, E., Barbacini, P., De Palma, S., Viganò, A., Lochmüller, H., Muntoni, F., Ferlini, A., Mora, M., *et al.* (2020). Comparative proteomic analyses of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy muscles: changes contributing to preserve muscle function in Becker muscular dystrophy patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 11, 547–563. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12527>.
- Carrell, E.M., Coppola, A.R., McBride, H.J., and Dirksen, R.T. (2016). Orai1 enhances muscle endurance by promoting fatigue-resistant type I fiber content but not through acute store-operated Ca²⁺ entry. *FASEB J* 30, 4109–4119. <https://doi.org/10.1096/fj.201600621R>.
- Caterina, M.J. (2015). An Introduction to Transient Receptor Potential Ion Channels and Their Roles in Disease. In TRP Channels as Therapeutic Targets, (Elsevier), pp. 1–12.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816–824. <https://doi.org/10.1038/39807>.
- Caterina, M.J., Rosen, T.A., Tominaga, M., Brake, A.J., and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436–441. <https://doi.org/10.1038/18906>.
- Chabrol, B., and Desguerre, I. (2015). Dystrophies musculaires (DM) de Duchenne (DMD) et de Becker (DMB). *Archives de Pédiatrie* 22, 12S1-12S2. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(16\)30001-X](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(16)30001-X).
- Chal, J., and Pourquié, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development* 144, 2104–2122. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>.
- Chamberlain, J.S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D., and Faulkner, J.A. (2007). Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *The FASEB Journal* 21, 2195–2204. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7353com>.
- Chandra, M., Zhou, H., Li, Q., Muallem, S., Hofmann, S.L., and Soyombo, A.A. (2011). A role for the Ca²⁺ channel TRPML1 in gastric acid secretion, based on analysis of knockout mice. *Gastroenterology* 140, 857-867.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.11.040>.
- Chapman, V.M., Miller, D.R., Armstrong, D., and Caskey, C.T. (1989). Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 1292–1296. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.4.1292>.
- Chazaud, B. (2018). Cellules satellites et cellules souches musculaires. *Cah. Myol.* 11–14. <https://doi.org/10.1051/myolog/201817003>.
- Chen, C.-C., Keller, M., Hess, M., Schiffmann, R., Urban, N., Wolfgardt, A., Schaefer, M., Bracher, F., Biel, M., Wahl-Schott, C., *et al.* (2014). A small molecule restores function to TRPML1 mutant isoforms responsible for mucopolidosis type IV. *Nat Commun* 5, 4681. <https://doi.org/10.1038/ncomms5681>.
- Chen, C.-C., Butz, E.S., Chao, Y.-K., Grishchuk, Y., Becker, L., Heller, S., Slaugenhaupt, S.A., Biel, M., Wahl-Schott, C., and Grimm, C. (2017). Small Molecules for Early Endosome-Specific Patch Clamping. *Cell Chemical Biology* 24, 907-916.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.05.025>.
- Chen, H.-C., Wang, C.-H., Shih, C.-P., Chueh, S.-H., Liu, S.-F., Chen, H.-K., and Lin, Y.-C. (2015). TRPC1 is required for survival and proliferation of cochlear spiral ganglion stem/progenitor cells. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 79, 2290–2294. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2015.10.027>.
- Chen, X., Sooch, G., Demaree, I.S., White, F.A., and Obukhov, A.G. (2020). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels: Then and Now. *Cells* 9, 1983. <https://doi.org/10.3390/cells9091983>.

- Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., and Ambudkar, I.S. (2008). Functional Requirement for Orai1 in Store-operated TRPC1-STIM1 Channels. *J Biol Chem* 283, 12935–12940. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800008200>.
- Cheng, K.T., Ong, H.L., Liu, X., and Ambudkar, I.S. (2013). Contribution and Regulation of TRPC Channels in Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Curr Top Membr* 71, 10.1016/B978-0-12-407870-3.00007-X. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00007-X>.
- Cheng, X., Zhang, X., Gao, Q., Ali Samie, M., Azar, M., Tsang, W.L., Dong, L., Sahoo, N., Li, X., Zhuo, Y., *et al.* (2014). The intracellular Ca²⁺ channel MCOLN1 is required for sarcolemma repair to prevent muscular dystrophy. *Nat Med* 20, 1187–1192. <https://doi.org/10.1038/nm.3611>.
- Cheung, K.-K., Yeung, S.S., Au, S.W., Lam, L.S., Dai, Z.-Q., Li, Y.-H., and Yeung, E.W. (2011). Expression and association of TRPC1 with TRPC3 during skeletal myogenesis. *Muscle Nerve* 44, 358–365. <https://doi.org/10.1002/mus.22060>.
- Cho, C.-H., Woo, J.S., Perez, C.F., and Lee, E.H. (2017). A focus on extracellular Ca²⁺ entry into skeletal muscle. *Exp Mol Med* 49, e378. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.208>.
- Cho, C.-H., Lee, K.J., and Lee, E.H. (2018). With the greatest care, stromal interaction molecule (STIM) proteins verify what skeletal muscle is doing. *BMB Rep* 51, 378–387. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.8.128>.
- Choi, J.H., Jeong, S.Y., Oh, M.R., Allen, P.D., and Lee, E.H. (2020). TRPCs: Influential Mediators in Skeletal Muscle. *Cells* 9, 850. <https://doi.org/10.3390/cells9040850>.
- Ciafaloni, E., Fox, D.J., Pandya, S., Westfield, C.P., Puzhankara, S., Romitti, P.A., Mathews, K.D., Miller, T.M., Matthews, D.J., Miller, L.A., *et al.* (2009). Delayed Diagnosis in Duchenne Muscular Dystrophy: Data from the Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network (MD STARnet). *The Journal of Pediatrics* 155, 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.02.007>.
- Clark, K.R., and Penaud-Budloo, M. (2011). Evaluation of the Fate of rAAV Genomes Following In Vivo Administration. In *Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols*, R.O. Snyder, and P. Moullier, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 239–258.
- Coblentz, J., St. Croix, C., and Kiselyov, K. (2013). Loss of TRPML1 promotes production of reactive oxygen species: is oxidative damage a factor in mucopolidosis type IV? *Biochemical Journal* 457, 361–368. <https://doi.org/10.1042/BJ20130647>.
- Consalvi, S., Mozzetta, C., Bettica, P., Germani, M., Fiorentini, F., Del Bene, F., Rocchetti, M., Leoni, F., Monzani, V., Mascagni, P., *et al.* (2013). Preclinical Studies in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy with the Histone Deacetylase Inhibitor Givinostat. *Mol Med* 19, 79–87. <https://doi.org/10.2119/molmed.2013.00011>.
- Cooper, B.J., Winand, N.J., Stedman, H., Valentine, B.A., Hoffman, E.P., Kunkel, L.M., Scott, M.O., Fischbeck, K.H., Kornegay, J.N., and Avery, R.J. (1988). The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334, 154–156. <https://doi.org/10.1038/334154a0>.
- Cosens, D.J., and Manning, A. (1969). Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285–287.
- Cossu, G., Previtali, S.C., Napolitano, S., Cicalese, M.P., Tedesco, F.S., Nicastro, F., Noviello, M., Roostalu, U., Natali Sora, M.G., Scarlato, M., *et al.* (2015). Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med* 7, 1513–1528. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505636>.
- Cox, D.B.T., Platt, R.J., and Zhang, F. (2015). Therapeutic Genome Editing: Prospects and Challenges. *Nat Med* 21, 121–131. <https://doi.org/10.1038/nm.3793>.
- Cox, G.A., Phelps, S.F., Chapman, V.M., and Chamberlain, J.S. (1993). New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nat Genet* 4, 87–93. <https://doi.org/10.1038/ng0593-87>.
- Cox, G.A., Sunada, Y., Campbell, K.P., and Chamberlain, J.S. (1994). Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy. *Nat Genet* 8, 333–339. <https://doi.org/10.1038/ng1294-333>.

- Creisméas, A., Gazaille, C., Bourdon, A., Lallemand, M.-A., François, V., Allais, M., Ledevin, M., Larcher, T., Toumaniantz, G., Lafoux, A., *et al.* (2021). TRPC3, but not TRPC1, as a good therapeutic target for standalone or complementary treatment of DMD. *J Transl Med* *19*, 519. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-03191-9>.
- Crisafulli, S., Sultana, J., Fontana, A., Salvo, F., Messina, S., and Trifirò, G. (2020). Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis* *15*, 141. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01430-8>.
- Cyranoski, D. (2015). Super-muscly pigs created by small genetic tweak. *Nature* *523*, 13–14. <https://doi.org/10.1038/523013a>.
- Dabrowski, M., Bukowy-Bieryllo, Z., and Zietkiewicz, E. (2018). Advances in therapeutic use of a drug-stimulated translational readthrough of premature termination codons. *Molecular Medicine* *24*, 25. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0024-7>.
- Dang, S., van Goor, M.K., Asarnow, D., Wang, Y., Julius, D., Cheng, Y., and van der Wijst, J. (2019). Structural insight into TRPV5 channel function and modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 8869–8878. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820323116>.
- Darakhshan, S., and Pour, A.B. (2015). Tranilast: A review of its therapeutic applications. *Pharmacological Research* *91*, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.10.009>.
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., König, S., Jousset, H., Bader, C., Demaurex, N., and Bernheim, L. (2009). STIM1- and Orai1-dependent Store-operated Calcium Entry Regulates Human Myoblast Differentiation*. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 5370–5380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806726200>.
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Ceroni, D., Bader, C.R., König, S., and Bernheim, L. (2010). Human Muscle Economy Myoblast Differentiation and Excitation-Contraction Coupling Use the Same Molecular Partners, STIM1 and STIM2. *J Biol Chem* *285*, 22437–22447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118984>.
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C.R., König, S., and Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *J Cell Biol* *194*, 335–346. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012157>.
- Darras, B.T., Urion, D.K., and Ghosh, P.S. (1993). Dystrophinopathies. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K.W. Gripp, G.M. Mirzaa, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Dauletbekov, D.L., Pfromm, J.K., Fritz, A.K., and Fischer, M.D. (2019). Innate Immune Response Following AAV Administration. In *Retinal Degenerative Diseases*, C. Bowes Rickman, C. Grimm, R.E. Anderson, J.D. Ash, M.M. LaVail, and J.G. Hollyfield, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 165–168.
- Davies, K.E., and Nowak, K.J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 762–773. <https://doi.org/10.1038/nrm2024>.
- De Angelis, F.G., Sthandier, O., Berarducci, B., Toso, S., Galluzzi, G., Ricci, E., Cossu, G., and Bozzoni, I. (2002). Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 9456–9461. <https://doi.org/10.1073/pnas.142302299>.
- Deconinck, N., and Dan, B. (2007). Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatric Neurology* *36*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016>.
- Deconinck, A.E., Rafael, J.A., Skinner, J.A., Brown, S.C., Potter, A.C., Metzinger, L., Watt, D.J., Dickson, J.G., Tinsley, J.M., and Davies, K.E. (1997). Utrophin-Dystrophin-Deficient Mice as a Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell* *90*, 717–727. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80532-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80532-2).
- DeHaven, W.I., Smyth, J.T., Boyles, R.R., Bird, G.S., and Putney, J.W. (2008). Complex Actions of 2-Aminoethyl-diphenyl Borate on Store-operated Calcium Entry. *J Biol Chem* *283*, 19265–19273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801535200>.

- Deist, F.L., and Capiod, T. (2011). Immunodéficiences et pathologies associées aux mutations dans STIM/ORAI - Un complexe membranaire au cœur de la signalisation calcique. *Med Sci (Paris)* 27, 737–745. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011278016>.
- Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., Innocenzi, A., Galvez, B.G., Messina, G., Morosetti, R., *et al.* (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 9, 255–267. <https://doi.org/10.1038/ncb1542>.
- Desai, P.N., Zhang, X., Wu, S., Janoshazi, A., Bolimuntha, S., Putney, J.W., and Trebak, M. (2015). Multiple Types of Calcium Channels Arising from Alternative Translation Initiation of the Orai1 Message. *Sci Signal* 8, ra74. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa8323>.
- Desguerre, I., and Laugel, V. (2015). Diagnostic et histoire naturelle de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Archives de Pédiatrie* 22, 12S24-12S30. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(16\)30005-7](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(16)30005-7).
- Desguerre, I., Mayer, M., Leturcq, F., Barbet, J.-P., Gherardi, R.K., and Christov, C. (2009). Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 762–773. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181aa31c2>.
- Di Palma, F., Belyantseva, I.A., Kim, H.J., Vogt, T.F., Kachar, B., and Noben-Trauth, K. (2002). Mutations in Mcoln3 associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (Va) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14994–14999. <https://doi.org/10.1073/pnas.222425399>.
- Dietrich, A., Mederos y Schnitzler, M., Emmel, J., Kalwa, H., Hofmann, T., and Gudermann, T. (2003). N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem* 278, 47842–47852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302983200>.
- Dirksen, R.T. (2009). Checking your SOCCs and feet: the molecular mechanisms of Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *J Physiol* 587, 3139–3147. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172148>.
- Disatnik, M.-H., Chamberlain, J.S., and Rando, T.A. (2000). Dystrophin mutations predict cellular susceptibility to oxidative stress. *Muscle & Nerve* 23, 784–792. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(200005\)23:5<784::AID-MUS17>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(200005)23:5<784::AID-MUS17>3.0.CO;2-Y).
- Doleschal, B., Primessnig, U., Wölkart, G., Wolf, S., Schernthaner, M., Lichtenegger, M., Glasnov, T.N., Kappe, C.O., Mayer, B., Antoons, G., *et al.* (2015). TRPC3 contributes to regulation of cardiac contractility and arrhythmogenesis by dynamic interaction with NCX1. *Cardiovasc Res* 106, 163–173. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv022>.
- Dong, B., Nakai, H., and Xiao, W. (2010). Characterization of genome integrity for oversized recombinant AAV vector. *Mol Ther* 18, 87–92. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.258>.
- Dong, X., Cheng, X., Mills, E., Dellling, M., Wang, F., Kurz, T., and Xu, H. (2008). The Type IV Mucopolidosis-Associated Protein TRPML1 is an Endo-lysosomal Iron Release Channel. *Nature* 455, 992–996. <https://doi.org/10.1038/nature07311>.
- Dorchies, O., and Brignol, T.N. (2019). Le tamoxifène dans l’arsenal thérapeutique des maladies neuromusculaires ? *Cah. Myol.* 25–27. <https://doi.org/10.1051/myolog/201919007>.
- Dorchies, O.M., Reutenauer-Patte, J., Dahmane, E., Ismail, H.M., Petermann, O., Patthey-Vuadens, O., Comyn, S.A., Gayi, E., Piacenza, T., Handa, R.J., *et al.* (2013). The Anticancer Drug Tamoxifen Counteracts the Pathology in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *The American Journal of Pathology* 182, 485–504. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.018>.
- Douglas, A., and Wood, M. (2013). Splicing therapy for neuromuscular disease. *Molecular and Cellular Neurosciences* 56. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.005>.
- Drachman, D.B., Toyka, K.V., and Myer, E. (1974). PREDNISONE IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY. *The Lancet* 304, 1409–1412. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(74\)90071-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(74)90071-3).
- Duan, D. (2018). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther* 26, 2337–2356. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.011>.

- Duan, D., Goemans, N., Takeda, S., Mercuri, E., and Aartsma-Rus, A. (2021). Duchenne muscular dystrophy. *Nat Rev Dis Primers* 7, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00248-3>.
- Duan, J., Li, J., Zeng, B., Chen, G.-L., Peng, X., Zhang, Y., Wang, J., Clapham, D.E., Li, Z., and Zhang, J. (2018). Structure of the mouse TRPC4 ion channel. *Nat Commun* 9, 3102. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05247-9>.
- Duan, J., Li, J., Chen, G.-L., Ge, Y., Liu, J., Xie, K., Peng, X., Zhou, W., Zhong, J., Zhang, Y., *et al.* (2019). Cryo-EM structure of TRPC5 at 2.8-Å resolution reveals unique and conserved structural elements essential for channel function. *Sci Adv* 5, eaaw7935. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7935>.
- Duchenne, G.-B. (1806-1875) A. du texte (1868). De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique, ou paralysie myo-sclérosique / par le Dr Duchenne (de Boulogne).
- Ducrot, T., Vandebrouck, C., Cao, M.L., Lebacqz, J., and Gailly, P. (2006). Functional role of store-operated and stretch-activated channels in murine adult skeletal muscle fibres. *J Physiol* 575, 913–924. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.115154>.
- Dudley, R.W.R., Khairallah, M., Mohammed, S., Lands, L., Des Rosiers, C., and Petrof, B.J. (2006). Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (mdx) muscles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291, R704–R710. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00031.2006>.
- Dueweke, J.J., Awan, T.M., and Mendias, C.L. (2017). Regeneration of skeletal muscle following eccentric injury. *J Sport Rehabil* 26, 171–179. <https://doi.org/10.1123/jsr.2016-0107>.
- Duncan, L.M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L.M., Woolf, E.A., Tepper, R.I., and Shyjan, A.W. (1998). Down-Regulation of the Novel Gene Melastatin Correlates with Potential for Melanoma Metastasis. 7. .
- Eagle, M., Baudouin, S.V., Chandler, C., Giddings, D.R., Bullock, R., and Bushby, K. (2002). Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscular Disorders* 12, 926–929. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(02\)00140-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(02)00140-2).
- Earley, S., Waldron, B.J., and Brayden, J.E. (2004). Critical Role for Transient Receptor Potential Channel TRPM4 in Myogenic Constriction of Cerebral Arteries. *Circulation Research* 95, 922–929. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000147311.54833.03>.
- Echigoya, Y., Lim, K.R.Q., Trieu, N., Bao, B., Miskew Nichols, B., Vila, M.C., Novak, J.S., Hara, Y., Lee, J., Touznic, A., *et al.* (2017). Quantitative Antisense Screening and Optimization for Exon 51 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther* 25, 2561–2572. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.07.014>.
- El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N., and Capiod, T. (2008). Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology* 47, 2068–2077. <https://doi.org/10.1002/hep.22263>.
- Elmore, Z.C., Oh, D.K., Simon, K.E., Fanous, M.M., and Asokan, A. (2020). Rescuing AAV gene transfer from neutralizing antibodies with an IgG-degrading enzyme. *JCI Insight* 5, 139881. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.139881>.
- Emery, A.E., and Burt, D. (1980). Intracellular calcium and pathogenesis and antenatal diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *Br Med J* 280, 355–357. .
- Escandell, J.M., Pais, D.A., Carvalho, S.B., Vincent, K., Gomes-Alves, P., and Alves, P.M. (2022). Leveraging rAAV bioprocess understanding and next generation bioanalytics development. *Current Opinion in Biotechnology* 74, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.12.009>.
- Evans, Evan., and Needham, David. (1987). Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J. Phys. Chem.* 91, 4219–4228. <https://doi.org/10.1021/j100300a003>.
- Evans, N.P., Misyak, S.A., Robertson, J.L., Bassaganya-Riera, J., and Grange, R.W. (2009). Immune mediated mechanisms potentially regulate the disease time course of Duchenne muscular dystrophy and provide targets for therapeutic intervention. *PM R* 1, 755–768. <https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2009.04.010>.

- Falzarano, M.S., Scotton, C., Passarelli, C., and Ferlini, A. (2015). Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules* 20, 18168–18184. <https://doi.org/10.3390/molecules201018168>.
- Fan, C., Choi, W., Sun, W., Du, J., and Lü, W. Structure of the human lipid-gated cation channel TRPC3. *ELife* 7, e36852. <https://doi.org/10.7554/eLife.36852>.
- Farini, A., Meregalli, M., Belicchi, M., Battistelli, M., Parolini, D., D'Antona, G., Gavina, M., Ottoboni, L., Constantin, G., Bottinelli, R., *et al.* (2007). T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. *The Journal of Pathology* 213, 229–238. <https://doi.org/10.1002/path.2213>.
- Farrar, M.C., and Jacobs, T.F. (2021). Tamoxifen. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Fauconnier, J., Thireau, J., Reiken, S., Cassan, C., Richard, S., Matecki, S., Marks, A.R., and Lacampagne, A. (2010). Leaky RyR2 trigger ventricular arrhythmias in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1559–1564. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908540107>.
- Feng, S. (2017). TRPC Channel Structure and Properties. In *Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases*, Y. Wang, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 9–23.
- Ferlini, A., Goyenvalle, A., and Muntoni, F. (2021). RNA-targeted drugs for neuromuscular diseases. *Science* 371, 29–31. <https://doi.org/10.1126/science.aba4515>.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>.
- Finkel, R.S., Flanigan, K.M., Wong, B., Bönnemann, C., Sampson, J., Sweeney, H.L., Reha, A., Northcutt, V.J., Elfring, G., Barth, J., *et al.* (2013). Phase 2a Study of Ataluren-Mediated Dystrophin Production in Patients with Nonsense Mutation Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 8, e81302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081302>.
- Fleig, A., and Penner, R. (2004). The TRPM ion channel subfamily: molecular, biophysical and functional features. *Trends in Pharmacological Sciences* 25, 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.004>.
- Fliegel, L. (2005). The Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.006>.
- Flotte, T., Carter, B., Conrad, C., Guggino, W., Reynolds, T., Rosenstein, B., Taylor, G., Walden, S., and Wetzel, R. (1996). A Phase I Study of an Adeno-Associated Virus-CFTR Gene Vector in Adult CF Patients with Mild Lung Disease. Johns Hopkins Children's Center, Baltimore, Maryland. *Human Gene Therapy* 7, 1145–1159. <https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.9-1145>.
- Formigli, L., Sassoli, C., Squecco, R., Bini, F., Martinesi, M., Chellini, F., Luciani, G., Sbrana, F., Zecchi-Orlandini, S., Francini, F., *et al.* (2009). Regulation of transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblasts and its relevance for a role of mechanotransduction in skeletal muscle differentiation. *Journal of Cell Science* 122, 1322–1333. <https://doi.org/10.1242/jcs.035402>.
- Fortunato, F., Farnè, M., and Ferlini, A. (2021). The DMD gene and therapeutic approaches to restore dystrophin. *Neuromuscular Disorders* 31, 1013–1020. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.08.004>.
- Fox, H., Millington, L., Mahabeer, I., and Ruiten, H. van (2020). Duchenne muscular dystrophy. *BMJ* 368, l7012. <https://doi.org/10.1136/bmj.l7012>.
- Franco, A., and Lansman, J.B. (1990). Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 344, 670–673. <https://doi.org/10.1038/344670a0>.
- Frank, D.E., Schnell, F.J., Akana, C., El-Husayni, S.H., Desjardins, C.A., Morgan, J., Charleston, J.S., Sardone, V., Domingos, J., Dickson, G., *et al.* (2020). Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 94, e2270–e2282. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009233>.

- Fraysse, B., Liantonio, A., Cetrone, M., Burdi, R., Pierno, S., Frigeri, A., Pisoni, M., Camerino, C., and De Luca, A. (2004). The alteration of calcium homeostasis in adult dystrophic mdx muscle fibers is worsened by a chronic exercise in vivo. *Neurobiol Dis* 17, 144–154. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.06.002>.
- Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* 96, 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>.
- Fukada, S., Morikawa, D., Yamamoto, Y., Yoshida, T., Sumie, N., Yamaguchi, M., Ito, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., *et al.* (2010). Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes. *The American Journal of Pathology* 176, 2414–2424. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090887>.
- Gailly, P. (2012). TRP channels in normal and dystrophic skeletal muscle. *Current Opinion in Pharmacology* 12, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.01.018>.
- Gao, Q., and McNally, E.M. (2015). The Dystrophin Complex: structure, function and implications for therapy. *Compr Physiol* 5, 1223–1239. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140048>.
- Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854–11859. <https://doi.org/10.1073/pnas.182412299>.
- Garcia, S., de Haro, T., Zafra-Ceres, M., Poyatos, A., Gomez-Capilla, J.A., and Gomez-Llorente, C. (2014). Identification of de novo Mutations of Duchènnè/Becker Muscular Dystrophies in Southern Spain. *Int J Med Sci* 11, 988–993. <https://doi.org/10.7150/ijms.8391>.
- George, L.A., Sullivan, S.K., Giermasz, A., Rasko, J.E.J., Samelson-Jones, B.J., Ducore, J., Cuker, A., Sullivan, L.M., Majumdar, S., Teitel, J., *et al.* (2017). Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med* 377, 2215–2227. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708538>.
- Gervásio, O.L., Whitehead, N.P., Yeung, E.W., Phillips, W.D., and Allen, D.G. (2008). TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase – role in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Cell Science* 121, 2246–2255. <https://doi.org/10.1242/jcs.032003>.
- Ghaleh, B., Barthélemy, I., Wojcik, J., Sambin, L., Bizé, A., Hittinger, L., Tran, T.D., Thomé, F.P., Blot, S., and Su, J.B. (2020). Protective effects of rimeporide on left ventricular function in golden retriever muscular dystrophy dogs. *International Journal of Cardiology* 312, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2020.03.031>.
- Giovarelli, M., Zecchini, S., Catarinella, G., Moscheni, C., Sartori, P., Barbieri, C., Roux-Biejat, P., Napoli, A., Vantaggiato, C., Cervia, D., *et al.* (2021). Givinostat as metabolic enhancer reverting mitochondrial biogenesis deficit in Duchenne Muscular Dystrophy. *Pharmacological Research* 170, 105751. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105751>.
- Gissel, H. (2006). The Role of Ca²⁺ in Muscle Cell Damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1066, 166–180. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.013>.
- Godfrey, C., Desviat, L.R., Smedsrød, B., Piétri-Rouxel, F., Denti, M.A., Disterer, P., Lorain, S., Nogales-Gadea, G., Sardone, V., Anwar, R., *et al.* (2017). Delivery is key: lessons learnt from developing splice-switching antisense therapies. *EMBO Mol Med* 9, 545–557. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607199>.
- Goldman, D.E. (1943). POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. *Journal of General Physiology* 27, 37–60. <https://doi.org/10.1085/jgp.27.1.37>.
- Goldman, S.M., Musgrove, R.E., Jewell, S.A., and Di Monte, D.A. (2017). Pesticides and Parkinson’s Disease: Current Experimental and Epidemiological Evidence. In *Advances in Neurotoxicology*, (Elsevier), pp. 83–117.
- Goñi, F.M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 1467–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.006>.
- Goodridge, J.P., Jacobs, B., Saetersmoen, M.L., Clement, D., Hammer, Q., Clancy, T., Skarpen, E., Brech, A., Landskron, J., Grimm, C., *et al.* (2019). Remodeling of secretory lysosomes during education tunes functional potential in NK cells. *Nat Commun* 10, 514. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08384-x>.

- van Goor, M.K.C., Hoenderop, J.G.J., and van der Wijst, J. (2017). TRP channels in calcium homeostasis: from hormonal control to structure-function relationship of TRPV5 and TRPV6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 883–893. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.027>.
- Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schümperli, D., and Kole, R. (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4929–4934. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.4929>.
- Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., *et al.* (2008). Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 455, 1097–1103. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0359-3>.
- Gowers, W.R. (1886). *A manual of diseases of the nervous system*.
- Goyenvalle, A. (2012). Engineering U7snRNA Gene to Reframe Transcripts. In *Exon Skipping: Methods and Protocols*, A. Aartsma-Rus, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 259–271.
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., and Danos, O. (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 306, 1796–1799. <https://doi.org/10.1126/science.1104297>.
- Grady, R.M., Teng, H., Nichol, M.C., Cunningham, J.C., Wilkinson, R.S., and Sanes, J.R. (1997). Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 729–738. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80533-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80533-4).
- Grieger, J.C., and Samulski, R.J. (2005). Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol* 79, 9933–9944. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9933-9944.2005>.
- Grieger, J.C., Soltys, S.M., and Samulski, R.J. (2016). Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther* 24, 287–297. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.187>.
- Griggs, R.C., Miller, J.P., Greenberg, C.R., Fehlings, D.L., Pestronk, A., Mendell, J.R., Moxley, R.T., King, W., Kissel, J.T., Cwik, V., *et al.* (2016). Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 87, 2123–2131. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003217>.
- Grimm, C., Cuajungco, M.P., van Aken, A.F.J., Schnee, M., Jörs, S., Kros, C.J., Ricci, A.J., and Heller, S. (2007). A helix-breaking mutation in TRPML3 leads to constitutive activity underlying deafness in the varitint-waddler mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19583–19588. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709846104>.
- Grounds, M.D., Terrill, J.R., Al-Mshhdani, B.A., Duong, M.N., Radley-Crabb, H.G., and Arthur, P.G. (2020). Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Dis. Model. Mech.* 13, dmm043638. <https://doi.org/10.1242/dmm.043638>.
- Grubbs, H., and Kahwaji, C.I. (2022). *Physiology, Active Immunity*. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Guglieri, M., Bushby, K., McDermott, M.P., Hart, K.A., Tawil, R., Martens, W.B., Herr, B.E., McColl, E., Wilkinson, J., Kirschner, J., *et al.* (2017). Developing standardized corticosteroid treatment for Duchenne muscular dystrophy. *Contemporary Clinical Trials* 58, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2017.04.008>.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., and Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 8, 2003–2014. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2013.21.009>.
- Guo, W., Tang, Q., Wei, M., Kang, Y., Wu, J.-X., and Chen, L. (2022). Structural mechanism of human TRPC3 and TRPC6 channel regulation by their intracellular calcium-binding sites. *Neuron* 110, 1023-1035.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.12.023>.
- Gussoni, E., Pavlath, G.K., Lanctot, A.M., Sharma, K.R., Miller, R.G., Steinman, L., and Blau, H.M. (1992). Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* 356, 435–438. <https://doi.org/10.1038/356435a0>.

Hafen, B.B., and Burns, B. (2021). Physiology, Smooth Muscle. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Hafen, B.B., Shook, M., and Burns, B. (2021). Anatomy, Smooth Muscle. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Hakim, C.H., and Duan, D. (2013). Truncated dystrophins reduce muscle stiffness in the extensor digitorum longus muscle of mdx mice. *Journal of Applied Physiology* 114, 482–489. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00866.2012>.

Hara, H., Nolan, P.M., Scott, M.O., Bucan, M., Wakayama, Y., and Fischbeck, K.H. (2002). Running endurance abnormality in mdx mice. *Muscle & Nerve* 25, 207–211. <https://doi.org/10.1002/mus.10023>.

Harisseh, R., Chatelier, A., Magaud, C., Déliot, N., and Constantin, B. (2013). Involvement of TRPV2 and SOCE in calcium influx disorder in DMD primary human myotubes with a specific contribution of α 1-syntrophin and PLC/PKC in SOCE regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 304, C881–C894. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00182.2012>.

Harteneck, C., and Gollasch, M. (2011). Pharmacological Modulation of Diacylglycerol-Sensitive TRPC3/6/7 Channels. *Curr Pharm Biotechnol* 12, 35–41. <https://doi.org/10.2174/138920111793937943>.

Hawke, T.J., and Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology* 91, 534–551. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.2.534>.

Haycock, J.W., Neil, S.M., Jones, P., Harris, J.B., and Mantle, D. (1996). Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy: *NeuroReport* 8, 357–361. <https://doi.org/10.1097/00001756-199612200-00070>.

Henricson, E., Abresch, R., Han, J.J., Nicorici, A., Goude Keller, E., de Bie, E., and McDonald, C.M. (2013). The 6-Minute Walk Test and Person-Reported Outcomes in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy and Typically Developing Controls: Longitudinal Comparisons and Clinically-Meaningful Changes Over One Year. *PLoS Curr* 5, ecurrents.md.9e17658b007eb79fcd6f723089f79e06. <https://doi.org/10.1371/currents.md.9e17658b007eb79fcd6f723089f79e06>.

Hermans, M.C.E., Pinto, Y.M., Merkies, I.S.J., de Die-Smulders, C.E.M., Crijns, H.J.G.M., and Faber, C.G. (2010). Hereditary muscular dystrophies and the heart. *Neuromuscul Disord* 20, 479–492. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.04.008>.

Hermonat, P.L., and Muzyczka, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6466–6470.

Hershberger, R.E., and Jordan, E. (1993). Dilated Cardiomyopathy Overview. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K.W. Gripp, G.M. Mirzaa, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Herzog, R.W., Cooper, M., Perrin, G.Q., Biswas M, M., Martino, A.T., Morel, L., Terhorst, C., and Hoffman, B.E. (2017). Regulatory T cells and TLR9 Activation Shape Antibody Formation to a Secreted Transgene Product in AAV Muscle Gene Transfer. *Cell Immunol* S0008-8749(17)30120-X. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.07.012>.

’t Hoen, P.A.C., de Meijer, E.J., Boer, J.M., Vossen, R.H.A.M., Turk, R., Maatman, R.G.H.J., Davies, K.E., van Ommen, G.-J.B., van Deutekom, J.C.T., and den Dunnen, J.T. (2008). Generation and Characterization of Transgenic Mice with the Full-length Human DMD Gene*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 5899–5907. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709410200>.

Hoffman, B.E., Martino, A.T., Sack, B.K., Cao, O., Liao, G., Terhorst, C., and Herzog, R.W. (2011). Nonredundant Roles of IL-10 and TGF- β in Suppression of Immune Responses to Hepatic AAV-Factor IX Gene Transfer. *Mol Ther* 19, 1263–1272. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.33>.

Hoffman, E.P., Schwartz, B.D., Mingle-Gaw, L.J., Smith, E.C., Castro, D., Mah, J.K., McDonald, C.M., Kuntz, N.L., Finkel, R.S., Guglieri, M., *et al.* (2019). Vamorolone trial in Duchenne muscular dystrophy shows dose-related

improvement of muscle function. *Neurology* 93, e1312–e1323. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008168>.

Hofherr, A., and Köttgen, M. (2011). TRPP Channels and Polycystins. In *Transient Receptor Potential Channels*, Md.S. Islam, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 287–313.

Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259–263. <https://doi.org/10.1038/16711>.

Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G., and Gudermann, T. (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *PNAS* 99, 7461–7466. <https://doi.org/10.1073/pnas.102596199>.

Hofmann, T., Chubanov, V., Gudermann, T., and Montell, C. (2003). TRPM5 Is a Voltage-Modulated and Ca²⁺-Activated Monovalent Selective Cation Channel. *Current Biology* 13, 1153–1158. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00431-7).

Holliday, R. (2005). Streptomycin, Errors in Mitochondria and Ageing. *Biogerontology* 6, 431–432. <https://doi.org/10.1007/s10522-005-4911-2>.

Honório, S.A.A., Batista, M., Santos, J., Petrica, J., Mesquita, H., Serrano, J., Ribeiro, J., and Martins, J. (2019). Physical Exercise as a Tool to Delay the Development Process of Duchenne Muscular Dystrophy (IntechOpen).

Hook, L.M., and Friedman, H.M. (2007). Subversion of innate and adaptive immunity: immune evasion from antibody and complement. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.

Hopf, F.W., Turner, P.R., Denetclaw, W.F., Reddy, P., and Steinhardt, R.A. (1996). A critical evaluation of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 271, C1325–C1339. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1325>.

Horinouchi, T., Higashi, T., Higa, T., Terada, K., Mai, Y., Aoyagi, H., Hatate, C., Nepal, P., Horiguchi, M., Harada, T., *et al.* (2012). Different binding property of STIM1 and its novel splice variant STIM1L to Orai1, TRPC3, and TRPC6 channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 428, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.034>.

Houang, E.M., Sham, Y.Y., Bates, F.S., and Metzger, J.M. (2018). Muscle membrane integrity in Duchenne muscular dystrophy: recent advances in copolymer-based muscle membrane stabilizers. *Skeletal Muscle* 8, 31. <https://doi.org/10.1186/s13395-018-0177-7>.

Houde, S., Filiatrault, M., Fournier, A., Dubé, J., D’Arcy, S., Bérubé, D., Brousseau, Y., Lapierre, G., and Vanasse, M. (2008). Deflazacort Use in Duchenne Muscular Dystrophy: An 8-Year Follow-Up. *Pediatric Neurology* 38, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.11.001>.

Hoy, S.M. (2019). Onasemnogene Apeparvovec: First Global Approval. *Drugs* 79, 1255–1262. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01162-5>.

Huang, G.N., Zeng, W., Kim, J.Y., Yuan, J.P., Han, L., Muallem, S., and Worley, P.F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, Icrac and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 8, 1003–1010. <https://doi.org/10.1038/ncb1454>.

Huang, J., Liu, C.-H., Hughes, S.A., Postma, M., Schwiening, C.J., and Hardie, R.C. (2010). Activation of TRP Channels by Protons and Phosphoinositide Depletion in *Drosophila* Photoreceptors. *Current Biology* 20, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.019>.

Huang, Y., Flegert, R., Guse, A.H., Lü, W., and Du, J. (2020). A Structural Overview of the Ion Channels of the TRPM Family. *Cell Calcium* 85, 102111. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102111>.

Huard, J., Bouchard, J.P., Roy, R., Malouin, F., Dansereau, G., Labrecque, C., Albert, N., Richards, C.L., Lemieux, B., and Tremblay, J.P. (1992). Human myoblast transplantation: Preliminary results of 4 cases. *Muscle & Nerve* 15, 550–560. <https://doi.org/10.1002/mus.880150504>.

- Hui, D.J., Edmonson, S.C., Podsakoff, G.M., Pien, G.C., Ivanciu, L., Camire, R.M., Ertl, H., Mingozi, F., High, K.A., and Basner-Tschakarjan, E. (2015). AAV capsid CD8+ T-cell epitopes are highly conserved across AAV serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2, 15029. <https://doi.org/10.1038/mtm.2015.29>.
- Hurst, R.S., Zhu, X., Boulay, G., Birnbaumer, L., and Stefani, E. (1998). Ionic currents underlying HTRP3 mediated agonist-dependent Ca²⁺ influx in stably transfected HEK293 cells. *FEBS Letters* 422, 333–338. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00035-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00035-0).
- Ilatovskaya, D.V., and Staruschenko, A. (2015). TRPC6 channel as an emerging determinant of the podocyte injury susceptibility in kidney diseases. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 309, F393–F397. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00186.2015>.
- Im, W.B., Phelps, S.F., Copen, E.H., Adams, E.G., Slightom, J.L., and Chamberlain, J.S. (1996). Differential Expression of Dystrophin Isoforms in Strains of mdx Mice with Different Mutations. *Human Molecular Genetics* 5, 1149–1153. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.8.1149>.
- Ioannou, P., Burki, U., Laval, S., Schaefer, S., and Straub, V. (2015). NHE1 inhibition as a potential therapeutic strategy to attenuate DMD pathology. *Neuromuscular Disorders* 25, S291–S292. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.06.378>.
- Ishikawa, Y., Miura, T., Ishikawa, Y., Aoyagi, T., Ogata, H., Hamada, S., and Minami, R. (2011). Duchenne muscular dystrophy: Survival by cardio-respiratory interventions. *Neuromuscular Disorders* 21, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.09.006>.
- Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Komamura, K., Miyatake, K., and Shigekawa, M. (2003). A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol* 161, 957–967. <https://doi.org/10.1083/jcb.200301101>.
- Iwata, Y., Katanosaka, Y., Arai, Y., Shigekawa, M., and Wakabayashi, S. (2009). Dominant-negative inhibition of Ca²⁺ influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum Mol Genet* 18, 824–834. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn408>.
- Jackson, M.J., Jones, D.A., and Edwards, R.H. (1985). Measurements of calcium and other elements in muscle biopsy samples from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Chim. Acta* 147, 215–221. .
- James, K.A., Gralla, J., Ridall, L.A., Do, T.N., Czaja, A.S., Mourani, P.M., Cifaloni, E., Cunniff, C., Donnelly, J., Oleszek, J., *et al.* (2020). Left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Cardiol Young* 30, 171–176. <https://doi.org/10.1017/S1047951119002610>.
- Jongpiputvanich, S., Sueblinvong, T., and Norapucsunton, T. (2005). Mitochondrial respiratory chain dysfunction in various neuromuscular diseases. *Journal of Clinical Neuroscience* 12, 426–428. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2004.06.014>.
- Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., and Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265. <https://doi.org/10.1038/nature02282>.
- Jørgensen, L.H., Blain, A., Grealley, E., Laval, S.H., Blamire, A.M., Davison, B.J., Brinkmeier, H., MacGowan, G.A., Schrøder, H.D., Bushby, K., *et al.* (2011). Long-Term Blocking of Calcium Channels in mdx Mice Results in Differential Effects on Heart and Skeletal Muscle. *Am J Pathol* 178, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.027>.
- Juan-Mateu, J., Gonzalez-Quereda, L., Rodriguez, M.J., Baena, M., Verdura, E., Nascimento, A., Ortez, C., Baiget, M., and Gallano, P. (2015). DMD Mutations in 576 Dystrophinopathy Families: A Step Forward in Genotype-Phenotype Correlations. *PLoS One* 10, e0135189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135189>.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P.L., and Bass, J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in Double-Muscléd Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Res.* 7, 910–915. <https://doi.org/10.1101/gr.7.9.910>.
- Kamina, P. (2009). Anatomie clinique : Tome 1 : [Anatomie générale, membres] (Paris: Maloine).

- Kamouchi, M., Philipp, S., Flockerzi, V., Wissenbach, U., Mamin, A., Raeymaekers, L., Eggermont, J., Droogmans, G., and Nilius, B. (1999). Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol* *518*, 345–358. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.0345p.x>.
- Kanki, H., Kinoshita, M., Akaike, A., Satoh, M., Mori, Y., and Kaneko, S. (2001). Activation of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Is Essential for the Opening of Mouse TRP5 Channels. *Mol Pharmacol* *60*, 989–998. <https://doi.org/10.1124/mol.60.5.989>.
- Karpati, G., Ajdukovic, D., Arnold, D., Gledhill, R.B., Guttmann, R., Holland, P., Koch, P.A., Shoubridge, E., Spence, D., Vanasse, M., *et al.* (1993). Myoblast transfer in duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology* *34*, 8–17. <https://doi.org/10.1002/ana.410340105>.
- Kawasaki, B.T., Liao, Y., and Birnbaumer, L. (2006). Role of Src in C3 transient receptor potential channel function and evidence for a heterogeneous makeup of receptor- and store-operated Ca²⁺ entry channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 335–340. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508030102>.
- de Kermadec, J.-M., Bécane, H.-M., Chénard, A., Tertrain, F., and Weiss, Y. (1994). Prevalence of left ventricular systolic dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: An echocardiographic study. *American Heart Journal* *127*, 618–623. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(94\)90672-6](https://doi.org/10.1016/0002-8703(94)90672-6).
- Khairallah, R.J., Shi, G., Sbrana, F., Prosser, B.L., Borroto, C., Mazaitis, M.J., Hoffman, E.P., Mahurkar, A., Sachs, F., Sun, Y., *et al.* (2012). Microtubules Underlie Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy. *Science Signaling* *5*, ra56–ra56. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002829>.
- Kharraz, Y., Guerra, J., Pessina, P., Serrano, A.L., and Muñoz-Cánoves, P. (2014). Understanding the Process of Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Biomed Res Int* *2014*, 965631. <https://doi.org/10.1155/2014/965631>.
- Kim, S.J. (2013). TRPC3 Channel Underlies Cerebellar Long-Term Depression. *Cerebellum* *12*, 334–337. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0455-1>.
- Kim, H.J., Li, Q., Tjon-Kon-Sang, S., So, I., Kiselyov, K., and Muallem, S. (2007). Gain-of-function Mutation in TRPML3 Causes the Mouse Varitint-Waddler Phenotype*. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 36138–36142. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700190200>.
- Kim, J.-H., Kwak, H.-B., Thompson, L.V., and Lawler, J.M. (2013). Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil* *34*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10974-012-9330-9>.
- Kim, M.J., Bible, K.L., Regnier, M., Adams, M.E., Froehner, S.C., and Whitehead, N.P. (2019). Simvastatin provides long-term improvement of left ventricular function and prevents cardiac fibrosis in muscular dystrophy. *Physiol Rep* *7*, e14018. <https://doi.org/10.14814/phy2.14018>.
- Kim, M.S., Lee, K.P., Yang, D., Shin, D.M., Abramowitz, J., Kiyonaka, S., Birnbaumer, L., Mori, Y., and Muallem, S. (2011). Genetic and Pharmacological Inhibition of the Ca²⁺ Influx Channel TRPC3 Protects Secretory Epithelia from Ca²⁺-Dependent Toxicity. *Gastroenterology* *140*, 2107–2115.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.052>.
- Kim, Y., Wong, A.C.Y., Power, J.M., Tadros, S.F., Klugmann, M., Moorhouse, A.J., Bertrand, P.P., and Housley, G.D. (2012). Alternative Splicing of the TRPC3 Ion Channel Calmodulin/IP3 Receptor-Binding Domain in the Hindbrain Enhances Cation Flux. *J Neurosci* *32*, 11414–11423. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6446-11.2012>.
- Kinnett, K., Rodger, S., Vroom, E., Furlong, P., Aartsma-Rus, A., and Bushby, K. (2015). Imperatives for DUCHENNE MD: a Simplified Guide to Comprehensive Care for Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS Curr* *7*, ecurrents.md.87770501e86f36f1c71e0a5882ed9ba1. <https://doi.org/10.1371/currents.md.87770501e86f36f1c71e0a5882ed9ba1>.
- Kinoshita, I., Vilquin, J.-T., Guérette, B., Asselin, I., Roy, R., and Tremblay, J.P. (1994). Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle & Nerve* *17*, 1407–1415. <https://doi.org/10.1002/mus.880171210>.

- Kiselyov, K., Xu, X., Mozhayeva, G., Kuo, T., Pessah, I., Mignery, G., Zhu, X., Birnbaumer#, L., and Muallem, S. (1998). Functional interaction between InsP3 receptors and store-operated Htrp3 channels. *Nature* 396, 478–482. <https://doi.org/10.1038/24890>.
- Kiselyov, K., Mignery, G.A., Zhu, M.X., and Muallem, S. (1999). The N-Terminal Domain of the IP3 Receptor Gates Store-Operated hTrp3 Channels. *Molecular Cell* 4, 423–429. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80344-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80344-5).
- Kitajima, N., Numaga-Tomita, T., Watanabe, M., Kuroda, T., Nishimura, A., Miyano, K., Yasuda, S., Kuwahara, K., Sato, Y., Ide, T., *et al.* (2016). TRPC3 positively regulates reactive oxygen species driving maladaptive cardiac remodeling. *Sci Rep* 6, 37001. <https://doi.org/10.1038/srep37001>.
- Kiviluoto, S., Decuypere, J.-P., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J.B., and Bultynck, G. (2011). STIM1 as a key regulator for Ca²⁺ homeostasis in skeletal-muscle development and function. *Skelet Muscle* 1, 16. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-16>.
- Kiyonaka, S., Kato, K., Nishida, M., Mio, K., Numaga, T., Sawaguchi, Y., Yoshida, T., Wakamori, M., Mori, E., Numata, T., *et al.* (2009). Selective and direct inhibition of TRPC3 channels underlies biological activities of a pyrazole compound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5400–5405. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808793106>.
- Klee, C.B., Crouch, T.H., and Krinks, M.H. (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *PNAS* 76, 6270–6273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.12.6270>.
- Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–228. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90383-2).
- Komaki, H., Takeshima, Y., Matsumura, T., Ozasa, S., Funato, M., Takeshita, E., Iwata, Y., Yajima, H., Egawa, Y., Toramoto, T., *et al.* (2020). Viltolarsen in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients: A phase 1/2 study. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 7, 2393–2408. <https://doi.org/10.1002/acn3.51235>.
- Kornegay, J.N. (2017). The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle* 7, 9. <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0124-z>.
- Kornegay, J., Spurney, C., Nghiem, P., Brinkmeyer-Langford, C., Hoffman, E., and Nagaraju, K. (2014). Pharmacologic Management of Duchenne Muscular Dystrophy: Target Identification and Preclinical Trials. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 55, 119–149. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu011>.
- Kota, J., Handy, C.R., Haidet, A.M., Montgomery, C.L., Eagle, A., Rodino-Klapac, L.R., Tucker, D., Shilling, C.J., Therlfall, W.R., Walker, C.M., *et al.* (2009). Follistatin Gene Delivery Enhances Muscle Growth and Strength in Nonhuman Primates. *Sci Transl Med* 1, 6ra15. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000112>.
- Kotin, R.M., Linden, R.M., and Berns, K.I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J* 11, 5071–5078. .
- Köttgen, M., Benzing, T., Simmen, T., Tauber, R., Buchholz, B., Feliciangeli, S., Huber, T.B., Schermer, B., Kramer-Zucker, A., Höpker, K., *et al.* (2005). Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J* 24, 705–716. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600566>.
- Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B.E., and Somlo, S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* 4, 191–197. <https://doi.org/10.1038/ncb754>.
- Krivov, L.I., Stenina, M.A., Yarygin, V.N., Polyakov, A.V., Savchuk, V.I., Obrubov, S.A., and Komarova, N.V. (2009). A New Genetic Variant of MDX Mice: Study of the Phenotype. *Bull Exp Biol Med* 147, 625–629. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0564-5>.
- Krüger, J., Kunert-Keil, C., Bisping, F., and Brinkmeier, H. (2008). Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle. *Neuromuscular Disorders* 18, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.04.003>.
- Kruzik, A., Fetahagic, D., Hartlieb, B., Dorn, S., Koppensteiner, H., Horling, F.M., Scheifflinger, F., Reipert, B.M., and de la Rosa, M. (2019). Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 14, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.05.014>.

- Kunert-Keil, C., Bisping, F., Krüger, J., and Brinkmeier, H. (2006). Tissue-specific expression of TRP channel genes in the mouse and its variation in three different mouse strains. *BMC Genomics* 7, 159. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-159>.
- Kuntz, N., Wagner, K., East, L., Upadhyay, S., Han, B., Koenig, E., Steiner, D., and Shieh, P. (2020). DMD – THERAPY: P.288 Casimersen treatment in eligible patients with Duchenne muscular dystrophy: Safety, tolerability, and pharmacokinetics over 144 weeks of treatment. *Neuromuscular Disorders* 30, S130–S131. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2020.08.285>.
- Kurebayashi, N., and Ogawa, Y. (2001). Depletion of Ca²⁺ in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca²⁺ entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 533, 185–199. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0185b.x>.
- Kyrychenko, V., Poláková, E., Janíček, R., and Shirokova, N. (2015). Mitochondrial dysfunctions during progression of dystrophic cardiomyopathy. *Cell Calcium* 58, 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.04.006>.
- Lai, Y., Yue, Y., and Duan, D. (2010). Evidence for the failure of adeno-associated virus serotype 5 to package a viral genome > or = 8.2 kb. *Mol Ther* 18, 75–79. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.256>.
- Landfeldt, E., Lindgren, P., Bell, C.F., Guglieri, M., Straub, V., Lochmüller, H., and Bushby, K. (2016). Health-related quality of life in patients with Duchenne muscular dystrophy: a multinational, cross-sectional study. *Dev Med Child Neurol* 58, 508–515. <https://doi.org/10.1111/dmnc.12938>.
- Landfeldt, E., Thompson, R., Sejersen, T., McMillan, H.J., Kirschner, J., and Lochmüller, H. (2020). Life expectancy at birth in Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 35, 643–653. <https://doi.org/10.1007/s10654-020-00613-8>.
- Lanner, J.T., Bruton, J.D., Assefaw-Redda, Y., Andronache, Z., Zhang, S.-J., Severa, D., Zhang, Z.-B., Melzer, W., Zhang, S.-L., Katz, A., *et al.* (2009). Knockdown of TRPC3 with siRNA coupled to carbon nanotubes results in decreased insulin-mediated glucose uptake in adult skeletal muscle cells. *The FASEB Journal* 23, 1728–1738. <https://doi.org/10.1096/fj.08-116814>.
- LaPelusa, A., and Kentris, M. (2021). Muscular Dystrophy. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V., Le Guiner, C., Goubin, H., Dutilleul, M., Guigand, L., *et al.* (2014). Characterization of Dystrophin Deficient Rats: A New Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110371>.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.-L., Scharenberg, A.M., Penner, R., and Kinet, J.-P. (2002). TRPM4 Is a Ca²⁺-Activated Nonselective Cation Channel Mediating Cell Membrane Depolarization. *Cell* 109, 397–407. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00719-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00719-5).
- Launikonis, B.S., Barnes, M., and Stephenson, D.G. (2003). Identification of the coupling between skeletal muscle store-operated Ca²⁺ entry and the inositol trisphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2941–2944. <https://doi.org/10.1073/pnas.0536227100>.
- Lauritzen, H.P.M.M., Ploug, T., Prats, C., Tavaré, J.M., and Galbo, H. (2006). Imaging of Insulin Signaling in Skeletal Muscle of Living Mice Shows Major Role of T-Tubules. *Diabetes* 55, 1300–1306. <https://doi.org/10.2337/db05-1216>.
- Law, M.L., Cohen, H., Martin, A.A., Angulski, A.B.B., and Metzger, J.M. (2020). Dysregulation of Calcium Handling in Duchenne Muscular Dystrophy-Associated Dilated Cardiomyopathy: Mechanisms and Experimental Therapeutic Strategies. *J Clin Med* 9, 520. <https://doi.org/10.3390/jcm9020520>.
- Le Guiner, C., Montus, M., Servais, L., Cherel, Y., Francois, V., Thibaud, J.-L., Wary, C., Matot, B., Larcher, T., Guigand, L., *et al.* (2014). Forelimb Treatment in a Large Cohort of Dystrophic Dogs Supports Delivery of a Recombinant AAV for Exon Skipping in Duchenne Patients. *Mol Ther* 22, 1923–1935. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.151>.

- Le Guiner, C.L., Servais, L., Montus, M., Larcher, T., Fraysse, B., Moullec, S., Allais, M., François, V., Dutilleul, M., Malerba, A., *et al.* (2017). Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications* 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms16105>.
- Le Rumeur, E., Winder, S.J., and Hubert, J.-F. (2010). Dystrophin: More than just the sum of its parts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 1713–1722. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.05.001>.
- Leborgne, C., Barbon, E., Alexander, J.M., Hanby, H., Delignat, S., Cohen, D.M., Collaud, F., Muraleetharan, S., Lupo, D., Silverberg, J., *et al.* (2020). IgG-cleaving endopeptidase enables in vivo gene therapy in the presence of anti-AAV neutralizing antibodies. *Nat Med* 26, 1096–1101. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0911-7>.
- Lee, E.H. (2010). Ca²⁺ channels and skeletal muscle diseases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 103, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.003>.
- Lee, E.H., Kim, D.H., and Allen, P.D. (2006a). Interplay Between Intra- and Extracellular Calcium Ions. *Molecules and Cells* 21, 315–329. .
- Lee, E.H., Cherednichenko, G., Pessah, I.N., and Allen, P.D. (2006b). Functional Coupling between TRPC3 and RyR1 Regulates the Expressions of Key Triadic Proteins*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 10042–10048. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600981200>.
- Lee, K.J., Woo, J.S., Hwang, J.-H., Hyun, C., Cho, C.-H., Kim, D.H., and Lee, E.H. (2013). STIM1 negatively regulates Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in skeletal myotubes. *Biochemical Journal* 453, 187–200. <https://doi.org/10.1042/BJ20130178>.
- Lee, K.P., Choi, S., Hong, J.H., Ahuja, M., Graham, S., Ma, R., So, I., Shin, D.M., Muallem, S., and Yuan, J.P. (2014). Molecular Determinants Mediating Gating of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels by Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1). *J Biol Chem* 289, 6372–6382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.546556>.
- Lee, Y., Lee, Y., Lee, J., Bang, S., Hyun, S., Kang, J., Hong, S.-T., Bae, E., Kaang, B.-K., and Kim, J. (2005). Pyrexia is a new thermal transient receptor potential channel endowing tolerance to high temperatures in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 37, 305–310. <https://doi.org/10.1038/ng1513>.
- Lefaucheur, J.P., Pastoret, C., and Sebillé, A. (1995). Phenotype of dystrophinopathy in old MDX mice. *The Anatomical Record* 242, 70–76. <https://doi.org/10.1002/ar.1092420109>.
- Li, H. (2017). TRP Channel Classification. In *Transient Receptor Potential Canonical Channels and Brain Diseases*, Y. Wang, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 1–8.
- Li, C., and Samulski, R.J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 21, 255–272. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>.
- Li, D., Yue, Y., Lai, Y., Hakim, C.H., and Duan, D. (2011). Nitrosative stress elicited by nNOS μ delocalization inhibits muscle force in dystrophin-null mice. *The Journal of Pathology* 223, 88–98. <https://doi.org/10.1002/path.2799>.
- Li, H., Ding, X., Lopez, J.R., Takeshima, H., Ma, J., Allen, P.D., and Eltit, J.M. (2010). Impaired Orai1-mediated Resting Ca²⁺ Entry Reduces the Cytosolic [Ca²⁺] and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Loading in Quiescent Junctophilin 1 Knock-out Myotubes. *J Biol Chem* 285, 39171–39179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.149690>.
- Li, J., Zhang, X., Song, X., Liu, R., Zhang, J., and Li, Z. (2019). The structure of TRPC ion channels. *Cell Calcium* 80, 25–28. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.03.005>.
- Li, M., Chen, C., Zhou, Z., Xu, S., and Yu, Z. (2012). A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca²⁺ entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Cell Calcium* 51, 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.04.014>.
- Li, X., Eastman, E.M., Schwartz, R.J., and Draghia-Akli, R. (1999). Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 17, 241–245. <https://doi.org/10.1038/6981>.

- Liao, Y., Erxleben, C., Yildirim, E., Abramowitz, J., Armstrong, D.L., and Birnbaumer, L. (2007). Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 4682–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611692104>.
- Liao, Y., Erxleben, C., Abramowitz, J., Flockerzi, V., Zhu, M.X., Armstrong, D.L., and Birnbaumer, L. (2008). Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 2895–2900. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712288105>.
- Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M.A., Bell, A.M., Denis, C.S., Šali, A., Hudspeth, A.J., Friedman, J.M., and Heller, S. (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* *103*, 525–535. .
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., and Meyer, T. (2005). STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Curr Biol* *15*, 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>.
- Liou, J., Fivaz, M., Inoue, T., and Meyer, T. (2007). Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 9301–9306. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702866104>.
- Liu, X., Wang, W., Singh, B.B., Lockwich, T., Jadlowiec, J., O'Connell, B., Wellner, R., Zhu, M.X., and Ambudkar, I.S. (2000). Trp1, a Candidate Protein for the Store-operated Ca²⁺Influx Mechanism in Salivary Gland Cells*. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 3403–3411. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3403>.
- Liu, X., Yao, X., and Tsang, S.Y. (2020). Post-Translational Modification and Natural Mutation of TRPC Channels. *Cells* *9*, 135. <https://doi.org/10.3390/cells9010135>.
- Liu, Y., Li, Q., Tan, M., Zhang, Y.-Y., Karpinski, E., Zhou, J., and Chen, X.-Z. (2002). Modulation of the human polycystin-L channel by voltage and divalent cations. *FEBS Letters* *525*, 71–76. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03071-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03071-5).
- Loehr, J.A., Stinnett, G.R., Hernández-Rivera, M., Roten, W.T., Wilson, L.J., Pautler, R.G., and Rodney, G.G. (2016). Eliminating Nox2 reactive oxygen species production protects dystrophic skeletal muscle from pathological calcium influx assessed in vivo by manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *J Physiol* *594*, 6395–6405. <https://doi.org/10.1113/JP272907>.
- Lombard, J. (2014). Once upon a time the cell membranes: 175 years of cell boundary research. *Biol Direct* *9*, 32. <https://doi.org/10.1186/s13062-014-0032-7>.
- Long, C., Amosii, L., Mireault, A.A., McAnally, J.R., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Bhattacharyya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.aad5725>.
- López, JoséJ., Salido, G.M., Pariente, J.A., and Rosado, J.A. (2006). Interaction of STIM1 with Endogenously Expressed Human Canonical TRP1 upon Depletion of Intracellular Ca²⁺ Stores*. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 28254–28264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604272200>.
- Lorant, J., Saury, C., Schleder, C., Robriquet, F., Lieubeau, B., Négroni, E., Leroux, I., Chabrand, L., Viau, S., Babarit, C., *et al.* (2018a). Skeletal Muscle Regenerative Potential of Human MuStem Cells following Transplantation into Injured Mice Muscle. *Mol Ther* *26*, 618–633. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.10.013>.
- Lorant, J., Larcher, T., Jaulin, N., Hedan, B., Lardenois, A., Leroux, I., Dubreil, L., Ledevin, M., Goubin, H., Moullec, S., *et al.* (2018b). Vascular Delivery of Allogeneic MuStem Cells in Dystrophic Dogs Requires Only Short-Term Immunosuppression to Avoid Host Immunity and Generate Clinical/Tissue Benefits. *Cell Transplant* *27*, 1096–1110. <https://doi.org/10.1177/0963689718776306>.
- Lorin, C., Vögeli, I., and Niggli, E. (2015). Dystrophic cardiomyopathy: role of TRPV2 channels in stretch-induced cell damage. *Cardiovascular Research* *106*, 153–162. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv021>.
- Louis, M., Zanou, N., Van Schoor, M., and Gailly, P. (2008). TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *Journal of Cell Science* *121*, 3951–3959. <https://doi.org/10.1242/jcs.037218>.

- Lucas, P., Ukhanov, K., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2003). A Diacylglycerol-Gated Cation Channel in Vomeronasal Neuron Dendrites Is Impaired in TRPC2 Mutant Mice: Mechanism of Pheromone Transduction. *Neuron* 40, 551–561. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00675-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00675-5).
- Lusby, E., Fife, K.H., and Berns, K.I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol* 34, 402–409. .
- Lyfenko, A.D., and Dirksen, R.T. (2008). Differential dependence of store-operated and excitation-coupled Ca²⁺ entry in skeletal muscle on STIM1 and Orai1. *J Physiol* 586, 4815–4824. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160481>.
- Lynch, G.S., Hinkle, R.T., Chamberlain, J.S., Brooks, S.V., and Faulkner, J.A. (2001). Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *The Journal of Physiology* 535, 591–600. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00591.x>.
- Ma, R., Li, W.-P., Rundle, D., Kong, J., Akbarali, H.I., and Tsiokas, L. (2005). PKD2 Functions as an Epidermal Growth Factor-Activated Plasma Membrane Channel. *Mol Cell Biol* 25, 8285–8298. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.18.8285-8298.2005>.
- Magri, F., Govoni, A., D’Angelo, M.G., Del Bo, R., Ghezzi, S., Sandra, G., Turconi, A.C., Sciacco, M., Ciscato, P., Bordoni, A., *et al.* (2011). Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol* 258, 1610–1623. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-5979-z>.
- Manini, A., Abati, E., Nuredini, A., Corti, S., and Comi, G.P. (2022). Adeno-Associated Virus (AAV)-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: The Issue of Transgene Persistence. *Front Neurol* 12, 814174. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.814174>.
- Manno, C.S., Pierce, G.F., Arruda, V.R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J.J., Rasko, J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., *et al.* (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12, 342–347. <https://doi.org/10.1038/nm1358>.
- Manno, S., Takakuwa, Y., and Mohandas, N. (2002). Identification of a functional role for lipid asymmetry in biological membranes: Phosphatidylserine-skeletal protein interactions modulate membrane stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1943–1948. <https://doi.org/10.1073/pnas.042688399>.
- Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U., and Vingtdeux, V. (2009). Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4, 20. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-20>.
- Marguet, D., Lenne, P.-F., Rigneault, H., and He, H.-T. (2006). Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J* 25, 3446–3457. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601204>.
- Mariot, V., Joubert, R., Hourdé, C., Féasson, L., Hanna, M., Muntoni, F., Maisonobe, T., Servais, L., Bogni, C., Le Panse, R., *et al.* (2017). Downregulation of myostatin pathway in neuromuscular diseases may explain challenges of anti-myostatin therapeutic approaches. *Nat Commun* 8, 1859. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01486-4>.
- Mariot, V., Le Guiner, C., Barthélémy, I., Montus, M., Blot, S., Torelli, S., Morgan, J., Muntoni, F., Voit, T., and Dumonceaux, J. (2020). Myostatin Is a Quantifiable Biomarker for Monitoring Pharmaco-gene Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 18, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.016>.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Martinac, B., and Hamill, O.P. (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* 7, 179–185. <https://doi.org/10.1038/ncb1218>.
- Martari, M., Sagazio, A., Mohamadi, A., Nguyen, Q., Hauschka, S.D., Kim, E., and Salvatori, R. (2009). Partial Rescue of Growth Failure in Growth Hormone (GH)-Deficient Mice by a Single Injection of a Double-Stranded Adeno-Associated Viral Vector Expressing the GH Gene Driven by a Muscle-Specific Regulatory Cassette. *Hum Gene Ther* 20, 759–766. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.197>.
- Martindale, J.J., and Metzger, J.M. (2014). Uncoupling of increased cellular oxidative stress and myocardial ischemia reperfusion injury by directed sarcolemma stabilization. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 67, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.12.008>.

- Matsuda, R., Nishikawa, A., and Tanaka, H. (1995). Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J Biochem* 118, 959–964. <https://doi.org/10.1093/jb/118.5.959>.
- Matsumura, T., Matsui, M., Iwata, Y., Asakura, M., Saito, T., Fujimura, H., and Sakoda, S. (2018). A Pilot Study of Tranilast for Cardiomyopathy of Muscular Dystrophy. *Intern. Med.* 57, 311–318. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8651-16>.
- Matsumura, T., Hashimoto, H., Sekimizu, M., Saito, A.M., Iwata, Y., Asakura, M., Kimura, K., Tamura, T., Funato, M., Segawa, K., *et al.* (2019). Study Protocol for a Multicenter, Open-Label, Single-Arm Study of Tranilast for Cardiomyopathy of Muscular Dystrophy. *The Kurume Medical Journal* 66, 121–126. <https://doi.org/10.2739/kurumemedj.MS662006>.
- Maxfield, F.R., and Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612–621. <https://doi.org/10.1038/nature04399>.
- Mayhew, A.G., Cano, S.J., Scott, E., Eagle, M., Bushby, K., Manzur, A., Muntoni, F., and Disease, the N.S.C.N. for N. (2013). Detecting meaningful change using the North Star Ambulatory Assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Developmental Medicine & Child Neurology* 55, 1046–1052. <https://doi.org/10.1111/dmnc.12220>.
- Mays, L.E., Wang, L., Lin, J., Bell, P., Crawford, A., Wherry, E.J., and Wilson, J.M. (2014). AAV8 Induces Tolerance in Murine Muscle as a Result of Poor APC Transduction, T Cell Exhaustion, and Minimal MHCI Upregulation on Target Cells. *Mol Ther* 22, 28–41. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.134>.
- Mazzone, E.S., Pane, M., Sormani, M.P., Scalise, R., Berardinelli, A., Messina, S., Torrente, Y., D’Amico, A., Doglio, L., Viggiano, E., *et al.* (2013). 24 Month Longitudinal Data in Ambulant Boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One* 8, e52512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052512>.
- McCarl, C.-A., Picard, C., Khalil, S., Kawasaki, T., Röther, J., Papolos, A., Kutok, J., Hivroz, C., LeDeist, F., Plogmann, K., *et al.* (2009). ORA1 deficiency and lack of store-operated Ca²⁺ entry cause immunodeficiency, myopathy and ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1311-1318.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.10.007>.
- McCulloch, M.A., Lal, A.K., Knecht, K., Butts, R.J., Villa, C.R., Johnson, J.N., Conway, J., Bock, M.J., Schumacher, K.R., Law, S.P., *et al.* (2020). Implantable Cardioverter Defibrillator Use in Males with Duchenne Muscular Dystrophy and Severe Left Ventricular Dysfunction. *Pediatr Cardiol* 41, 925–931. <https://doi.org/10.1007/s00246-020-02336-9>.
- McDonald, A.A., Hebert, S.L., Kunz, M.D., Ralles, S.J., and McLoon, L.K. (2015). Disease course in mdx:utrophin+/- mice: comparison of three mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Physiol Rep* 3, e12391. <https://doi.org/10.14814/phy2.12391>.
- McDonald, C.M., Campbell, C., Torricelli, R.E., Finkel, R.S., Flanigan, K.M., Goemans, N., Heydemann, P., Kaminska, A., Kirschner, J., Muntoni, F., *et al.* (2017). Ataluren in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy (ACT DMD): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet* 390, 1489–1498. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31611-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31611-2).
- McDouall, R.M., Dunn, M.J., and Dubowitz, V. (1990). Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences* 99, 199–217. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(90\)90156-H](https://doi.org/10.1016/0022-510X(90)90156-H).
- McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., and Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Disease Models & Mechanisms* 8, 195–213. <https://doi.org/10.1242/dmm.018424>.
- McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52–58. <https://doi.org/10.1038/nature719>.
- McNulty, S., and Fonfria, E. (2005). The role of TRPM channels in cell death. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 451, 235–242. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1440-4>.

- van Meer, G., Voelker, D.R., and Feigenson, G.W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.
- Meliani, A., Boisgerault, F., Harget, R., Marmier, S., Collaud, F., Ronzitti, G., Leborgne, C., Costa Verdera, H., Simon Sola, M., Charles, S., *et al.* (2018). Antigen-selective modulation of AAV immunogenicity with tolerogenic rapamycin nanoparticles enables successful vector re-administration. *Nat Commun* 9, 4098. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06621-3>.
- Mendell, J.R., Kissel, J.T., Amato, A.A., King, W., Signore, L., Prior, T.W., Sahenk, Z., Benson, S., McAndrew, P.E., Rice, R., *et al.* (1995). Myoblast Transfer in the Treatment of Duchenne’s Muscular Dystrophy (Massachusetts Medical Society).
- Mendell, J.R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., Bowles, D., Gray, S., Li, C., Galloway, G., *et al.* (2010). Dystrophin Immunity in Duchenne’s Muscular Dystrophy. *N Engl J Med* 363, 1429–1437. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000228>.
- Mendell, J.R., Sahenk, Z., Malik, V., Gomez, A.M., Flanigan, K.M., Lowes, L.P., Alfano, L.N., Berry, K., Meadows, E., Lewis, S., *et al.* (2015). A Phase 1/2a Follistatin Gene Therapy Trial for Becker Muscular Dystrophy. *Mol Ther* 23, 192–201. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.200>.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., *et al.* (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 377, 1713–1722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>.
- Mendell, J.R., Sahenk, Z., Lehman, K., Nease, C., Lowes, L.P., Miller, N.F., Iammarino, M.A., Alfano, L.N., Nicholl, A., Al-Zaidy, S., *et al.* (2020). Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Neurol* 77, 1122–1131. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1484>.
- Mendell, J.R., Al-Zaidy, S.A., Rodino-Klapac, L.R., Goodspeed, K., Gray, S.J., Kay, C.N., Boye, S.L., Boye, S.E., George, L.A., Salabarria, S., *et al.* (2021). Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Molecular Therapy* 29, 464–488. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.12.007>.
- Mercuri, E., Muntoni, F., Osorio, A.N., Tulinius, M., Buccella, F., Morgenroth, L.P., Gordish-Dressman, H., Jiang, J., Trifillis, P., Zhu, J., *et al.* (2020). Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE Registry and CINRG DMD Natural History Study. *Journal of Comparative Effectiveness Research* 9, 341–360. <https://doi.org/10.2217/cer-2019-0171>.
- Messina, S., and Vita, G.L. (2018). Clinical management of Duchenne muscular dystrophy: the state of the art. *Neurol Sci* 39, 1837–1845. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3555-3>.
- Meyers, T.A., and Townsend, D. (2019). Cardiac Pathophysiology and the Future of Cardiac Therapies in Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci* 20, 4098. <https://doi.org/10.3390/ijms20174098>.
- Millay, D.P., Goonasekera, S.A., Sargent, M.A., Maillet, M., Aronow, B.J., and Molkenin, J.D. (2009). Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *PNAS* 106, 19023–19028. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906591106>.
- Mingozzi, F., Maus, M.V., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Murphy, S.L., Rasko, J.E.J., Ragni, M.V., Manno, C.S., Sommer, J., Jiang, H., *et al.* (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* 13, 419–422. <https://doi.org/10.1038/nm1549>.
- Mingozzi, F., Meulenberg, J.J., Hui, D.J., Basner-Tschakarjan, E., Hasbrouck, N.C., Edmonson, S.A., Hutnick, N.A., Betts, M.R., Kastelein, J.J., Stroes, E.S., *et al.* (2009). AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* 114, 2077–2086. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-167510>.
- Miraldi Utz, V., Coussa, R.G., Antaki, F., and Traboulsi, E.I. (2018). Gene therapy for RPE65-related retinal disease. *Ophthalmic Genetics* 39, 671–677. <https://doi.org/10.1080/13816810.2018.1533027>.

- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., *et al.* (1996). PKD2, a Gene for Polycystic Kidney Disease That Encodes an Integral Membrane Protein. *Science* 272, 1339–1342. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1339>.
- Mok, E., Béghin, L., Gachon, P., Daubrosse, C., Fontan, J.-E., Cuisset, J.-M., Gottrand, F., and Hankard, R. (2006). Estimating body composition in children with Duchenne muscular dystrophy: comparison of bioelectrical impedance analysis and skinfold-thickness measurement. *Am J Clin Nutr* 83, 65–69. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.1.65>.
- Mokri, B., and Engel, A.G. (1975). Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* 25, 1111–1120. .
- Montell, C. (2005). The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. STKE* 2005. <https://doi.org/10.1126/stke.2722005re3>.
- Moran, M.M. (2017). TRP Channels as Potential Drug Targets. 24. .
- Morandi, L., Bernasconi, P., Gebbia, M., Mora, M., Crosti, F., Mantegazza, R., and Cornelio, F. (1995). Lack of mRNA and dystrophin expression in DMD patients three months after myoblast transfer. *Neuromuscular Disorders* 5, 291–295. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(94\)00070-P](https://doi.org/10.1016/0960-8966(94)00070-P).
- Morgan, J.E., Hoffman, E.P., and Partridge, T.A. (1990). Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse. *Journal of Cell Biology* 111, 2437–2449. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.6.2437>.
- Morrison, J., Lu, Q.L., Pastoret, C., Partridge, T., and Bou-Gharios, G. (2000). T-Cell-Dependent Fibrosis in the mdx Dystrophic Mouse. *Lab Invest* 80, 881–891. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780092>.
- Mosqueira, M., Zeiger, U., Förderer, M., Brinkmeier, H., and Fink, R.H. (2013). Cardiac and Respiratory Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy and the Role of Second Messengers: ROLE OF SECOND MESSENGERS IN DMD. *Med. Res. Rev.* 33, 1174–1213. <https://doi.org/10.1002/med.21279>.
- Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2, 731–740. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(03\)00585-4](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(03)00585-4).
- Murphy, M.M., Lawson, J.A., Mathew, S.J., Hutcheson, D.A., and Kardon, G. (2011). Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 138, 3625–3637. <https://doi.org/10.1242/dev.064162>.
- Nagata, K., Zheng, L., Madathany, T., Castiglioni, A.J., Bartles, J.R., and García-Añoveros, J. (2008). The varitint-waddler (Va) deafness mutation in TRPML3 generates constitutive, inward rectifying currents and causes cell degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 353–358. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707963105>.
- Nakai, H., Fuess, S., Storm, T.A., Muramatsu, S., Nara, Y., and Kay, M.A. (2005). Unrestricted Hepatocyte Transduction with Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vectors in Mice. *J Virol* 79, 214–224. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.214-224.2005>.
- Nakamura, A., Shiba, N., Miyazaki, D., Nishizawa, H., Inaba, Y., Fueki, N., Maruyama, R., Echigoya, Y., and Yokota, T. (2017). Comparison of the phenotypes of patients harboring in-frame deletions starting at exon 45 in the Duchenne muscular dystrophy gene indicates potential for the development of exon skipping therapy. *J Hum Genet* 62, 459–463. <https://doi.org/10.1038/jhg.2016.152>.
- Naso, M.F., Tomkowicz, B., Perry, W.L., and Strohl, W.R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* 31, 317–334. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>.
- Nathwani, A.C., Rosales, C., McIntosh, J., Rastegarlar, G., Nathwani, D., Raj, D., Nawathe, S., Waddington, S.N., Bronson, R., Jackson, S., *et al.* (2011). Long-term Safety and Efficacy Following Systemic Administration of a Self-complementary AAV Vector Encoding Human FIX Pseudotyped With Serotype 5 and 8 Capsid Proteins. *Mol Ther* 19, 876–885. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.274>.

- Nathwani, A.C., Reiss, U.M., Tuddenham, E.G.D., Rosales, C., Chowdary, P., McIntosh, J., Della Peruta, M., Lheriteau, E., Patel, N., Raj, D., *et al.* (2014). Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N Engl J Med* 371, 1994–2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407309>.
- Nault, J.-C., Datta, S., Imbeaud, S., Franconi, A., Mallet, M., Couchy, G., Letouzé, E., Pilati, C., Verret, B., Blanc, J.-F., *et al.* (2015). Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 47, 1187–1193. <https://doi.org/10.1038/ng.3389>.
- Nesin, V., and Tsiokas, L. (2014). TRPC1. In *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, B. Nilius, and V. Flockerzi, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 15–51.
- Neuner, S.M., Wilmott, L.A., Hope, K.A., Hoffmann, B., Chong, J.A., Abramowitz, J., Birnbaumer, L., O’Connell, K.M., Tryba, A.K., Greene, A.S., *et al.* (2015). TRPC3 channels critically regulate hippocampal excitability and contextual fear memory. *Behavioural Brain Research* 281, 69–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.018>.
- Ng, S.W., di Capite, J., Singaravelu, K., and Parekh, A.B. (2008). Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca²⁺ influx through Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 283, 31348–31355. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804942200>.
- Nichol, J.A., and Hutter, O.F. (1996). Tensile strength and dilatational elasticity of giant sarcolemmal vesicles shed from rabbit muscle. *J Physiol* 493, 187–198. .
- Nicolson, G.L. (2014). The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838, 1451–1466. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>.
- Niebroj-Dobosz, I., Kornguth, S., Schutta, H.S., and Siegel, F.L. (1989). Elevated calmodulin levels and reduced calmodulin-stimulated calcium-ATPase in Duchenne progressive muscular dystrophy. *Neurology* 39, 1610–1614. <https://doi.org/10.1212/wnl.39.12.1610>.
- Nielsen, T.L., Vissing, J., and Krag, T.O. (2021). Antimyostatin Treatment in Health and Disease: The Story of Great Expectations and Limited Success. *Cells* 10, 533. <https://doi.org/10.3390/cells10030533>.
- Oda, S., Numaga-Tomita, T., Kitajima, N., Toyama, T., Harada, E., Shimauchi, T., Nishimura, A., Ishikawa, T., Kumagai, Y., Birnbaumer, L., *et al.* (2017). TRPC6 counteracts TRPC3-Nox2 protein complex leading to attenuation of hyperglycemia-induced heart failure in mice. *Sci Rep* 7, 7511. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07903-4>.
- Odunewu-Aderibigbe, A., and Fliegel, L. (2014). The Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger and pH regulation in the heart. *IUBMB Life* 66, 679–685. <https://doi.org/10.1002/iub.1323>.
- Okada, T., Shimizu, S., Wakamori, M., Maeda, A., Kurosaki, T., Takada, N., Imoto, K., and Mori, Y. (1998). Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Receptor-activated TRP Ca²⁺ Channel from Mouse Brain*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 10279–10287. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.17.10279>.
- Okada, T., Inoue, R., Yamazaki, K., Maeda, A., Kurosaki, T., Yamakuni, T., Tanaka, I., Shimizu, S., Ikenaka, K., Imoto, K., *et al.* (1999). Molecular and Functional Characterization of a Novel Mouse Transient Receptor Potential Protein Homologue TRP7: Ca²⁺-PERMEABLE CATION CHANNEL THAT IS CONSTITUTIVELY ACTIVATED AND ENHANCED BY STIMULATION OF G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 27359–27370. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.39.27359>.
- Ong, H.L., and Ambudkar, I.S. (2017). STIM-TRP Pathways and Microdomain Organization: Contribution of TRPC1 in Store-Operated Ca²⁺ Entry: Impact on Ca²⁺ Signaling and Cell Function. In *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Pathways*, K. Groschner, W.F. Graier, and C. Romanin, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 159–188.
- Ong, H.L., Cheng, K.T., Liu, X., Bandyopadhyay, B.C., Paria, B.C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B.B., *et al.* (2007). Dynamic Assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 Ternary Complex Is Involved in Store-operated Calcium Influx. *J Biol Chem* 282, 9105–9116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608942200>.
- Ong, H.L., Jang, S.-I., and Ambudkar, I.S. (2012). Distinct Contributions of Orai1 and TRPC1 to Agonist-Induced [Ca²⁺]_i Signals Determine Specificity of Ca²⁺-Dependent Gene Expression. *PLoS One* 7, e47146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047146>.

- Ordaz, B., Tang, J., Xiao, R., Salgado, A., Sampieri, A., Zhu, M.X., and Vaca, L. (2005). Calmodulin and Calcium Interplay in the Modulation of TRPC5 Channel Activity. *Journal of Biological Chemistry* 280, 30788–30796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504745200>.
- Ozawa, E., Hagiwara, Y., and Yoshida, M. (1999). Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem* 190, 143–151. .
- Pacak, C.A., Mah, C.S., Thattaliyath, B.D., Conlon, T.J., Lewis, M.A., Cloutier, D.E., Zolotukhin, I., Tarantal, A.F., and Byrne, B.J. (2006). Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circulation Research* <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000237661.18885.f6>.
- Pal, R., Palmieri, M., Loehr, J.A., Li, S., Abo-Zahrah, R., Monroe, T.O., Thakur, P.B., Sardiello, M., and Rodney, G.G. (2014). Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* 5, 4425. <https://doi.org/10.1038/ncomms5425>.
- Palaschak, B., Marsic, D., Herzog, R.W., Zolotukhin, S., and Markusic, D.M. (2017). An Immune-Competent Murine Model to Study Elimination of AAV-Transduced Hepatocytes by Capsid-Specific CD8+ T Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 5, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.04.004>.
- Palmer, C.P., Zhou, X.-L., Lin, J., Loukin, S.H., Kung, C., and Saimi, Y. (2001). A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca²⁺-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7801–7805. <https://doi.org/10.1073/pnas.141036198>.
- Palmer, C.P., Aydar, E., and Djamgoz, M.B.A. (2005). A microbial TRP-like polycystic-kidney-disease-related ion channel gene. *Biochem J* 387, 211–219. <https://doi.org/10.1042/BJ20041710>.
- Pan, Z., Yang, D., Nagaraj, R.Y., Nosek, T.A., Nishi, M., Takeshima, H., Cheng, H., and Ma, J. (2002). Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking *mg29*. *Nat Cell Biol* 4, 379–383. <https://doi.org/10.1038/ncb788>.
- Pan, Z., Brotto, M., and Ma, J. (2014). Store-operated Ca²⁺ entry in muscle physiology and diseases. *BMB Rep* 47, 69–79. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2014.47.2.015>.
- Parenti, A., De Logu, F., Geppetti, P., and Benemei, S. (2016). What is the evidence for the role of TRP channels in inflammatory and immune cells? *Br J Pharmacol* 173, 953–969. <https://doi.org/10.1111/bph.13392>.
- Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2009). STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell* 136, 876–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.014>.
- Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton, G.R., Hoffman, E.P., and Kunkel, L.M. (1989). Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337, 176–179. <https://doi.org/10.1038/337176a0>.
- Pastoret, C., and Sebillé, A. (1995). mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *Journal of the Neurological Sciences* 129, 97–105. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(94\)00276-T](https://doi.org/10.1016/0022-510X(94)00276-T).
- Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M., and Viswanath, V. (2003). ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4, 529–539. <https://doi.org/10.1038/nrn1141>.
- Paúl-González, S., Aragón, J., Rodríguez-Martínez, G., Romo-Yáñez, J., and Montanez, C. (2021). Differential expression of Dp71 and Dp40 isoforms in proliferating and differentiated neural stem cells: Identification of Dp40 splicing variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 560, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.03.142>.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., *et al.* (2002). A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell* 108, 705–715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9).
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D.L., Beck, A., Nadler, M.J.S., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.-P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 8, 771–773. <https://doi.org/10.1038/ncb1435>.

- Penaud-Budloo, M., Le Guiner, C., Nowrouzi, A., Toromanoff, A., Chérel, Y., Chenuaud, P., Schmidt, M., von Kalle, C., Rolling, F., Moullier, P., *et al.* (2008). Adeno-Associated Virus Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle. *J Virol* 82, 7875–7885. <https://doi.org/10.1128/JVI.00649-08>.
- Penaud-Budloo, M., François, A., Clément, N., and Ayuso, E. (2018). Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production. *Mol Ther Methods Clin Dev* 8, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.01.002>.
- Peng, J.-B. (2011). TRPV5 and TRPV6 in Transcellular Ca²⁺ Transport: Regulation, Gene Duplication, and Polymorphisms in African Populations. In *Transient Receptor Potential Channels*, Md.S. Islam, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 239–275.
- Péréon, Y., Mercier, S., and Magot, A. (2015). Physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Archives de Pédiatrie* 22, 12S18-12S23. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(16\)30004-5](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(16)30004-5).
- Pestronk, A., Parhad, I.M., Drachman, D.B., and Price, D.L. (1982). Membrane myopathy: morphological similarities to Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 5, 209–214. <https://doi.org/10.1002/mus.880050306>.
- Petrillo, S., Pelosi, L., Piemonte, F., Travaglini, L., Forcina, L., Catteruccia, M., Petrini, S., Verardo, M., D’Amico, A., Musarò, A., *et al.* (2017). Oxidative stress in Duchenne muscular dystrophy: focus on the NRF2 redox pathway. *Human Molecular Genetics* 26, 2781–2790. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx173>.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 3710. .
- Philipp, S., Cavalié, A., Freichel, M., Wissenbach, U., Zimmer, S., Trost, C., Marquart, A., Murakami, M., and Flockerzi, V. (1996). A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J* 15, 6166–6171. .
- Philipp, S., Hambrecht, J., Braslavski, L., Schroth, G., Freichel, M., Murakami, M., Cavalié, A., and Flockerzi, V. (1998). A novel capacitative calcium entry channel expressed in excitable cells. *EMBO J* 17, 4274–4282. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.15.4274>.
- Pien, G.C., Basner-Tschakarjan, E., Hui, D.J., Mentlik, A.N., Finn, J.D., Hasbrouck, N.C., Zhou, S., Murphy, S.L., Maus, M.V., Mingozi, F., *et al.* (2009). Capsid antigen presentation flags human hepatocytes for destruction after transduction by adeno-associated viral vectors. *J Clin Invest* 119, 1688–1695. <https://doi.org/10.1172/JCI36891>.
- Pigozzo, S.R., Da Re, L., Romualdi, C., Mazzara, P.G., Galletta, E., Fletcher, S., Wilton, S.D., and Vitiello, L. (2013). Revertant Fibers in the mdx Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy: An Age- and Muscle-Related Reappraisal. *PLoS One* 8, e72147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072147>.
- Pillay, S., Zou, W., Cheng, F., Puschnik, A.S., Meyer, N.L., Ganaie, S.S., Deng, X., Wosen, J.E., Davulcu, O., Yan, Z., *et al.* (2017). Adeno-associated Virus (AAV) Serotypes Have Distinctive Interactions with Domains of the Cellular AAV Receptor. *J Virol* 91, e00391-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00391-17>.
- Plesch, E., Chen, C.-C., Butz, E., Scotto Rosato, A., Krogsaeter, E.K., Yinan, H., Bartel, K., Keller, M., Robaa, D., Teupser, D., *et al.* (2018). Selective agonist of TRPML2 reveals direct role in chemokine release from innate immune cells. *ELife* 7, e39720. <https://doi.org/10.7554/eLife.39720>.
- Polat, O.K., Uno, M., Maruyama, T., Tran, H.N., Imamura, K., Wong, C.F., Sakaguchi, R., Ariyoshi, M., Itsuki, K., Ichikawa, J., *et al.* (2019). Contribution of Coiled-Coil Assembly to Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Inactivation of TRPC6 Channel and its Impacts on FSGS-Associated Phenotypes. *J Am Soc Nephrol* 30, 1587–1603. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018070756>.
- Porcher, R., Desguerre, I., Amthor, H., Chabrol, B., Audic, F., Rivier, F., Isapof, A., Tiffreau, V., Campana-Salort, E., Leturcq, F., *et al.* (2021). Association between prophylactic angiotensin-converting enzyme inhibitors and overall survival in Duchenne muscular dystrophy—analysis of registry data. *European Heart Journal* 42, 1976–1984. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab054>.
- Power, G. (2012). Neuromuscular Function Following Lengthening Contractions.

- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P.G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443, 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature05122>.
- Previtali, S.C., Gidaro, T., Díaz-Manera, J., Zambon, A., Carnesecchi, S., Roux-Lombard, P., Spitali, P., Signorelli, M., Szigyarto, C.A.-K., Johansson, C., *et al.* (2020). Rimeporide as a first-in-class NHE-1 inhibitor: Results of a phase Ib trial in young patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *Pharmacological Research* 159, 104999. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104999>.
- Prosser, B.L., Ward, C.W., and Lederer, W.J. (2011). X-ROS Signaling: Rapid Mechano-Chemo Transduction in Heart. *Science* 333, 1440–1445. <https://doi.org/10.1126/science.1202768>.
- Pumroy, R.A., Fluck, E.C., Ahmed, T., and Moiseenkova-Bell, V.Y. (2020). Structural insights into the gating mechanisms of TRPV Channels. *Cell Calcium* 87, 102168. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102168>.
- Putney, J.W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6).
- Putney, J.W. (2005). Capacitative calcium entry. *J Cell Biol* 169, 381–382. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503161>.
- Quattrocelli, M., Palazzolo, G., Perini, I., Crippa, S., Cassano, M., and Sampaolesi, M. (2012). Mouse and Human Mesoangioblasts: Isolation and Characterization from Adult Skeletal Muscles. In *Myogenesis: Methods and Protocols*, J.X. DiMario, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 65–76.
- Quattrocelli, M., Salamone, I.M., Page, P.G., Warner, J.L., Demonbreun, A.R., and McNally, E.M. (2017). Intermittent Glucocorticoid Dosing Improves Muscle Repair and Function in Mice with Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *The American Journal of Pathology* 187, 2520–2535. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.07.017>.
- Quattrocelli, M., Zelikovich, A.S., Salamone, I.M., Fischer, J.A., and McNally, E.M. (2021). Mechanisms and Clinical Applications of Glucocorticoid Steroids in Muscular Dystrophy. *Journal of Neuromuscular Diseases* 8, 39–52. <https://doi.org/10.3233/JND-200556>.
- Rafael-Fortney, J.A., Chimanji, N.S., Schill, K.E., Martin, C.D., Murray, J.D., Ganguly, R., Stangland, J.E., Tran, T., Xu, Y., Canan, B.D., *et al.* (2011). Early Treatment with Lisinopril and Spironolactone Preserves Cardiac and Skeletal Muscle in Duchenne Muscular Dystrophy Mice. *Circulation* 124, 582–588. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.031716>.
- Raman, S.V., Hor, K.N., Mazur, W., Halnon, N.J., Kissel, J.T., He, X., Tran, T., Smart, S., McCarthy, B., Taylor, M.D., *et al.* (2015). Eplerenone for early cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 14, 153–161. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70318-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70318-7).
- Raman, S.V., Hor, K.N., Mazur, W., Cardona, A., He, X., Halnon, N., Markham, L., Soslow, J.H., Puchalski, M.D., Auerbach, S.R., *et al.* (2019). Stabilization of Early Duchenne Cardiomyopathy With Aldosterone Inhibition: Results of the Multicenter AIDMD Trial. *J Am Heart Assoc* 8, e013501. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.013501>.
- Ramos, J., and Chamberlain, J.S. (2015). Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 3, 1255–1266. <https://doi.org/10.1517/21678707.2015.1088780>.
- Rando, T.A. (2001). Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: A “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microscopy Research and Technique* 55, 223–235. <https://doi.org/10.1002/jemt.1172>.
- Rando, T.A., Disatnik, M.-H., Yu, Y., and Franco, A. (1998). Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscular Disorders* 8, 14–21. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(97\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(97)00124-7).
- Riccio, A., Medhurst, A.D., Mattei, C., Kelsell, R.E., Calver, A.R., Randall, A.D., Benham, C.D., and Pangalos, M.N. (2002). mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* 109, 95–104. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00527-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00527-2).
- Rios, E., Pizarro, G., and Stefani, E. (1992). Charge Movement and the Nature of Signal Transduction in Skeletal Muscle Excitation-Contraction Coupling. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 109–133. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.54.030192.000545>.

- Ripa, R., George, T., and Sattar, Y. (2021). Physiology, Cardiac Muscle. In StatPearls, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006). Microdomains of Intracellular Ca²⁺ : Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews* 86, 369–408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2005>.
- Roberts-Thomson, S.J., Peters, A.A., Grice, D.M., and Monteith, G.R. (2010). ORAI-mediated calcium entry: Mechanism and roles, diseases and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* 127, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.04.016>.
- Rodino-Klapac, L.R., Janssen, P.M., Montgomery, C.L., Coley, B.D., Chicoine, L.G., Clark, K.R., and Mendell, J.R. (2007). A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Transl Med* 5, 45. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-45>.
- Rogers, G.L., Martino, A.T., Aslanidi, G.V., Jayandharan, G.R., Srivastava, A., and Herzog, R.W. (2011). Innate Immune Responses to AAV Vectors. *Front Microbiol* 2, 194. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00194>.
- Rogers, G.L., Shirley, J.L., Zolotukhin, I., Kumar, S.R.P., Sherman, A., Perrin, G.Q., Hoffman, B.E., Srivastava, A., Basner-Tschakarjan, E., Wallet, M.A., *et al.* (2017). Plasmacytoid and conventional dendritic cells cooperate in crosspriming AAV capsid-specific CD8+ T cells. *Blood* 129, 3184–3195. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-11-751040>.
- Ronzitti, G., Gross, D.-A., and Mingozi, F. (2020). Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front Immunol* 11, 670. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00670>.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169, 435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>.
- Rosenberg, P., Hawkins, A., Stiber, J., Shelton, J.M., Hutcheson, K., Bassel-Duby, R., Shin, D.M., Yan, Z., and Williams, R.S. (2004). TRPC3 channels confer cellular memory of recent neuromuscular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9387–9392. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308179101>.
- Rosenzweig, M., Brennan, K.M., Tayler, T.D., Phelps, P.O., Patapoutian, A., and Garrity, P.A. (2005). The Drosophila ortholog of vertebrate TRPA1 regulates thermotaxis. *Genes Dev* 19, 419–424. <https://doi.org/10.1101/gad.1278205>.
- Rouger, K., Larcher, T., Dubreil, L., Deschamps, J.-Y., Le Guiner, C., Jouvion, G., Delorme, B., Lieubeau, B., Carlus, M., Fornasari, B., *et al.* (2011). Systemic Delivery of Allogenic Muscle Stem Cells Induces Long-Term Muscle Repair and Clinical Efficacy in Duchenne Muscular Dystrophy Dogs. *Am J Pathol* 179, 2501–2518. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.022>.
- Sabourin, J., Cognard, C., and Constantin, B. (2009). Regulation by scaffolding proteins of canonical transient receptor potential channels in striated muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 30, 289–297. <https://doi.org/10.1007/s10974-010-9206-9>.
- Sabourin, J., Antigny, F., Robin, E., Frieden, M., and Raddatz, E. (2012). Activation of Transient Receptor Potential Canonical 3 (TRPC3)-mediated Ca²⁺ Entry by A1 Adenosine Receptor in Cardiomyocytes Disturbs Atrioventricular Conduction*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 26688–26701. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378588>.
- Sabourin, J., Bartoli, F., Antigny, F., Gomez, A.M., and Benitah, J.-P. (2016). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent Store-operated Ca²⁺ Channels. *Journal of Biological Chemistry* 291, 13394–13409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.693911>.
- Sadoulet-Puccio, H.M., Rajala, M., and Kunkel, L.M. (1997). Dystrobrevin and dystrophin: An interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12413–12418. .
- Sahoo, N., Gu, M., Zhang, X., Raval, N., Yang, J., Bekier, M., Calvo, R., Patnaik, S., Wang, W., King, G., *et al.* (2017). Gastric acid secretion from parietal cells is mediated by a Ca²⁺ efflux channel in the tubulovesicle. *Dev Cell* 41, 262-273.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.003>.

- Saito, T., Kawai, M., Kimura, E., Ogata, K., Takahashi, T., Kobayashi, M., Takada, H., Kuru, S., Mikata, T., Matsumura, T., *et al.* (2017). Study of Duchenne muscular dystrophy long-term survivors aged 40 years and older living in specialized institutions in Japan. *Neuromuscular Disorders* 27, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.11.012>.
- Salmon, M.D., and Ahluwalia, J. (2010). Discrimination between receptor- and store-operated Ca(2+) influx in human neutrophils. *Cell Immunol* 265, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.07.009>.
- Salva, M.Z., Himeda, C.L., Tai, P.W., Nishiuchi, E., Gregorevic, P., Allen, J.M., Finn, E.E., Nguyen, Q.G., Blankinship, M.J., Meuse, L., *et al.* (2007). Design of Tissue-specific Regulatory Cassettes for High-level rAAV-mediated Expression in Skeletal and Cardiac Muscle. *Molecular Therapy* 15, 320–329. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300027>.
- Samanta, A., Hughes, T.E.T., and Moiseenkova-Bell, V.Y. (2018). Transient Receptor Potential (TRP) Channels. In *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*, J.R. Harris, and E.J. Boekema, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 141–165.
- Samie, M., Wang, X., Zhang, X., Goschka, A., Li, X., Cheng, X., Gregg, E., Azar, M., Zhuo, Y., Garrity, A., *et al.* (2013). A TRP Channel in the Lysosome Regulates Large Particle Phagocytosis via Focal Exocytosis. *Dev Cell* 26, 511–524. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.08.003>.
- Säuc, S., and Frieden, M. (2017). Neurological and Motor Disorders: TRPC in the Skeletal Muscle. In *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Pathways*, K. Groschner, W.F. Graier, and C. Romanin, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 557–575.
- Saul, S., Stanisz, H., Backes, C.S., Schwarz, E.C., and Hoth, M. (2014). How ORAI and TRP channels interfere with each other: Interaction models and examples from the immune system and the skin. *European Journal of Pharmacology* 739, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.071>.
- Saxton, A., Tariq, M.A., and Bordoni, B. (2021). Anatomy, Thorax, Cardiac Muscle. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Schleifer, H., Doleschal, B., Lichtenegger, M., Oppenrieder, R., Derler, I., Frischauf, I., Glasnov, T., Kappe, C., Romanin, C., and Groschner, K. (2012). Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca²⁺ entry pathways. *Br J Pharmacol* 167, 1712–1722. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02126.x>.
- Schmalbruch, H. (1984). Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: A serial section study. *Neurology* 34, 60–60. <https://doi.org/10.1212/WNL.34.1.60>.
- Schmidt, W.M., Uddin, M.H., Dysek, S., Moser-Thier, K., Pirker, C., Höger, H., Ambros, I.M., Ambros, P.F., Berger, W., and Bittner, R.E. (2011). DNA Damage, Somatic Aneuploidy, and Malignant Sarcoma Susceptibility in Muscular Dystrophies. *PLoS Genet* 7, e1002042. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002042>.
- Schönbeck, U., and Libby, P. (2004). Inflammation, Immunity, and HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Circulation* 109, II–18. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129505.34151.23>.
- Schrank, S., Barrington, N., and Stutzmann, G.E. (2020). Calcium-Handling Defects and Neurodegenerative Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 12, a035212. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035212>.
- Schümperli, D., and Pillai, R.S. (2004). The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell Mol Life Sci* 61, 2560–2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4190-0>.
- Segura, L.G., Lorenz, J.D., Weingarten, T.N., Scavonetto, F., Bojanić, K., Selcen, D., and Sprung, J. (2013). Anesthesia and Duchenne or Becker muscular dystrophy: review of 117 anesthetic exposures. *Paediatr Anaesth* 23, 855–864. <https://doi.org/10.1111/pan.12248>.
- Selvaraj, S., Sun, Y., and Singh, B.B. (2010). TRPC Channels and their Implications for Neurological Diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 94–104. .
- Sena-Esteves, M., and Gao, G. (2020). Introducing Genes into Mammalian Cells: Viral Vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2020, 095513. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095513>.

- Serena, E., Zatti, S., Zoso, A., Lo Verso, F., Tedesco, F.S., Cossu, G., and Elvassore, N. (2016). Skeletal Muscle Differentiation on a Chip Shows Human Donor Mesoangioblasts' Efficiency in Restoring Dystrophin in a Duchenne Muscular Dystrophy Model. *Stem Cells Transl Med* 5, 1676–1683. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0053>.
- Servais, L., Straathof, C.S.M., Schara, U., Klein, A., Leinonen, M., Hasham, S., Meier, T., De Waele, L., Gordish-Dressman, H., McDonald, C.M., *et al.* (2020). Long-term data with idebenone on respiratory function outcomes in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 30, 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.10.008>.
- Sharp, N.J.H., Kornegay, J.N., Van Camp, S.D., Herbstreith, M.H., Secore, S.L., Kettle, S., Hung, W.-Y., Constantinou, C.D., Dykstra, M.J., Roses, A.D., *et al.* (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115–121. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90210-J](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90210-J).
- Shawi, F., Perras, C., and Severn, M. (2016). Emerging Drugs for Duchenne Muscular Dystrophy. In *CADTH Issues in Emerging Health Technologies*, (Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health), p.
- Shen, S., Bryant, K.D., Brown, S.M., Randell, S.H., and Asokan, A. (2011). Terminal N-Linked Galactose Is the Primary Receptor for Adeno-associated Virus 9. *Journal of Biological Chemistry* 286, 13532–13540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210922>.
- Shi, J., Mori, E., Mori, Y., Mori, M., Li, J., Ito, Y., and Inoue, R. (2004). Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol* 561, 415–432. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.075051>.
- Shi, J., Geshi, N., Takahashi, S., Kiyonaka, S., Ichikawa, J., Hu, Y., Mori, Y., Ito, Y., and Inoue, R. (2013). Molecular determinants for cardiovascular TRPC6 channel regulation by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *J Physiol* 591, 2851–2866. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.251249>.
- Shi, J., Miralles, F., Kinet, J.-P., Birnbaumer, L., Large, W.A., and Albert, A.P. (2017). Evidence that Orai1 does not contribute to store-operated TRPC1 channels in vascular smooth muscle cells. *Channels (Austin)* 11, 329–339. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1303025>.
- Shibuya, S., Wakayama, Y., Inoue, M., Oniki, H., and Kominami, E. (2002). Changes in the distribution and density of caveolin 3 molecules at the plasma membrane of mdx mouse skeletal muscles: a fracture-label electron microscopic study. *Neuroscience Letters* 325, 171–174. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00267-7).
- Shimizu-Fujiwara, M., Komaki, H., Nakagawa, E., Mori-Yoshimura, M., Oya, Y., Fujisaki, T., Tokita, Y., Kubota, N., Shimazaki, R., Sato, K., *et al.* (2012). Decreased resting energy expenditure in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Brain and Development* 34, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2011.05.005>.
- Shirley, J.L., Keeler, G.D., Sherman, A., Zolotukhin, I., Markusic, D.M., Hoffman, B.E., Morel, L.M., Wallet, M.A., Terhorst, C., and Herzog, R.W. (2020). Type I IFN Sensing by cDCs and CD4⁺ T Cell Help Are Both Requisite for Cross-Priming of AAV Capsid-Specific CD8⁺ T Cells. *Mol Ther* 28, 758–770. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.11.011>.
- Shkryl, V.M., Martins, A.S., Ullrich, N.D., Nowycky, M.C., Niggli, E., and Shirokova, N. (2009). Reciprocal amplification of ROS and Ca²⁺ signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 458, 915–928. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0670-2>.
- Shupe, J., Zhang, A., Odenwelder, D.C., and Dobrowsky, T. (2022). Gene therapy: challenges in cell culture scale-up. *Current Opinion in Biotechnology* 75, 102721. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102721>.
- Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G., and Barnard, P.J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244, 1578–1580. <https://doi.org/10.1126/science.2662404>.
- Simon, F., Varela, D., and Cabello-Verrugio, C. (2013). Oxidative stress-modulated TRPM ion channels in cell dysfunction and pathological conditions in humans. *Cellular Signalling* 25, 1614–1624. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.03.023>.

- Singh, B.B., Liu, X., Tang, J., Zhu, M.X., and Ambudkar, I.S. (2002). Calmodulin Regulates Ca²⁺-Dependent Feedback Inhibition of Store-Operated Ca²⁺ Influx by Interaction with a Site in the C Terminus of TrpC1. *Molecular Cell* 9, 739–750. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00506-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00506-3).
- Skopenkova, V.V., Egorova, T.V., and Bardina, M.V. (2021). Muscle-Specific Promoters for Gene Therapy. *Acta Naturae* 13, 47–58. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11063>.
- Skuk, D. (2004). Myoblast transplantation for inherited myopathies: a clinical approach. *Expert Opinion on Biological Therapy* 4, 1871–1885. <https://doi.org/10.1517/14712598.4.12.1871>.
- Skuk, D., and Tremblay, J.P. (2003). Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J Muscle Res Cell Motil* 24, 285–300. .
- Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., Chapdelaine, P., Bouchard, J.-P., Roy, R., Dugré, F.J., Lachance, J.-G., Deschênes, L., Senay, H., *et al.* (2004). Dystrophin Expression in Myofibers of Duchenne Muscular Dystrophy Patients Following Intramuscular Injections of Normal Myogenic Cells. *Molecular Therapy* 9, 475–482. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2003.11.023>.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J.-P., Roy, R., Dugré, F.J., Sylvain, M., Lachance, J.-G., Deschênes, L., *et al.* (2006). Dystrophin Expression in Muscles of Duchenne Muscular Dystrophy Patients After High-Density Injections of Normal Myogenic Cells. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65, 371–386. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218443.45782.81>.
- Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Piette, V., Côté, C.H., Chapdelaine, P., Hogrel, J.-Y., Paradis, M., Bouchard, J.-P., Sylvain, M., *et al.* (2007). First test of a “high-density injection” protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up. *Neuromuscular Disorders* 17, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.10.003>.
- Smith, G.D., Gunthorpe, M.J., Kelsell, R.E., Hayes, P.D., Reilly, P., Facer, P., Wright, J.E., Jerman, J.C., Walhin, J.-P., Ooi, L., *et al.* (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418, 186–190. <https://doi.org/10.1038/nature00894>.
- Smith, H.K., Maxwell, L., Martyn, J.A., and Bass, J.J. (2000). Nuclear DNA fragmentation and morphological alterations in adult rabbit skeletal muscle after short-term immobilization. *Cell Tissue Res* 302, 235–241. <https://doi.org/10.1007/s004410000280>.
- Sonobe, T., Inagaki, T., Poole, D.C., and Kano, Y. (2008). Intracellular calcium accumulation following eccentric contractions in rat skeletal muscle in vivo: role of stretch-activated channels. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, R1329–R1337. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00815.2007>.
- Soukup, T., Zacharová, G., and Smerdu, V. (2002). Fibre type composition of soleus and extensor digitorum longus muscles in normal female inbred Lewis rats. *Acta Histochem* 104, 399–405. <https://doi.org/10.1078/0065-1281-00660>.
- de Souza, L.B., Ong, H.L., Liu, X., and Ambudkar, I.S. (2015). Fast endocytic recycling determines TRPC1–STIM1 clustering in ER–PM junctions and plasma membrane function of the channel. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853, 2709–2721. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.019>.
- Spix, B., Chao, Y.-K., Abrahamian, C., Chen, C.-C., and Grimm, C. (2020). TRPML Cation Channels in Inflammation and Immunity. *Front Immunol* 11, 225. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00225>.
- Spurney, C.F., Guerron, A.D., Yu, Q., Sali, A., van der Meulen, J.H., Hoffman, E.P., and Nagaraju, K. (2011). Membrane Sealant Poloxamer P188 Protects Against Isoproterenol Induced Cardiomyopathy in Dystrophin Deficient Mice. *BMC Cardiovasc Disord* 11, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-11-20>.
- Srikanth, S., Jew, M., Kim, K.-D., Yee, M.-K., Abramson, J., and Gwack, Y. (2012). Junctate is a Ca²⁺-sensing structural component of Orai1 and stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8682–8687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200667109>.

- Srivastava, A. (2016). In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol* 21, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.003>.
- Stalens, C., Motté, L., Béhin, A., Ben Yaou, R., Leturcq, F., Bassez, G., Laforêt, P., Fontaine, B., Ederhy, S., Masingue, M., *et al.* Improved Cardiac Outcomes by Early Treatment with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Becker Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis* 8, 495–502. <https://doi.org/10.3233/JND-200620>.
- Stamboulian, S., Moutin, M.-J., Treves, S., Pochon, N., Grunwald, D., Zorzato, F., De Waard, M., Ronjat, M., and Arnoult, C. (2005). Junctional, an inositol 1,4,5-triphosphate receptor associated protein, is present in rodent sperm and binds TRPC2 and TRPC5 but not TRPC1 channels. *Developmental Biology* 286, 326–337. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.08.006>.
- Stedman, H.H., Sweeney, H.L., Shrager, J.B., Maguire, H.C., Panettieri, R.A., Petrof, B., Narusawa, M., Lefterovich, J.M., Sladky, J.T., and Kelly, A.M. (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 352, 536–539. <https://doi.org/10.1038/352536a0>.
- Stenina, M.A., Krivov, L.I., Voevodin, D.A., and Yarygin, V.N. (2013). Phenotypic Differences between mdx Black Mice and mdx Albino Mice. Comparison of Cytokine Levels in the Blood. *Bull Exp Biol Med* 155, 376–379. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2158-5>.
- Stiber, J.A., and Rosenberg, P.B. (2011). The role of store-operated calcium influx in skeletal muscle signaling. *Cell Calcium* 49, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.11.012>.
- Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z.-S., Wang, S., Burch, J., Graham, V., Ward, C.C., Seth, M., Finch, E., Malouf, N., *et al.* (2008a). STIM1 signaling controls store operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 10, 688–697. <https://doi.org/10.1038/ncb1731>.
- Stiber, J.A., Zhang, Z.-S., Burch, J., Eu, J.P., Zhang, S., Truskey, G.A., Seth, M., Yamaguchi, N., Meissner, G., Shah, R., *et al.* (2008b). Mice Lacking Homer 1 Exhibit a Skeletal Myopathy Characterized by Abnormal Transient Receptor Potential Channel Activity. *Mol Cell Biol* 28, 2637–2647. <https://doi.org/10.1128/MCB.01601-07>.
- Storch, U., Forst, A.-L., Pardatscher, F., Erdogmus, S., Philipp, M., Gregoritz, M., Mederos y Schnitzler, M., and Gudermann, T. (2017). Dynamic NHERF interaction with TRPC4/5 proteins is required for channel gating by diacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E37–E46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612263114>.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., *et al.* (2003). ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures. *Cell* 112, 819–829. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2).
- Sun, C., Serra, C., Lee, G., and Wagner, K. (2020a). Stem cell-based therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Neurol* 323, 113086. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113086>.
- Sun, C., Shen, L., Zhang, Z., and Xie, X. (2020b). Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update. *Genes* 11, 837. <https://doi.org/10.3390/genes11080837>.
- Sun, L., Hua, Y., Vergarajauregui, S., Diab, H.I., and Puertollano, R. (2015a). Novel role of TRPML2 in the regulation of the innate immune response. *J Immunol* 195, 4922–4932. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500163>.
- Sun, Y., Sukumaran, P., Schaar, A., and Singh, B.B. (2015b). TRPM7 and its role in neurodegenerative diseases. *Channels (Austin)* 9, 253–261. <https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1075675>.
- Sundivakkam, P.C., Freichel, M., Singh, V., Yuan, J.P., Vogel, S.M., Flockerzi, V., Malik, A.B., and Tirupathi, C. (2012). The Ca²⁺ Sensor Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) Is Necessary and Sufficient for the Store-Operated Ca²⁺ Entry Function of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) 1 and 4 Channels in Endothelial Cells. *Mol Pharmacol* 81, 510–526. <https://doi.org/10.1124/mol.111.074658>.
- Svoboda, P. (2020). Key Mechanistic Principles and Considerations Concerning RNA Interference. *Frontiers in Plant Science* 11. .
- Swiderski, K., Todorov, M., Gehrig, S.M., Naim, T., Chee, A., Stapleton, D.I., Koopman, R., and Lynch, G.S. (2014). Tranilast administration reduces fibrosis and improves fatigue resistance in muscles of mdx dystrophic mice. *Fibrogenesis Tissue Repair* 7, 1. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-7-1>.

- Szabó, P.L., Ebner, J., Koenig, X., Hamza, O., Watzinger, S., Trojanek, S., Abraham, D., Todt, H., Kubista, H., Schicker, K., *et al.* (2021). Cardiovascular phenotype of the Dmdmdx rat - a suitable animal model for Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech* 14, dmm047704. <https://doi.org/10.1242/dmm.047704>.
- Szabo, S.M., Salhany, R.M., Deighton, A., Harwood, M., Mah, J., and Gooch, K.L. (2021). The clinical course of Duchenne muscular dystrophy in the corticosteroid treatment era: a systematic literature review. *Orphanet J Rare Dis* 16, 237. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01862-w>.
- Sztretye, M., Geyer, N., Vincze, J., Al-Gaadi, D., Oláh, T., Szentesi, P., Kis, G., Antal, M., Balatoni, I., Csernoch, L., *et al.* (2017). SOCE Is Important for Maintaining Sarcoplasmic Calcium Content and Release in Skeletal Muscle Fibers. *Biophys J* 113, 2496–2507. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.023>.
- Tajeddine, N., Zanou, N., Van Schoor, M., Lebacqz, J., and Gailly, P. (2010). TRPC1: Subcellular Localization? *J Biol Chem* 285, le1. <https://doi.org/10.1074/jbc.L109.073221>.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R.F., and Nilius, B. (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438, 1022–1025. <https://doi.org/10.1038/nature04248>.
- Tams, J.W., Vind, J., and Welinder, K.G. (1999). Adapting protein solubility by glycosylation. N-glycosylation mutants of *Coprinus cinereus* peroxidase in salt and organic solutions. *Biochim Biophys Acta* 1432, 214–221. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00103-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00103-x).
- Tang, J., Lin, Y., Zhang, Z., Tikunova, S., Birnbaumer, L., and Zhu, M.X. (2001). Identification of Common Binding Sites for Calmodulin and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors on the Carboxyl Termini of Trp Channels. *J Biol Chem* 276, 21303–21310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102316200>.
- Tang, Q., Guo, W., Zheng, L., Wu, J.-X., Liu, M., Zhou, X., Zhang, X., and Chen, L. (2018). Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Res* 28, 746–755. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0038-2>.
- Taylor, M., Jefferies, J., Byrne, B., Lima, J., Ambale-Venkatesh, B., Ostovaneh, M.R., Makkar, R., Goldstein, B., Smith, R.R., Fudge, J., *et al.* (2019). Cardiac and skeletal muscle effects in the randomized HOPE-Duchenne trial. *Neurology* 92, e866–e878. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006950>.
- Tedesco, F.S., Moyle, L.A., and Perdiguero, E. (2017). Muscle Interstitial Cells: A Brief Field Guide to Non-satellite Cell Populations in Skeletal Muscle. In *Muscle Stem Cells: Methods and Protocols*, E. Perdiguero, and D. Cornelison, eds. (New York, NY: Springer), pp. 129–147.
- Teulon, J. (2004). LE PATCH-CLAMP EN BREF. *Med Sci (Paris)* 20, 550–550. <https://doi.org/10.1051/medsci/2004205550>.
- Thakur, D.P., Wang, Q., Jeon, J., Tian, J.-B., and Zhu, M.X. (2020). Intracellular acidification facilitates receptor-operated TRPC4 activation through PLC δ 1 in a Ca²⁺-dependent manner. *J Physiol* 598, 2651–2667. <https://doi.org/10.1113/JP279658>.
- Thyagarajan, B., Poteser, M., Romanin, C., Kahr, H., Zhu, M.X., and Groschner, K. (2001). Expression of Trp3 Determines Sensitivity of Capacitative Ca²⁺ Entry to Nitric Oxide and Mitochondrial Ca²⁺ Handling: EVIDENCE FOR A ROLE OF Trp3 AS A SUBUNIT OF CAPACITATIVE Ca²⁺ ENTRY CHANNELS*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 48149–48158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103977200>.
- Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y., and Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 25, 1804–1815. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601083>.
- Townsend, D., Turner, I., Yasuda, S., Martindale, J., Davis, J., Shillingford, M., Kornegay, J.N., and Metzger, J.M. (2010). Chronic administration of membrane sealant prevents severe cardiac injury and ventricular dilatation in dystrophic dogs. *J Clin Invest* 120, 1140–1150. <https://doi.org/10.1172/JCI41329>.

- Tozawa, T., Itoh, K., Yaoi, T., Tando, S., Umekage, M., Dai, H., Hosoi, H., and Fushiki, S. (2012). The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Mol Neurobiol* 45, 287–297. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8233-5>.
- Trebak, M., St. J. Bird, G., McKay, R.R., and Putney, J.W. (2002). Comparison of Human TRPC3 Channels in Receptor-activated and Store-operated Modes: DIFFERENTIAL SENSITIVITY TO CHANNEL BLOCKERS SUGGESTS FUNDAMENTAL DIFFERENCES IN CHANNEL COMPOSITION*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21617–21623. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202549200>.
- Tremblay, J.P., Malouin, F., Roy, R., Huard, J., Bouchard, J.P., Satoh, A., and Richards, C.L. (1993). Results of a Triple Blind Clinical Study of Myoblast Transplantations without Immunosuppressive Treatment in Young Boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Transplant* 2, 99–112. <https://doi.org/10.1177/096368979300200203>.
- Treves, S., Franzini-Armstrong, C., Moccagatta, L., Arnoult, C., Grasso, C., Schrum, A., Ducreux, S., Zhu, M.X., Mikoshiba, K., Girard, T., *et al.* (2004). Junctate is a key element in calcium entry induced by activation of InsP3 receptors and/or calcium store depletion. *J Cell Biol* 166, 537–548. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404079>.
- Treves, S., Vukcevic, M., Griesser, J., Armstrong, C.-F., Zhu, M.X., and Zorzato, F. (2010). Agonist-activated Ca²⁺ influx occurs at stable plasma membrane and endoplasmic reticulum junctions. *J Cell Sci* 123, 4170–4181. <https://doi.org/10.1242/jcs.068387>.
- Tsabari, R., Simchovitz, E., Lavi, E., Eliav, O., Avrahami, R., Ben-Sasson, S., and Dor, T. (2021). Safety and clinical outcome of tamoxifen in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* 31, 803–813. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.05.005>.
- Tseliou, E., Pollan, S., Malliaras, K., Terrovitis, J., Sun, B., Galang, G., Marbán, L., Luthringer, D., and Marbán, E. (2013). Allogeneic Cardiospheres Safely Boost Cardiac Function and Attenuate Adverse Remodeling After Myocardial Infarction in Immunologically Mismatched Rat Strains. *Journal of the American College of Cardiology* 61, 1108–1119. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.10.052>.
- Tsoumpra, M.K., Fukumoto, S., Matsumoto, T., Takeda, S., Wood, M.J.A., and Aoki, Y. (2019). Peptide-conjugate antisense based splice-correction for Duchenne muscular dystrophy and other neuromuscular diseases. *EBioMedicine* 45, 630–645. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.036>.
- Tutdibi, O., Brinkmeier, H., Rüdell, R., and Föhr, K.J. (1999). Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibres of MDX and ADR-MDX mice is reduced by ion channel blockers. *J Physiol* 515, 859–868. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.859ab.x>.
- Vaca, L. (2010). SOCIC: The store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium* 47, 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.01.002>.
- Vaca, L., and Sampieri, A. (2002). Calmodulin Modulates the Delay Period between Release of Calcium from Internal Stores and Activation of Calcium Influx via Endogenous TRP1 Channels*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42178–42187. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204531200>.
- Vaghy, P.L., Fang, J., Wu, W., and P. Vaghy, L. (1998). Increased caveolin-3 levels in mdx mouse muscles. *FEBS Letters* 431, 125–127. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00738-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00738-8).
- Valentine, B.A., and Cooper, B.J. (1991). Canine X-linked muscular dystrophy: Selective involvement of muscles in neonatal dogs. *Neuromuscular Disorders* 1, 31–38. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(91\)90040-Y](https://doi.org/10.1016/0960-8966(91)90040-Y).
- Valentine, B.A., Cooper, B.J., and Gallagher, E.A. (1989). Intracellular calcium in canine muscle biopsies. *Journal of Comparative Pathology* 100, 223–230. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(89\)90099-6](https://doi.org/10.1016/0021-9975(89)90099-6).
- Vandamme, C., Adjali, O., and Mingozzi, F. (2017). Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial. *Hum Gene Ther* 28, 1061–1074. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.150>.
- Vandebrouck, A., Ducret, T., Basset, O., Sebillé, S., Raymond, G., Ruegg, U., Gailly, P., Cognard, C., and Constantin, B. (2006). Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *The FASEB Journal* 20, 136–138. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3633fje>.

- Vandebrouck, A., Sabourin, J., Rivet, J., Balghi, H., Seville, S., Kitzis, A., Raymond, G., Cognard, C., Bourmeyster, N., and Constantin, B. (2007). Regulation of capacitative calcium entries by $\alpha 1$ -syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of $\alpha 1$ -syntrophin. *The FASEB Journal* 21, 608–617. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6683com>.
- Vandebrouck, C., Duport, G., Cognard, C., and Raymond, G. (2001). Cationic channels in normal and dystrophic human myotubes. *Neuromuscular Disorders* 11, 72–79. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(00\)00153-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(00)00153-X).
- Vandebrouck, C., Martin, D., Schoor, M.C.-V., Debaix, H., and Gailly, P. (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 158, 1089–1096. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203091>.
- Vandewalle, J., Luypaert, A., De Bosscher, K., and Libert, C. (2018). Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 29, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.010>.
- Vazquez, G., Lievremont, J.-P., St. J. Bird, G., and Putney, J.W. (2001). Human Trp3 forms both inositol trisphosphate receptor-dependent and receptor-independent store-operated cation channels in DT40 avian B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11777–11782. <https://doi.org/10.1073/pnas.201238198>.
- Vazquez, G., Wedel, B.J., Aziz, O., Trebak, M., and Putney, J.W. (2004). The mammalian TRPC cation channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1742, 21–36. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.08.015>.
- Veltrop, M., van Vliet, L., Hulsker, M., Claassens, J., Brouwers, C., Breukel, C., van der Kaa, J., Linssen, M.M., den Dunnen, J.T., Verbeek, S., *et al.* (2018). A dystrophic Duchenne mouse model for testing human antisense oligonucleotides. *PLoS One* 13, e0193289. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193289>.
- Venema, V.J., Ju, H., Zou, R., and Venema, R.C. (1997). Interaction of Neuronal Nitric-oxide Synthase with Caveolin-3 in Skeletal Muscle: IDENTIFICATION OF A NOVEL CAVEOLIN SCAFFOLDING/INHIBITORY DOMAIN*. *Journal of Biological Chemistry* 272, 28187–28190. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28187>.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP Channels. *Annu Rev Biochem* 76, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>.
- Vennekens, R., Mesuere, M., and Philippaert, K. (2018). TRPM5 in the battle against diabetes and obesity. *Acta Physiologica* 222, e12949. <https://doi.org/10.1111/apha.12949>.
- Venugopal, V., and Pavlakis, S. (2021). Duchenne Muscular Dystrophy. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Verdera, H.C., Kuranda, K., and Mingozzi, F. (2020). AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer. *Mol Ther* 28, 723–746. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.12.010>.
- Verhaart, I.E.C., Cappellari, O., Tanganyika-de Winter, C.L., Plomp, J.J., Nnorom, S., Wells, K.E., Hildyard, J.C.W., Bull, D., Aartsma-Rus, A., and Wells, D.J. (2021). Simvastatin Treatment Does Not Ameliorate Muscle Pathophysiology in a Mouse Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *JND* 8, 845–863. <https://doi.org/10.3233/JND-200524>.
- Victor Dubowitz, Sewry, C.A., and Oldfors, A. (2020). *Muscle Biopsy: A Practical Approach* by Victor Dubowitz, Caroline A. Sewry, and Anders Oldfors | eBook on Inkling (Elsevier).
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., *et al.* (2006). CRACM1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Science* 312, 1220–1223. <https://doi.org/10.1126/science.1127883>.
- Vila, M.C., Rayavarapu, S., Hogarth, M.W., Van der Meulen, J.H., Horn, A., Defour, A., Takeda, S., Brown, K.J., Hathout, Y., Nagaraju, K., *et al.* (2017). Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Differ* 24, 330–342. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.127>.
- Vinayagam, D., Mager, T., Apelbaum, A., Bothe, A., Merino, F., Hofnagel, O., Gatsogiannis, C., and Raunser, S. (2018). Electron cryo-microscopy structure of the canonical TRPC4 ion channel. *ELife* 7, e36615. <https://doi.org/10.7554/eLife.36615>.

- Virag, T., Cecchini, S., and Kotin, R.M. (2009). Producing Recombinant Adeno-Associated Virus in Foster Cells: Overcoming Production Limitations Using a Baculovirus–Insect Cell Expression Strategy. *Hum Gene Ther* 20, 807–817. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.092>.
- Viswanath, V., Story, G.M., Peier, A.M., Petrus, M.J., Lee, V.M., Hwang, S.W., Patapoutian, A., and Jegla, T. (2003). Opposite thermosensor in fruitfly and mouse. *Nature* 423, 822–823. <https://doi.org/10.1038/423822a>.
- Vitiello, L., Tibaudo, L., Pegoraro, E., Bello, L., and Canton, M. (2019). Teaching an Old Molecule New Tricks: Drug Repositioning for Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci* 20, 6053. <https://doi.org/10.3390/ijms20236053>.
- Vriens, J., Owsianik, G., Hofmann, T., Philipp, S.E., Stab, J., Chen, X., Benoit, M., Xue, F., Janssens, A., Kerselaers, S., *et al.* (2011). TRPM3 Is a Nociceptor Channel Involved in the Detection of Noxious Heat. *Neuron* 70, 482–494. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.051>.
- Vulin, A., Barthélémy, I., Goyenvalle, A., Thibaud, J.-L., Beley, C., Griffith, G., Benchaouir, R., le Hir, M., Unterfinger, Y., Lorain, S., *et al.* (2012). Muscle Function Recovery in Golden Retriever Muscular Dystrophy After AAV1-U7 Exon Skipping. *Mol Ther* 20, 2120–2133. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.181>.
- Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N., and Lee, S.-J. (2002). Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Annals of Neurology* 52, 832–836. <https://doi.org/10.1002/ana.10385>.
- Wahbi, K. (2015). Aspects cardiologiques des dystrophinopathies. *Archives de Pédiatrie* 22, 12S37-12S41. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(16\)30007-0](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(16)30007-0).
- Walker, R.G., Willingham, A.T., and Zuker, C.S. (2000). A Drosophila Mechanosensory Transduction Channel. *Science* <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2229>.
- Wang, H., Cheng, X., Tian, J., Xiao, Y., Tian, T., Xu, F., Hong, X., and Zhu, M.X. (2020). TRPC channels: Structure, function, regulation and recent advances in small molecular probes. *Pharmacology & Therapeutics* 209, 107497. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107497>.
- Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Li, J., and Xiao, X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol* 23, 321–328. <https://doi.org/10.1038/nbt1073>.
- Ward, M.-L., Williams, I.A., Chu, Y., Cooper, P.J., Ju, Y.-K., and Allen, D.G. (2008). Stretch-activated channels in the heart: Contributions to length-dependence and to cardiomyopathy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 97, 232–249. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2008.02.009>.
- Wasala, N.B., Chen, S., and Duan, D. (2020). Duchenne muscular dystrophy animal models for high-throughput drug discovery and precision medicine. *Expert Opin Drug Discov* 15, 443–456. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1718100>.
- Webster, C., Silberstein, L., Hays, A.P., and Blau, H.M. (1988). Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 52, 503–513. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90463-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90463-1).
- Wei-LaPierre, L., Carrell, E.M., Boncompagni, S., Protasi, F., and Dirksen, R.T. (2013). Orai1-dependent Calcium Entry Promotes Skeletal Muscle Growth and Limits Fatigue. *Nat Commun* 4, 2805. <https://doi.org/10.1038/ncomms3805>.
- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., *et al.* (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87–91. <https://doi.org/10.1038/nature05756>.
- Weller, M.L., Amornphimoltham, P., Schmidt, M., Wilson, P.A., Gutkind, J.S., and Chiorini, J.A. (2010). Epidermal growth factor receptor is a co-receptor for adeno-associated virus serotype 6. *Nat Med* 16, 662–664. <https://doi.org/10.1038/nm.2145>.
- Wes, P.D., Chevesich, J., Jeromin, A., Rosenberg, C., Stetten, G., and Montell, C. (1995). TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9652–9656. .

- Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Casas, E., Cundiff, L.V., and Koohmaraie, M. (2001). The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. *Journal of Animal Science* *79*, 3069. <https://doi.org/10.2527/2001.79123069x>.
- Whitehead, N.P., Streamer, M., Lusambili, L.I., Sachs, F., and Allen, D.G. (2006a). Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from mdx mice. *Neuromuscular Disorders* *16*, 845–854. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.07.024>.
- Whitehead, N.P., Yeung, E.W., and Allen, D.G. (2006b). Muscle Damage in Mdx (dystrophic) Mice: Role of Calcium and Reactive Oxygen Species. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* *33*, 657–662. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04394.x>.
- Whitehead, N.P., Yeung, E.W., Froehner, S.C., and Allen, D.G. (2010). Skeletal Muscle NADPH Oxidase Is Increased and Triggers Stretch-Induced Damage in the mdx Mouse. *PLoS One* *5*, e15354. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015354>.
- Whitehead, N.P., Kim, M.J., Bible, K.L., Adams, M.E., and Froehner, S.C. (2015). A new therapeutic effect of simvastatin revealed by functional improvement in muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 12864–12869. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509536112>.
- Willcocks, R.J., Forbes, S.C., Walter, G.A., Sweeney, L., Rodino-Klapac, L.R., Mendell, J.R., and Vandenborne, K. (2021). Assessment of rAAVrh.74.MHCK7.micro-dystrophin Gene Therapy Using Magnetic Resonance Imaging in Children With Duchenne Muscular Dystrophy. *JAMA Netw Open* *4*, e2031851. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.31851>.
- Willig, T.N., Carlier, L., Legrand, M., Rivière, H., and Navarro, J. (1993). Nutritional assessment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* *35*, 1074–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1993.tb07925.x>.
- Wilson, K., Faelan, C., Patterson-Kane, J.C., Rudmann, D.G., Moore, S.A., Frank, D., Charleston, J., Tinsley, J., Young, G.D., and Milici, A.J. (2017). Duchenne and Becker muscular dystrophies: a review of animal models, clinical endpoints, and biomarker quantification. *Toxicol Pathol* *45*, 961–976. <https://doi.org/10.1177/0192623317734823>.
- Wirth, T., Parker, N., and Ylä-Herttua, S. (2013). History of gene therapy. *Gene* *525*, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>.
- Wittlieb-Weber, C.A., Knecht, K.R., Villa, C.R., Cunningham, C., Conway, J., Bock, M.J., Gambetta, K.E., Lal, A.K., Schumacher, K.R., Law, S.P., *et al.* (2020). Risk Factors for Cardiac and Non-cardiac Causes of Death in Males with Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatr Cardiol* *41*, 764–771. <https://doi.org/10.1007/s00246-020-02309-y>.
- Woo, J.S., Kim, D.H., Allen, P.D., and Lee, E.H. (2008). TRPC3-interacting triadic proteins in skeletal muscle. *Biochemical Journal* *411*, 399–405. <https://doi.org/10.1042/BJ20071504>.
- Woo, J.S., Lee, K.J., Huang, M., Cho, C.-H., and Lee, E.H. (2014). Heteromeric TRPC3 with TRPC1 formed via its ankyrin repeats regulates the resting cytosolic Ca²⁺ levels in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *446*, 454–459. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.127>.
- Wu, Z., Yang, H., and Colosi, P. (2010). Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy* *18*, 80–86. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.255>.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1998). Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus. *J Virol* *72*, 2224–2232. .
- Xu, H., Ramsey, I.S., Kotecha, S.A., Moran, M.M., Chong, J.A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y., *et al.* (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* *418*, 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature00882>.
- Xu, H., Delling, M., Li, L., Dong, X., and Clapham, D.E. (2007). Activating mutation in a mucolipin transient receptor potential channel leads to melanocyte loss in varitint-waddler mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 18321–18326. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709096104>.

- Yan, Z., Zak, R., Zhang, Y., and Engelhardt, J.F. (2005). Inverted terminal repeat sequences are important for intermolecular recombination and circularization of adeno-associated virus genomes. *J Virol* 79, 364–379. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.364-379.2005>.
- Yang, S.L., Cao, Q., Zhou, K.C., Feng, Y.J., and Wang, Y.Z. (2009). Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. *Oncogene* 28, 1320–1328. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.475>.
- Yarotsky, V., and Dirksen, R.T. (2012). Temperature and RyR1 Regulate the Activation Rate of Store-Operated Ca²⁺ Entry Current in Myotubes. *Biophys J* 103, 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.06.001>.
- Yasuda, S., Townsend, D., Michele, D.E., Favre, E.G., Day, S.M., and Metzger, J.M. (2005). Dystrophic heart failure blocked by membrane sealant poloxamer. *Nature* 436, 1025–1029. <https://doi.org/10.1038/nature03844>.
- Yazaki, M., Yoshida, K., Nakamura, A., Koyama, J., Nanba, T., Ohori, N., and Ikeda, S. (1999). Clinical Characteristics of Aged Becker Muscular Dystrophy Patients with Onset after 30 Years. *ENE* 42, 145–149. <https://doi.org/10.1159/000008089>.
- Yeung, E.W., and Allen, D.G. (2004). STRETCH-ACTIVATED CHANNELS IN STRETCH-INDUCED MUSCLE DAMAGE: ROLE IN MUSCULAR DYSTROPHY. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31, 551–556. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04027.x>.
- Yiu, E.M., and Kornberg, A.J. (2008). Duchenne muscular dystrophy. *Neurology India* 56, 236. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.43441>.
- Ylä-Herttua, S. (2012). Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther* 20, 1831–1832. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.194>.
- Young, C.S., Mokhonova, E., Quinonez, M., Pyle, A.D., and Spencer, M.J. (2017). Creation of a Novel Humanized Dystrophic Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy and Application of a CRISPR/Cas9 Gene Editing Therapy. *J Neuromuscul Dis* 4, 139–145. <https://doi.org/10.3233/JND-170218>.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F., and Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 9, 636–645. <https://doi.org/10.1038/ncb1590>.
- Yuan, J.P., Kim, M.S., Zeng, W., Shin, D.M., Huang, G., Worley, P.F., and Muallem, S. (2009). TRPC channels as STIM1-regulated SOCs. *Channels* 3, 221–225. <https://doi.org/10.4161/chan.3.4.9198>.
- Yuasa, K., Ishii, A., Miyagoe, Y., and Takeda, S. (1997). [Introduction of rod-deleted dystrophin cDNA, delta DysM3, into mdx skeletal muscle using adenovirus vector]. *Nihon Rinsho* 55, 3148–3153. .
- Yuasa, K., Miyagoe, Y., Yamamoto, K., Nabeshima, Y., Dickson, G., and Takeda, S. (1998). Effective restoration of dystrophin-associated proteins in vivo by adenovirus-mediated transfer of truncated dystrophin cDNAs. *FEBS Lett* 425, 329–336. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00251-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00251-8).
- Zabłocka, B., Górecki, D.C., and Zabłocki, K. (2021). Disrupted Calcium Homeostasis in Duchenne Muscular Dystrophy: A Common Mechanism behind Diverse Consequences. *International Journal of Molecular Sciences* 22, 11040. <https://doi.org/10.3390/ijms222011040>.
- Zanou, N., Iwata, Y., Schakman, O., Lebacqz, J., Wakabayashi, S., and Gailly, P. (2009). Essential role of TRPV2 ion channel in the sensitivity of dystrophic muscle to eccentric contractions. *FEBS Letters* 583, 3600–3604. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.033>.
- Zanou, N., Shapovalov, G., Louis, M., Tajeddine, N., Gallo, C., Van Schoor, M., Anguish, I., Cao, M.L., Schakman, O., Dietrich, A., *et al.* (2010). Role of TRPC1 channel in skeletal muscle function. *Am J Physiol Cell Physiol* 298, C149–C162. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00241.2009>.
- Zeng, W., Yuan, J.P., Kim, M.S., Choi, Y.J., Huang, G.N., Worley, P.F., and Muallem, S. (2008). STIM1 gates TRPC channels but not Orai1 by electrostatic interaction. *Mol Cell* 32, 439–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.09.020>.

- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Zhang, X.H.-F., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K.A., and Cahalan, M.D. (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9357–9362. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603161103>.
- Zhang, X., Cheng, X., Yu, L., Yang, J., Calvo, R., Patnaik, S., Hu, X., Gao, Q., Yang, M., Lawas, M., *et al.* (2016). MCOLN1 is a ROS sensor in lysosomes that regulates autophagy. *Nat Commun* *7*, 12109. <https://doi.org/10.1038/ncomms12109>.
- Zhang, Z., Tang, J., Tikunova, S., Johnson, J.D., Chen, Z., Qin, N., Dietrich, A., Stefani, E., Birnbaumer, L., and Zhu, M.X. (2001). Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 3168–3173. <https://doi.org/10.1073/pnas.051632698>.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y. (2009). The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest* *119*, 2388–2398. <https://doi.org/10.1172/JCI37607>.
- Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1996). trp, a Novel Mammalian Gene Family Essential for Agonist-Activated Capacitative Ca²⁺ Entry. *Cell* *85*, 661–671. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81233-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81233-7).
- Zhu, X., Jiang, M., and Birnbaumer, L. (1998). Receptor-activated Ca²⁺ Influx via Human Trp3 Stably Expressed in Human Embryonic Kidney (HEK)293 Cells: EVIDENCE FOR A NON-CAPACITATIVE Ca²⁺ ENTRY*. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 133–142. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.133>.
- Zierler, S., Hampe, S., and Nadolni, W. (2017). TRPM channels as potential therapeutic targets against pro-inflammatory diseases. *Cell Calcium* *67*, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.002>.
- Zimmers, T.A., Davies, M.V., Koniaris, L.G., Haynes, P., Esquela, A.F., Tomkinson, K.N., McPherron, A.C., Wolfman, N.M., and Lee, S.-J. (2002). Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. *Science* *296*, 1486–1488. <https://doi.org/10.1126/science.1069525>.
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Molecular Therapy* *16*, 1073–1080. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.76>.
- Zitt, C., Zobel, A., Obukhov, A.G., Harteneck, C., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A., and Schultz, G. (1996). Cloning and Functional Expression of a Human Ca²⁺-Permeable Cation Channel Activated by Calcium Store Depletion. *Neuron* *16*, 1189–1196. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80145-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80145-2).
- Zucchi, R., and Ronca-Testoni, S. (1997). The Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Channel/Ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease States. *Pharmacol Rev* *49*, 1–52. .

Titre : Étude de stratégies thérapeutiques ciblant les anomalies calciques dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne

Mots clés : Dystrophie Musculaire de Duchenne, canaux Transient Receptor Potential, perméabilité calcique du sarcolemme, thérapie génique, microdystrophine

Résumé : La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie héréditaire létale. Elle est due à une absence d'expression de la dystrophine, conduisant à une dégénérescence musculaire progressive, pour laquelle il n'existe aucun traitement curatif. L'espérance de vie actuelle des patients DMD est de 20 à 40 ans, le décès étant causé par des complications cardio-respiratoires. Des essais cliniques en cours sont basés sur une approche de thérapie génique utilisant des AAVr-microdystrophine (AAVr-MD), qui permettraient de rapprocher le phénotype des patients DMD à celui d'une dystrophinopathie plus bénigne, la dystrophie musculaire de Becker (DMB). Si les résultats préliminaires de ces essais sont encourageants, la DMB reste une myopathie, avec une espérance de vie réduite. Il est donc important de développer des stratégies alternatives ou complémentaires aux traitements basés sur les AAVr-MD. Chez les patients DMD, comme dans les modèles animaux, la nécrose des cellules musculaires est induite par un influx accru de Ca^{2+} (SPCa), qui semble être liée à une dérégulation de l'activité et/ou de l'expression de

canaux ioniques, comme les canaux Transient Receptor Potential (TRP). Nous avons évalué l'implication des canaux TRPC1 et TRPC3 dans la pathogenèse de la DMD dans le muscle squelettique du rat *DMD^{mdx}*, un modèle animal qui mime la maladie DMD humaine. Nous avons démontré des augmentations précoces de $[Ca^{2+}]_c$ et de SPCa dans les fibres musculaires EDL des rats *DMD^{mdx}*, accompagnées d'une augmentation de l'expression du canal TRPC3. Nous avons également montré que l'augmentation de la SPCa chez les rats *DMD^{mdx}* est liée à un influx de Ca^{2+} sensible à Pyr10, un inhibiteur de TRPC3. L'expression de MD via l'injection d'un AAVr-MD ne prévient que partiellement ces altérations de l'homéostasie du Ca^{2+} , la surexpression de TRPC3, et le déclin de la force musculaire. TRPC3 représente donc une cible thérapeutique de choix pour le développement d'un traitement de la DMD, en complément à la thérapie génique AAVr-MD. Dans cet objectif, nous avons conçu des outils de thérapie géniques ciblant TRPC3 pour lutter contre les dérégulations calciques de la DMD.

Title : Therapeutic strategies targeting calcium abnormalities in Duchenne Muscular Dystrophy

Keywords : Duchenne Muscular Dystrophy, Transient Receptor Potential channels, sarcolemmal permeability to calcium, gene therapy, microdystrophin

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an inherited and fatal disease caused by the absence of dystrophin expression. It leads to progressive muscle degeneration, for which there is no curative treatment. The current life expectancy of DMD patients is 20 to 40 years with cardio-respiratory complications responsible for the death of the patients. Some clinical trials are underway for the evaluation of rAAV-microdystrophin (rAAV-MD) gene therapy products. The objective is to modify the phenotype of DMD patients closer to that of a more benign dystrophinopathy, Becker muscular dystrophy (BMD). If preliminary results are encouraging, BMD remains a myopathy and reduces the life expectancy of patients. Therefore, there is an urgent need to find alternative strategies to MD-based gene therapy. In DMD patients, as in animal models, muscle cell necrosis is induced by an increased flux of Ca^{2+} (SPCa). This may be based on deregulated activity and/or expression of ion channels, such as the

Transient Receptor Potential (TRP) channels. We assessed the involvement of TRPC1 and TRPC3 channels in the pathogenesis of DMD in skeletal muscle of the *DMD^{mdx}* rat, an animal model that mimics human DMD disease. We demonstrated early increases in $[Ca^{2+}]_c$ and SPCa in EDL muscle fibers of *DMD^{mdx}* rats compared to healthy rats. This was accompanied by an increase in TRPC3 expression in dystrophic rats. We also shown that the increase in SPCa in *DMD^{mdx}* rats is linked to an influx of Ca^{2+} sensitive to Pyr10, an inhibitor of TRPC3. Expression of MD via injection of rAAV-MD induces only partial prevention of alterations in Ca^{2+} homeostasis, overexpression of TRPC3, and muscle strength. TRPC3 thus represents a good therapeutic target for the development of a treatment for DMD, in addition to rAAV-MD gene therapy. With this goal, we designed gene therapy tools targeting TRPC3 to fight calcium dysregulation in DMD.