



HAL
open science

Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour modéliser les mécanismes physiopathologiques associés aux dystrophies musculaires des ceintures de type R2

Céline Bruge

► **To cite this version:**

Céline Bruge. Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour modéliser les mécanismes physiopathologiques associés aux dystrophies musculaires des ceintures de type R2. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL054 . tel-04838668

HAL Id: tel-04838668

<https://theses.hal.science/tel-04838668v1>

Submitted on 15 Dec 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.

Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour modéliser les mécanismes physiopathologiques associés aux dystrophies musculaires des ceintures de type R2

*Using human pluripotent stem cells derived skeletal muscles to address
the pathogenesis of limb girdle muscular dystrophy type R2*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577
Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)
Spécialité du doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Graduate School : Life Science and Health
Réfèrent : Université d'Evry Val d'Essonne

Thèse préparée dans l'Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des
maladies monogéniques (I-Stem, Université Paris-Saclay, Inserm), sous la direction du
Docteur Xavier NISSAN.

Thèse soutenue publiquement à Evry, le 24 octobre 2022, par

Céline BRUGE

Composition du Jury

Elisabeth PETIT-TEIXEIRA Professeure, GenHotel, Evry	Présidente
Marc BARTOLI Docteur, MMG, Marseille	Rapporteur & Examineur
Stéphane VASSILOPOULOS Docteur, UMR 974 / Centre de recherche en myologie, Paris	Rapporteur & Examineur
Pascale BOMONT Docteure, UMR 5261, Institut NeuroMyoGène, Lyon	Examinatrice
Nicolas LEVY Professeur, Chief scientist rare diseases, Servier	Examineur
Xavier NISSAN Docteur, I-Stem, Evry	Directeur de thèse

Titre : Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour modéliser les mécanismes physiopathologiques associés aux dystrophies musculaires des ceintures de type R2.

Mots clés : Dystrophies musculaires des ceintures, Cellules souches pluripotentes humaines induites, Muscle squelettique, Modélisation pathologique, Criblage à haut débit.

Résumé : Les dystrophies musculaires des ceintures (ou LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies) désignent un ensemble de maladies génétiques rares caractérisées par une atrophie et une faiblesse spécifique des muscles squelettiques du bassin (ceinture pelvienne) et des épaules (ceinture scapulaire). Parmi la trentaine de formes de LGMD identifiées, la LGMD R2 (ou anciennement LGMD 2B) est causée par une déficience en dysferline, due à des mutations du gène *DYSF*, qui est une protéine essentielle à la physiologie des muscles squelettiques. Depuis l'identification de la cause génétique sous-jacente à la LGMD R2 en 1998, des avancées majeures en termes de diagnostic, de compréhension physiopathologique et de développement de stratégies thérapeutiques ont été réalisées. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun traitement thérapeutique disponible sur le marché pour les patients, soulignant la nécessité d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la LGMD R2.

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse consistait à mettre en place les conditions expérimentales permettant la production de cellules musculaires squelettiques à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC) et à évaluer le potentiel de ce modèle cellulaire pour modéliser les LGMD. Grâce à un protocole robuste de différenciation myogénique, j'ai ainsi pu générer des populations homogènes et fonctionnelles de myoblastes et de myotubes exprimant la majorité des gènes et des protéines impliqués dans les LGMD et démontrer la fiabilité de ce modèle cellulaire à récapituler les phénotypes spécifiques à une LGMD, la LGMD R9.

Une fois ce nouveau modèle cellulaire caractérisé, le second objectif de ma thèse était d'identifier de nouvelles voies moléculaires régulées par la dysferline. Par une approche transcriptomique, j'ai ainsi identifié dans les myotubes dérivés de hiPSC de patients LGMD R2 une dérégulation du niveau d'expression de Disabled-2 (*Dab2*), un adaptateur de l'endocytose médiée par les clathrines. Dans l'ensemble, les résultats démontrent que *Dab2* est inversement régulé par les niveaux de dysferline. *Dab2* étant impliqué dans la régulation de l'internalisation du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLr) et de l'absorption des LDL riches en cholestérol, nous avons alors émis l'hypothèse que sa dérégulation pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la LGMD R2, et plus particulièrement dans l'homéostasie défectueuse du cholestérol chez les patients. Au-delà de l'étude de ce processus moléculaire fondamental d'endocytose du cholestérol, ce projet pourrait ouvrir une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement de la LGMD R2 en modulant l'homéostasie du cholestérol à l'aide de nouveaux outils génétiques ou d'une pharmacologie facilement accessible.

En parallèle, au cours de ma thèse, j'ai développé un autre projet visant à empêcher pharmacologiquement la dégradation des formes mal conformées mais fonctionnelles de la dysferline. C'est notamment le cas de la mutation faux-sens L1341P de la dysferline qui conduit à un mauvais repliement de la protéine, son agrégation dans le réticulum endoplasmique et sa dégradation ultérieure par l'ERAD (endoplasmic reticulum-associated protein degradation machinery). Dans ce programme de recherche translationnelle, l'effet de 2239 médicaments repositionnables a été évalué sur l'expression et la localisation de ce variant de la dysferline, aboutissant à l'identification de deux inducteurs d'autophagie, le saracatinib et le bazédoxifène comme médicaments candidats. Au-delà de l'identification d'une nouvelle option thérapeutique pour les patients atteints de LGMD R2, nos résultats mettent en lumière une procédure réutilisable pour évaluer l'effet de milliers de médicaments repositionnables sur des troubles musculaires similaires causés par des mutations faux-sens dégradées par l'ERAD.

Title : Using human pluripotent stem cells derived skeletal muscles to address the pathogenesis of limb girdle muscular dystrophy type R2.

Keywords : Limb girdle muscular dystrophies, Human induced pluripotent stem cells, Skeletal muscle cells, Disease modeling, High throughput screening.

Abstract : Limb Girdle Muscular Dystrophies (LGMD) refer to a genetically heterogeneous group of autosomal inherited muscular dystrophies characterized by a progressive muscle weakness and wasting of the shoulder or pelvic girdles. Among them, LGMD R2 (or formerly LGMD 2B) is caused by mutations in the *DYSF* gene leading to a deficiency of dysferlin, a protein essential to skeletal muscle physiology. Since the identification of the genetic cause underlying LGMD R2 in 1998, major advances in diagnosis, pathophysiological understanding and development of therapeutic strategies have been performed. Nevertheless, no curative treatment is currently available for patients, highlighting the need to decipher the molecular mechanisms associated to LGMD R2.

In this context, the first objective of my thesis was to set up the experimental conditions allowing the production of skeletal muscle cells from human induced pluripotent stem cells (hiPSC) and to evaluate the potential of this cellular model to model LGMD. Thanks to a robust myogenic differentiation protocol, I generated homogeneous and functional populations of myoblasts and myotubes expressing the majority of genes and proteins involved in LGMD, and demonstrated the reliability of this cellular model to recapitulate the phenotypes associated to the LGMD R2 subtype.

Once this new cellular model was characterized, the second objective of my thesis was to identify new molecular pathways regulated by dysferlin. Using a transcriptomic approach, I identified in hiPSC-derived myotubes from LGMD R2 patients a deregulation of the expression level of Disabled-2 (Dab2), an adaptor of clathrin-mediated endocytosis. Overall, the results demonstrate that Dab2 is inversely regulated by dysferlin levels. Because Dab2 is involved in the regulation of low-density lipoprotein receptor (LDLr) internalization and cholesterol-rich LDL uptake, we then hypothesized that its deregulation might be involved in the pathophysiology of LGMD R2, and more specifically in the defective cholesterol homeostasis in patients. Beyond the study of this fundamental molecular process of cholesterol endocytosis, this project could open a new therapeutic avenue for the treatment of LGMD R2 by modulating cholesterol homeostasis using new genetic tools or readily available pharmacology.

In parallel, I developed during my thesis another project aiming at pharmacologically preventing the degradation of misfolded but functional forms of dysferlin. This is the case of the L1341P missense mutation of dysferlin which leads to misfolding of the protein, its aggregation in the endoplasmic reticulum and its subsequent degradation by the ERAD (endoplasmic reticulum-associated protein degradation machinery). In this translational research program, the effect of 2239 repositionable drugs was evaluated on the expression and localization of this dysferlin variant, leading to the identification of two autophagy inducers, saracatinib and bazedoxifene, as drug candidates. Beyond identifying a new therapeutic option for LGMD R2 patients, our results highlight a reusable procedure to evaluate the effect of thousands of repurposable drugs on similar muscle disorders caused by ERAD degraded missense mutations.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de doctorat, le Dr. Marc Bartoli et le Dr. Stéphane Vassilopoulos pour leur contribution en tant que rapporteurs, le Pr. Elisabeth Petit-Teixeira, le Dr. Pascale Bomont et le Dr. Nicolas Lévy qui ont également jugé ces travaux en tant qu'examineurs. Je tiens à remercier particulièrement Marc pour avoir suivi ce projet tout au long de ma thèse, pour ses conseils avisés, ainsi que pour son accueil chaleureux à Marseille le temps de quelques réparations membranaires avec Océane.

Je remercie mon directeur de thèse, Xavier Nissan, pour m'avoir accordé sa confiance dès mon arrivée dans l'équipe en tant qu'ingénieure et de m'avoir ensuite donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Merci d'avoir toujours cru en moi. Tu as participé à mon épanouissement scientifique en me laissant une grande liberté dans la gestion de mon projet, même s'il fallait parfois que tu coupes quelques branches à mon arbre des hypothèses. Merci d'avoir su te rendre disponible et d'avoir été à l'écoute quand j'en avais besoin. Enfin, un grand merci pour ton aide et la correction de ce manuscrit de thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de Marc Peschanski qui m'a accueillie au sein de la grande famille d'I-stem depuis maintenant cinq années. Merci de m'avoir permis de travailler dans un environnement scientifique privilégié.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué aux avancées de ce projet de recherche. Merci tout d'abord à Isabelle Richard pour son expertise dans les myopathies des ceintures et le temps qu'elle a consacré à la relecture des articles. Un merci tout particulier à Nathalie Bourg-Alibert pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci à Vincent Mouly et à Simone Spuler de m'avoir donné accès, respectivement, aux différentes lignées de myoblastes immortalisés ainsi qu'aux modèles cellulaires récapitulant l'agrégation des protéines mal conformées. Merci à Gorka Fernandez de m'avoir permis de travailler sur des biopsies musculaires de patients. Mes remerciements s'adressent également à Stéphane Vassilopoulos pour ses conseils avisés sur les voies complexes de l'endocytose.

Les plateformes d'I-Stem ont également été d'un soutien continu dans le développement de ce projet. Je souhaite remercier Karine et Lina pour leur expertise de stabilité génomique. Un clin d'oeil particulier à Karine pour m'avoir soutenue dans mes galères de milieux et pour avoir été un binôme sans faille pour les produire à quatre mains, à l'échelle industrielle! Merci également à tous les membres de la plateforme de bioproduction de m'avoir permis de robotiser mes différenciations myogéniques. Merci Lise d'avoir relevé que mes progéniteurs ressemblaient à des oeufs au plat et merci Léa pour nos questions existentielles autour du cytomètre. Je remercie la plateforme NGS pour les nombreuses analyses de transcriptome. Merci Margot de m'avoir fait recompter un nombre incalculable de fois mes myotubes et de m'avoir accompagné dans la complexité du single cell. Merci Hélène pour ta gentillesse et ta

patience quand je ne comprenais pas un seul mot de R. Par ailleurs, mon projet ne serait pas ce qu'il est sans la plateforme d'imagerie. Merci Céline pour ta bonne humeur. Merci Jérôme pour ta patience sans limite à développer mes macros d'analyse. Enfin, mes remerciements vont à la plateforme HTS. Gurvan, tes goûts musicaux, parfois étranges, me manquent. Jo, merci de m'avoir initié au criblage de petites molécules dans une ambiance de folie.

La réussite de ce projet de thèse revient également à tous les membres de l'équipe LGMD qui ont été un réel soutien pour moi durant toutes ces années. Lucile, merci de m'avoir accompagné dans ce projet, tu as été un réel modèle de bienveillance. Merci Manon d'avoir été là dans les moments un peu plus difficiles. Merci pour nos discussions de commères et ton rire communicatif. Emilie, mon binôme Dysferline, merci pour ton sourire et ta bonne humeur permanente. Et, bien sûr, merci aux nouveaux qui ont récemment rejoint l'équipe. Petite Lucille, Noëlla et Quentin. Bon courage les filles pour la thèse, vous allez y arriver! Bon courage Quentin pour supporter six filles...

Jackie, mon rayon de soleil, ma combattante, j'aurai aimé partager la fin de ma thèse avec toi mais les anges ont préféré te rappeler à eux. Grâce à toi j'ai découvert qu'une discussion qui devait durer 5 minutes pouvait se transformer en une heure. Ta voix, ton rire et sourire contagieux me manquent.

Les filles en or, comme aimé le dire Jackie, je ne vous ai pas oubliées: Johana, Laure, Céline, Claire, Karine et Léa. Vous avez su faire de cette période éprouvante et pleine de doutes, des moments remplis de joie. Merci pour les fous rires, les danses endiablées, les cours de sport, les restos, les soirées... Vous êtes tout simplement formidables, ne changez rien! Un remerciement particulier à Jo, ma binôme de U qui est devenue une copine pour la vie. Merci pour ton oreille attentive et d'avoir toujours su trouver les mots justes. Tu as été un soutien sans faille dans cette aventure. Merci pour ta bonne humeur et ne baisse pas les bras, tu es une future docteure qui déchire!!!

Eren et Sabrina, le duo gagnant! Merci de m'avoir fait rire chaque jour de ma thèse, ne serait-ce qu'en échangeant un regard au travers d'un couloir. Eren, la vie au labo n'est plus la même sans toi. Merci d'être resté tard le soir au bureau pour me soutenir dans la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du laboratoire que j'ai pu côtoyer de près ou de loin au cours de cette aventure. Vous avez tous contribué, par votre présence, votre soutien et votre aide, à l'aboutissement de cette thèse. Merci Sandra et Annabelle d'avoir été présentes toutes ces années, de m'avoir soutenue dans toutes mes péripéties. Merci Michel, mon mentor CRISPR, d'avoir rebaptisé mon projet Dab2 en 2Bad (too bad). Même si je n'ai pas toujours les sous-titres pour comprendre ta vision de la biologie moléculaire, tu as été un allié de taille pour mes constructions plasmidiques.

Merci également à tous mes amis, qui ont toujours répondu présent au cours de ces dernières années. Je remercie en particulier Emmanuelle et Anne Claire, mes copines d'enfance et de

coeur, de m'avoir toujours accompagnée. Gaetan, tu es sûrement arrivé au moment le plus dur de la thèse. Merci de m'avoir encouragée et de m'avoir permis de rédiger dans le calme, sans mon terrible lion, le dénommé Spirou.

Enfin, le dernier, mais le plus important remerciement est adressé à ma famille. J'aimerai remercier ma soeur Elodie, mon frère Benjamin et ma belle-soeur Adeline pour leur soutien. Merci à mes neveux, Hayden et James, et ma nièce Elyne. Je suis tellement fière d'être votre tata. Merci à ma grand-mère Christiane pour son amour. Merci à mes parents, d'avoir toujours cru en moi, peu importe mes choix. Merci pour votre confiance et merci de m'avoir nourrie avec des beignets, des brownies et des cookies pendant la rédaction.

Merci pour tout.

* * *

“ Il est une chose admirable qui surpasse toujours la connaissance, l'intelligence, et même le génie, c'est l'incompréhension. ”

L'Anomalie, Hervé Le Tellier.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	7
Table des matières	13
Index des figures	16
Index des tableaux	18
Abréviations	19
Introduction	
Chapitre 1 : Les dystrophies musculaires	23
1. <i>Le muscle squelettique</i>	23
1.1. La structure et l'organisation du muscle squelettique.....	23
1.1.1. L'anatomie du muscle squelettique	23
1.1.2. La structure de la fibre musculaire squelettique.....	24
1.2. L'ontogenèse du muscle squelettique : du développement des fibres à leur régénération	26
1.2.1. La genèse des fibres musculaires	26
1.2.2. La plasticité du muscle squelettique	28
1.2.3. La régénération du muscle squelettique	29
1.3. Les myopathies : les maladies du muscle squelettique	30
2. <i>Les dystrophies musculaires</i>	31
2.1. Les formes de dystrophies musculaires	32
2.2. Les dystrophies musculaires des ceintures	33
Chapitre 2 : Les dysferlinopathies	37
1. <i>Les symptômes et formes associés aux dysferlinopathies</i>	37
1.1. La myopathie de Miyoshi	38
1.2. La dystrophie musculaire des ceintures de type R2	39
1.3. Les formes rares et atypiques de dysferlinopathie	39
1.4. Les dysferlinopathies, une pathologie unique	40
2. <i>Les atteintes musculaires et l'établissement du diagnostic</i>	41
2.1. L'examen clinique.....	41
2.2. L'évaluation musculaire	42
2.3. Le diagnostic génétique	44
3. <i>Les bases génétiques et moléculaires des dysferlinopathies</i>	45
3.1. La structure du gène <i>DYSF</i> et ses transcrits	45
3.2. Les mutations du gène <i>DYSF</i> : une absence de corrélation génotype-phénotype.....	46
4. <i>La dysferline</i>	48
4.1. La structure modulaire de la dysferline	48
4.2. L'expression et la distribution de la dysferline.....	50
4.3. La localisation de la dysferline	50
5. <i>Les modèles d'étude des dysferlinopathies</i>	51
5.1. Les modèles animaux naturels	51
5.2. Les modèles animaux génétiquement modifiés	52
5.3. Les modèles cellulaires.....	54

6.	<i>Les partenaires et les fonctions de la dysferline dans le muscle squelettique</i>	55
6.1.	Le trafic vésiculaire et la réparation membranaire	55
6.2.	La croissance, la différenciation et la régénération musculaire	61
6.3.	La formation des tubules-t et la stabilisation des triades	62
6.4.	L'inflammation	64
6.5.	Le métabolisme lipidique	64
Chapitre 3 : Les stratégies thérapeutiques des dysferlinopathies		66
1.	<i>Les approches pharmacologiques</i>	67
1.1.	Les approches symptomatiques	67
1.1.1.	Réduire la dégénérescence musculaire	67
1.1.2.	Empêcher l'altération de la fibre musculaire	69
1.2.	Restaurer l'expression de la dysferline	70
1.2.1.	La modulation des voies de dégradation	70
1.2.2.	Le développement de chaperons pharmacologiques	72
2.	<i>La thérapie cellulaire</i>	74
2.1.	L'utilisation des myoblastes	75
2.2.	Le transfert de cellules souches adultes	75
2.3.	L'utilisation des cellules souches pluripotentes	76
3.	<i>La thérapie génique</i>	77
3.1.	Les différentes stratégies de thérapie génique	77
3.2.	Les différents vecteurs d'administration	78
3.3.	La thérapie génique par le remplacement de gène	78
3.3.1.	Le transfert du gène <i>DYSF</i> pleine longueur par concatémérisation de vecteurs AAV	79
3.3.2.	Le transfert de mini gène	81
3.3.3.	La thérapie compensatoire	83
3.4.	La thérapie génique par modification d'ARN	84
3.4.1.	Le saut d'exon	84
3.4.2.	Le trans-épissage	86
3.4.3.	La translecture de codon stop	87
3.5.	La thérapie génique par l'édition de gène	88
Chapitre 4 : Les cellules souches pluripotentes humaines		92
1.	<i>Les propriétés des cellules souches pluripotentes</i>	92
2.	<i>Les différentes sources de cellules souches pluripotentes</i>	92
2.1.	Les cellules souches embryonnaires	93
2.1.1.	L'origine des cellules souches embryonnaires	93
2.1.2.	Le diagnostic préimplantatoire	94
2.1.3.	Les lois de bioéthique et les réglementations relatives à l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines : cadre législatif français	94
2.2.	Les cellules souches induites à la pluripotence	95
2.2.1.	L'acquisition de l'identité cellulaire : un processus réversible	95
2.2.2.	Les méthodes de reprogrammation	96
2.2.3.	L'évolution des méthodes de vectorisation	99
2.2.4.	Les lois de bioéthique et les réglementations relatives à l'utilisation des cellules souches humaines induites à la pluripotence : cadre législatif français	101
3.	<i>Les caractéristiques des cellules souches pluripotentes humaines</i>	101
3.1.	Les facteurs clés de la pluripotence	101
3.2.	Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la pluripotence	103
3.3.	Le potentiel de différenciation des cellules souches pluripotentes	105
3.3.1.	La différenciation guidée	106
3.3.2.	La surexpression de facteurs de transcription	107
4.	<i>Les enjeux et applications biomédicales des cellules souches pluripotentes</i>	109
4.1.	La thérapie cellulaire : de la greffe allogénique à la greffe autologue	109
4.2.	La modélisation pathologique : comprendre les causes de la maladie	111

4.2.1.	La pertinence du modèle cellulaire	112
4.2.2.	La génération de modèles pathologiques	113
4.2.3.	Les différentes stratégies de modélisation	113
5.	<i>L'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour la modélisation des LGMD</i>	114
5.1.	La différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules musculaires squelettiques	114
5.1.1.	La reprogrammation directe	115
5.1.2.	La différenciation dirigée.....	116
5.2.	La contribution de la modélisation pathologique dans l'étude des LGMD	118
 Travaux de recherche		
Problématique & démarches expérimentales.....		123
Résultats		125
<i>PARTIE 1 : Mise en place d'un protocole de dérivation de cellules musculaires squelettiques à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence.</i>		<i>125</i>
<i>PARTIE 2 : Identification de nouveaux mécanismes moléculaires associés à une déficience primaire des cellules musculaires en dysferline.....</i>		<i>147</i>
<i>PARTIE 3 : Mise en place d'un modèle pharmacologique de la LGMD R2 afin d'identifier des molécules capables d'empêcher la dégradation des formes mal conformées mais fonctionnelles de la dysferline.</i>		<i>175</i>
 Discussion & conclusion		
Discussion générale		207
Conclusion		227
 Annexes		
Annexe 1		231
Annexe 2		249
Annexe 3		271
Références bibliographiques		279

INDEX DES FIGURES

Figure 1. L'organisation générale du muscle squelettique.....	24
Figure 2. La structure macroscopique du muscle strié squelettique.....	25
Figure 3. L'organisation des triades du muscle squelettique.....	26
Figure 4. La myogenèse embryonnaire et de la régénération musculaire.....	27
Figure 5. La régénération du muscle squelettique après une blessure aiguë.....	29
Figure 6. La distribution des principaux muscles affectés selon le type de dystrophie musculaire.....	33
Figure 7. Les principales protéines impliquées dans les dystrophies musculaires des ceintures.....	35
Figure 8. Les principaux muscles touchés dans la myopathie de Miyoshi.....	38
Figure 9. Les principaux muscles touchés dans la LGMD R2.....	39
Figure 10. Les caractéristiques cliniques des dysferlinopathies.....	42
Figure 11. Examen du tissu musculaire des patients atteints de dysferlinopathie.....	43
Figure 12. Les transcrits du gène DYSF.....	46
Figure 13. Cartographie des principales mutations pathogènes de DYSF répertoriées.....	47
Figure 14. La structure modulaire de la dysferline.....	49
Figure 15. Le processus de réparation membranaire des cellules musculaires.....	58
Figure 16. Le mécanisme d'endocytose est impliqué dans la réparation du sarcolemme.....	60
Figure 17. Proposition d'un modèle de fusion des myoblastes.....	62
Figure 18. La participation de la dysferline à la formation des tubules-t et à l'homéostasie calcique.....	63
Figure 19. Les stratégies thérapeutiques des dysferlinopathies.....	66
Figure 20. La modulation des voies de dégradation des protéines mal conformées.....	72
Figure 21. Le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques.....	73
Figure 22. Les cellules candidates pour la thérapie cellulaire du muscle squelettique.....	74
Figure 23. Le transfert du gène DYSF pleine longueur par concatémérisation de vecteurs AAV.....	79
Figure 24. Le transfert de mini gène DYSF.....	82
Figure 25. Les exons du gène DYSF pouvant être ciblés par la stratégie du saut d'exon.....	85
Figure 26. Les techniques de trans-épissage d'un pré-ARN messenger de la dysferline.....	86
Figure 27. La translecture de codon stop.....	88
Figure 28. Description de la première semaine du développement embryonnaire humain.....	93
Figure 29. Acquisition de l'identité cellulaire.....	96
Figure 30. La reprogrammation par transfert nucléaire.....	96
Figure 31. La reprogrammation par fusion cellulaire.....	97
Figure 32. La reprogrammation par transduction de facteurs de reprogrammation.....	98
Figure 33. Evolution des méthodes de vectorisation pour la reprogrammation des cellules somatiques.....	100
Figure 34. Le réseau de régulation transcriptionnelle de la pluripotence.....	102
Figure 35. Les voies de signalisation impliquées dans le maintien de la pluripotence ou de la différenciation des cellules souches pluripotentes.....	104
Figure 36. La différenciation guidée des cellules souches pluripotentes.....	106
Figure 37. La spécification des cellules souches pluripotentes par la surexpression de facteurs de transcription.....	108
Figure 38. Les applications biomédicales des cellules souches pluripotentes.....	109
Figure 39. Description des stratégies de thérapie cellulaire autologues et allogéniques avec les cellules souches pluripotentes humaines.....	110
Figure 40. Description de la stratégie de modélisation pathologique avec les cellules souches humaines induites à la pluripotence.....	112
Figure 41. Comparaison des approches de différenciation des cellules souches pluripotentes en muscles squelettiques.....	115
Figure 42. Caractérisation de la pluripotence des lignées hiPSC contrôles et LGMD R2.....	148
Figure 43. Différenciation et caractérisation des skMC dérivées de hiPSC contrôles et LGMD R2.....	149
Figure 44. Caractérisation phénotypique des skMC dérivées de hiPSC LGMD R2.....	151
Figure 45. Analyse transcriptomique comparative des skMt contrôles et LGMD R2.....	153
Figure 46. Identification d'un gène, Disabled-2 (dab2), régulé à la hausse dans les biopsies musculaires et les skMt dérivés de hiPSC.....	155
Figure 47. Régulation de l'expression de dab2 in vivo.....	157
Figure 48. L'expression de dab2 est inversement régulée à celle de la dysferline.....	159

<i>Figure 49. Régulation de l'expression de dab2 dans des biopsies musculaires de patients atteints de dysferlinopathie.</i>	<i>161</i>
<i>Figure 50. Accumulation de gouttelettes lipidiques dans les skMt dérivés de hiPSC LGMD R2.</i>	<i>163</i>
<i>Figure 51. Le marché du médicament.</i>	<i>208</i>
<i>Figure 52. Le processus de découverte et de développement des médicaments.</i>	<i>209</i>
<i>Figure 53. Les principales stratégies de repositionnement d'un médicament.</i>	<i>210</i>

INDEX DES TABLEAUX

<i>Tableau 1. Liste des myopathies acquises et héréditaires les plus courantes.</i>	31
<i>Tableau 2. Nomenclature et classification des LGMD.</i>	34
<i>Tableau 3. Les principaux modèles animaux naturels de dysferlinopathies.</i>	51
<i>Tableau 4. Les principaux modèles animaux génétiquement modifiés de dysferlinopathies.</i>	53
<i>Tableau 5. Résumé des protocoles de différenciation de cellules musculaires à partir de cellules souches pluripotentes.</i>	117
<i>Tableau 6. Liste des amorces humaines utilisées pour la PCR quantitative.</i>	168
<i>Tableau 7. Liste des amorces murines utilisées pour la PCR quantitative.</i>	172

ABREVIATIONS

AAV: adeno associated virus	ESC: embryonic stem cell
α -DG: alpha dystroglycan	FAP: fibro-adipogenic progenitors
ADN: acide désoxyribonucléique	FDA: food drug administration
ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire	FGF: fibroblast growth factor
AMPK: AMP-activated protein kinase	FGF2: basic fibroblast growth factor
AON: antisense oligonucleotide	FIV: fécondation <i>in vitro</i>
ARH: autosomal recessive hypercholesterolemia	FSHD: facioscapulohumeral muscular dystrophy
ARN: acide ribonucléique	Gal-1: galectin-1
ARNm: acide ribonucléique messenger	GLU: glutéal
ASC: adipose-derived stem cells	GSK3: glycogen synthase kinase 3
α -SG: alpha sarcoglycan	H&E: hématoxyline/éosine
ASM: acid sphingomyelinase	HCS: high-content screening
bFGF: basic fibroblast growth factor	HDAC: histone deacetylase inhibitor
BIN1: bridging integrator 1	HDL: high-density lipoprotein
BMD: Becker muscular dystrophy	HDR: homology directed repair
Bp: base pair	hESC: human embryonic stem cell
BSA: bovine serum albumin	HGF: hepatocyte growth factor
Cas9: CRISPR associated protein 9	hiPSC: human induced pluripotent stem cell
CCP: clathrin coated pit	HPS: hémalum, phloxine, safran
CDK4: cyclin-dependent kinase 4	HSV: herpes simplex virus
CERFE: centre pour l'exploration et la recherche fonctionnelle expérimentale	hTert: human telomerase reverse transcriptase
CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	HTS: high-throughput screening
CMD: congenital muscular dystrophy	HUCB: human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells
CME: clathrin-mediated endocytosis	IGF1: insulin-like growth factor-1
CPK: phosphocreatine kinase	iPSC: induced pluripotent stem cell
CPN: calpaïne	iPSC-CM: induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes
CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeats	IRM: imagerie par résonance magnétique
CSM: cellule souche mésenchymateuse	ITR: inverted terminal repeat
CSP: cellule souche pluripotente	Kb: kilobase
Dab2: disabled-2	KLF4: Krüppel-like factor 4
DEG: differentially expressed genes	LDL: low-density lipoprotein
DG: dystroglycan	LDLR: low-density lipoprotein receptor
DHPR: dihydropyridine receptor	LGMD: limb girdle muscular dystrophy
DIA: diaphragm	MAB: mésoangioblaste
DMD: Duchenne muscular dystrophy	MCI: masse cellulaire interne
DMSO: diméthylsulfoxyde	MD: muscular dystrophy
DPI: diagnostic pré-implantatoire	MEC: matrice extracellulaire
EDMD: Emery-Dreifuss muscular dystrophy	mFISH: multicolor fluorescence in situ hybridization
EDTA: acide éthylènediaminetétraacétique	MG53: mitsugumin 53
EGF: epidermal growth factor	MM: Miyoshi myopathy
EMA: European medicines agency	MMD: myotonic muscular dystrophy
EOPS: exempt d'organisme pathogène spécifique	mTOR: mammalian target of rapamycine
ERAD: endoplasmic reticulum-associated protein degradation	MuCS: muscle satellite cell
	Myf5: myogenic factor 5
	MyoD: myoblast determination protein 1

MyoG: myogénine
NGS: next-generation sequencing
NHEJ: non-homologous end-joining
NMD: nonsense mediated mRNA decay
OCT3/4: octamer-binding transcription factor 3/4
OPMD: oculopharyngeal muscular dystrophy
PBMC: peripheral blood mononuclear cell
PBS: phosphate-buffered saline
PCA: principal component analysis
PCR: polymerase chain reaction
PDGF: platelet-derived growth factor
PI3K: phosphatidylinositol 3- kinase
PMA: procréation médicalement assistée
PMR: plasma membrane repair
PSMN: pôle scientifique de modélisation numérique
PSO: psoas
PTC: premature termination codon
PTM: pre-mRNA trans-splicing molecule
RyR: ryanodine receptor
SERM: selective estrogen receptor modulator
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA
skMb: skeletal myoblast
skMC: skeletal muscle cell
skMt: skeletal myotube
SMA: amyotrophie spinale
SMaRT: spliceosome mediated RNA trans-splicing
SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SNP: single nucleotide polymorphisms
SOX2: sex determining region Y-box 2
SSEA-3/4: stage-specific embryonic antigen 3/4
SVF: sérum de veau foetal
Ta: muscle tibial antérieur
TALEN: transcription activator-like effector nuclease
Tfn: transferrin
TfnR: transferrin receptor
TGF- β : transforming growth factor beta
TNN: troponine
TRA-1-60/81: tumor rejection antigen 60/81
TRI: triceps
TTN: titine
Tubule-t: tubule transverse
VUS: variant of uncertain significance
ZFN: zinc finger nuclease
4-PBA: 4-Phenylbutyric acid

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : LES DYSTROPHIES MUSCULAIRES

Les dystrophies musculaires sont des maladies rares d'origine génétique qui affectent le muscle squelettique. Elles se manifestent par une faiblesse et une dégénérescence progressive des muscles, entraînant ainsi une perte de mobilité, des difficultés respiratoires et, dans la plupart des cas, un décès prématuré. Les dystrophies musculaires ne touchent généralement pas le système nerveux central ou les nerfs périphériques (bien que certaines le fassent), malgré la relation anatomique étroite entre le muscle squelettique et les nerfs, mais elles peuvent affecter le cœur et d'autres organes.

1. Le muscle squelettique

Chez l'Homme, le muscle squelettique représente environ 40% du poids total du corps et contient 50 à 75% des protéines totales (Frontera and Ochala, 2015). Il se distingue des deux autres tissus musculaires de l'organisme, le muscle lisse et le cardiaque, par le fait qu'il est contrôlé par le système nerveux somatique qui lui permet une contraction et un mouvement volontaire. D'un point de vue mécanique, le muscle squelettique assure la motricité de l'organisme (locomotion, mouvement, posture, etc..) grâce à des caractéristiques fonctionnelles d'excitabilité, de contractilité, d'élasticité et d'extensibilité. D'un point de vue métabolique, il constitue un réservoir de glycogène et d'acides aminés nécessaires à son propre fonctionnement mais aussi à celui d'autres tissus (Wolfe, 2006).

1.1. La structure et l'organisation du muscle squelettique

1.1.1. L'anatomie du muscle squelettique

Le muscle squelettique présente une organisation anatomique et cellulaire particulière (Mukund and Subramaniam, 2020) ([Figure 1](#)). Il est composé de plusieurs fibres musculaires alignées longitudinalement et reliées à leurs extrémités aux tendons, formant ainsi des jonctions myotendineuses qui relient les muscles aux os. A l'intérieur de chaque muscle, les faisceaux de fibres forment les fascicules et les faisceaux de fascicules constituent le tissu musculaire. Chaque couche est rendue solidaire par des enveloppes de tissu conjonctif :

- (i) L'endomysium, essentiellement composé de collagène et de fibres réticulaires, entoure la matrice extracellulaire (MEC) des fibres musculaires. Il permet à ces dernières d'être solidaires entre elles au sein de chaque fascicule ;
- (ii) Le périmysium entoure chaque fascicule ;
- (iii) L'épimysium permet d'envelopper le muscle entier dans une gaine épaisse de tissu conjonctif.

Le muscle squelettique est également irrigué par un réseau de vaisseaux sanguins, permettant un apport en nutriments et en oxygène, et innervé par les motoneurones (cellule nerveuse spécialisée dans la commande des mouvements) pour la transmission des impulsions électriques.

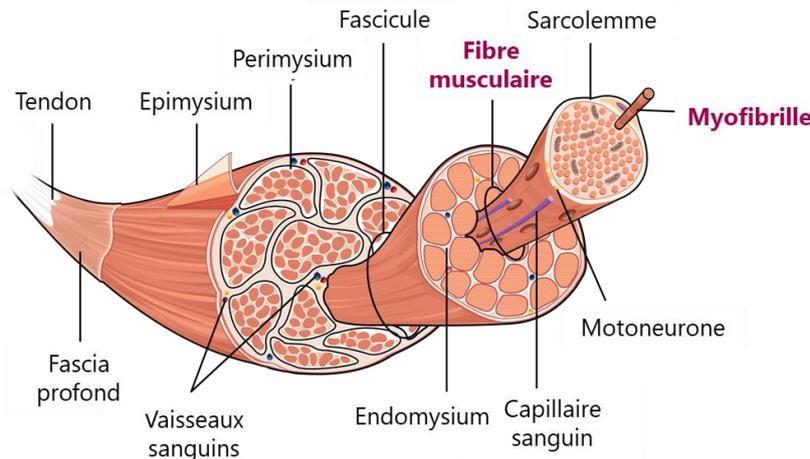


Figure 1. L'organisation générale du muscle squelettique.

Adapté de l'université de l'Etat d'Oregon.

1.1.2. La structure de la fibre musculaire squelettique

La fibre musculaire, également appelée myofibre ou myocyte, est une cellule longue et cylindrique délimitée par une membrane plasmique (sarcolemme) et qui contient plusieurs noyaux post-mitotiques dans un cytoplasme (sarcoplasme) large et continu. Chaque fibre musculaire est composée de deux parties :

- (i) Une composante contractile permettant la contraction et le mouvement du muscle : les myofibrilles. Il s'agit d'assemblages longitudinaux de sarcomères donnant au muscle son aspect strié au microscope.
- (ii) Une composante non contractile servant de support à l'activité contractile : les organites intracellulaires.

La myofibrille

La myofibrille est l'unité de base de la contraction musculaire (Figure 2). Elle est constituée d'une succession de segments, appelés sarcomères, délimités à leurs extrémités par une strie Z. Ces sarcomères sont principalement constitués de deux types de myofilaments parallèles qui se chevauchent et s'interconnectent pour permettre le raccourcissement ou le relâchement de la fibre musculaire en réponse à un signal neuronal :

- (i) Les myofilaments fins, principalement constitués d'actine ;
- (ii) Les myofilaments épais, principalement constitués de myosine.

Des protéines régulatrices, à savoir les troponines C, I, T et la tropomyosine, sont associées aux myofilaments d'actine et jouent un rôle clé dans le mécanisme de glissement des myofilaments. La titine et la nébuline sont également d'autres protéines majeures du sarcomère qui contribuent aux propriétés mécaniques du muscle (Granzier and Labeit, 2004; Ottenheim and Granzier, 2010).

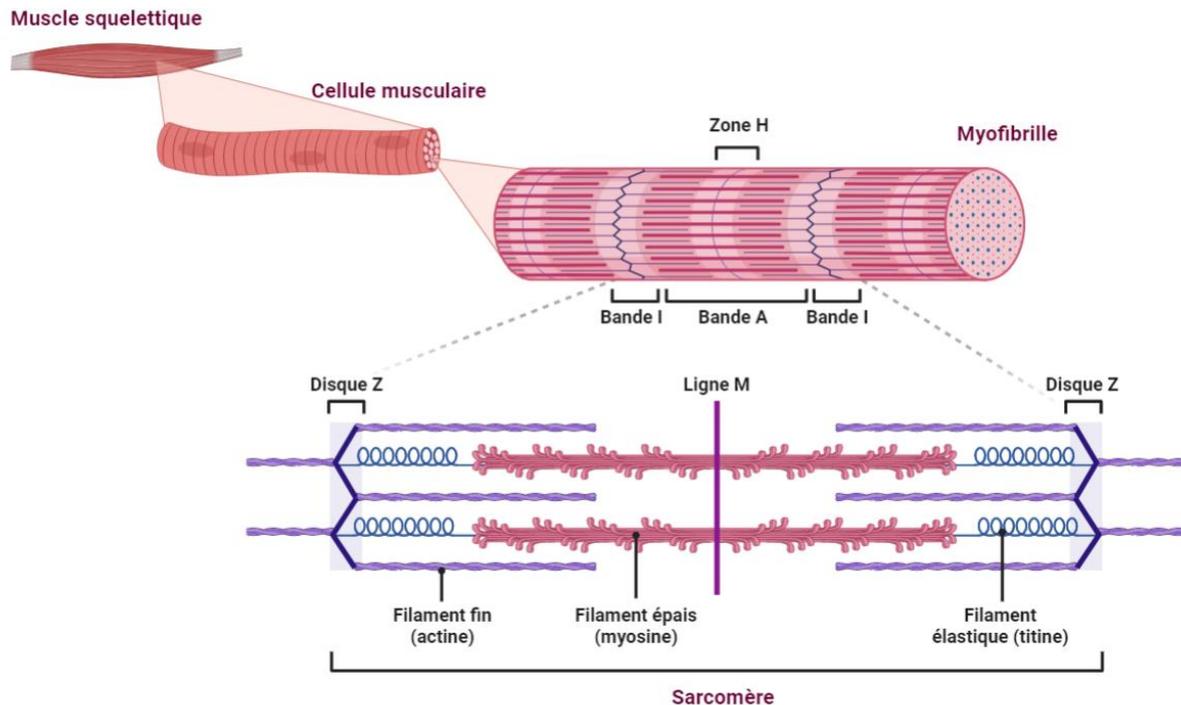


Figure 2. La structure macroscopique du muscle strié squelettique.

La fibre musculaire contient de nombreux éléments contractiles cylindriques appelés myofibrilles. Chaque myofibrille est constituée d'une succession de segments, appelés sarcomères. Ces derniers sont constitués d'une ligne centrale M, à laquelle sont attachés de part et d'autre les myofilaments épais de myosine. Cela forme une bande sombre appelée bande A. Le sarcomère est bordé par la ligne Z qui sert de site d'origine aux myofilaments fins d'actine qui se projettent les uns vers les autres jusqu'à la partie médiane du sarcomère, en recouvrant partiellement les filaments de myosine. La partie constituée uniquement de myofilaments d'actine constitue la bande I claire. Schéma adapté de (Mukund and Subramaniam, 2020) avec le site BioRender.

Les organites intracellulaires

Le sarcoplasme des cellules musculaires est composé d'un ensemble d'organites de base mais aussi de structures spécifiques ou particulièrement développées (Figure 3).

Les myofibrilles sont par exemple caractérisées par un système de tubules transverses (tubules-t) qui sont de fines invaginations du sarcolemme réparties régulièrement sur toute la fibre musculaire. Ce réseau permet la propagation et la diffusion du potentiel d'action nerveux de l'extérieur vers l'intérieur de la fibre, en particulier au niveau du réticulum sarcoplasmique. Il permet d'améliorer la coordination et l'uniformité de la réponse contractile.

Chaque myofibrille possède également un réticulum sarcoplasmique lisse particulièrement développé qui joue un rôle essentiel lors de la contraction ou le relâchement musculaire en libérant le calcium qu'il contient dans ses citernes terminales (extrémités) ou en le réabsorbant. Les deux citernes de part et d'autre d'un tubule-t forment, avec ce dernier, une structure appelée triade qui est essentielle au couplage excitation-contraction des muscles. Le signal électrique fourni à la fibre musculaire par un motoneurone, via les jonctions neuromusculaires, circule le long des tubules-t avant d'être transformé en un signal biochimique qui atteint le réticulum sarcoplasmique et induit la libération de calcium nécessaire au déclenchement de la contraction des myofibrilles (Ahn et al., 2016).

Enfin, l'approvisionnement des muscles en énergie est possible grâce à un réseau interconnecté de mitochondries dans le sarcoplasme dont le volume, la structure et la fonction sont modulés selon les besoins de la fibre.

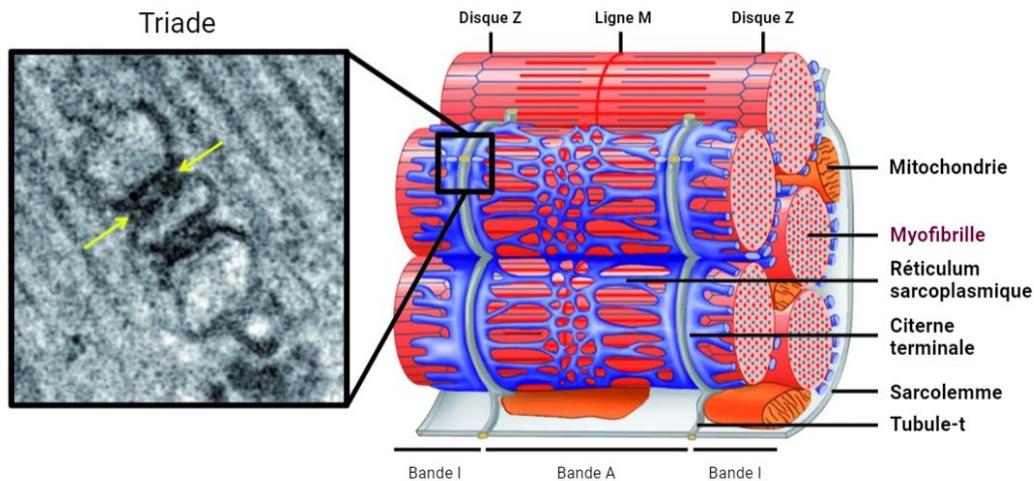


Figure 3. L'organisation des triades du muscle squelettique.

Gauche : micrographie électronique d'une triade. Un tubule-t central est encadré de part et d'autre par une cisterne terminale du réticulum sarcoplasmique. Les flèches indiquent les points de jonction entre les deux compartiments. Droite : Représentation schématique d'un sarcomère et des tubules-t environnants. Adapté de (Al-Qusairi and Laporte, 2011).

1.2. L'ontogenèse du muscle squelettique : du développement des fibres à leur régénération

Le muscle squelettique est l'un des tissus les plus dynamiques et les plus plastiques du corps humain qui ne cesse de s'adapter aux facteurs environnementaux et intrinsèques. Sa genèse a lieu au cours du développement embryonnaire grâce à la coordination de cascades transcriptionnelles et de voies de signalisation qui dirigent, dans l'espace et le temps, la prolifération et la différenciation cellulaire, la migration et les changements morphologiques (Bryson-Richardson and Currie, 2008). Successivement, une phase de croissance se met en place pendant la période post-natale, entraînant une augmentation de la masse musculaire, en particulier grâce à la propriété de plasticité du muscle squelettique. Enfin, au cours de la vie adulte, le muscle squelettique continue de se remodeler en réponse aux stimulus internes et externes, grâce à sa capacité de régénération.

1.2.1. La genèse des fibres musculaires

Au cours du développement embryonnaire, la majorité des muscles squelettiques dérivent des somites, qui sont des structures embryonnaires transitoires dérivées du mésoderme para-axial (Chal and Pourquié, 2017; Mukund and Subramaniam, 2020). Plus précisément, la myogenèse s'initie dans le dermomyotome, un lignage localisé dans la partie dorsale du somite et à l'origine du derme et des muscles (Figure 4).

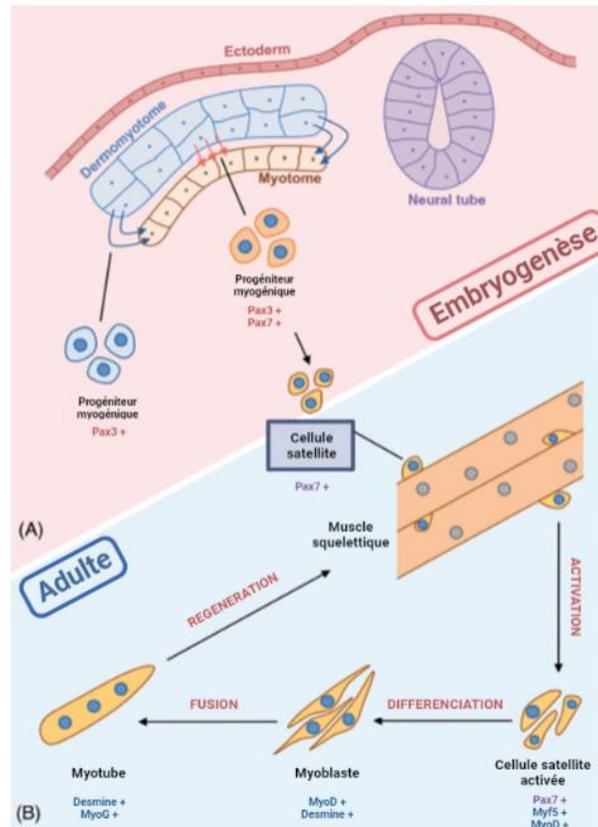


Figure 4. La myogenèse embryonnaire et de la régénération musculaire.

(A) La genèse du muscle squelettique a lieu pendant le développement embryonnaire en dérivant du dermomyotome. A la fin du développement fœtale un groupe de cellules positives Pax3/Pax7 donne naissance aux cellules souches musculaires positives Pax7. (B) Les cellules satellites sont situées sous la lame basale entre les myofibrilles. Après une blessure, elles sortent de leur quiescence et sont activées. Les cellules satellites se différencient en myoblastes qui vont ensuite fusionner pour former des myotubes. Enfin, la maturation des myotubes permet de former de nouvelles myofibrilles conduisant à la régénération musculaire. Adapté de (Girardi and Le Grand, 2018).

Les cellules du dermomyotome, ou progéniteurs mésodermiques, expriment les facteurs de transcription *PAX3/PAX7* et constituent le pool de cellules souches assurant la croissance musculaire embryonnaire, fœtale et adulte (Buckingham and Relaix, 2015). Les muscles se développent au cours de deux phases consécutives appelées myogenèse embryonnaire (ou primaire) et myogenèse fœtale (ou secondaire). Au cours de ce processus, les premières cellules myogéniques apparaissent aux bords du dermomyotome et migrent ensuite pour former une structure musculaire primitive appelée myotome (Cinnamon et al., 2001). Ces cellules sont principalement des myoblastes en cours de différenciation qui expriment les premiers marqueurs de détermination myogénique tels que *Myf5*, *MyoD* et/ou *Desmine*. Successivement, ces myoblastes prolifèrent, s'alignent et fusionnent pour former des myotubes, un syncytium plurinucléé et post-mitotique (Abmayr and Pavlath, 2012). S'en suit la maturation des myotubes en fibres musculaires : les sarcomères s'organisent et s'agencent pour former des unités contractiles au sein des myofibrilles, le cytosquelette se réarrange et les noyaux se relocalisent à la périphérie des cellules musculaires de façon à être accolés au sarcolemme. Aux derniers stades de la myogenèse fœtale, une population distincte de progéniteurs musculaires, appelés cellules satellites et issus du dermomyotome, est présente

sous la lame basale et en contact étroit avec le sarcolemme de la myofibre (Mauro, 1961). Ces cellules souches musculaires adultes, indifférenciées et quiescentes, assurent la croissance et la régénération postnatale du muscle squelettique (Relaix et al., 2005). Elles sont activées lorsque l'homéostasie musculaire est compromise ou que l'architecture des myofibres est perturbée.

1.2.2. La plasticité du muscle squelettique

Pendant l'enfance et la puberté, les muscles squelettiques continuent leur croissance. D'une part, les myoblastes nouvellement générés vont fusionner avec les myofibres existantes (Ontell et al., 1988). D'autre part, la masse musculaire va augmenter d'environ 20 fois grâce à un mécanisme d'hypertrophie qui entraîne une augmentation de la taille des myofibres (Schiaffino et al., 2021).

L'hypertrophie musculaire est une caractéristique de la plasticité des muscles squelettiques (Hoppeler and Flück, 2002) qui ont la capacité de modifier leurs propriétés structurelles et fonctionnelles en fonction des stimulus internes et externes auxquels ils sont soumis. Elle se produit lorsque le taux de synthèse des protéines musculaires dépasse celui de dégradation (Schiaffino et al., 2021). Elle est notamment soutenue par l'exercice mécanique et l'apport en nutriments. Cliniquement, l'élargissement des fibres musculaires est accompagné d'une augmentation du nombre de noyaux par fibre afin de maintenir un rapport nucléocytoplasmique constant. A l'inverse, lorsque l'homéostasie tissulaire se déplace de plus en plus vers la dégradation des protéines, le muscle s'atrophie. L'atrophie peut se produire pour diverses raisons telles qu'un manque d'exercice physique, une nutrition non adaptée, le vieillissement ou de nombreuses pathologies. Elle se caractérise par une fonte ou une perte de masse musculaire accompagnée d'une diminution du volume de la myofibre (Boonyarom and Inui, 2006; Jackman and Kandarian, 2004). Ce rétrécissement des cellules est notamment causé par la perte de cytoplasme, d'organites (l'autophagie peut par exemple déclencher l'élimination sélective des mitochondries via la mitophagie) et de protéines.

Cet équilibre dynamique entre le taux de synthèse et de dégradation des protéines musculaires est principalement régulé par deux grandes voies de signalisation. L'activation de la voie IGF1-PI3K-Akt-mTOR induit une augmentation du volume musculaire par la signalisation mTOR qui stimule la synthèse protéique (Risson et al., 2009; Schiaffino and Mammucari, 2011) tandis que l'activation des facteurs de transcription MURF1/Atrogin1 via la signalisation SMAD (myostatine), NFκB et STAT conduit à l'atrophie musculaire (Bodine and Baehr, 2014). Les deux systèmes protéolytiques cellulaires les plus importants, que sont les machineries ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome, semblent également jouer un rôle central dans la régulation de l'homéostasie musculaire globale en participant à la dégradation des protéines musculaires (Bonaldo and Sandri, 2013).

1.2.3. La régénération du muscle squelettique

A l'âge adulte, le muscle squelettique continue de se remodeler pour répondre aux stimulus environnementaux et intrinsèques, et notamment aux contraintes mécaniques qui le déstabilisent (Antonio and Gonyea, 1993). A ce stade, les fibres musculaires sont capables de réparer des lésions mineures infligées par l'usure quotidienne de la fibre. Par exemple, des dommages locaux de la membrane plasmique causés par des contractions musculaires peuvent être réparés spontanément (Cooper and McNeil, 2015) ou par le recrutement actif de vésicules intracellulaires au sarcolemme afin de combler la lésion membranaire (Bansal et al., 2003; Steinhardt et al., 1994). D'un autre côté, des lésions plus importantes peuvent endommager les fibres musculaires de façon irréversible, entraînant la nécrose d'un segment de la myofibre, voire de son intégralité. C'est le cas dans certaines conditions physiologiques (exercice intensif) ou pathologiques (dystrophies musculaires). Lorsque les muscles squelettiques subissent de tels dommages, un processus de régénération finement ajusté se met en place afin de reformer un appareil musculaire contractile, vascularisé et innervé (Yin et al., 2013) et donc de maintenir une intégrité et une fonction musculaire (Figure 5).

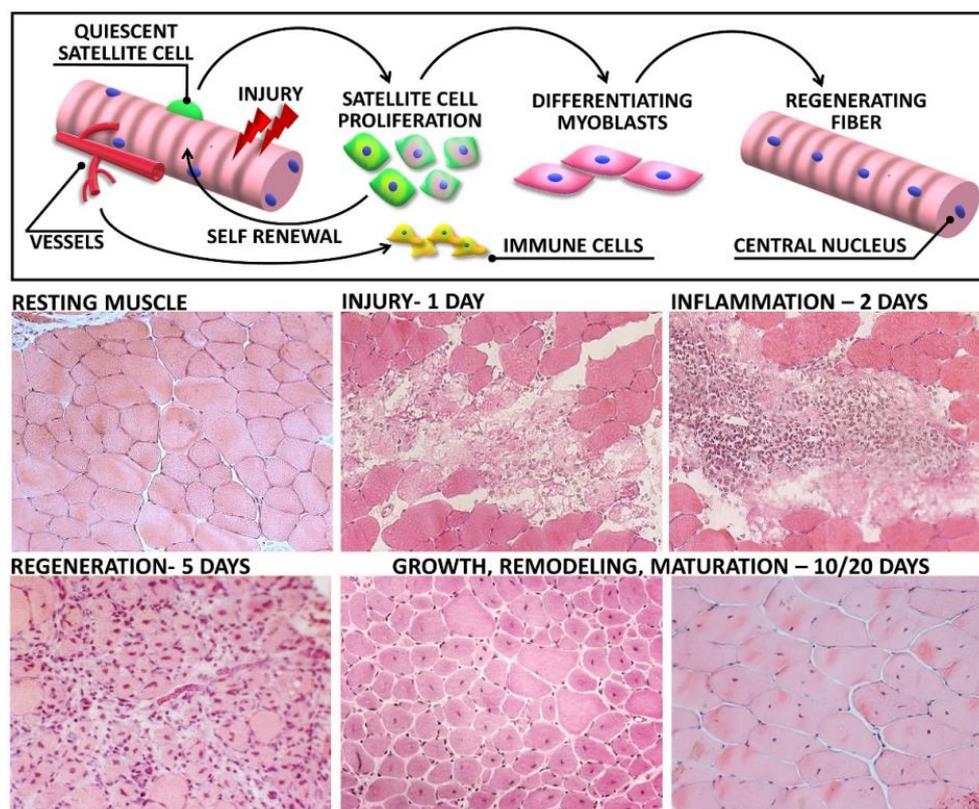


Figure 5. La régénération du muscle squelettique après une blessure aiguë.

Haut : Représentation schématique du processus de régénération activé dans le tissu musculaire après une lésion.

Bas : Panel de sections musculaires représentatives de chaque étape du processus de dégénérescence/régénération musculaire après injection de cardiotoxine. Au début, la lésion traumatique induit une nécrose des myofibres (jour 1) qui va stimuler une réponse inflammatoire caractérisée notamment par l'infiltration de cellules immunitaires dans le tissu lésé (jour 2). Les cellules satellites sont activées, prolifèrent et se différencient pour réparer le muscle. Des fibres nouvellement régénérées apparaissent au cours de la première semaine. Dix jours après la lésion, l'architecture générale du tissu est restaurée et la plupart des myofibres présentent des noyaux centraux. Ces dernières subissent ensuite une croissance et une maturation progressive, mises en évidence par l'augmentation de leur surface et la relocalisation des noyaux vers la périphérie. Source (Forcina et al., 2020).

Cette activité est portée par les cellules satellites (ou MuCS pour muscle satellite cell), localisées à la périphérie des fibres musculaires, qui sont quiescentes à l'état basal. En réponse à un afflux de cytokines pro-inflammatoires, les MuCS s'activent et migrent vers le site lésé puis se différencient et fusionnent afin de réparer les myofibres endommagés ou d'en générer de nouvelles (Relaix and Zammit, 2012). Les myofibres qui se régénèrent se distinguent alors par la position centrale de leurs noyaux et par leur petite taille. Parallèlement, certaines MuCS s'auto-renouvèlent et retournent à la quiescence pour assurer le maintien d'un nombre suffisant de cellules souches, permettant ainsi la réparation et le remplacement des fibres musculaires à long terme (Mayeuf and Relaix, 2011). Enfin, la régénération musculaire s'achève avec la maturation des nouvelles fibres et le remodelage des muscles régénérés (Ciciliot and Schiaffino, 2010). Les cellules augmentent en taille et les noyaux se déplacent vers la périphérie de la fibre. Les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAP), demeurant dans le tissu musculaire, se différencient en fibroblastes qui permettent la synthèse de MEC et libèrent de l'IGF1 (insulin-like growth factor-1) nécessaire à la maturation des fibres musculaires (Tidball, 2017).

Dans des conditions normales, les muscles régénérés sont morphologiquement et fonctionnellement indiscernables des muscles non endommagés à la fin du processus. A l'inverse, dans le cadre de certaines maladies du muscle squelettique où le processus de dégénération-régénération est continu, de nombreuses fibres nouvellement formées sont visualisées et une augmentation du tissu conjonctif ainsi qu'un remplacement graisseux des myofibres peuvent être observés.

1.3. Les myopathies : les maladies du muscle squelettique

La myopathie est un terme général désignant toute maladie affectant le muscle squelettique (Cardamone et al., 2008; Glasberg, 1979). Les troubles résultent d'anomalies affectant la structure, le métabolisme ou la fonction des fibres musculaires et qui entraînent principalement une faiblesse et une atrophie des muscles. Les myopathies peuvent également être associées à d'autres symptômes musculaires comme une difficulté au relâchement du muscle (myotonie), une perte de masse et de force musculaire (sarcopénie), une mobilité anormalement importante des articulations (hyperlaxité), etc. Dans certains cas, la pathologie s'étend aux fibres musculaires cardiaques, entraînant une cardiomyopathie hypertrophique ou dilatée. Des phénotypes secondaires comme des troubles cognitifs ou une atteinte sensorielle peuvent également être observés.

Les myopathies peuvent être réparties en deux grandes catégories : héréditaires (González-Jamett et al., 2018) et acquises (Chiodo, 2013)(Tableau 1). D'un côté, les myopathies héréditaires sont des maladies d'origine génétique. Elles sont déterminées par des mutations dans plus de 350 gènes distincts (Kaplan and Hamroun, 2015) qui empêchent la production d'une protéine ou d'une enzyme ayant un rôle essentielle dans le fonctionnement des cellules musculaires squelettiques. De l'autre côté, les myopathies acquises se développent plus tard dans la vie et résultent principalement de maladies systémiques. Elles peuvent être dues à un dysfonctionnement du système immunitaire, à des complications de maladies endocriniennes

(hyper/hypothyroïdie) ou toxiques (alcoolisme chronique), à des infections, à l'exposition de certains médicaments (corticoïdes, statines), etc. L'évolution dans le temps de la pathologie, le profil de la faiblesse musculaire et l'absence/présence d'antécédents familiaux de myopathie aident à distinguer les deux types. Un âge d'apparition précoce avec une durée relativement longue de la maladie suggère une myopathie héréditaire alors qu'une apparition soudaine ou aiguë à un âge plus avancé reflète plutôt une myopathie acquise.

Myopathies acquises
Myopathie inflammatoire <ul style="list-style-type: none"> ○ Polymyosite ○ Dermatomyosite ○ Myosite à inclusions
Myopathie associée à une maladie systémique <ul style="list-style-type: none"> ○ Troubles endocriniens (thyroïde, parathyroïde, dysfonctionnement hypophysaire ou surrénalien) ○ Maladies inflammatoires systémiques (arthrite rhumatoïde, sclérodermie, sarcoïdose, etc.) ○ Déséquilibre électrolytique (anomalies du potassium ou du magnésium, hypophosphatémie) ○ Myopathie amyloïde
Myopathie toxique <ul style="list-style-type: none"> ○ Médicaments (immunothérapies, corticostéroïdes, hypocholestérolémiants, chloroquine, antiviraux et inhibiteurs de protéases, etc.) ○ Toxines (alcool, toluène)
Myopathie infectieuse <ul style="list-style-type: none"> ○ Infections virales (VIH, virus de la grippe, virus d'Epstein-Barr) ○ Pyomyosite bactérienne (Staphylococcus aureus et streptocoques) ○ Spirochète (maladie de Lyme) ○ Infections parasitaires (Trichinose)
Myopathies héréditaires
Dystrophie musculaire <ul style="list-style-type: none"> ○ Dystrophinopathie (dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker) ○ Dystrophie myotonique de type 1 et 2 ○ Dystrophie musculaire des ceintures ○ Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale ○ Dystrophie musculaire oculopharyngée
Myopathie congénitale <ul style="list-style-type: none"> ○ Myopathie à némaline ○ Myopathie à « central cores »
Myopathie métabolique <ul style="list-style-type: none"> ○ Glycogénoses ○ Défauts d'oxydation des acides gras ○ Maladies mitochondriales et défauts de la chaîne respiratoire

Tableau 1. Liste non exhaustive des myopathies acquises et héréditaires les plus courantes.

2. Les dystrophies musculaires

Parmi les myopathies héréditaires répertoriées précédemment, les dystrophies musculaires (ou MD pour muscular dystrophy) représentent une part importante de ces troubles avec une prévalence globale estimée à 3,6 cas pour 100 000 personnes (Salari et al., 2022). Les MD constituent un groupe hétérogène de maladies génétiques qui ont comme caractéristique commune la destruction du tissu musculaire, associée à un processus chronique de type nécrose-régénération (Emery, 2002, 1998). En effet, les mutations génétiques responsables de ces pathologies affectent des protéines essentielles à l'intégrité et/ou à la fonction des muscles

squelettiques, déstabilisant alors la fibre musculaire qui n'arrive plus à compenser sur le long terme les lésions qu'elle subit en continu. Histologiquement, les biopsies musculaires de MD sont caractérisées par la présence en grande quantité de fibres nécrotiques et régénératives (McNally and Pytel, 2007). Bien que le contexte génétique soit souvent identifié pour la plupart des MD, les mécanismes pathophysiologiques sous-jacents par lesquels ces mutations mènent au dysfonctionnement du muscle squelettique restent majoritairement inconnus.

2.1. Les formes de dystrophies musculaires

Malgré une atteinte musculaire commune caractérisée par une faiblesse et une perte progressive de la masse et de la force musculaire, il existe une grande variabilité entre les MD. Elles diffèrent selon la nature de l'anomalie génétique en cause, le moment d'apparition et l'évolution des symptômes, le degré d'atteinte respiratoire et cardiaque, l'implication d'autres systèmes organiques ainsi que la sévérité de la pathologie et le pronostic vital associé. Elles se différencient également par la distribution sélective des muscles affectés, à contrario des autres formes de myopathies où la faiblesse musculaire est diffuse (Figure 6). Les formes les plus fréquentes de MD sont les suivantes : la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et sa variante allélique plus modérée la myopathie de Becker (BMD), la dystrophie d'Emery-Dreifuss (EDMD), les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD), la facio-scapulo-humérale (FSHD), la distale (CMD), l'oculopharyngée (OPMD) et la myotonique (MMD).

Le développement des outils de génétique moléculaire ont permis d'identifier plus de 50 gènes impliqués dans les MD, et des variantes très rares restent encore à être découvertes (Mercuri et al., 2019). Les principales classes de protéines impliquées dans les MD sont les protéines de la MEC et de la membrane basale, du sarcolemme, de la membrane nucléaire, du sarcomère, du réticulum endoplasmique ou certaines enzymes (Mercuri et al., 2019). Le déclenchement, la progression et les symptômes de la maladie sont variables. Les signes cliniques peuvent apparaître à la naissance, pendant l'enfance ou plus tardivement à l'âge adulte. Généralement, la déambulation n'est jamais possible si les symptômes sont présents dès la naissance alors que pour les formes de MD apparaissant pendant l'enfance, la déambulation est acquise mais est invariablement perdue dans les variantes à progression rapide comme la DMD ou certaines LGMD. Dans les autres formes de LGMD et dans la plupart des cas de FSHD, la déambulation peut être maintenue et une assistance en fauteuil roulant n'est nécessaire que plus tard dans la vie. Concernant la MMD, la gravité clinique est extrêmement hétérogène, allant de nourrissons gravement atteints dont l'issue est fatale à des adultes peu atteints présentant des cataractes et une myotonie de préhension.

L'atteinte de la fibre musculaire est aussi responsable de déformations orthopédiques, d'éventuelles difficultés respiratoires et de complications cardiaques. Cette dernière peut être observée dans de nombreuses MD à cause des similitudes structurales, génétiques et protéiques entre les muscles squelettiques et cardiaques. La complication cardiaque est la plus grave des atteintes systémiques puisqu'elle conditionne le pronostic vital. Dans certaines MD on observe également une atteinte fonctionnelle ou structurelle du cerveau. Par exemple, un

tiers des garçons DMD présentent un retard mental et des comorbidités comportementales ou psychiatriques associées (trouble de l'attention ou autisme). Certaines MD sont également associées à des atteintes sensorielles comme la vision (FSHD, CMD, MMD), l'audition (FSHD), la peau (CMD).

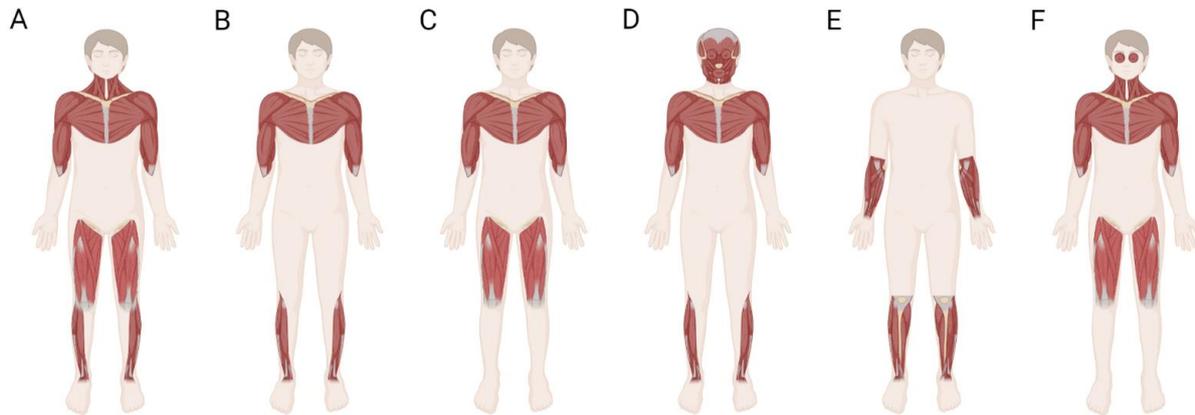


Figure 6. La distribution des principaux muscles affectés selon le type de dystrophie musculaire.

(A) DMD et BMD, (B) EDMD, (C) LGMD, (D) FSHD, (E) CMD, (F) OPMD. L'ombrage représente les zones affectées.

Schéma créé sur le site BioRender.

2.2. Les dystrophies musculaires des ceintures

Parmi les MD les plus fréquentes, les myopathies des ceintures (ou LGMD pour Limb girdle muscular dystrophy) se caractérisent par un déficit et une atrophie spécifique des muscles du bassin (ceinture pelvienne) et des épaules (ceinture scapulaire) (Guglieri et al., 2008; Nigro and Savarese, 2014). Les LGMD sont causées par des altérations génétiques de plusieurs gènes jouant tous un rôle critique dans la fonction, le maintien et la réparation des muscles squelettiques (Liewluck and Milone, 2018; Wicklund and Kissel, 2014). D'après la dernière classification des LGMD révisée en 2017 (Straub et al., 2018), ces pathologies sont subdivisées en deux groupes principaux selon leur mode de transmission : les LGMD autosomiques dominantes (LGMD D) et les récessives (LGMD R). Pour les différencier, une numérotation correspondant à l'ordre de découverte du gène est ajoutée après le type de transmission (Tableau 2). Depuis la description de cette pathologie en 1954 (Walton and Nattrass, 1954) et la première identification d'un gène responsable d'une LGMD en 1995 (Richard et al., 1995), 32 formes différentes de LGMD ont été caractérisées, 5 LGMD dominantes et 27 LGMD récessives dont 2 ont été identifiées très récemment (Coppens et al., 2021; Straub et al., 2018).

Nouvelle nomenclature	Gène	Protéine	Nouvelle nomenclature	Gène	Protéine
LGMD D1	<i>DNAJB6</i>	DNAJB6	LGMD R2	<i>DYSF</i>	Dysferline
LGMD D2	<i>TNPO3</i>	Transportine 3	LGMD R3	<i>SGCA</i>	α -sarcoglycane
LGMD D3	<i>HNRNPDL</i>	hnRNPDL	LGMD R4	<i>SGCB</i>	β -sarcoglycane
LGMD D4 / R1	<i>CAPN3</i>	Calpaine 3	LGMD R5	<i>SGCG</i>	γ -sarcoglycane
LGMD D5 / R22	<i>COL6A1</i> , <i>COL6A2</i> , <i>COL6A3</i>	Collagène 6	LGMD R6	<i>SGCD</i>	δ -sarcoglycane
			LGMD R7	<i>TCAP</i>	Téléthonine
			LGMD R8	<i>TRIM32</i>	TRIM32
			LGMD R9	<i>FKRP</i>	FKRP
			LGMD R10	<i>TTN</i>	Titine
			LGMD R11	<i>POMT1</i>	POMT1
			LGMD R12	<i>ANO5</i>	Anoctamine 5
			LGMD R13	<i>FKTN</i>	Fukutine
			LGMD R14	<i>POMT2</i>	POMT2
			LGMD R15	<i>POMGNT1</i>	POMGNT1
			LGMD R16	<i>DAG1</i>	α et β dystroglycanes
			LGMD R17	<i>PLEC</i>	Plectine
			LGMD R18	<i>TRAPPC11</i>	TRAPPC11
			LGMD R19	<i>GMPPB</i>	GMPPB
			LGMD R20	<i>ISPD</i>	ISPD
			LGMD R21	<i>POGLUT1</i>	POGLUT1
			LGMD R23	<i>LAMA2</i>	Laminine $\alpha 2$ (mérosine)
			LGMD R24	<i>POMGNT2</i>	POMGNT2
			LGMD R25	<i>POPDC1/BVES</i>	POPDC1
			LGMD R26	<i>POPDC3</i>	POPDC3
			LGMD R27	<i>JAG2</i>	Jagged 2

Tableau 2. Nomenclature et classification des LGMD.

Adapté de (Straub et al., 2018).

Les protéines impliquées dans les LGMD ont des fonctions très variées. Elles jouent un rôle notamment au niveau de la membrane de la cellule musculaire ou au niveau d'éléments constitutifs des myofibrilles, comme le noyau, le sarcoplasme, les sarcomères et la MEC (Figure 7). De ce fait, les manifestations cliniques et la progression de la maladie sont très hétérogènes selon les protéines impactées. Les formes peuvent être modérées, avec une apparition tardive de la maladie et une progression lente, ou plus sévères, avec un phénotype qui apparaît dès la première décennie de la vie entraînant la perte de la marche à l'âge adulte et de possibles complications cardiaques et/ou respiratoires (Thompson and Straub, 2016). De façon similaire à certaines MD, la sévérité et la progression de la pathologie peuvent dépendre de la mutation (type, localisation), pour un même gène en question.

Bien que la prévalence globale des LGMD soit difficile à évaluer et qu'elle varie grandement selon les sous types, on estime qu'elle se situe entre 1/44 000 et 1/123 000 (source Orphanet). Parmi toutes les LGMD, les formes récessives sont de loin les plus fréquentes puisqu'elles représentent près de 90% des patients. Plusieurs équipes internationales ont par ailleurs tenté de mesurer la fréquence des différentes formes de LGMD à partir de plusieurs analyses génétiques de cohortes de patients. Une étude américaine menée au niveau national sur une population de 4 656 individus a ainsi pu identifier les principaux gènes contributeurs aux LGMD (Nallamilli et al., 2018): *CAPN3* (17%), *DYSF* (16%), *FKRP* (9%) et *ANO5* (7%). Ces fréquences

varient néanmoins selon la zone géographique. Il a par exemple été démontré que le principal gène contributeur de LGMD dans le nord de la Norvège est *FKRP* avec une fréquence de 50% (Müller et al., 2021).

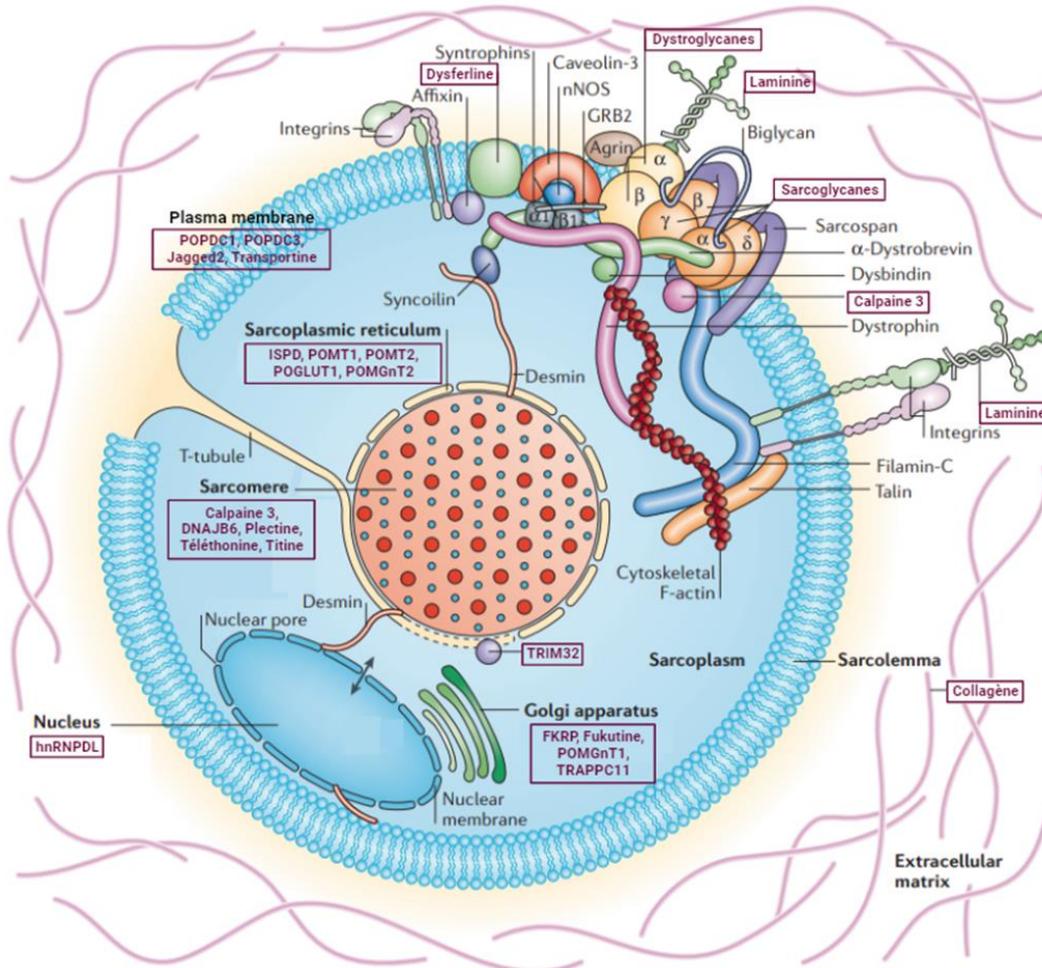


Figure 7. Les principales protéines impliquées dans les dystrophies musculaires des ceintures.

Schéma d'une coupe transversale d'une myofibre montrant la position approximative des principales protéines impliquées dans les dystrophies musculaires des ceintures. Les protéines sont mises en évidence en violet. Adapté de (Davies and Nowak, 2006).

A ce jour, malgré les progrès scientifiques réalisés au cours des dernières décennies pour comprendre les mécanismes pathologiques associés aux différentes formes de LGMD, il n'existe aucun traitement pour ces pathologies, faisant des LGMD un besoin médical non satisfait. Dans ce contexte, mon projet de thèse a consisté à modéliser un sous type de LGMD afin d'identifier de nouveaux phénotypes pathologiques qui pourraient permettre, *in fine*, de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour cette maladie. Parmi la trentaine de formes de LGMD, je me suis intéressée à la LGMD R2 qui résulte d'un déficit en dysferline, une protéine essentielle au fonctionnement des muscles squelettiques. Ainsi, la suite de cette introduction bibliographique consiste à faire un état de l'art de nos connaissances sur la LGMD R2, et plus généralement sur les dysferlinopathies qui regroupent un ensemble de formes cliniques caractérisées par une déficience commune en dysferline.

CHAPITRE 2 : LES DYSFERLINOPATHIES

Les dysferlinopathies désignent un ensemble de MD causées par une déficience primaire en dysferline, une protéine du sarcolemme essentielle au bon fonctionnement des muscles squelettiques. Ces pathologies sont caractérisées par une diminution du volume et de la force musculaire ainsi que par une perte progressive de la mobilité du patient. Les dysferlinopathies regroupent une variété de pathologies caractérisées par un large spectre clinique et une hétérogénéité en termes d'âge d'apparition, d'évolution et de sévérité de la maladie. Néanmoins, elles se distinguent par la répartition des muscles touchés. Ainsi, une anomalie de l'expression de la dysferline peut entraîner une atteinte musculaire distale, avec une faiblesse prédominante des muscles situés aux extrémités des membres, ou proximale, avec une atteinte des muscles proches de l'axe du corps. Elle est aussi en cause dans des manifestations intermédiaires dites « proximo-distales ».

Depuis l'identification de la cause génétique sous-jacente aux dysferlinopathies en 1998, des avancées majeures en termes de diagnostic, de prise en charge clinique, de compréhension physiopathologique et de développement de stratégies thérapeutiques ont été réalisées. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun traitement disponible sur le marché pour les patients.

1. Les symptômes et formes associés aux dysferlinopathies

Les dysferlinopathies sont des maladies lentes par rapport à d'autres MD. De plus, les complications cardiaques et respiratoires ne faisant pas partie des symptômes associés à cette maladie, hormis quelques rares exceptions de cardiomyopathies (Wenzel et al., 2007), les dysferlinopathies n'ont pas d'incidence sur la durée de vie du patient. L'âge d'apparition des premiers symptômes varie d'un patient à l'autre mais, généralement, les premiers signes de la maladie apparaissent entre la fin de l'adolescence et le début de l'âge adulte. L'âge médian est de 20 ans (Harris et al., 2016; Jacobs et al., 2021), bien que des formes très précoces ou tardives aient aussi été décrites (Fernández-Eulate et al., 2021). Au niveau clinique, la pathologie semble d'abord toucher les muscles inférieurs avant de progresser vers les muscles de la partie supérieure du corps. Après plusieurs années de progression de la maladie, la faiblesse musculaire se généralise et des problèmes de mobilité apparaissent. Les patients peuvent ainsi perdre la marche 10 à 15 ans après l'apparition des premiers symptômes (Díaz et al., 2016; Jacobs et al., 2021; Linssen, 1997; Woudt et al., 2016). Néanmoins, certains patients atteints de formes modérées peuvent rester ambulants tout au long de leur vie.

Dans un but de simplification, les formes cliniques de dysferlinopathies ont été classées selon les types de muscles touchés en premier et l'évolution de l'atteinte musculaire :

- (i) La myopathie de Miyoshi (MM), caractérisée par une atteinte des muscles squelettiques distaux ;
- (ii) La myopathie des ceintures de type R2 (LGMD R2 ou anciennement LGMD 2B) où la faiblesse musculaire est prédominante sur les muscles proximaux ;
- (iii) Les formes proximaux-distales et plus atypiques.

1.1. La myopathie de Miyoshi

La MM correspond à l'une des formes les plus répandues de dysferlinopathie. C'est aussi la première à avoir été décrite en 1967 puis en 1986 (Miyoshi et al., 1986). Dans la publication originale du médecin japonais, quatre patients issus de deux familles consanguines présentaient une myopathie distale à transmission récessive et à apparition tardive (Figure 8). Longtemps considérée comme limitée au Japon, cette maladie a rapidement été signalée en Europe et ailleurs par la suite.

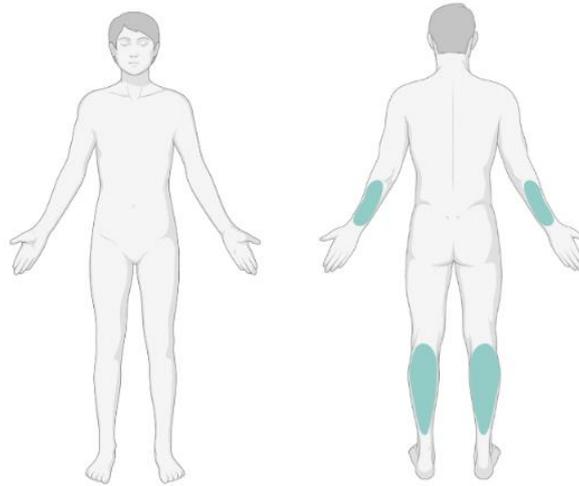


Figure 8. Les principaux muscles touchés dans la myopathie de Miyoshi.

Schéma créé sur le site BioRender.

Les patients atteints de MM présentent généralement leurs premiers symptômes au cours de l'adolescence ou chez le jeune adulte. Ce sont tout d'abord les membres inférieurs qui sont atteints et plus particulièrement les muscles du mollet que sont le gastrocnémien et le soléaire (Miyoshi et al., 1986). En effet, un signe précoce de la MM est l'incapacité des patients à se tenir sur la pointe des pieds (Argov et al., 2000). La faiblesse musculaire progresse ensuite vers le compartiment postérieur des cuisses (ex : ischio-jambiers) puis la ceinture des hanches avec le muscle grand glutéal (Linssen, 1997). Cette faiblesse peut alors s'accompagner de troubles de la démarche, d'une tendance à tomber et des difficultés à se lever, à courir et à monter les escaliers. Les muscles extenseurs des avant-bras peuvent également être légèrement atrophiés avec une diminution de la force de préhension, mais le brachio-radial et les muscles intrinsèques de la main sont généralement épargnés (Amato and Brown, 2011). La progression de la MM est très variable. Pour certains patients la faiblesse musculaire reste localisée au mollet pendant une période prolongée alors que d'autres peuvent rapidement devenir non ambulants en quelques années. Il semblerait qu'un tiers des patients se déplacent en fauteuil roulant dans les 15 ans suivant l'apparition de la maladie (Linssen et al., 2013).

1.2. La dystrophie musculaire des ceintures de type R2

La LGMD R2 est la deuxième forme de dysferlinopathie la plus fréquente avec une prévalence estimée à 1-9 naissances sur 1 000 000 (source Orphanet). Comme décrit précédemment dans la partie des dystrophies des ceintures, la LGMD R2 est une myopathie qui affecte plutôt les muscles inférieurs et supérieurs proximaux, avec une faiblesse caractéristique des muscles de la ceinture pelvienne et scapulaire (Figure 9).

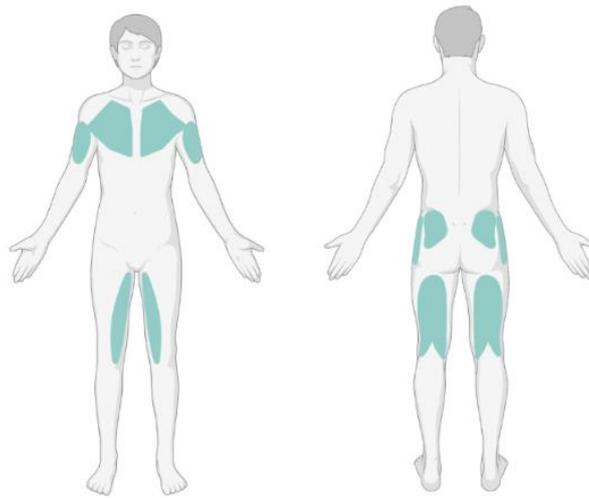


Figure 9. Les principaux muscles touchés dans la LGMD R2.
Schéma créé sur le site BioRender.

De façon similaire à la MM, l'âge d'apparition des symptômes de la LGMD R2 se situe à la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte. Ce sont d'abord les muscles proximaux des membres inférieurs qui sont atteints avec des difficultés pour les patients à marcher, monter les escaliers et courir. Ensuite, la pathologie progresse vers les muscles proximaux des membres supérieurs (Mahjneh et al., 1996a, 1996b), qui restent cependant plus légèrement impactés. Les principaux muscles des membres inférieurs touchés sont le moyen glutéal et le muscle tenseur du fascia lata (ceinture pelvienne), les muscles adducteurs et les ischio-jambiers (zones antérieure et postérieure de la cuisse) (Stramare et al., 2010). Concernant les muscles supérieurs, ce sont principalement le biceps et la tête du grand pectoral qui sont les plus sévèrement affectés. La progression de la maladie est généralement lente mais, comme pour la MM, il semblerait qu'un tiers des patients deviennent non ambulants 15 à 20 ans après l'établissement du diagnostic (LoMauro et al., 2021).

1.3. Les formes rares et atypiques de dysferlinopathie

Le spectre clinique des dysferlinopathies a par la suite été élargi avec l'identification de plusieurs formes atypiques et cliniquement hétérogènes. Ces formes vont de l'asymptomatique à un handicap fonctionnel sévère (Nguyen et al., 2007).

La forme atypique la plus décrite est la myopathie distale du muscle tibial antérieur (Illa et al.,

2001; Illarioshkin et al., 2000). Si l'âge d'apparition et les modifications histologiques sont comparables avec la MM distale, la distribution de la faiblesse musculaire est sensiblement différente : les muscles tibiaux antérieurs sont les premiers à être touchés (Illarioshkin et al., 1996). Au fur et à mesure que la maladie progresse, la faiblesse musculaire s'étend également au compartiment postérieur des jambes. Dans les extrémités supérieures, une atrophie peut être observée au niveau des muscles fléchisseurs du poignet et des doigts ainsi que du biceps brachial (Amato and Brown, 2011; Illa et al., 2001).

Une forme rare de dysferlinopathie, de type dystrophie musculaire congénitale, a été observée chez deux frères et sœurs qui présentaient dès l'âge de deux mois une hypotonie généralisée, une faiblesse des membres inférieurs proximaux et des muscles fléchisseurs du cou (Paradas et al., 2009). Un retard de développement moteur a également pu être observé. Ce même phénotype a été rapporté plus tard chez deux autres frères et sœurs présentant la même mutation homozygote que celle décrite dans la précédente étude (Ceyhan-Birsoy et al., 2015).

Une autre forme dite proximo-distale a été rapportée chez des patients présentant une atteinte des muscles proximaux et distaux (Ueyama et al., 2002). Ce phénotype résulte soit d'une MM après extension de la maladie à des muscles plus proximaux, soit d'une LGMD R2 qui s'étend rapidement vers les muscles distaux.

Deux cas de myopathie axiale avec syndrome de la colonne vertébrale rigide ont aussi été rapportés (Nagashima et al., 2004; Seror et al., 2008). Ces patients présentent des symptômes cliniques et des signes caractéristiques d'une atteinte des muscles paraspinaux associée à des douleurs dorsales chroniques, une colonne vertébrale rigide et déformée, un remplacement graisseux des muscles érecteurs de la colonne vertébrale et une atteinte des muscles postérieurs de la cuisse et du mollet, voire des ceintures scapulaire et pelvienne.

Enfin, la dysferlinopathie peut aussi se manifester comme un trouble pseudo-métabolique (Nguyen et al., 2007, 2005) avec une intolérance à l'effort, des douleurs et des crampes musculaires, ou une hyperckémie asymptomatique caractérisée uniquement par une élévation marquée de la concentration sérique de créatine kinase.

1.4. Les dysferlinopathies, une pathologie unique

Alors que les dysferlinopathies sont classées et divisées selon leur spectre clinique, une étude très récente d'histoire naturelle de la maladie, la "Jain COS" (Jain clinical outcome study), suggère que les dysferlinopathies ne formeraient pas des entités phénotypiques distinctes (distal versus proximal) mais qu'elles devraient être considérées comme une seule et même pathologie, tant pour la prise en charge des patients que pour l'accès aux futurs traitements (Moore et al., 2021). En effet, l'analyse comparative de données cliniques, biologiques et d'imageries musculaires de 114 personnes atteintes de LGMD R2 et de 54 personnes atteintes de MM a montré qu'il n'y avait pas de différence significative quant à la localisation proximale versus distale de l'atteinte musculaire entre ces deux formes. Les différences concernent plutôt

la répartition géographique des patients : ceux atteints de MM sont plus fréquemment retrouvés au Japon, alors que ceux atteints d'une LGMD R2 vivent plutôt en Europe et aux Etats-Unis. La répartition des dysferlinopathies en phénotypes distincts ne semble donc plus être pertinente et les phénotypes pourraient être combinés dans des études cliniques et physiopathologiques. C'est d'ailleurs ce qu'avait déjà suggéré une étude précédente sur un nombre plus réduit de patients (Paradas et al., 2010). Un autre argument en faveur du regroupement des formes de dysferlinopathies sous une même entité réside dans la variabilité phénotypique entre patients porteurs de la même mutation responsable du déficit en dysferline. En effet, une même mutation du gène responsable de dysferlinopathie peut conduire à des formes cliniques différentes au sein d'une même famille (Guo et al., 2021; Illarioshkin et al., 2000; Weiler et al., 1999), suggérant que des facteurs environnementaux, épigénétiques et génétiques autres que les anomalies de dysferline contribueraient à déterminer la forme clinique de la maladie.

2. Les atteintes musculaires et l'établissement du diagnostic

L'hétérogénéité des dysferlinopathies et la lenteur de progression de la maladie représentent un défi de diagnostic pour le corps médical. Au regard du tableau clinique, la dysferlinopathie est, par exemple, fortement susceptible d'être diagnostiquée comme une polymyosite, une myopathie inflammatoire. Dans une étude rétrospective, près de 25% des patients LGMD R2/MM de la cohorte analysée ont initialement reçu un diagnostic de polymyosite (Nguyen et al., 2007). Or, ce diagnostic erroné peut avoir une incidence sur les patients en proposant des thérapies inutiles et potentiellement dangereuses, comme par exemple l'administration à long terme de corticostéroïdes (Sreetama et al., 2018; Walter et al., 2013). Le diagnostic des dysferlinopathies nécessite donc une approche multidisciplinaire qui comprend un examen clinique, une évaluation musculaire et une analyse génétique (Fanin and Angelini, 2016; Ivanova et al., 2022).

2.1. L'examen clinique

Les dysferlinopathies étant des maladies génétiques héréditaires, le diagnostic repose dans un premier temps sur l'évaluation des antécédents familiaux de la personne. Un examen physique complet est également nécessaire pour confirmer la présence d'une faiblesse musculaire, premier symptôme de la maladie (Patel et al., 2017) (Figure 10). L'atteinte musculaire des dysferlinopathies peut se traduire par des signes inhabituels d'atrophie (80% des patients) ou de contractures musculaires aux chevilles, genoux et coudes (36% des patients) (Harris et al., 2016). Le signe clinique du « diamant », qui est un renflement anormal de la partie antérolatérale du quadriceps lorsque les patients doivent se tenir avec les genoux fléchis, est par exemple le reflet d'une atrophie musculaire typique de la maladie. Il touche 64% des patients atteints de LGMD R2 et 75% des patients MM (Pradhan, 2008). Pour compléter l'évaluation, un bilan sanguin est réalisé afin de doser le taux de créatine kinases (CPK), une enzyme du métabolisme énergétique qui s'échappe des muscles endommagés. Lorsque des

taux élevés de CPK sont détectés sur plusieurs analyses d'échantillons sanguins cela signifie généralement que le muscle est désagrégé par un processus anormal ou que son processus de régénération est ralenti ou altéré. Ainsi, lorsqu'une faiblesse musculaire visuelle est accompagnée d'un taux de CPK 10 fois supérieur à la normale, le diagnostic clinique se dirige vers une MD. Chez les patients atteints de dysferlinopathie, le taux de CPK dans le sang est généralement élevé, dépassant de 10 à 100 fois la normale (Fanin and Angelini, 2016; Harris et al., 2016), et persiste tout au long de la maladie.



Figure 10. Les caractéristiques cliniques des dysferlinopathies.

(A) Patient atteint de LGMD R2 avec une atrophie sélective de la moitié du biceps provoquant un aspect de boule. (B) Patient atteint de MM présentant une atrophie caractéristique du mollet. (C) Caractéristique clinique du « diamant » sur le quadriceps d'un patient atteint de MM. Adapté de (Pradhan, 2009; Umakhanova et al., 2017; Woudt et al., 2016).

2.2. L'évaluation musculaire

Dans un second temps, un examen du tissu musculaire, de sa structure et de son organisation est réalisé à partir d'une biopsie musculaire (Figure 11).

D'un point de vue histologique, les dysferlinopathies sont caractérisées, comme toute MD, par une dégénérescence chronique des fibres musculaires squelettiques menant à un processus de nécrose/régénération et, dans les cas les plus avancés, à un remplacement des myofibres par du tissu conjonctif ou adipeux. Ces caractéristiques peuvent être observées grâce à des méthodes de coloration du tissu musculaire comme l'hématoxyline/éosine (H&E) qui permettent de visualiser l'irrégularité de la taille des myofibres, une localisation centrale des noyaux et un tissu conjonctif anormalement volumineux (Amato and Brown, 2011; Harris et al., 2016). Chez les patients atteints de dysferlinopathie, le processus de régénération musculaire peut impacter plus de 10% des fibres (Fanin and Angelini, 2002) consécutivement à un processus de dégénérescence massif (>1% des fibres). Les biopsies de patients sont également caractérisées par la présence anormale de cellules inflammatoires mononucléées qui,

contrairement à ce que l'on observe chez les patients atteints de polymyosite, ne sont recrutées qu'au niveau des fibres musculaires nécrosées (Gallardo et al., 2001; Rowin et al., 1999). Ces infiltrats inflammatoires ont été observés dans les muscles de 60 à 70 % des patients atteints de dysferlinopathie, même chez ceux qui étaient cliniquement moins affectés (Fanin and Angelini, 2002; Gallardo et al., 2001).

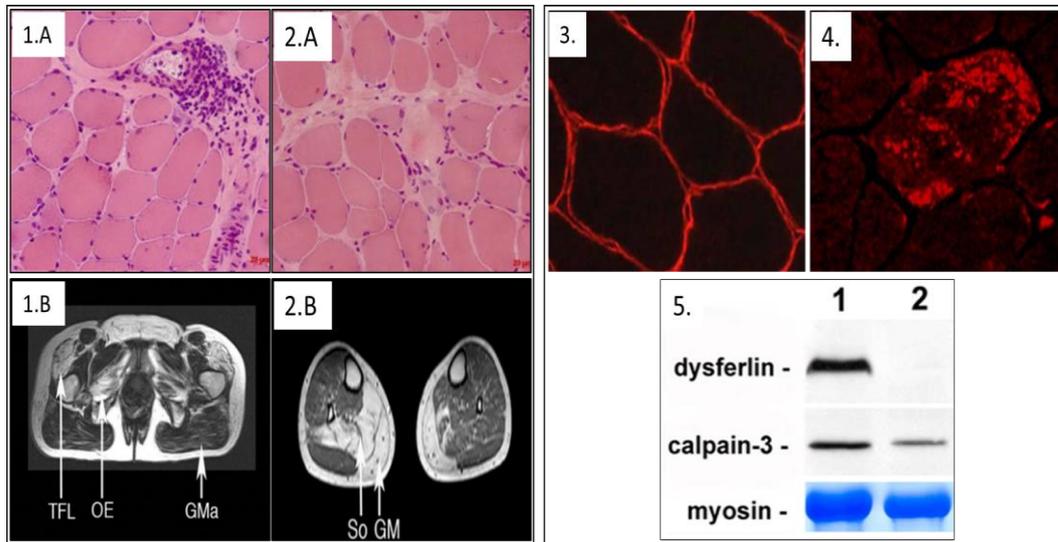


Figure 11. Examen du tissu musculaire des patients atteints de dysferlinopathie.

Coloration H&E de biopsies musculaires de patients atteints de LGMD R2 (1.A) ou de MM (2.A) présentant un schéma dystrophique classique lié à l'absence de dysferline : infiltration du tissu conjonctif, taille des fibres irrégulière et noyaux centronucléés. IRM musculaire axiale de patients atteints de dysferlinopathie présentant un remplacement graisseux du muscle tenseur du fascia lata (TFL), du muscle obturateur externe (OE) et interne (OI) (1.B), ou du gastrocnémien médial (GM) et du muscle soléaire (So) (2.B). Immunomarquage musculaire de la dysferline chez un contrôle sain (3.) et un patient atteint de dysferlinopathie (4.), chez qui la protéine est absente du sarcolemme. Analyse protéique de la dysferline par western blot (5.) montrant une absence de la protéine chez un patient atteint de dysferlinopathie (patient 2) en comparaison à un patient sain (patient 1). Adapté de (Diaz-Manera et al., 2018; Fanin and Angelini, 2016; Fernández-Eulate et al., 2021).

Au niveau protéique, les dysferlinopathies sont diagnostiquées par une absence totale ou une sévère réduction de dysferline, associée à une expression normale d'autres protéines musculaires. Ce défaut peut être observé par un immunomarquage des biopsies ou quantifié par la technique de western blot. Néanmoins, lorsqu'une réduction de dysferline et non une absence est observée dans les échantillons, des analyses complémentaires doivent être effectuées. En effet, plusieurs études rapportent qu'une diminution de dysferline peut occasionnellement être observée dans d'autres types de LGMD induites par un déficit primaire en calpaïne 3 (Chrobáková et al., 2004) ou en cavéoline-3 (Matsuda, 2001).

Un certain nombre d'autres technologies peut être utilisé de façon complémentaire pour suivre l'étendue des lésions musculaires, comme l'imagerie musculo-squelettique par IRM (imagerie par résonance magnétique), Elle n'est pas assez spécifique pour distinguer les différentes formes de myopathies mais permet d'identifier les muscles affectés et d'évaluer la progression de la maladie. L'imagerie permet par exemple de visualiser une inflammation musculaire au stade initial des dysferlinopathies ou une infiltration graisseuse dans la phase atrophique (Patel et al., 2017). Dans un article récent (Diaz-Manera et al., 2018), un consortium international à

l'origine d'une étude d'histoire naturelle de la dysferlinopathie met l'accent sur l'intérêt de l'imagerie, en particulier celui de l'IRM musculaire du corps entier. A partir des données d'IRM de 181 patients, les auteurs ont en effet pu identifier un profil type de répartition du remplacement graisseux des fibres musculaires dans la dysferlinopathie. Les auteurs ont également pu déterminer des paramètres évolutifs de la maladie dans le cadre de l'histoire naturelle. Autant d'éléments nouveaux qui pourront être utiles, autant pour le diagnostic et l'évolution de la pathologie que pour les essais cliniques à venir.

2.3. Le diagnostic génétique

Afin d'identifier avec précision le gène ainsi que le variant pathogène en cause dans la maladie, le séquençage d'ADN génomique est nécessaire. Selon les besoins diagnostics, différentes techniques de séquençage peuvent être utilisées. Le séquençage par Sanger est effectué lorsque les informations cliniques sont assez précises pour orienter la recherche vers un nombre réduit de gènes à séquencer (1 à 3). Il permet notamment d'identifier des variants familiaux connus dans le cas où d'autres membres de la famille du patient sont atteints de maladies musculaires. Lorsque les premiers tests de diagnostic ne permettent pas d'identifier les causes génétiques de la maladie, le séquençage de nouvelle génération (NGS pour next-generation sequencing) est alors utile puisqu'il permet d'étudier des régions génétiques de grande taille et l'analyse simultanée de plusieurs gènes. Il est cependant nécessaire de cibler au préalable ce qui doit être analysé afin d'être le plus pertinent possible et de réduire les coûts d'analyse. Dans le cadre des myopathies, l'approche par NGS se fait généralement sur un panel de gènes prédéfinis (entre 20 et 300) lorsque la maladie est caractérisée et que de nombreux gènes sont connus. Par contre, lorsque le phénotype de la maladie est caractérisé mais que les gènes majeurs connus ont été exclus, l'analyse peut être orientée sur l'ensemble des parties codantes du génome. On parle alors d'exome clinique (~5 000 gènes décrits en pathologie humaine) ou d'exome entier (~20 000 gènes ~1 à 2% génome).

Le NGS semble devenir la nouvelle référence de test génétique pour les maladies musculaires puisqu'il présente un meilleur taux de réussite au diagnostic des troubles des muscles squelettiques, dont les LGMD (Nigro and Savarese, 2016). Cependant, le volume de données générées par le séquençage à haut débit est important et plus difficile à analyser. Le principal défi d'analyse du NGS repose sur l'interprétation du caractère pathogène des variants identifiés (Li et al., 2022). En effet, le génome d'un individu peut différer du génome humain de référence sur 4 à 5 millions de sites (Auton et al., 2015). Afin d'interpréter la pathogénicité des variants dans un contexte de diagnostic, un système de classification a été élaboré par l'ACMG (American College of Medical Genetics). Ce système est notamment basé sur les données provenant de la littérature (1000Genome, gnomAD, Leiden Open Variation Database et Human Gene Mutation Database), des prédictions informatiques et des études fonctionnelles (Richards et al., 2015). Ainsi, les variants peuvent être déterminés comme pathogènes, probablement pathogènes, de signification incertaine (VUS for variant of uncertain significance), probablement bénins ou bénins. Néanmoins, ils sont souvent signalés comme VUS. Dans le

cadre des dysferlinopathies, 2648 variants sont par exemple répertoriés dans la base de données publique ClinVar, dont 811 sont de signification incertaine.

3. Les bases génétiques et moléculaires des dysferlinopathies

Une origine génétique commune aux formes cliniques des dysferlinopathies a été mise en évidence dans les années 1990 par la découverte de l'implication d'un même locus 2p13 dans la LGMD R2 (Bashir et al., 1994) et la MM (Bejaoui et al., 1995; Illarioshkin et al., 1996). La cause génétique responsable de ces deux formes fut découverte quelques années plus tard lorsque deux études menées par les groupes de Kate Bushby et de Robert H. Brown ont simultanément identifié un nouveau gène qui était communément muté dans les deux maladies (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998). La protéine prédite étant homologue à la protéine fer-1 de *C. elegans*, elle fut nommée « dysferline » pour « dystrophy-associated fer-1 like protein » et sa séquence codante reçut le symbole *DYSF* (Liu et al., 1998). Tout ceci aboutit finalement à la notion de dysferlinopathie en 1999 comme un ensemble de MD causées par une déficience commune en dysferline (Bushby, 1999).

3.1. La structure du gène *DYSF* et ses transcrits

Le gène humain *DYSF* s'étend sur plus de 150 kilobases (kb) au niveau p13.3-p13.1 du bras court du chromosome 2 et comprend 55 exons de taille variable, allant de 30 à 461 paires de bases (bp) (Aoki et al., 2001; Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998).

Quatorze transcrits du gène *DYSF* sont connus à ce jour chez l'homme, permettant la production d'autant d'isoformes de la protéine dysferline qui n'ont pas tous la même importance biologique ni la même répartition tissulaire (Figure 12). Ces quatorze transcrits résultent de l'épissage alternatif du gène *DYSF* à partir de deux sites différents d'initiation de la transcription présents dans l'intron 1 (Pramono et al., 2009, 2006). Sept variants *DYSF* sont générés à partir du promoteur canonique alors que les sept autres variants *DYSF_v1* le sont à partir du promoteur alternatif. L'expression des transcrits contenant l'exon alternatif v1 semble être inférieure (23%) comparée à celle des transcrits contenant l'exon 1 classique dans le muscle squelettique, suggérant que ces derniers pourraient être les transcrits principaux de ce tissu. Les 14 transcrits sont également produits par un épissage alternatif induisant l'exclusion de l'exon 17 (Salani et al., 2004) ou par l'inclusion dans le cadre de lecture des exons alternatifs 5a et 40a dérivés respectivement des introns 5 et 40 (Pramono et al., 2009). Ces transcrits sont différentiellement exprimés selon le stade développemental, le type de tissu et la condition pathologique. Parmi cette diversité de transcrits, le numéro 1 est celui qui est majoritairement exprimé dans le muscle squelettique adulte (ENST00000258104.8) puisqu'il représente 73% de tous les transcrits dans ce tissu. C'est le transcrit le plus long (~7kb) et qui ne contient aucun exon alternatif.

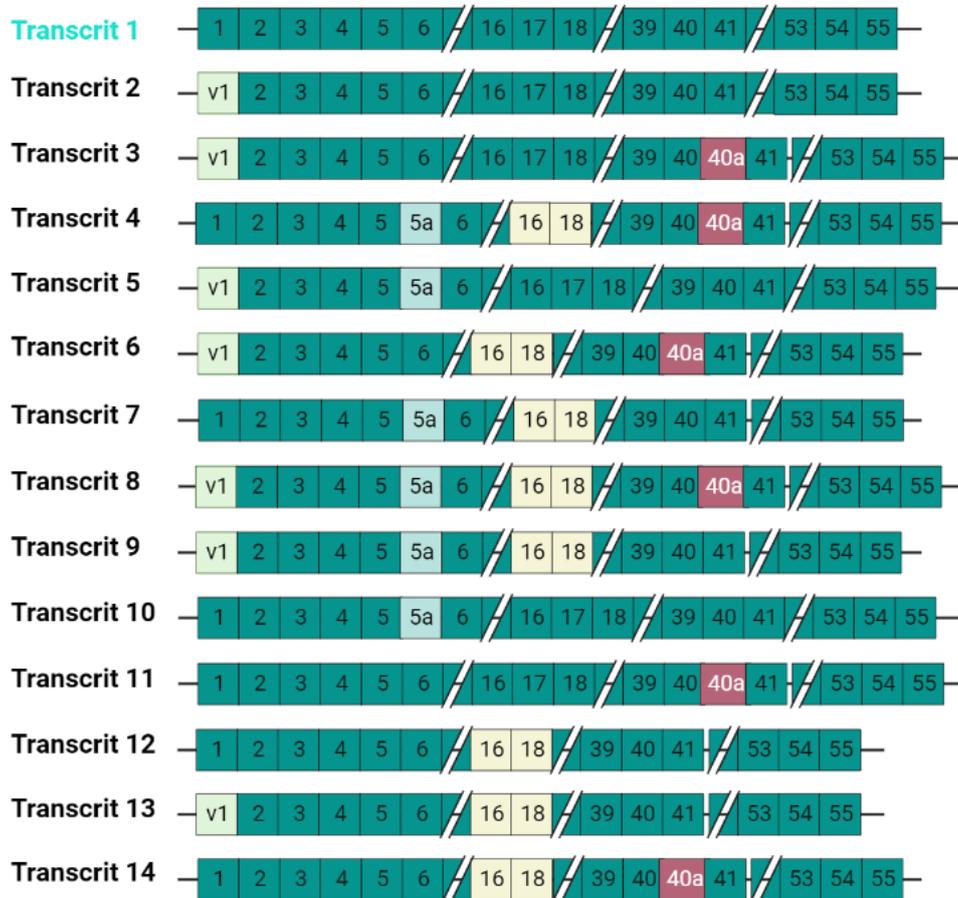


Figure 12. Les transcrits du gène *DYSF*.

Schéma adapté de (Pramono et al., 2009) avec le site BioRender.

3.2. Les mutations du gène *DYSF* : une absence de corrélation génotype-phénotype

Les dysferlinopathies sont des maladies génétiques héréditaires qui se transmettent au sein d'une même famille selon un mode de transmission autosomique récessif. Néanmoins, il existe quelques rares patients atteints de dysferlinopathie dont aucun membre de la famille n'est porteur d'un variant pathogène de *DYSF* (Okahashi et al., 2008). Ce sont des cas dits sporadiques car l'anomalie génétique est issue d'une erreur lors de la gamétogénèse.

Les mutations pathogènes, responsables de dysferlinopathies, sont réparties sur toute la longueur de la séquence codante de *DYSF*, sans site en particulier plus sujet à une fréquence élevée de variants qu'un autre (Shin et al., 2015) (Figure 13). Depuis la description des premières mutations de *DYSF*, plus de 2000 variants polymorphiques ont été rapportés dont quelques centaines seraient associés à un phénotype pathologique (bases de données : ClinVar = 374 ; UMD DYF = 416 ; LOVD = 648). Ces mutations pathogènes incluent des variants non-sens (20%) et faux-sens (35%), des insertions ou délétions décalant le cadre de lecture (30%), des variants au niveau des sites d'épissage (12%) et des grands réarrangements génomiques (3%) (Fanin and Angelini, 2016; Harris et al., 2016). Néanmoins, d'autres mutations restent encore à découvrir. En effet, la recherche de variants pathogènes pour les dysferlinopathies est difficile

à réaliser en raison de la grande taille de *DYSF* et de la répartition des mutations qui couvrent la quasi-totalité du gène. Il est d'ailleurs estimé que pour 20% des patients atteints de dysferlinopathie, seul un allèle mutant *DYSF* a été identifié, suggérant que la deuxième mutation pourrait avoir échappé à son identification (Charnay et al., 2021; Krahn et al., 2009; Nguyen et al., 2005).

Parmi les variants pathogènes identifiés, certaines mutations sont dites « privées » car elles sont récurrentes dans des populations spécifiques. Cela peut s'expliquer par l'isolement de petites communautés (consanguinité) ainsi que par des facteurs culturels, historiques ou démographiques. Dans le cadre des dysferlinopathies, cela semble être le cas pour la mutation espagnole p.R1905X (Vilchez et al., 2005), japonaise p.W999C (Izumi et al., 2020) ou les mutations fondatrices récurrentes parmi les populations juives d'Israël et de la Libye (Argov et al., 2000; Bashir et al., 1998).

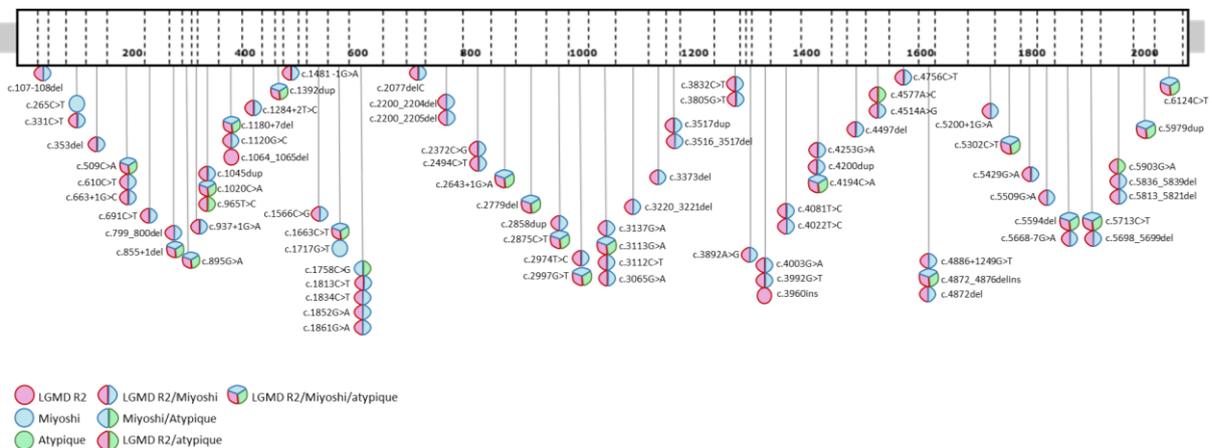


Figure 13. Cartographie des principales mutations pathogènes de *DYSF* répertoriées.

Les variants pathogènes sont répartis uniformément sur le gène *DYSF* (chaque tiret sépare les exons). Il n'existe pas de corrélation génotype-phénotype identifiée puisqu'une même mutation peut engendrer différents phénotypes cliniques. (Source : base de données UMD-*DYSF*)

Les corrélations génotype-phénotype semblent compliquées à établir pour les dysferlinopathies, notamment en raison de l'hétérogénéité des phénotypes cliniques et parce que la plupart des patients sont des composites hétérozygotes du gène *DYSF*. Des mutations identiques ont, par exemple, été associées à des âges d'apparition et des degrés de sévérité de la maladie différents, ainsi qu'à une hétérogénéité des muscles impliqués (Ceyhan-Birsoy et al., 2015; Illarioshkin et al., 2000; Krahn et al., 2009). Une variabilité clinique a également été décrite parmi des patients porteurs de la même mutation homozygote au sein d'une même famille (Ceyhan-Birsoy et al., 2015; Illarioshkin et al., 2000; Vilchez et al., 2005; Weiler et al., 1999).

4. La dysferline

Depuis son identification dans les années 1990, de nombreuses études se sont intéressées à disséquer la structure, la localisation et l'expression de la dysferline.

4.1. La structure modulaire de la dysferline

La dysferline est une grande protéine de 237 kilodaltons (Anderson et al., 1999) qui appartient à la famille des ferlines, un groupe de protéines qui partagent des homologies de séquence et de structure. Les ferlines sont codées par six gènes paralogues chez les mammifères (*Fer1L1* à *Fer1L6*) dont *Fer1L1* qui correspond au gène *DYSF* codant pour la dysferline. Ce sont des protéines transmembranaires, toutes caractérisées par un court domaine extracellulaire C-terminal et de multiples domaines C2 cytosoliques. Les ferlines contiennent également un nombre variable de domaines Fer et DysF. Bien que le rôle de ces derniers reste inconnu, la plupart des fonctions attribuées aux ferlines semblent être médiées par leurs domaines C2 (Lek et al., 2012) qui se lient aux bicouches lipidiques et favorisent le remodelage des structures membranaires. Ces modifications permettent une variété de processus cellulaires tels que la fusion de vésicules à la membrane ou le recrutement d'autres protéines impliquées dans le trafic membranaire (Lek et al., 2012; Marty et al., 2013). Parmi les membres de la famille les plus étudiés, la myoferline est, par exemple, fortement exprimée dans le muscle squelettique en développement (Davis et al., 2000) où elle régule la fusion des myoblastes et la régénération musculaire (Doherty et al., 2005). Elle participe également au trafic des vésicules et à la croissance du muscle squelettique (Davis et al., 2000; Zhu et al., 2019). La protéine fer-1 like family member 5 est, quant à elle, impliquée dans la fusion des myoblastes au sein du muscle squelettique (Usha Kalyani et al., 2020).

Ainsi, la dysferline est une protéine modulaire composée de sept domaines C2 ainsi que de trois domaines Fer et DysF, d'un domaine transmembranaire en région c-terminale et d'une petite portion extracellulaire (Figure 14). Les sept domaines C2 de la dysferline sont nommés de C2A à C2G (Therrien et al., 2006) selon leur distribution tout au long de la séquence protéique (Marty et al., 2013) et possèdent chacun une affinité variable pour le calcium et les phospholipides (Abdullah et al., 2014; Davis et al., 2002; Fuson et al., 2014; Marty et al., 2013; Therrien et al., 2009). Ces domaines semblent avoir des fonctions indépendantes dans le muscle squelettique mais le rôle de chacun est encore flou.

Le premier domaine, C2A, en position N-terminale semble jouer un rôle de médiateur dans la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique (Han et al., 2012) et serait également nécessaire pour l'accumulation de la dysferline au niveau des sites endommagés de la membrane plasmique grâce à l'interaction avec son partenaire MG53 (Matsuda et al., 2012). Ce domaine serait également impliqué dans la formation de complexes multi-protéiques avec les annexines A1 et A2, l'alpha tubuline (Azakir et al., 2010) (papier rétracté) ou la protéine AHNAK (Huang et al., 2007). De plus, le fragment protéique contenant les domaines C2F, C2G et le domaine transmembranaire semble être impliqué, lui aussi, dans la réparation du sarcolemme

(Krahn et al., 2010; Lek et al., 2013; Redpath et al., 2014). Ce fragment, appelé « mini dysferline », provient du clivage de la dysferline par des calpaïnes lors d'une lésion de la membrane plasmique. Enfin, le motif C2B-FerI-C2C est supposé réguler l'expression de la dysferline à la membrane plasmique (Evesson et al., 2010) ainsi que son taux d'endocytose, qui semble être crucial dans la réparation membranaire (Idone et al., 2008; McDade et al., 2014). Très récemment, le rôle de chaque domaine C2 a été un peu plus exploré (Muriel et al., 2022). Il a ainsi été montré que l'ensemble des domaines contribue au mécanisme de réparation membranaire de la cellule musculaire, avec un rôle prédominant de C2A et C2B sans lesquels le mécanisme est complètement inhibé. De plus, les domaines C2D à C2G seraient nécessaires pour la localisation de la dysferline au sarcolemme. Concernant les domaines Fer et DysF de la dysferline, la relation structure-fonction n'est pas connue. Une seule étude propose un rôle de DysF I dans la réparation membranaire par le recrutement sélectif de la dysferline à la membrane plasmique (Espinoza-Fonseca, 2016). Par ailleurs, les récents progrès des méthodes *in silico* dans l'étude du repliement des protéines complexes pourraient permettre à l'avenir d'améliorer notre compréhension de la structure de chaque domaine et, possiblement, leur fonction (Dominguez et al., 2022).

L'étude des transcrits résultant de l'épissage alternatif du gène *DYSF* pourrait également aider à la compréhension des fonctions de la dysferline, et plus précisément de ses domaines. En effet, il est probable que la présence d'exons alternatifs (v1, 5a, 17 et 40a) puisse avoir une importance structurelle et fonctionnelle dans l'organisme, comme cela a par exemple été démontré avec l'exon 40a qui aurait un rôle dans la réparation membranaire des cellules musculaires (Ballouhey et al., 2021). Dans le muscle squelettique, il semble donc probable que le remplacement de l'exon 1, codant pour le domaine protéique C2A de la dysferline, par l'exon v1 (19% des transcrits de la dysferline du muscle squelettique) puisse modifier les interactions de la protéine avec les phospholipides ou ses partenaires protéiques (Fuson et al., 2014) et donc sa fonction.

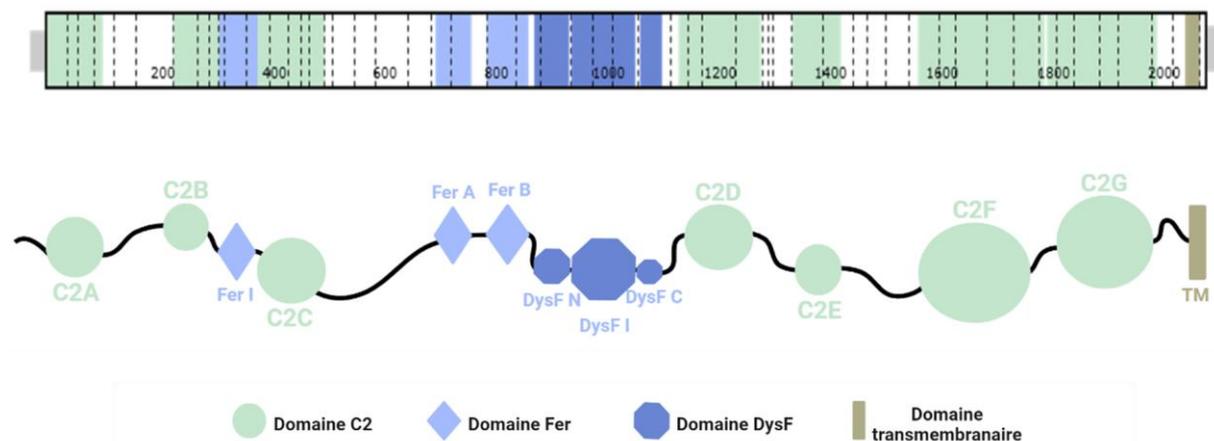


Figure 14. La structure modulaire de la dysferline.

La dysferline est composée de sept domaines C2, trois domaines Fer, trois domaines DysF et un domaine transmembranaire. Les parties codantes de chaque domaine sont référencées sur la représentation du gène *DYSF* par le code couleur associé. Schéma inspiré de la thèse *Etude d'un transcrit alternatif de la dysferline et mise en place d'un traitement pour les dysferlinopathies* par Océane BALLOUHEY, 2021 et créé sur le site BioRender.

4.2. L'expression et la distribution de la dysferline

La dysferline est détectée dans les premiers stades du développement fœtal, dès 5 à 6 semaines de gestation, quand les membres commencent à montrer une différenciation régionale (Anderson et al., 1999). L'expression de la dysferline persiste ensuite dans le muscle squelettique mature.

Concernant sa distribution tissulaire, la dysferline est une protéine ubiquitaire. Des données transcriptomiques montrent que son ARN messager (ARNm) est principalement exprimé dans les muscles squelettiques, bien qu'il soit également présent dans le cœur et le placenta, et plus faiblement dans le foie, les poumons, les reins et le pancréas (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998). Au niveau protéique, l'expression la plus élevée de dysferline se trouve aussi dans le muscle squelettique (Anderson et al., 1999). On la retrouve également fortement exprimée dans le muscle cardiaque et les reins ou les monocytes circulants du sang (Ho et al., 2002). Malgré cette large distribution tissulaire, les phénotypes pathologiques résultant d'une déficience en dysferline ont été majoritairement décrits dans le muscle squelettique.

La dysferline présente une expression et une distribution subcellulaire différentielle au cours de la myogenèse. Des données provenant de cultures primaires de biopsies musculaires humaines indiquent que la dysferline peut être détectée dans les MuSC activées myoD positives et que le niveau d'ARN augmente ensuite progressivement à mesure que les myoblastes se différencient en myotubes (De Luna et al., 2004; Salani et al., 2004).

4.3. La localisation de la dysferline

Dans le tissu musculaire squelettique, la dysferline a été décrite pour la première fois comme une protéine concentrée au niveau du sarcolemme des myofibres (Anderson et al., 1999). Quelques années plus tard, la dysferline a été détectée au niveau des membranes des tubules-t où elle s'aligne avec les récepteurs de la dihydropyridine (DHPR) et de la ryanodine (RyR) qui sont présents au niveau des triades (Ampong et al., 2005; Kerr et al., 2013; Klinge et al., 2010, 2007; Roche et al., 2011). D'autres études ont également montré une localisation de la dysferline au niveau de vésicules intracellulaires des cellules musculaires, notamment dans les myotubes en cours de différenciation (Bansal and Campbell, 2004; McDade and Michele, 2014).

La répartition de la dysferline entre le sarcolemme et la membrane des tubules-t change au cours de la maturation musculaire. Dans des expériences d'immunohistochimie, l'intensité du marquage de la dysferline atteint son maximum sur les tubules-t pendant leur développement et leur régénération, mais se redistribue principalement vers le sarcolemme dans les fibres musculaires matures, sans pour autant perdre son expression au niveau des tubules-t.

5. Les modèles d'étude des dysferlinopathies

Une grande majorité de nos connaissances sur les dysferlinopathies proviennent du développement et de la caractérisation de modèles animaux. En récapitulant des caractéristiques de la pathologie, ils sont utiles à la compréhension des processus physiopathologiques mais également dans l'identification et la validation de cibles thérapeutiques. Toutefois, ces modèles présentent certaines limites qui nécessitent de développer des modèles cellulaires alternatifs plus ciblés afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires associés aux dysferlinopathies.

5.1. Les modèles animaux naturels

Afin de pouvoir étudier les mécanismes responsables des dysferlinopathies, les modèles murins déficients en dysferline ont été privilégiés. En effet, la structure musculaire de la souris est similaire à celle de l'homme et le gène *DYSF* présente une homologie de séquence globale de plus de 90% entre les deux espèces (Vafiadaki et al., 2001). Parmi les nombreux modèles murins publiés (tableau 3), deux sont naturels : les souris SJL/J et A/J.

Modèle	Mutation	Phénotype musculaire	Muscles touchés	Myopathie déclarée	Myopathie active	Autres phénotypes	Référence
SJL/J	Altération d'un site d'épissage et délétion de l'exon 45	Faiblesse musculaire proximale Atrophie musculaire Fibrose Remplacement graisseux Inflammation Fibres dystrophiques	Muscles proximaux (quadriceps/triceps)	1 mois	6-8 mois	Comportement agressif Incidence élevée de lymphomes Sensibilité aux maladies auto-immunes et aux infections virales	(Weller et al., 1997) (Bittner et al., 1999) (Vafiadaki et al., 2001)
A/J	Insertion spontanée d'un rétrotransposon (5-6 kb) dans l'intron 4	Faiblesse musculaire proximale Fibrose Remplacement graisseux Inflammation Fibres dystrophiques Défaut d'intégrité du sarcolemme	Muscles abdominaux et proximaux (quadriceps/triceps)	4-5 mois	8-12 mois	Cardiomyopathie modérée à 10 mois Perte progressive de l'audition Incidence élevée d'adénomes pulmonaires Sensibilité aux infections	(Ho et al., 2004)

Tableau 3. Les principaux modèles animaux naturels de dysferlinopathies.

Le modèle murin *SJL/J* (ou *SJL*) présente une délétion spontanée de 171 bp au niveau d'un site d'épissage de l'intron 44 du gène *DYSF*, menant au saut de l'exon 45 et à une réduction de 85% de l'expression de la dysferline (Bittner et al., 1999a; Vafiadaki et al., 2001). Histologiquement, les premières lésions musculaires peuvent être détectées chez les souris âgées d'un mois. Ensuite, la myopathie progresse et devient active vers l'âge de sept mois avec la détection de caractéristiques dystrophiques avancées comme de l'inflammation, de la fibrose et le remplacement de fibres par du tissu adipeux. Au niveau clinique, les muscles proximaux sont les plus affectés. L'atrophie musculaire commence à dix mois et, à seize mois, la moitié des fibres musculaires sont remplacées par de la graisse.

Le modèle *A/J* porte une insertion d'un rétrotransposon de 5000-6000 bp dans l'intron 4 du gène *DYSF*, menant à une absence de la protéine (Ho et al., 2004). Les souris *A/J* présentent un début plus tardif et une progression plus lente de la maladie par rapport au modèle *SJL*. Les premières caractéristiques dystrophiques apparaissent à l'âge de quatre/cinq mois, affectant

sévèrement les muscles abdominaux puis les muscles proximaux des membres inférieurs. Les principales caractéristiques histopathologiques et cliniques sont : des fibres dystrophiques, une inflammation, un remplacement des lésions par du tissu fibreux et graisseux et une réduction de l'intégrité du sarcolemme mis en évidence par des taux de CPK augmentés entre 4 et 6 fois et des anomalies ultra-structurales de la membrane (Kobayashi et al., 2010). La progression de la maladie est lente, sauf dans les muscles abdominaux, qui présentent un taux de fonte musculaire plus rapide.

5.2. Les modèles animaux génétiquement modifiés

En parallèle, d'autres modèles murins de dysferlinopathie ont été créés par modification de leur génome grâce à diverses techniques comme le croisement de souches, la substitution chromosomique ou la recombinaison homologe (tableau 4).

Tout d'abord, les modèles murins naturels de dysferlinopathie ont été rétro-croisés sur des fonds génétiques caractérisés afin d'identifier le véritable effet causal de la déficience en dysferline. En effet, les modèles SJL et A/J possèdent certaines caractéristiques qui ne sont pas observées chez les patients (Ho et al., 2004) et qui peuvent s'expliquer par leur fond génétique (Doetschman, 2009). Les techniques de croisement de souches ont ainsi permis d'obtenir les modèles murins *Bla/J*, *SCID-BLAJ* et *C57BL/10.SJL-Dysf*. La souris *BLA/J* étant le modèle murin le plus populaire en raison de son phénotype similaire à celui des autres modèles dysfonctionnels, de sa sensibilité réduite aux infections et de son fond génétique bien étudié (Lostal et al., 2010), c'est la seule que je décrirai en détail. Les autres lignées sont résumées dans le tableau 4. Les souris homozygotes *Bla/J* ont été obtenues par le croisement de la souche *A/J* avec des souris saines *C57BL/6* (Lostal et al., 2010), ce qui permet de maintenir le caractère délétère de la mutation *A/J* tout en possédant le fond génétique des souris *C57BL/6*. Les caractéristiques dystrophiques des souris *Bla/J* sont similaires à la souche *A/J* mais sont détectées plus tôt que dans la lignée originale. L'apparition de la maladie est observée dès deux mois et se caractérise par la présence de fibres centronucléées et de zones d'inflammation. Les altérations morphologiques s'aggravent à l'âge de quatre mois. La majorité des muscles sont altérés, le *psoas* étant le plus affecté, suivi du *quadriceps fémoral* et du *muscle tibial antérieur*, puis du *gastrocnémien*. Les souris parcourent moins de distance et sont moins actives que le type sauvage, et présentent également une diminution de leur capacité de réparation de leurs membranes.

D'autres modèles ont été développés en invalidant le gène *DYSF* (*knockout*) par des techniques de substitution chromosomique ou de recombinaison homologue. Il s'agit des modèles murins *Chr6-A/J*, *Dysf -/-*, *dqxDysf -/-* et *Dysfpy1159x/py1159x* dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau 4.

Modèle	Origine	Mutation	Phénotype musculaire	Muscles touchés	Myopathie déclarée	Myopathie active	Référence
Bla/J	Croisement A/J et C57BL/6	Insertion d'un rétrotransposon (5-6 Kb) dans l'intron 4	Faiblesse musculaire des membres inférieurs Fibrose Remplacement graisseux Inflammation Fibres dystrophiques Remodelage du métabolisme lipidique Défaut d'intégrité du sarcolemme	Muscles proximaux (psoas/gluteal/ quadriceps)	2 mois	4-6 mois	(Lostal et al., 2010)
SCID-BLAJ	Croisement Bla/J et SCID	Insertion d'un rétrotransposon (5-6 Kb) dans l'intron 4	Moins de fibres dystrophiques et de défaut d'intégrité du sarcolemme que le modèle Bla/J Déficience en lymphocytes B et T	Muscles proximaux (quadriceps)	Caractéristiques dystrophiques plus légères que Bla/J	Caractéristiques dystrophiques plus légères que Bla/J	(Diaz-Manera et al., 2010) (Farini et al., 2012)
C57BL/10.SJL-Dysf	Croisement SJL et C57BL/10	Altération d'un site d'épissage et délétion de l'exon 45	Faiblesse musculaire Fibrose Remplacement graisseux Inflammation Fibres dystrophiques	Muscles proximaux (quadriceps/triceps)	1 mois	6-8 mois	(Von Der Hagen et al., 2005)
Chr6-A/J	Substitution chromosomique du chromosome 6 entre A/J et C57BL/6	Insertion d'un rétrotransposon (5-6 Kb) dans l'intron 4	Faiblesse musculaire proximale Fibrose Remplacement graisseux Inflammation Fibres dystrophiques Défaut d'intégrité du sarcolemme	Muscles abdominaux et proximaux (quadriceps/triceps)	4-5 mois	8-12 mois	(Nadeau et al., 2000)
Dysf-/-	Modification génétique de ESC	Délétion des exons 53 à 55	Faiblesse musculaire proximale Remplacement graisseux Inflammation Fibres dystrophiques Défaut de PMR	Muscles ilio-psoas/ quadriceps/ triceps/ gastrocnémiens	2 mois	8-10 mois	(Bansal et al., 2003)
dqx^{Dysf-/-}	Invalidation de gène par recombinaison homologue	Insertion d'un codon stop dans l'exon 24 dans le modèle C57BL/6	Faiblesse musculaire Fibres dystrophiques	/	/	/	(Seo et al., 2011)
Dysf^{py1159x/py1159x}	Invalidation de gène par recombinaison homologue	Insertion d'un codon stop dans l'exon 32 dans le modèle C57BL/6	Faiblesse musculaire Fibrose Remplacement graisseux Fibres dystrophiques	Quadriceps/tibial antérieur/ gastrocnémiens	3 mois	9 mois	(Ballouhey et al., in preparation 2022)
MMex38	Mutagenèse dirigée par recombinaison homologue de ESC	Insertion d'une mutation faux sens dans l'exon 38 (c.4079T>C; p.L1360P)	Fibrose Fibres dystrophiques Défaut de PMR	Quadriceps	3 mois	/	(Malcher et al., 2018)

Tableau 4. Les principaux modèles animaux génétiquement modifiés de dysferlinopathies.

Abréviations : ESC, cellules souches embryonnaires ; PMR, réparation de la membrane plasmique.

Enfin, un premier modèle murin porteur d'une mutation faux-sens a été récemment créé afin de pouvoir étudier les conséquences histologiques et cliniques de la variation d'un seul acide aminé et du mauvais repliement de la dysferline (Malcher et al., 2018). Ce modèle, **MMex38**, a été généré par l'introduction homozygote de la mutation murine *DYSF* c.4079T>C dans l'exon 38 du modèle C57BL/6, menant à la modification protéique p.L1360P. Ce variant est analogue à la mutation humaine c.4022T>C (p.L1341P), responsable d'une LGMD R2. Le modèle MMex38 récapitule des phénotypes dystrophiques progressifs et conformes à ceux observés chez les patients. A la naissance, les souris ne présentent pas de symptômes sur le plan clinique et histologique. Les premiers signes de dystrophie musculaire, comme des fibres nécrosées et dégénérantes ou de la fibrose, apparaissent au début de l'âge adulte (à partir de trois mois) et s'aggravent avec le temps. Au niveau protéique, la mutation induit une diminution de 90% de l'expression de la protéine. Tandis que la dysferline est totalement absente du sarcolemme, des accumulations protéiques peuvent être observées sous forme de dépôts amyloïdes.

Parallèlement aux modèles murins, d'autres modèles animaux de dysferlinopathie ont été créés à partir d'organismes phylogénétiquement plus éloignés afin de faciliter l'étude de certains phénomènes et mécanismes moléculaires. Néanmoins, ces modèles sont rares. Un seul modèle de poisson zèbre a ainsi été développé en 2011, à l'aide d'oligonucléotides anti-sens ciblant l'ARNm de la dysferline (Kawahara et al., 2011). Les poissons zèbre modifiés au stade embryonnaire présentent une expression réduite de la dysferline associée à une désorganisation du muscle squelettique.

5.3. Les modèles cellulaires

Les souris déficientes en dysferline fournissent des informations essentielles sur la fonction de la protéine et les processus qui conduisent à la dystrophie musculaire. Néanmoins, la mutation étant dans un contexte murin, certains modèles animaux peuvent ne pas récapituler entièrement le phénotype pathologique observé chez l'homme. De plus, les centaines de mutations pathologiques du gène *DYSF* ne peuvent pas être créées et évaluées dans des modèles murins pour des raisons de coûts et de temps. Dans ce contexte, plusieurs modèles humains *in vitro* ont été développés afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires associés aux dysferlinopathies.

Les myoblastes primaires isolés à partir de biopsies musculaires de patients représentent la ressource biologique la plus couramment utilisée. Néanmoins, l'accès à ces cellules est réduit à cause de la fibrose excessive présente dans les muscles des patients et leur capacité de prolifération en culture est limitée par la sénescence répliquative (Aas et al., 2013). Afin de contourner ces limitations, l'immortalisation des myoblastes primaires par transduction de hTert (human telomerase reverse transcriptase) et de CDK4 (cyclin-dependent kinase 4) est donc couramment utilisée pour modéliser les dysferlinopathies (Mamchaoui et al., 2011; Philippi et al., 2012). Une dizaine de lignées myogéniques LGMD R2 porteuses de variants pathogènes non-sens ou faux-sens ont ainsi été immortalisées sur la plateforme MyoLine de l'institut de myologie. C'est le cas de la lignée faux-sens 814 (c.4022T>C, p.L1341P) que j'ai

utilisée dans le cadre de mon projet de thèse.

En parallèle, d'autres modèles *in vitro* ont été développés par transdifférenciation de cellules non musculaires en cellules squelettiques (Bar-Nur et al., 2018). A l'aide d'une transduction lentivirale du facteur myogénique *myoD* dont l'expression est inducible, des fibroblastes issus de biopsies de peau de patients sont convertibles en myoblastes et peuvent fusionner en myotubes comme le font les cellules musculaires.

Bien que ces différents modèles évoqués présentent plusieurs avantages en terme de prolifération et de maturité, le développement de modèles cellulaires sans transgènes à partir de procédures non invasives a également été proposé grâce à l'utilisation de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC). Une première preuve de concept d'utilisation des hiPSC pour modéliser la LGMD R2 et tester une thérapeutique a ainsi été rapportée dès 2013 (Tanaka et al., 2013). A ce jour, quelques lignées de hiPSC ont été décrites dans la littérature (Kokubu et al., 2019; Turan et al., 2016) et seule une petite collection de trois lignées a été déposée par la Jain Foundation auprès du revendeur WiCell.

6. Les partenaires et les fonctions de la dysferline dans le muscle squelettique

Depuis son identification comme la cause directe de dysferlinopathie, des efforts importants ont été déployés pour révéler les fonctions de la dysferline, en particulier avec le développement des modèles d'étude détaillés précédemment. Plusieurs travaux de recherche ont ainsi pu identifier un rôle consensus de la dysferline dans le mécanisme de réparation des membranes plasmiques. Ce rôle est particulièrement pertinent dans les muscles squelettiques où la réparation de la membrane plasmique lésée constitue un phénomène critique pour maintenir l'intégrité et la fonction musculaire. D'autres études ont également supposé que la dysferline pourrait être impliquée dans différents processus cellulaires tels que :

- (i) la croissance, la différenciation et la régénération musculaire ;
- (ii) la formation et la stabilisation des tubules-t ;
- (iii) l'inflammation ;
- (iv) l'homéostasie lipidique.

Cependant, à l'heure actuelle, on ne sait pas exactement dans quelle mesure ces mécanismes contribuent au développement des dysferlinopathies. La situation devient encore plus complexe si l'on considère les diverses manifestations cliniques de cette pathologie. Dans la partie qui va suivre, je vais donc décrire l'ensemble des fonctions supposées de la dysferline.

6.1. Le trafic vésiculaire et la réparation membranaire

La plupart des études visant à élucider les mécanismes pathologiques sous-jacents aux dysferlinopathies se sont concentrées sur le rôle de la dysferline dans la réparation de la membrane plasmique (PMR pour plasma membrane repair). Deux études princeps ont tout d'abord montré la présence d'irrégularités de la membrane plasmique, telles qu'une rupture

de la membrane plasmique, un épaissement de la lame basale et une accumulation de petites vésicules sous la lésion, dans des cellules musculaires squelettiques de patients porteurs de mutations de *DYSF* (Selcen et al., 2001) ou de souris modèles *Dysf*^{-/-} (Bansal et al., 2003), soulignant ainsi un rôle de la dysferline dans le maintien de l'intégrité structurale de la fibre musculaire. Par la suite, ces perturbations du sarcolemme ont été associées à un défaut de PMR dans des fibres de souris *Dysf*^{-/-} (Bansal et al., 2003) et des myocytes de patients (Philippi et al., 2012), suggérant alors que, dans les dysferlinopathies, l'altération du mécanisme de PMR causée par la perte de la dysferline pourrait être responsable de la dégénérescence musculaire.

La PMR est un processus dynamique qui permet de restaurer l'homéostasie intracellulaire et de maintenir une fonction musculaire normale (Steinhardt et al., 1994). Elle est déclenchée par une entrée massive de calcium et d'oxydants dans la cellule, générée par la rupture de la membrane de la cellule musculaire. Même si le fonctionnement exact de la PMR n'est pas encore clair, les multiples études menées pour élucider ce mécanisme ont conduit à l'identification de processus cellulaires complexes (Zhen et al., 2021) qui coexistent dans l'espace et le temps pour réparer le sarcolemme. Dans la suite de ce paragraphe, je vais donc décrire l'ensemble des processus participant à la PMR et pour lesquels un rôle de la dysferline a été décrit (Figure 15).

(i) Réduction de la tension membranaire et remodelage du cytosquelette

Dans le cadre de lésions importantes (>nm) (Cooper and McNeil, 2015), la rupture de la membrane plasmique induit une tension membranaire dont la force est opposée et supérieure à la force de réparation, provoquant une rétractation de la membrane au niveau du site de lésion et empêchant sa fermeture spontanée. Un premier mécanisme de PMR consiste donc à diminuer cette tension membranaire.

D'une part, la tension membranaire peut être réduite en remodelant le cytosquelette (Dai and Sheetz, 1999), notamment en diminuant l'actine corticale filamenteuse et en désassemblant le réseau de microtubules autour de la lésion membranaire. Pour cela, l'entrée massive de calcium par la partie membranaire endommagée entraîne l'activation locale de protéases, les calpaïnes (CPN), qui vont dégrader des protéines du cytosquelette (Redpath et al., 2014). En particulier, les CPN vont cliver deux partenaires de l'actine que sont la vimentine et la taline (Mellgren et al., 2007; Taveau et al., 2003), induisant une dépolarisation de la membrane qui permet de réduire la tension au sarcolemme. Le clivage de ces protéines favorise également le remodelage du cytosquelette en désassemblant le réseau d'actine endommagé. Cet événement essentiel pour la PMR (Abreu-Blanco et al., 2012) est néanmoins transitoire. Après le désassemblage du réseau d'actine, deux GTPases, RhoA et Cdc42, recrutent l'actine et la myosine autour du site de lésion pour former un anneau d'actomyosine (Abreu-Blanco et al., 2014) qui va continuellement se contracter pendant le processus de réparation de la membrane. Concernant la dysferline, il semblerait qu'elle ait un rôle à jouer dans le remodelage du cytosquelette, notamment de par son interaction avec son partenaire protéique, l'affixine (ou β -parvine) (Matsuda et al., 2005), une protéine de l'adhésion focale qui participe à la réorganisation de l'actine fibrillaire (Yamaji et al., 2004). Néanmoins, ce mécanisme reste encore

à élucider.

D'autre part, la tension membranaire peut être réduite en augmentant la surface du sarcolemme par l'ajout de lipides, grâce à un processus d'exocytose à distance du site lésé qui permet la fusion de membranes intracellulaires avec le sarcolemme (Steinhardt, 2005; Togo et al., 2000). Ce processus est une phase rapide où des vésicules locales, notamment les lysosomes, sont recrutées en réponse à une élévation aiguë de calcium intracellulaire. Concernant la dysferline, elle est supposée participer à l'exocytose de ces lysosomes (Defour et al., 2014; Han et al., 2012) puisque son absence dans les muscles squelettiques réduit le nombre de lysosomes présents au niveau du sarcolemme et entraîne une diminution globale de la cinétique et du nombre de lysosomes qui subissent une exocytose en réponse à une blessure. Plus précisément, la dysferline pourrait agir comme un effecteur de la fusion des vésicules intracellulaires avec la membrane plasmique. Elle semble en effet accélérer l'assemblage calcium dépendant des protéines de fusion SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) qui sont associées à chacune des membranes, en particulier via son interaction directe avec la syntaxine 4 et SNAP-23 (Coddling et al., 2016).

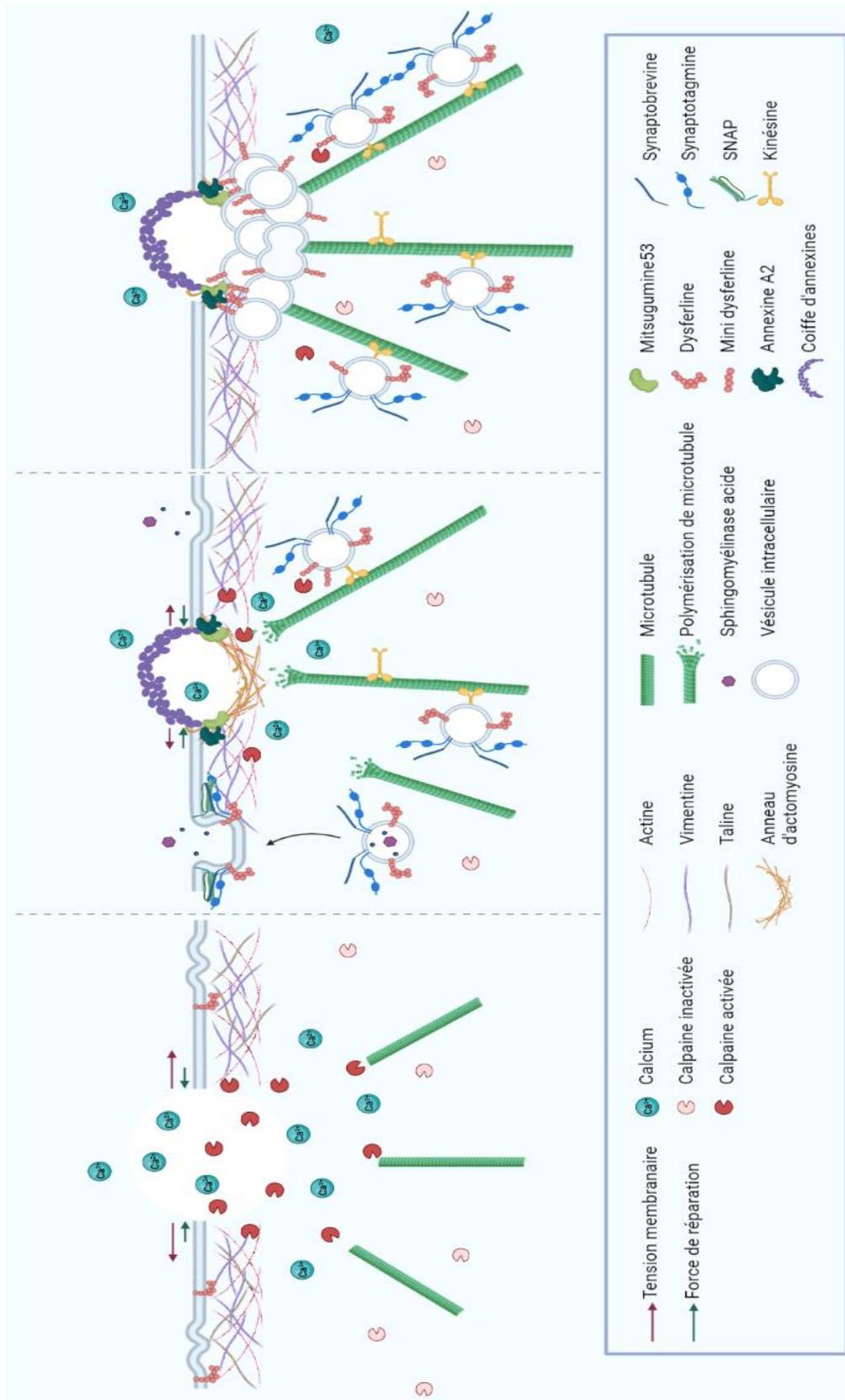


Figure 15. Le processus de réparation membranaire des cellules musculaires.

Lors d'une lésion du sarcolemme, un mécanisme actif de réparation est mis en place, faisant intervenir des processus cellulaires complexes qui coexistent dans l'espace et le temps. L'entrée massive de calcium dans la cellule induit plusieurs réactions : le remodelage du cytosquelette d'actine et des microtubules avec l'activation locale de calpaïnes, l'exocytose et le recrutement de protéines et de vésicules intracellulaires. L'ensemble de ces processus permet de réduire la tension membranaire et de former un anneau d'actomyosine ainsi qu'un patch membranaire qui vont permettre de combler la lésion. Schéma créé sur le site BioRender.

(ii) Formation d'un patch membranaire grâce au trafic vésiculaire

Un autre mécanisme important de la PMR est la formation d'un "patch membranaire" au niveau de la lésion qui empêche la fuite du contenu intracellulaire vers l'extérieur et qui comble la lésion (McDade et al., 2014; McDade and Michele, 2014; McNeil, 2009, 2002). Ce patch est formé de vésicules intracellulaires, contenant notamment la dysferline, qui sont recrutées au niveau de la blessure où elles fusionnent entre elles afin de former de grandes vésicules qui vont sceller la lésion membranaire. L'origine de ces vésicules n'a pas encore été identifiée. Les compartiments candidats sont les vésicules dérivées des tubules-t et les vésicules provenant du sarcolemme ou de ses sous-compartiments comme les endosomes et les lysosomes.

L'assemblage du patch membranaire semble être initié par un partenaire de la dysferline, la mitsugumine (MG53 ou TRIM72), qui facilite l'accumulation des vésicules intracellulaires vers le site lésé (Cai et al., 2009; McNeil, 2009; Weisleder et al., 2012). En effet, la MG53 détecte le changement d'oxydation du milieu intracellulaire à la suite d'une blessure du sarcolemme, s'oligodimérise et se déplace jusqu'à la lésion afin de pouvoir y recruter les vésicules intracellulaires grâce à son interaction avec la phosphatidylsérine des membranes et sa liaison avec le domaine C2A de la dysferline. La MG53 et la dysferline forment alors un réseau qui remplit la zone de lésion avec des vésicules et referme la blessure.

Les annexines, d'autres partenaires de la dysferline, contribuent également à ce mécanisme de PMR. D'un côté, les annexines semblent participer indirectement à la formation du patch membranaire en facilitant les interactions entre les protéines membranaires et les protéines cytosoliques. En particulier, l'annexine A2 semble jouer un rôle dans l'accumulation de la dysferline à la membrane (Bittel et al., 2020; Lennon et al., 2003) en s'associant d'un côté avec les vésicules de dysferline (possiblement via le domaine C2A de la protéine) et de l'autre côté avec les lipides et les microdomaines riches en cholestérol du sarcolemme (Gerke and Moss, 2002; Marg et al., 2012). D'autre part, les annexines semblent se lier aux membranes proches du site de rupture afin de former un réseau en 2D, appelé « coiffe », qui renforce le sarcolemme et limite l'expansion de la déchirure (Carneille et al., 2016; Demonbreun et al., 2016; Robinson et al., 2020).

(iii) Mécanisme d'endocytose

Enfin, l'afflux de calcium dans les myofibres lésées semble déclencher la formation de vésicules d'endocytose via l'invagination de la membrane plasmique (Idone et al., 2008; McDade et al., 2014).

D'un côté, des vésicules contenant la dysferline sont endocytées à distance de la partie lésée afin que la protéine soit recyclée dans les vésicules intracellulaires qui sont utilisées pour former le patch membranaire. Cette endocytose de dysferline serait notamment régulée par son partenaire, la cavéoline 3, un composant des cavéoles qui est spécifique du muscle squelettique et cardiaque (Hernández-Deviez et al., 2008). Des études suggèrent également, qu'après son recyclage, la dysferline est clivée à proximité de la lésion par les calpaines qui ont été activées par l'afflux massif de calcium. Ce clivage s'effectue au niveau du motif protéique codé par l'exon alternatif 40a, générant ainsi une mini-dysferline C72 composée du domaine transmembranaire ainsi que des deux derniers domaines C2F et C2G de la protéine (Lek et al.,

2013; Redpath et al., 2014).

D'un autre côté, une endocytose serait déclenchée au niveau de la zone membranaire lésée (Idone et al., 2008) par la libération dans le compartiment extracellulaire d'une enzyme lysosomale, la sphingomyélinase acide (ASM) (Figure 16). En effet, l'ASM agit sur le feuillet externe de la membrane plasmique en hydrolysant la sphingomyéline en céramide, ce qui induit la flexion du sarcolemme vers l'intérieur de la cellule et favorise l'endocytose (Andrews and Corrotte, 2018; Corrotte et al., 2013; Tam et al., 2010). La vésicule cytoplasmique résultante, qui contient la zone membranaire endommagée, peut ensuite fusionner avec un endosome ou un lysosome. Concernant la dysferline, elle semble participer à cette libération d'ASM dans le milieu extracellulaire, en facilitant notamment l'exocytose lysosomale, puisque la sécrétion de l'enzyme est réduite dans les cellules dysferlinopathiques lésées (Defour et al., 2014).

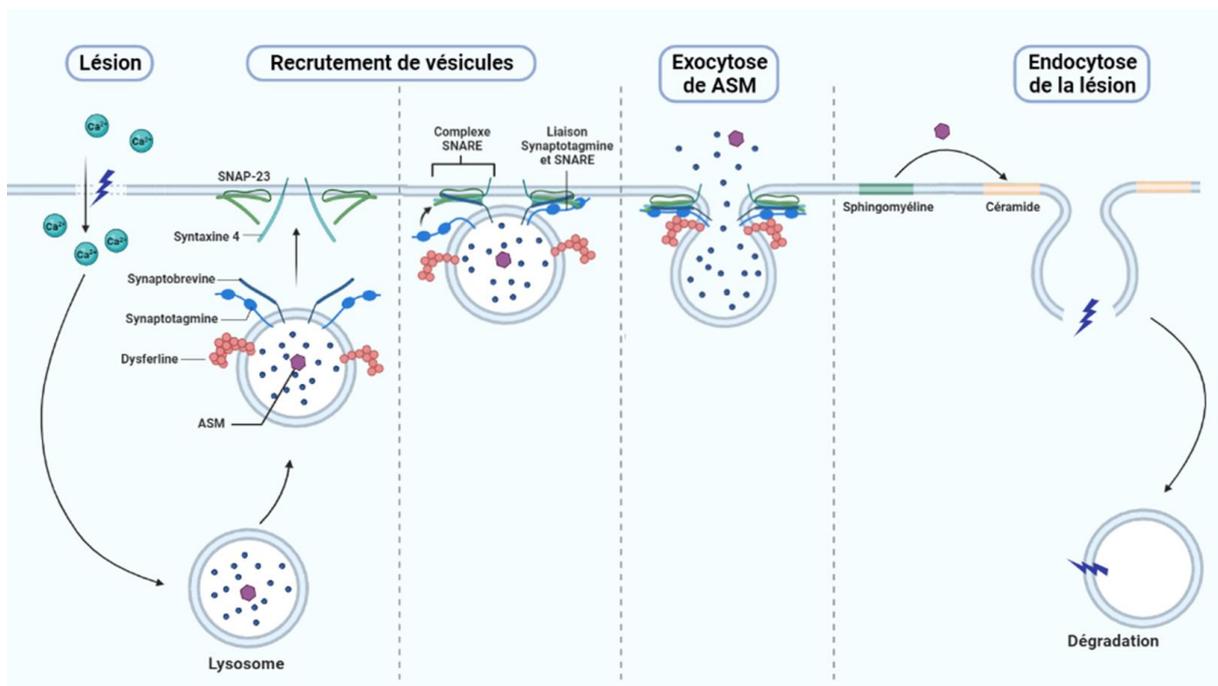


Figure 16. Le mécanisme d'endocytose est impliqué dans la réparation du sarcolemme.

Une lésion de la membrane des cellules musculaires déclenche un mécanisme de réparation qui implique l'exocytose de lysosomes suivie de l'endocytose de la lésion et de sa dégradation intracellulaire. L'influx de calcium à travers la blessure déclenche une exocytose localisée des lysosomes qui libère des enzymes, dont l'acide sphingomyélinase, dans le compartiment extracellulaire. Celle-ci remodèle la surface cellulaire, facilitant ainsi l'endocytose de la lésion. Après internalisation dans les endosomes, les lésions membranaires circulent vers la lumière des lysosomes où elles sont dégradées. Abréviation : ASM, acide sphingomyélinase. Schéma créé sur le site BioRender.

Malgré toutes ces données soulignant un rôle prédominant de la dysferline dans le processus de PMR, plusieurs études démontrent cependant que la réversion de la réparation défectueuse de la membrane plasmique n'est pas suffisante pour empêcher ou améliorer le phénotype dystrophique dans les tissus déficients en dysferline (Krahn et al., 2010; Lostal et al., 2012). Par conséquent, le mécanisme pathologique des dysferlinopathies ne peut pas être expliqué uniquement par un défaut de réparation de la membrane plasmique.

6.2. La croissance, la différenciation et la régénération musculaire

Chez les patients ou les modèles murins pré-symptomatiques atteints de dysferlinopathie, les muscles squelettiques se développent normalement. Ce n'est qu'à partir d'un certain âge que plusieurs groupes musculaires commencent à montrer des signes de la maladie. Si la dysferline joue un rôle dans la croissance du muscle ou la différenciation/fusion des myoblastes, il semble donc probable qu'elle intervienne après un stade de développement défini. Cependant, il est difficile d'établir le rôle de la dysferline dans ces mécanismes puisque les rapports sont contradictoires. Certains auteurs montrent qu'une absence de dysferline n'a pas d'effet sur la différenciation des myoblastes *in vitro* (Defour et al., 2014; Humphrey et al., 2012; Philippi et al., 2012). En effet, les myoblastes issus de patients ou de souris A/J ne présentent pas de défauts de prolifération ou de fusion et les marqueurs myogéniques sont correctement exprimés au cours de la différenciation. A l'inverse, d'autres auteurs plaident pour un rôle de la dysferline dans le processus de différenciation musculaire (Cohen et al., 2012; De Luna et al., 2006). Dans leurs études, la déficience en dysferline entraîne une diminution des niveaux d'expression de facteurs régulateurs de la myogenèse, en particulier la myogénine, et retarde la différenciation myogénique *in vitro*. Les myoblastes isolés de patients atteints de dysferlinopathie ou dérivés de souris SJL/J et A/J prolifèrent à un rythme normal mais présentent une efficacité de fusion réduite. La dysferline pourrait donc avoir un rôle dans la fusion des myoblastes mononucléés pour former des myofibres multinucléées. D'un côté, on peut supposer que la dysferline joue un rôle dans la réorganisation du cytosquelette nécessaire à la fusion cellule-cellule. En effet, elle semble former un complexe protéique avec Fam65b et l'HDAC6, ce qui permet d'acétyler la tubuline et donc d'augmenter la stabilité des microtubules permettant la migration des cellules (Balasubramanian et al., 2014). D'un autre côté, la dysferline pourrait être impliquée dans le trafic de vésicules intracellulaires à la membrane des myoblastes afin de former des pores de fusion qui permettent la continuité cytoplasmique entre les deux cellules. Dans ce sens, la dysferline a été identifiée dans un complexe protéique, nommé Myomixer-Myomerger-Minion, qui a la capacité avec la protéine Myomaker de contrôler la fusion myogénique (Chen et al., 2019).

Un rôle de la dysferline dans la régénération musculaire a également été décrit mais les résultats sont là aussi contradictoires. Tandis qu'une étude démontre que l'absence de dysferline chez des souris SJL/J entraîne une accélération de la régénération des fibres après une lésion (Ishiba et al., 2019), d'autres auteurs suggèrent que ce mécanisme est altéré (Chiu et al., 2009). Cette différence de dynamique dans la régénération du muscle squelettique peut cependant s'expliquer par la variabilité dans le type de lésion, l'âge du modèle animal ou la souche de souris utilisée.

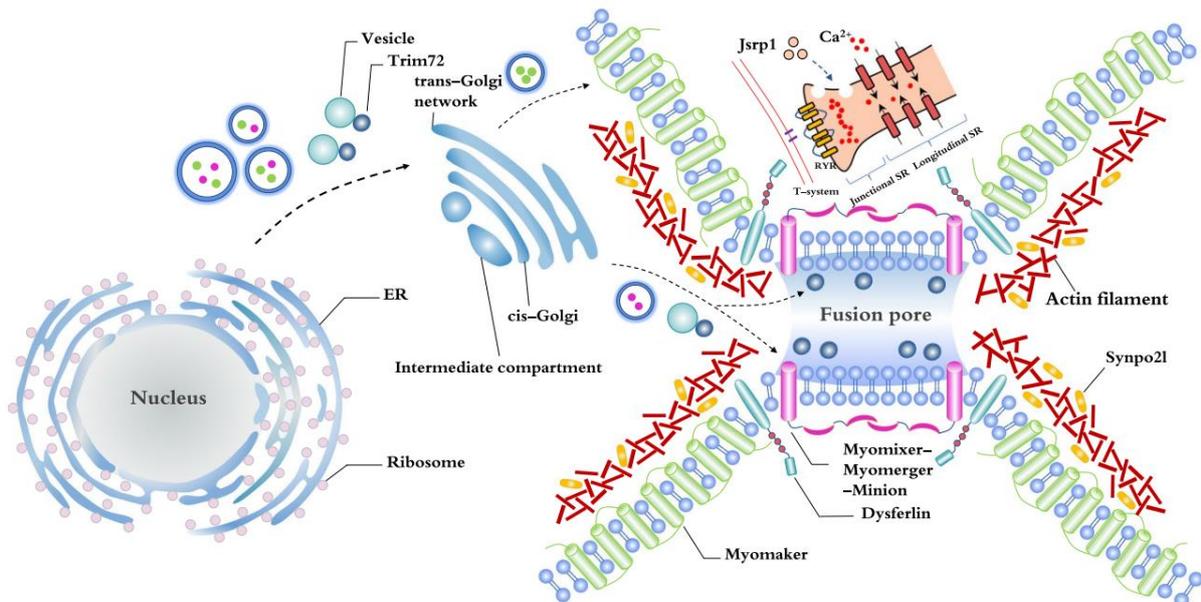


Figure 17. Proposition d'un modèle de fusion des myoblastes.

Lors du processus de fusion des myoblastes, des vésicules intracellulaires fusionnent le long de la membrane et forment des pores qui permettent une continuité de cytoplasme entre les deux cellules musculaires. Myomaker et Myomixer-Myomerger-Minion, dont l'expression est régulée par MyoD et Myogénine, sont transportés vers la membrane plasmique via le trafic de vésicules. Myomaker influence la fluidité de la membrane et établit l'état d'hémifusion, tandis que Myomixer crée une pression pour produire des trous de fusion. Trim72 (Mitsugumin-53) et la dysferline sont, quant à eux, transportés vers le site de fusion, avec les vésicules, pour participer à la fusion des myoblastes. Synpo21 s'étend avec le myofilament et forme progressivement un syncytium complet. La dysferline, en tant que protéine membranaire, joue un rôle dans la promotion de la réparation de la membrane. Source (Chen et al., 2019).

6.3. La formation des tubules-t et la stabilisation des triades

Outre sa fonction dans la réparation du sarcolemme des fibres musculaires, la dysferline semble également contribuer au développement du réseau des tubules-t. En effet, les muscles déficients en dysferline présentent une morphologie anormale de ces structures avec des défauts de transversalisation (Klinge et al., 2010). Leur sensibilité est également accrue aux dommages causés par une exposition au glycérol (Demonbreun et al., 2014) ou un choc osmotique (Kerr et al., 2013). De plus, il a été démontré que la dysferline induit la formation de structures tubulaires lorsqu'elle est exprimée dans des cellules non musculaires (Hofhuis et al., 2017).

Cependant, les mécanismes moléculaires requis pour la biogenèse, le maintien et la fonction de cet organe cellulaire ne sont que partiellement compris. La membrane des tubules-t étant distincte du sarcolemme par sa composition en phospholipides et sa haute concentration en cholestérol (Flucher et al., 1994; Lau et al., 1977), il est supposé que la formation des tubules-t est initiée par l'invagination et la tubulation du sarcolemme mais que leur extension dans le cytoplasme résulte de la fusion de vésicules membranaires contenant des composants protéiques distincts du sarcolemme (Hall et al., 2020). Jusqu'à présent, deux protéines impliquées dans la biogenèse des tubules-t ont été identifiées : la cavéoline-3 et Bin1. D'un

côté, la cavéoline 3 semble être à l'origine de la formation des tubules-t. En effet, aux prémices de leur formation, les tubules-t sont perlés (Franzini-Armstrong, 1991), ont un diamètre et une morphologie similaire aux cavéoles, et ont une composition lipidique identique (Parton et al., 1997). D'un autre côté, Bin1 est recrutée au niveau des tubules-t par sa liaison aux phospholipides de la membrane (Lee et al., 2002), ce qui permet de libérer son domaine SH3 qui va alors se lier au domaine riche en proline de la dynamine 2 (Kojima 2004). L'interaction sarcolemme-Bin1-Dynamine 2 entraînerait alors la courbure de la membrane plasmique. En ce qui concerne la dysferline, elle est supposée participer à l'élongation des tubules-t dans le sarcoplasme en contribuant au trafic de vésicules membranaires, notamment en interagissant avec ses partenaires protéiques impliqués dans la fusion des vésicules que sont la MG53, la cavéoline-3, l'annexine A1 et AHNAK. Cette hypothèse est notamment soutenue par l'accumulation de vacuoles subsarcolemmales contiguës aux tubules-t chez les patients atteints de dysferlinopathie (Selcen et al., 2001).

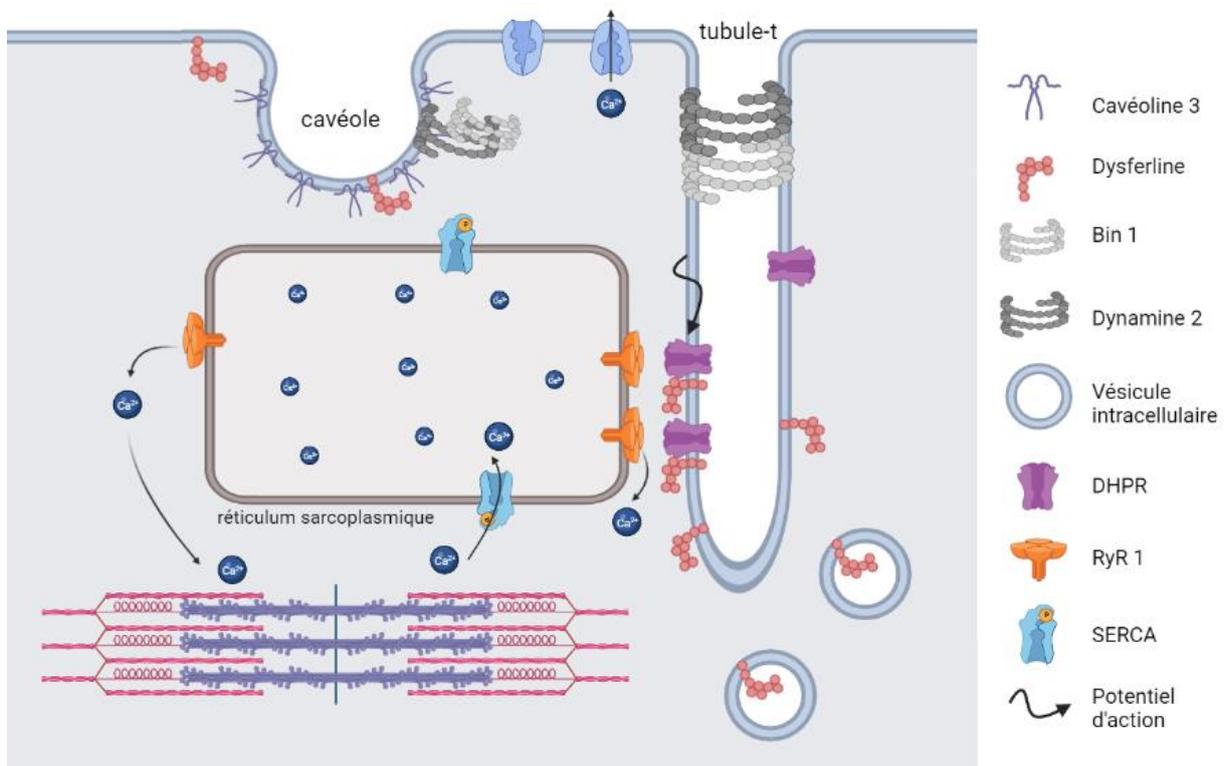


Figure 18. La participation de la dysferline à la formation des tubules-t et à l'homéostasie calcique.

Proposition des protéines impliquées dans la biogenèse et le maintien des tubules-t. Les tubules-t sont formés par des invaginations du sarcolemme, à partir des cavéoles, et s'étendent dans le sarcoplasme jusqu'à occuper la totalité de la fibre musculaire. Les protéines Bin 1 et dynamine 2 semblent être impliquées dans la courbure de la membrane, permettant son invagination, tandis que la cavéoline 3 et la dysferline participeraient à l'extension et à la stabilisation des tubules-t en régulant l'incorporation des membranes internes. En ce qui concerne le couplage excitation/contraction, il est initié par la propagation d'un potentiel d'action jusqu'aux tubules-t qui induit un changement de configuration du récepteur DHPR, entraînant une libération de calcium dans le cytoplasme à partir du réticulum sarcoplasmique par l'ouverture des récepteurs à la ryanodine (RyR). Une fois le calcium libéré, il se lie aux myofilaments pour déclencher la contraction. Lorsque la cellule n'est plus activée, le récepteur DHPR reprend sa configuration initiale et le calcium est recyclé dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe calcique SERCA. Schéma créé sur le site BioRender.

La dysferline semble également participer à la régulation métabolique du calcium des fibres musculaires lésées via la stabilisation mécano-chimique des triades (Demonbreun et al., 2014;

Kerr et al., 2014, 2013; Klinge et al., 2010; Lukyanenko et al., 2017). Pour rappel, le flux de calcium intracellulaire, nécessaire au mécanisme de contraction/relâchement des myofibres, est régulé grâce au couplage mécanique entre le canal voltage-dépendant DHPR, localisé à la membrane du tubule-t, et le récepteur de la ryanodine RyR1, situé sur la citerne terminale du réticulum sarcoplasmique. Lorsque des myofibres dépourvues de dysferline sont soumises à un stress comme un choc osmotique, l'homéostasie calcique est déstabilisée (Kerr et al., 2013). Ces modifications calciques peuvent cependant être empêchées soit par une réexpression de la dysferline soit par l'expression d'antagonistes des canaux DHPR ou RyR (Kerr et al., 2013; Lukyanenko et al., 2017), protégeant alors les fibres des dommages induits par le choc osmotique. Ainsi, la dysferline semble contribuer à maintenir l'homéostasie du calcium pendant un stress mécanique de la fibre musculaire, en stabilisant les mécanismes qui sous-tendent la libération voltage dépendante de calcium au niveau des triades.

6.4. L'inflammation

De façon similaire à d'autres MD, les dysferlinopathies sont accompagnées d'un processus inflammatoire qui pourrait contribuer à la progression de la maladie. En effet, les composants de la voie de l'inflammasome, des complexes protéiques cytosoliques impliqués dans la réponse immunitaire innée, sont activés et augmentés dans les muscles de patients ou de souris atteints de dysferlinopathie (Mariano et al., 2013; Rawat et al., 2010). Les muscles déficients en dysferline présentent également une augmentation des facteurs du système du complément (Han et al., 2010) et une infiltration de macrophages (Roche et al., 2015). En outre, les monocytes de patients et de souris présentent une activité phagocytaire accrue qui pourrait également contribuer à la réponse inflammatoire (Baek et al., 2017; Nagaraju et al., 2008). Cependant, l'utilisation d'agents anti-inflammatoires ne suffit pas à améliorer le dysfonctionnement des muscles déficients en dysferline (Dillingham et al., 2015; Walter et al., 2013), suggérant l'implication d'autres mécanismes dans ces pathologies.

6.5. Le métabolisme lipidique

Enfin, des études récentes ont pu décrire de nouveaux phénotypes pathologiques associés à une déficience en dysferline. Ainsi, un rôle majeur de la dérégulation du métabolisme des lipides a pu être identifié dans la phase la plus précoce de la LGMD R2 (Srivastava et al., 2018). D'un point de vue clinique, cette modification contribue au remodelage du muscle squelettique (Haynes et al., 2019) comme le révèle le dépôt anormalement élevé de lipides dans les myofibres de patients (Diaz-Manera et al., 2018) ou de souris modèles (Agarwal et al., 2019; Grounds et al., 2014; Haynes et al., 2019) et l'infiltration d'adipocytes entre les fibres à un stade plus tardif (Agarwal et al., 2019; Grounds et al., 2014; Haynes et al., 2019). En outre, des niveaux anormalement élevés de tissus graisseux ont remplacé jusqu'à 40% des myofibres dans le psoas de souris A/J, à des stades tardifs de la pathologie (Terrill et al., 2013). D'un point de vue métabolique, l'absence de dysferline est associée à une augmentation de l'expression d'enzymes de la lipogénèse et de la voie de synthèse des triglycérides (Agarwal et al., 2019),

ainsi que de l'absorption et du stockage des acides gras (Haynes et al., 2019).

Malgré l'augmentation du nombre d'articles suggérant que la dérégulation du métabolisme lipidique dans les fibres déficientes en dysferline pourrait contribuer à la physiopathologie des dysferlinopathies, les mécanismes sous-jacents à ce phénomène restent à élucider. Une équipe suggère que cette accumulation de graisse pourrait être causée par l'activité accrue de certaines connexines détectée dans les cellules musculaires pathologiques (Cea et al., 2020). En effet, le traitement de souris BLAJ symptomatiques avec la boldine, un bloqueur des canaux de connexines, empêche cette accumulation de graisse dans les muscles (Cea et al., 2016; Fernández et al., 2020). De plus, le traitement permet une récupération progressive de l'activité motrice des souris, suggérant que la dérégulation du métabolisme lipidique pourrait être une cible thérapeutique envisagée pour soigner les patients atteints de dysferlinopathie. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur l'efficacité de la molécule sur les autres mécanismes pathologiques rapportés dans cette maladie.

Le développement et la caractérisation de modèles animaux et cellulaires des dysferlinopathies ont conduit à de grands progrès à la fois dans la compréhension des processus physiopathologiques associés à une déficience en dysferline mais également dans l'identification de cibles pathologiques. Le chapitre suivant de cette introduction bibliographique est donc consacré à l'état de l'art des thérapies qui ont été développées pour traiter les dysferlinopathies.

CHAPITRE 3 : LES STRATEGIES THERAPEUTIQUES DES DYSFERLINOPATHIES

Actuellement, il n'existe pas de traitement efficace pour les patients atteints de dysferlinopathie. Les options de traitement disponibles sont principalement de nature palliative et se concentrent sur le soulagement des douleurs physiques ainsi que sur le maintien de la force musculaire et la mobilité des patients. Néanmoins, des efforts considérables sont déployés depuis plusieurs années afin d'identifier et de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Les mutations causales des dysferlinopathies et les phénotypes pathologiques associés étant multiples, plusieurs voies thérapeutiques sont actuellement à l'étude : la thérapie par pharmacologie, la thérapie cellulaire et la thérapie génique (Figure 19).

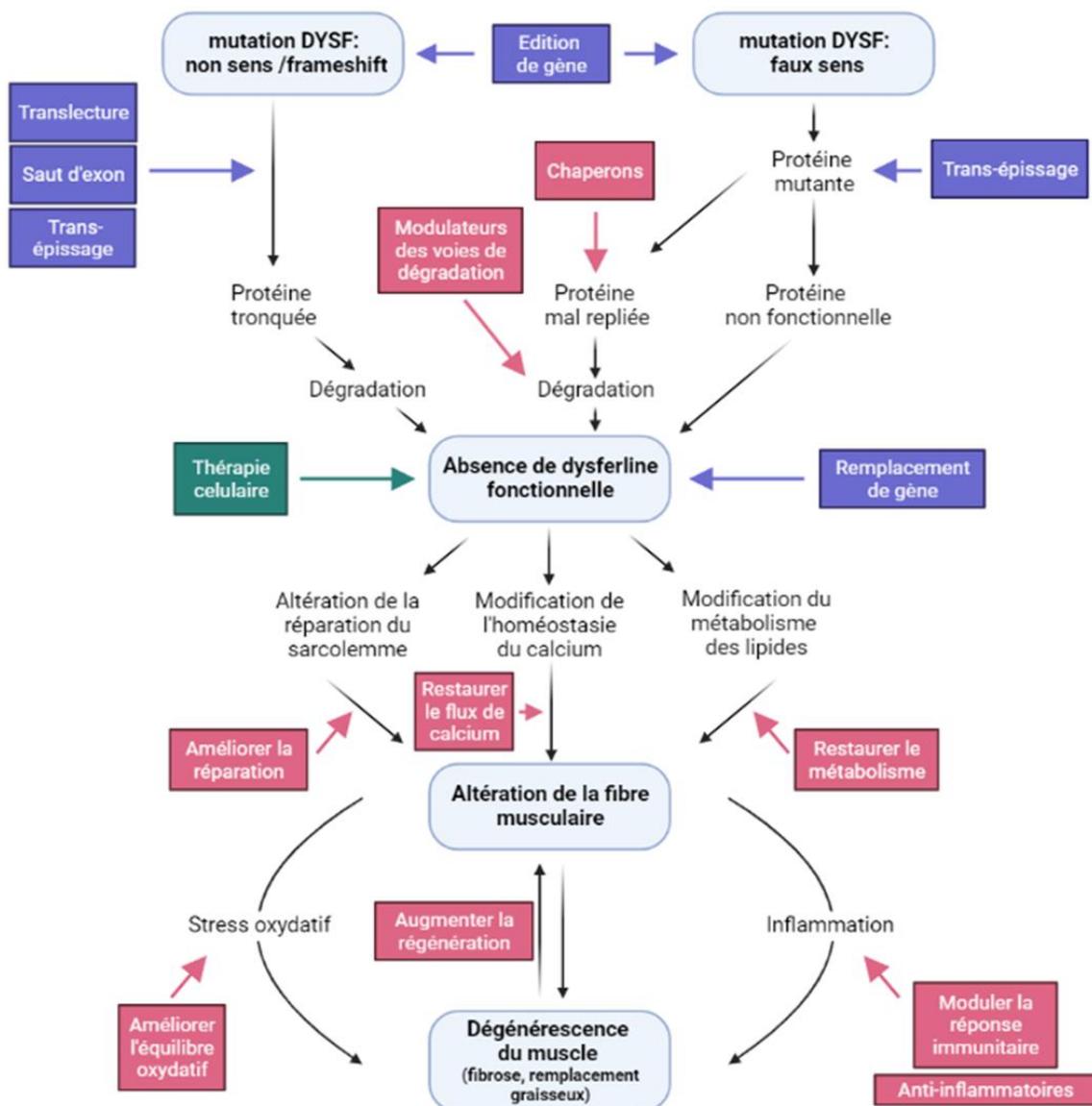


Figure 19. Les stratégies thérapeutiques des dysferlinopathies.

La chaîne d'événements qui provoque la maladie chez les patients atteints de dysferlinopathie est représentée par les encadrés en bleu clair et les flèches noires. Les encadrés roses, verts et bleus représentent, respectivement, les approches de thérapie pharmacologique, cellulaire et génique pour traiter la maladie. Source : Jain Foundation. Schéma créé sur le site BioRender.

1. Les approches pharmacologiques

L'amélioration de nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques et les possibilités de criblage pharmacologique à haut débit sur de nouveaux modèles cellulaires, conduisent aujourd'hui à un regain d'intérêt pour les approches pharmacologiques qui ont été délaissées pendant quelques années au profit des thérapies géniques pour le traitement des maladies génétiques rares. On distingue deux stratégies pharmacologiques pour les dysferlinopathies : une approche symptomatique qui vise à améliorer les phénotypes dystrophiques sans chercher à cibler la dysferline, afin d'améliorer la fonction et la qualité du muscle, et une approche qui vise à restaurer l'expression de la protéine et donc de ses fonctions au sein de la cellule.

1.1. Les approches symptomatiques

1.1.1. Réduire la dégénérescence musculaire

Comme évoqué précédemment, la perte de la dysferline déclenche de multiples voies pathologiques qui vont induire une fragilisation de la fibre musculaire menant *in fine* à la dégénérescence du muscle. Les premières approches pharmacologiques développées avaient ainsi pour objectif d'améliorer l'état général des patients en ciblant certaines caractéristiques dystrophiques des dysferlinopathies menant à la dégénérescence des fibres et à la perte de force musculaire : l'inflammation, la fibrose et l'atrophie musculaire.

En 2007, un premier traitement pharmacologique avec le Dantrolène a été testé chez deux patients dans le but d'améliorer leur tonus et leur force musculaire, ainsi que les contractions brusques et involontaires des muscles (Hattori et al., 2007). En effet, le Dantrolène est un myorelaxant qui agit directement sur la contraction des fibres musculaires striées en empêchant la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique lors du couplage excitation-contraction (Ward et al., 1986). En réponse au traitement, les taux de CPK chez les patients ont été réduits, pouvant suggérer une diminution de l'inflammation du tissu musculaire, mais aucune amélioration du phénotype dystrophique n'a pu être détectée. Une hépatite médicamenteuse a également été suspectée pour l'un des patients, menant à l'interruption du traitement. Depuis cette étude aucune autre donnée n'a montré l'intérêt thérapeutique de cette molécule pour les dysferlinopathies.

La plupart des recherches suivantes se sont concentrées sur l'atténuation de la réponse inflammatoire engendrée par l'absence de dysferline afin de minimiser la dégénérescence du muscle. Ainsi, certaines recherches se sont intéressées à moduler la réponse immunitaire afin de contrecarrer l'initiation de l'inflammation. Une étude pilote sur deux patients a été réalisée avec le Rituximab, un anticorps monoclonal génétiquement modifié (chimère murin/homme) dirigé contre l'antigène CD20 des lymphocytes B (Grillo-Lopez et al., 2000), qui a montré une activité prometteuse dans le traitement de diverses maladies auto-immunes (Taylor and Lindorfer, 2007). Après un an de traitement, aucun effet secondaire n'a été détecté et une récupération partielle de la force musculaire des patients, corrélée à une diminution du nombre

des lymphocytes B, a pu être mise en évidence (Lerario et al., 2010). Ces résultats suggèrent ainsi que la modulation de l'inflammation, par l'inhibition d'une cible spécifique au sein du système immunitaire, semble être une piste thérapeutique efficace pour les dysferlinopathies. Les corticoïdes (anti-inflammatoires stéroïdiens) ont également été des candidats d'intérêt pour le traitement pharmacologique des dysferlinopathies. Ils sont en effet étudiés depuis des années et ont, pour certains, prouvé leur intérêt thérapeutique pour d'autres MD. C'est le cas par exemple du Deflazacort et de la Prednisone, qui ont démontré leur efficacité pour ralentir la progression de la DMD et retarder la perte de mobilité des patients (Brooke et al., 1987; Heier et al., 2013; Mendell et al., 1989; Mesa et al., 1991). Le Deflazacort (Emflaza) a ainsi été approuvé par la FDA en 2017 comme première thérapie corticostéroïde pour traiter les patients DMD. De ce fait, plusieurs équipes ont examiné le potentiel de ces anti-inflammatoires pour les dysferlinopathies mais leur utilisation s'est révélée préjudiciable. Une étude clinique avec le Deflazacort a ainsi démontré une détérioration de la force musculaire des patients traités, associée à un large spectre d'effets secondaires liés aux stéroïdes (Walter et al., 2013). Le traitement à la Prednisone a quant à lui aggravé la faiblesse musculaire, altéré la réparation membranaire et augmenté l'atrophie des fibres de souris déficientes en dysferline (Sreetama et al., 2018). Le Vamorolone, un corticoïde modifié pour conserver son activité anti-inflammatoire tout en étant dépourvu des effets secondaires associés à ces médicaments (Mah et al., 2022), a également été testé par la suite. Contrairement aux autres stéroïdes, le traitement de souris pathologiques A/J avec le Vamorolone induit une augmentation de la force musculaire ainsi qu'une diminution de la dégénérescence des muscles (Sreetama et al., 2018). Certains anti-inflammatoires pourraient donc être adaptés au traitement des dysferlinopathies mais nécessitent une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action. Néanmoins, mis à part le Vamorolone, aucun autre composé modulant l'inflammation, qu'il soit stéroïdien ou non, n'a démontré un intérêt thérapeutique pour les dysferlinopathies (Collier et al., 2018; Dillingham et al., 2015; Rayavarapu et al., 2010). De façon intéressante, le Vamorolone est le seul anti-inflammatoire pour qui un rôle dans la stabilisation de la membrane plasmique a été décrit dans des modèles déficients en dysferline (Sreetama et al., 2018).

En parallèle de ces études, d'autres équipes ont également testé des molécules ayant déjà démontré un intérêt thérapeutique pour une autre myopathie. C'est le cas de l'Halofuginone et du Losartan. D'un côté, l'Halofuginone est un composé végétal dont les propriétés anti-fibrotiques ont été soulignées dans plusieurs MD (Nevo et al., 2010; Turgeman et al., 2008). D'autre part, le Losartan est un hypotenseur qui s'est avéré utile pour traiter la DMD en atténuant également la fibrose et en favorisant la régénération musculaire (Lee et al., 2015). Concernant les dysferlinopathies, le traitement de souris *Dysf*^{-/-} avec l'Halofuginone permet de réduire certaines caractéristiques histopathologiques (fibrose, atrophie et fibres centronucléées) et améliore leurs performances musculaires (Barzilai-Tutsch et al., 2020, 2018). A contrario, l'administration du Losartan s'est révélée délétère sur plusieurs groupes musculaires de modèles murins de dysferlinopathie (White et al., 2019). Comme pour le Vamorolone, il est intéressant de noter que l'Halofuginone semble améliorer l'intégrité des membranes plasmiques déficientes en dysferline, permettant ainsi de protéger le sarcolemme

des lésions (Barzilai-Tutsch et al., 2018). Ainsi, ces données tendent à explorer plus en détail les mécanismes sous-jacents à cette stabilisation de la membrane cellulaire qui aurait un effet thérapeutique sur les fibres déficientes en dysferline.

1.1.2. Empêcher l'altération de la fibre musculaire

Le champ des recherches pour le développement de thérapies pharmacologiques s'est par la suite agrandi avec l'identification de nouvelles fonctions cellulaires associées à la dysferline. Comme évoqué précédemment, la fonction de la dysferline la plus étudiée et la mieux comprise est son rôle dans le mécanisme de PMR, un phénomène critique pour maintenir l'intégrité et la fonction musculaire. En adéquation avec les conclusions précédentes, une des pistes thérapeutiques pour les dysferlinopathies a consisté à identifier de petites molécules capables de stabiliser la membrane des cellules musculaires et d'aider cette dernière à résister aux lésions ou à les refermer d'elle-même. Des études récentes ont ainsi tenté de surexprimer des composants essentiels au mécanisme de PMR, dont certains partenaires protéiques de la dysferline. En 2017, le potentiel thérapeutique de la protéine humaine recombinante rhMG53 a été testé. Comme précédemment démontré *in vivo* chez un modèle de DMD (Weisleder et al., 2012), le traitement au rhMG53 de souris *Dysf*^{-/-} améliore l'intégrité de leurs fibres musculaires en réponse aux dommages induits par un laser, et ce, par un processus indépendant du calcium (Gushchina et al., 2017). Plus récemment, une équipe japonaise a montré que la Metformine, un médicament couramment utilisé par les diabétiques, augmente la capacité de réparation des myofibres et diminue l'atteinte musculaire chez des poissons zèbres et des souris *Bla/J* (Ono et al., 2020). Les auteurs supposent que l'action de la Metformine passerait par l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase), une protéine qui se lie à la dysferline et participe à la réparation des membranes. Une troisième équipe s'est quant à elle intéressée à la galectine-1, une protéine de liaison au galactoside, qui s'est révélée efficace pour stabiliser le sarcolemme d'un modèle de la DMD (Van Ry et al., 2015). Une première étude menée auprès de différents modèles murins de dysferlinopathies (*A/J*, *Dysf*^{-/-}) a montré que le traitement avec la galectine-1 améliore la capacité des fibres musculaires à réparer leur membrane lésée et augmente leur maturation (Vallecillo-Zúniga et al., 2020). Ces résultats ont par la suite été confirmés par une deuxième étude qui décrit également un effet thérapeutique de la galectine-1 sur la réponse inflammatoire chronique des modèles (Vallecillo-Zúniga et al., 2021), le deuxième mécanisme majeur mis en jeu dans les dysferlinopathies. En effet, chez les modèles murins, comme sur les cellules humaines *in vitro*, les marqueurs de l'inflammation sont diminués au bénéfice des cytokines anti-inflammatoires après traitement avec la galectine-1. Malgré ces preuves de concept intéressantes sur l'effet bénéfique de ces molécules sur la stabilisation du sarcolemme, il reste cependant nécessaire d'étudier l'impact de ces dernières sur la fonction musculaire et les phénotypes dystrophiques. En effet, il a été montré par des études de thérapie génique que la récupération de la fonction de PMR de la dysferline n'empêche pas nécessairement la dégénérescence des fibres musculaires (Lostal et al., 2012), suggérant ainsi l'importance d'étudier et d'identifier d'autres mécanismes pathologiques liés à l'absence de la protéine.

Ainsi, l'identification de mécanismes pathologiques supplémentaires induits par l'absence de dysferline sont d'autant de pistes thérapeutiques à envisager. L'expression persistante de connexines dans les modèles de dysferlinopathies (Cea et al., 2016) constitue, par exemple, une cible thérapeutique intéressante qui est facilement accessible sur le plan pharmacologique (Fernández et al., 2020). En traitant quotidiennement les muscles squelettiques de souris pathologiques avec de la Boldine, un composé qui bloque le fonctionnement des hémiconnexines, une équipe chilienne a ainsi pu diminuer certaines altérations musculaires (perméabilité, homéostasie calcique, CPK, fibres centronucléées) et restaurer les performances motrices de l'animal (Cea et al., 2020). Le traitement à la Boldine a également normalisé une autre caractéristique des dysferlinopathies qui est l'infiltration et l'accumulation de graisse dans les muscles squelettiques. De façon similaire, la découverte de stress oxydatif dans les muscles squelettiques de patients et de souris Bla/J a mené à la proposition d'une thérapie avec un oxydant, le N-Acétylcystéine (García-Campos et al., 2020). Une supplémentation alimentaire pendant 10 semaines entraîne une amélioration de l'équilibre oxydatif du muscle et de la résistance à la fatigue des souris.

L'ensemble de ces mécanismes pathologiques, en plus d'être ciblés par une approche pharmacologique, pourraient également servir à valider l'effet bénéfique d'autres stratégies thérapeutiques en complément du test de PMR.

1.2. Restaurer l'expression de la dysferline

Un tiers des anomalies génétiques responsables de dysferlinopathie sont des mutations faux-sens. Elles aboutissent pour certaines à la formation d'une dysferline mal conformée et agrégée dans le réticulum endoplasmique (Wenzel et al., 2006), puis dégradée par les mécanismes de contrôle qualité de la cellule. Ainsi, une autre stratégie pharmacologique pour cette pathologie consiste à restaurer l'expression et la fonction de la dysferline à la membrane plasmique. Dans ce sens, des études suggèrent que les protéines mal conformées peuvent être relocalisées à la membrane des cellules en modulant, soit la voie de repliement/maturation des protéines, soit celle de dégradation qui comprend le contrôle qualité associé au réticulum endoplasmique et le système ubiquitine-protéasome (Bartoli et al., 2008; Bonuccelli et al., 2003; Carotti et al., 2018; Gastaldello et al., 2008; Soheili et al., 2012). Ces études démontrent également que, bien que mutées, ces protéines peuvent être fonctionnelles si elles sont correctement relocalisées.

1.2.1. La modulation des voies de dégradation

En ce qui concerne les dysferlinopathies, une étude princeps a démontré que la dysferline mutante L1341P pouvait être sauvée de la dégradation (Schoewel et al., 2012). En effet, des peptides dérivés de la dysferline mutante sont capables de pénétrer dans le réticulum endoplasmique des cellules musculaires, de réduire le stress induit par le mauvais repliement de la dysferline et d'y interférer avec les agrégats permettant à la protéine anormale de se

relocaliser à la membrane. En récupérant sa position transmembranaire, la dysferline mutante retrouve alors sa fonction dans la réparation du sarcolemme. De façon complémentaire, d'autres études ont évalué si l'inhibition du système ubiquitine-protéasome pouvait empêcher la dégradation de la dysferline mal conformée et permettre sa relocalisation à la membrane. En effet, le système ubiquitine-protéasome est la principale voie protéolytique puisque 80% des protéines y sont dégradées. Cette stratégie a d'ailleurs été utilisée par notre groupe et s'est révélée efficace pour sauver de la dégradation des protéines alpha-sarcoglycane mutantes mal repliées (LGMD R3) en utilisant un inhibiteur du protéasome, le thioestrepton (Hoch et al., 2019) (annexe 1). Au regard des dysferlinopathies, une des premières études a montré que le MG132, un autre inhibiteur du protéasome, était capable d'augmenter l'expression de la dysferline mutante W999C dans des fibroblastes humains et de restaurer sa fonction dans la PMR (Matsuda et al., 2015). Une deuxième étude a par la suite testé l'effet de l'Oprozomib et de l'Ixazomib sur des myoblastes immortalisés d'un patient présentant la mutation faux-sens G1628R (Fernández-Simón et al., 2020). A contrario de l'étude précédente, le traitement par ces inhibiteurs du protéasome n'a induit aucun effet sur la fonction de PMR alors qu'une légère augmentation de la dysferline mutée a été observée. Les auteurs ont alors suggéré que le système ubiquitine-protéasome pourrait ne pas être le seul mécanisme de dégradation de la dysferline. Cette hypothèse est en accord avec une précédente étude proposant un modèle de dégradation de la dysferline mutée, mal conformée et agrégée (Fujita et al., 2007). Contrairement à la dysferline sauvage qui serait dégradée par le système ubiquitine-protéasome, la dysferline mutante se retrouverait agrégée dans le réticulum endoplasmique à cause d'une saturation du protéasome et serait alors envoyée à dégradation par le système autophagie-lysosome.

Une étude récente confirme effectivement qu'il est possible d'empêcher l'agrégation et la dégradation de la dysferline mutante en inhibant le processus d'autophagie. En 2019, un criblage de petites molécules réalisé sur des cellules musculaires de patients présentant la mutation W999C a ainsi permis d'identifier un composé, le Nocodazole, qui augmente le niveau d'expression de la dysferline mutée et améliore la capacité de PMR des cellules (Kokubu et al., 2019). Dans cet essai, il a aussi été démontré que le MG132 n'était pas suffisant pour moduler l'expression de la dysferline, signifiant que le système ubiquitine-protéasome pourrait ne pas constituer la principale voie responsable de la dégradation de cette dysferline mal conformée. Effectivement, les données indiquent que la dégradation de la protéine mutante serait assurée par le processus d'autophagie. Le Nocodazole, en induisant une dépolymérisation des microtubules, empêcherait le transport des agrégats de dysferline vers les autophagosomes et, par conséquent, leur dégradation dans les autolysosomes. La dysferline non dégradée pourrait alors persister dans les cellules et contribuer à améliorer la PMR.

L'ensemble de ces données montre que les stratégies thérapeutiques visant à inhiber les différents systèmes de dégradation des protéines mutées pourraient être prometteuses (Figure 20). Elles suggèrent également d'évaluer l'intérêt de combiner l'inhibition des voies du protéasome et de l'autophagie qui semblent être deux voies de dégradation complémentaires

pour la dysferline mutante. Dans ce sens, notre groupe a très récemment mis en évidence un effet synergique du Givinostat et du Bortezomib sur la dégradation de la protéine alpha-sarcoglycane mal conformée, par le double blocage des voies de l'autophagie et du protéasome (Hoch et al., 2022) (Annexe 2). En plus de l'effet synergique des molécules, leur combinaison permet de diminuer les concentrations utilisées et donc de minimiser les effets secondaires néfastes attribués à certains de ces inhibiteurs (Kaplan et al., 2017; Mohan et al., 2017).

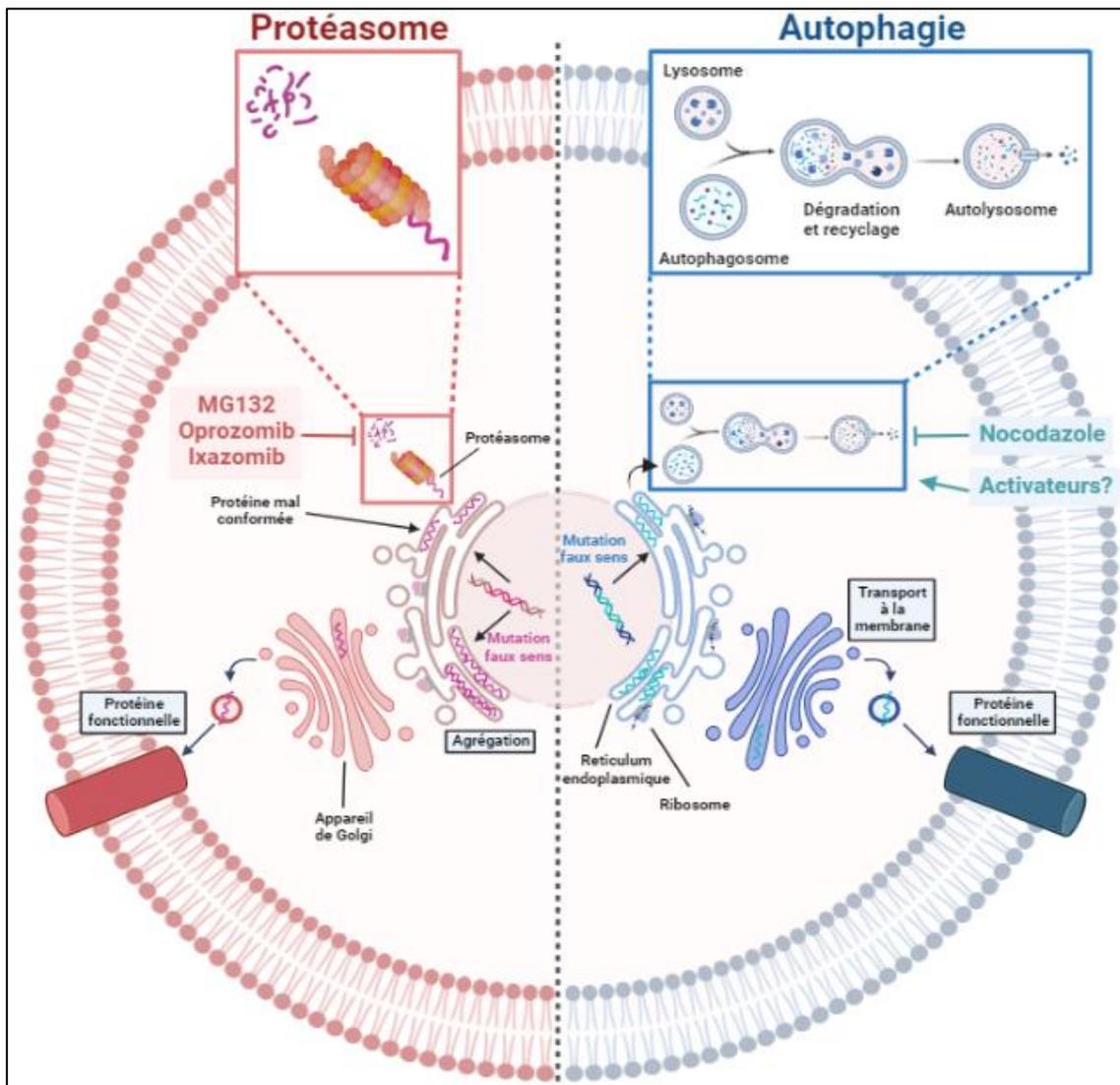


Figure 20. La modulation des voies de dégradation des protéines mal conformées.

La modulation des voies de dégradation protéique par des molécules pharmacologiques permet d'empêcher la dégradation de protéines mutées et de restaurer leur expression ainsi que leurs fonctions cellulaires. **Rose** : inhibition de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome pour restaurer l'expression de la dysferline. **Bleu** : inhibition/activation de l'autophagie pour restaurer l'expression de la dysferline. Schéma créé sur le site BioRender.

1.2.2. Le développement de chaperons pharmacologiques

Les chaperons pharmacologiques sont des petites molécules qui peuvent se lier aux protéines mal conformées afin de les stabiliser et de leur faire acquérir une conformation quasi native qui leur permettra d'échapper au système contrôle-qualité et, par conséquent, d'être

correctement localisées et de récupérer une fonctionnalité. Cette stratégie est utilisée pour traiter la fibrose kystique et est encore en cours de développement pour les dysferlinopathies. Très récemment, une équipe a en effet développé une technique basée sur la cytométrie en flux afin de quantifier la proportion de dysferline localisée à la membrane des cellules et d'évaluer l'effet d'une molécule chaperonne sur cette localisation (Tominaga et al., 2022). En appliquant cette technique à des cellules porteuses de mutations faux-sens de *DYSF*, il a été observé que 64 de ces anomalies sur 113 au total aboutissent à une quantité faible de dysferline à la membrane (inférieure à 25% du taux normal). Or, pour 25 de ces mutations, le traitement des cellules avec de l'acide 4-phénylbutyrique (4-PBA) a permis d'augmenter la quantité de dysferline à la membrane. L'administration de ce chaperon pharmacologique pendant 48 heures à des souris modèle de la mutation faux-sens humaine L1341P (MMex38) a également permis de restaurer, en partie, la localisation de la dysferline à la membrane et rétablit complètement l'activité de PMR de leurs cellules musculaires. Bien que des études complémentaires soient nécessaires pour évaluer l'efficacité du 4-PBA sur les phénotypes dystrophiques, cette molécule présente néanmoins un potentiel thérapeutique important et ouvre la voie à la découverte d'autres chaperons pharmacologiques pour traiter les dysferlinopathies (Figure 21).

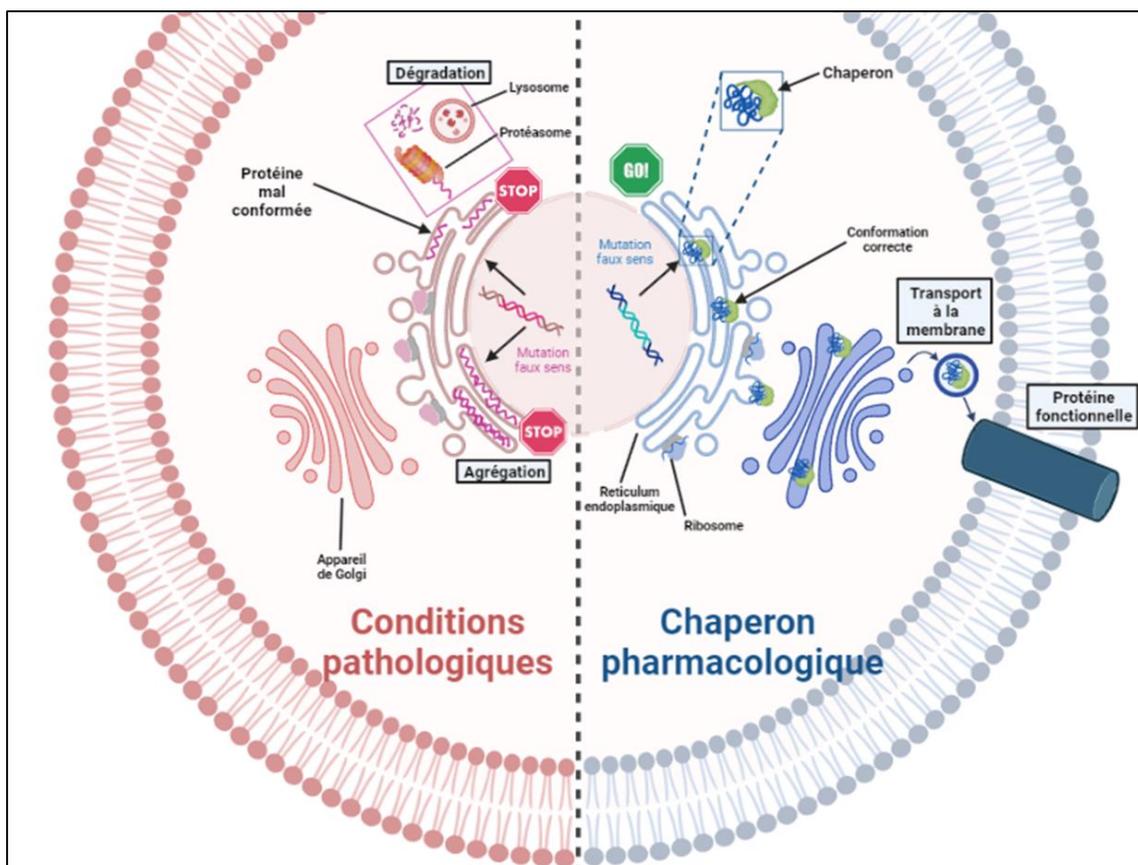


Figure 21. Le mécanisme d'action des chaperons pharmacologiques.

Rose : les protéines résultantes de mutations faux-sens sont mal conformées, instables et retenues dans le réticulum endoplasmique sous forme d'agrégats. Elles sont reconnues par le contrôle qualité de la cellule et envoyées vers les voies de dégradation. **Bleu** : les chaperons pharmacologiques se lient sélectivement aux protéines mal conformées afin d'améliorer / restaurer leur repliement et leur stabilité, ce qui permet leur trafic vers l'organe cible. Schéma créé sur le site BioRender.

2. La thérapie cellulaire

Dans le cadre de nombreuses maladies, le dysfonctionnement d'un type cellulaire particulier affecte les tissus et les organes, qui vont alors se détériorer avec le temps et perdre leurs fonctions. Dans ce contexte, la thérapie cellulaire offre de nouvelles perspectives de par son potentiel à remplacer des cellules défailtantes de l'organisme par des cellules saines afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. Cette technique peut être adaptée pour la thérapie du muscle dystrophique en transplantant des précurseurs myogéniques exogènes avec une copie de type sauvage du gène muté. Ces précurseurs vont alors générer de nouvelles myofibrilles ou fusionner avec des fibres existantes, rétablissant ainsi l'expression de la protéine musculaire absente. Le renouvellement des fibres musculaires a pour effet de bloquer le processus délétère de la perte musculaire, et de restaurer, au moins partiellement, une fonction musculaire normale.

De ce fait, la ressource biologique utilisée pour développer le produit de thérapie cellulaire est un point majeur à prendre en compte. Ainsi, de nombreuses études ont tenté d'identifier les populations de cellules qui pourraient être utilisées afin de promouvoir efficacement la réparation du muscle squelettique (Figure 22). Les principales explorées sont les myoblastes, les cellules souches adultes et les progéniteurs myogéniques dérivés de cellules souches pluripotentes.

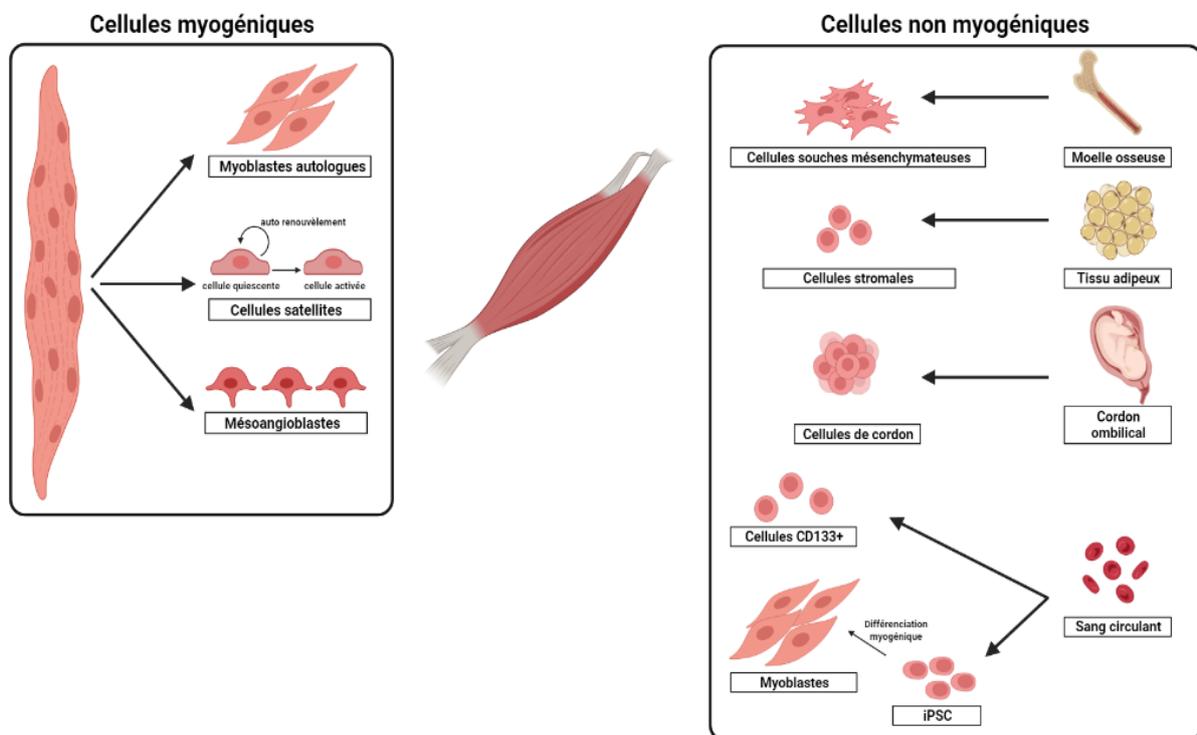


Figure 22. Les cellules candidates pour la thérapie cellulaire du muscle squelettique.

La thérapie cellulaire pour la régénération musculaire a impliqué l'utilisation de plusieurs types de cellules d'origine myogénique ou non. Schéma adapté de (Alarcin et al., 2021) et créé sur le site BioRender.

2.1. L'utilisation des myoblastes

Les études préliminaires de thérapie cellulaire pour le muscle dystrophique ont d'abord porté sur l'utilisation de myoblastes. En effet, les travaux pionniers de Partridge et de ses collaborateurs (Partridge et al., 1989) réalisés sur un modèle murin de la DMD ont confirmé la capacité des myoblastes injectés intra-musculairement à coloniser le muscle strié et à restaurer sa fonction. Les myoblastes, faciles à obtenir à partir de biopsies musculaires, sont capables de participer à la régénération du muscle squelettique par fusion cellulaire après transplantation, conduisant à la formation de fibres musculaires nouvelles ou hybrides (Brussee et al., 1999). Ces études ont alors stimulé l'utilisation de myoblastes allogéniques dans des essais cliniques (Huard et al., 1992; Karpati et al., 1993; Mendell et al., 1995; Tremblay et al., 1993) ou des études pilotes (Gussoni et al., 1997; Miller et al., 1997; Neumeyer et al., 1998) pour restaurer la fonction musculaire dans la DMD ou la BMD. Ces essais ont abouti à un effet clinique limité ou nul, principalement en raison d'une réaction immunitaire contre les cellules du donneur, d'une faible prolifération et d'une capacité migratoire limitée des myoblastes transplantés dans le tissu musculaire (Negroni et al., 2006; Vilquin, 2005). Ces concepts généraux développés dans des modèles DMD s'appliquent également aux dysferlinopathies. Une première étude a ainsi démontré que la transplantation de cellules musculaires primaires chez un modèle pathologique *in vivo* permet de restaurer partiellement l'expression de la protéine puisque 20 à 30% des fibres de souris SJL/J expriment la dysferline après une greffe allogénique (Leriche-Guérin et al., 2002). Néanmoins, comme démontré dans les modèles de DMD, les fibres positives à la dysferline sont organisées en cluster et apparaissent localisées au niveau des sites d'injection à cause de la faible migration des myoblastes transplantés. Les myoblastes du donneur se trouveraient donc à un stade de développement inapproprié pour reproduire le comportement des cellules satellites. Néanmoins, ces travaux ont établi la faisabilité de la thérapie cellulaire dans le muscle squelettique humain.

2.2. Le transfert de cellules souches adultes

Les efforts ultérieurs se sont alors concentrés sur l'identification de cellules souches adultes moins différenciées mais avec un potentiel myogénique, et qui pourraient se greffer avec plus de succès dans le muscle hôte. Parmi les sous-populations de cellules souches présentes dans les muscles squelettiques, les cellules satellites constituent le premier choix pour la thérapie cellulaire. Elles sont considérées comme le principal type cellulaire responsable de la croissance et de l'entretien des muscles. Cependant, des travaux pionniers (Grounds et al., 1992) ont démontré que le nombre de cellules satellites résidentes dans les muscles adultes sains est beaucoup plus faible que le nombre de précurseurs myogéniques engagés qui peuplent le tissu musculaire peu après une blessure. Différents précurseurs, musculaires et non musculaires, à potentiel myogénique ont ainsi été étudiés par la suite.

Par exemple, les mésoangioblastes (MAB) ont été considérés pour le traitement des dystrophies musculaires. Ces cellules souches ont la capacité de se différencier dans différentes

lignées mésodermiques, dont les cellules musculaires squelettiques et cardiaques (Minasi et al., 2002), et de sortir efficacement de la paroi d'un vaisseau sanguin pour coloniser les muscles dystrophiques. Plusieurs études ont montré leur innocuité et leur efficacité dans différents modèles animaux de MD, dont la DMD (Domi et al., 2015; Sampaolesi et al., 2006, 2003; Tedesco et al., 2011) ou la LGMD R3 (Galvez et al., 2006; Guttinger et al., 2006; Sciorati et al., 2006). Ces résultats ont été confirmés chez un modèle souris de dysferlinopathies, le SCID/BLAJ. En effet, les MAB murins isolés d'un muscle tibial antérieur sain ont la capacité de coloniser les muscles dystrophiques des souris greffées et de restaurer partiellement la dysferline, permettant ainsi de normaliser la capacité de PMR (Díaz-Manera et al., 2010).

Des cellules dotées d'un potentiel myogénique ont également été identifiées dans le système hématopoïétique (Bittner et al., 1999b; Ferrari et al., 1998). Alors que la transplantation de moelle osseuse n'a pas montré une restauration de l'expression de la dysferline dans les cellules musculaires de souris A/J (Flix et al., 2013), des résultats prometteurs ont été obtenus en utilisant des cellules issues de sang de cordon ombilical humain (HUCB) ou des cellules circulantes CD133+. Dans une étude sur des souris SJL, il a été montré que des progéniteurs myogéniques sont présents dans les populations cellulaires de l'HUCB et qu'elles peuvent se disséminer dans le muscle dystrophique après administration intraveineuse (Kong et al., 2004). Ces cellules sont alors capables de différenciation myogénique dans le muscle hôte, permettant ainsi l'expression de la dysferline. Dans une seconde étude, des cellules CD133+, isolées d'échantillons sanguins de patients atteints de MM, ont été génétiquement modifiées par l'intermédiaire d'un vecteur lentiviral permettant la réexpression du transcrite de la dysferline puis transplantées chez des souris SCID-BLAJ (Meregalli et al., 2013). L'injection intramusculaire de ces cellules a alors entraîné une expression suffisante de la dysferline pour corriger les déficits fonctionnels des muscles squelettiques des souris, comme la PMR.

Enfin, les cellules souches mésenchymateuses (CSM), ont été étudiées pour traiter les processus secondaires des MD comme l'inflammation, de par leurs propriétés immuno-modulatrices. Un certain nombre d'études ont exploré le rôle des CSM dans des modèles murins de DMD, montrant une modeste prise de greffe mais pas d'amélioration significative de la force contractile musculaire ni de l'expression de la dystrophine (Chan et al., 2007; De Bari et al., 2003; Feng et al., 2008; Gang et al., 2009). Les cellules stromales dérivées du tissu adipeux (ASC) ont également été signalées comme CSM ayant des effets bénéfiques. Au contact de cellules musculaires dystrophiques hôtes, les ASC sont capables de se différencier en cellules musculaires et leur injection systémique chez des souris SJL permet de restaurer l'expression de la dysferline et d'améliorer la capacité motrice des animaux modèles de dysferlinopathies.

2.3. L'utilisation des cellules souches pluripotentes

Une alternative à l'utilisation des cellules souches adultes pour le traitement des MD par thérapie cellulaire réside dans le potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches pluripotentes (CSP) en progéniteurs myogéniques. Néanmoins, dans le cadre des dysferlinopathies, aucune étude n'a eu recours à la transplantation de progéniteurs

myogéniques dérivées de CSP humaines pour traiter un modèle animal ou un patient. Brièvement, il a été montré que cette stratégie thérapeutique pouvait être envisagée pour d'autres LGMD. Par exemple, la transplantation intramusculaire de progéniteurs myogéniques murins et humains dans un modèle souris FKRP (LGMD R9) permet de renouveler les myofibres du muscle dystrophique et de restaurer 30% du phénotype pathologique (Azzag et al., 2020). La présence de cellules *PAX7* positives, dérivées du donneur, sous la lame basale indique une prise de greffe de cellules satellites et donc un potentiel de repeuplement à long terme. Les essais fonctionnels ont révélé une force accrue dans les muscles transplantés par rapport aux contrôles injectés par PBS. Une autre étude sur la LGMD R1 confirme la réexpression de la calpaïne 3 après transplantation autologue chez un modèle murin de progéniteurs myogéniques dérivés de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC) et corrigés par la technologie CRISPR-Cas9 (Selvaraj et al., 2019a). Par ailleurs, ces résultats prometteurs ont amené la société de biotechnologie « Vita Therapeutics » à financer des recherches précliniques de thérapie cellulaire combinant la technologie des hiPSC et de l'édition de gène pour le traitement des MD.

3. La thérapie génique

La thérapie génique vise à traiter une maladie spécifique en introduisant, supprimant ou modifiant du matériel génétique dans les cellules du patient. En comparaison aux traitements médicamenteux, cette thérapie consiste à corriger la cause génétique sous-jacente de la maladie afin d'offrir un bénéfice clinique durable, voire curatif, en un seul traitement. D'abord conçue comme une approche thérapeutique destinée aux maladies génétiques rares, et notamment les affections monogéniques pour lesquelles il n'existait presque que des traitements palliatifs, les modalités et les indications de la thérapie génique se révèlent aujourd'hui beaucoup plus larges, avec 65% des essais cliniques qui concernent le traitement de cancers (Ginn et al., 2018). Certains succès majeurs obtenus lors d'essais cliniques ont également mené à la commercialisation de plusieurs médicaments (Aiuti et al., 2017; Jensen et al., 2021; Keeler and Flotte, 2019; Russell et al., 2017; Schuessler-Lenz et al., 2020).

3.1. Les différentes stratégies de thérapie génique

Il existe principalement deux types de thérapie génique pour modifier le matériel génétique dans une cellule cible : les méthodes *ex vivo* et *in vivo*. Dans la thérapie génique *ex vivo*, les cellules cibles sont prélevées de l'organisme du patient, modifiées soit par l'ajout du gène thérapeutique, soit par les technologies d'édition de gène permettant de corriger le phénotype de la maladie. Les cellules sont ensuite réinjectées au patient. Ce type d'intervention est également appelé thérapie génique *in vitro* et s'applique particulièrement aux maladies du sang car il est possible de prélever les cellules à corriger par une simple prise de sang. Travailler *ex vivo* permet de mieux contrôler les étapes, d'utiliser moins de vecteurs et d'éviter la dispersion du traitement dans des organes non ciblés. Concernant les maladies génétiques musculaires, cette stratégie reste encore compliquée à mettre en œuvre en raison des

problèmes de survie cellulaire et d'incompatibilité avec une délivrance systémique (Singh et al., 2017; van Nies et al., 2018). Dans la thérapie génique *in vivo*, le vecteur thérapeutique est administré par voie systémique dans la circulation sanguine ou le liquide céphalo-rachidien du patient. Le vecteur de thérapie doit alors être optimisé pour avoir un tropisme fort envers les cellules à traiter. Le vecteur peut également être administré dans un organe ou une zone spécifique du corps du patient, soit par injection directe, soit par insertion d'un cathéter dans le cas où l'organe à traiter est le cœur. On parle alors de thérapie *in situ*.

Le choix de la procédure dépend entièrement du type d'indication, du tissu affecté et du type cellulaire à corriger. Dans le cadre des LGMD, la thérapie génique *in vivo* est privilégiée.

3.2. Les différents vecteurs d'administration

Une grande variété de vecteurs a été utilisée dans les programmes de thérapie génique. On distingue les vecteurs viraux intégratifs ou non intégratifs, ainsi que les vecteurs non viraux. Ils se différencient principalement par leur tropisme pour un type cellulaire donné, leur capacité d'encapsulation plus ou moins grande, leur toxicité et leur immunogénicité.

Bien que les techniques non virales soient de plus en plus courantes, les vecteurs viraux restent de loin l'approche la plus populaire, puisqu'ils sont impliqués dans environ 2/3 des essais cliniques (Ginn et al., 2018). Les vecteurs viraux intégratifs, tels que les lentivirus et les rétrovirus, insèrent leur ADN dans le génome de l'hôte. En conséquence, le matériel génétique à visée thérapeutique est transmis aux cellules filles en cas de divisions cellulaires, ce qui entraîne une expression stable et permanente du transgène. Ces vecteurs intégratifs sont les mieux adaptés pour la thérapie génique *ex vivo*. Par contre, un des effets secondaires de leur intégration, connu sous le nom de mutagénèse insertionnelle, implique l'activation de proto-oncogènes ou la perturbation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les vecteurs viraux non intégratifs, tels que les adénovirus, les virus adéno-associés (AAV) ou l'herpès simplex (HSV), eux, ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule hôte et provoquent une expression génique transitoire. Le gène thérapeutique s'exprime pendant la durée de vie de la cellule et disparaît à la mort de celle-ci. Ces vecteurs sont privilégiés *in vivo* quand il s'agit de faire pénétrer un transgène dans des cellules cibles qui ne se divisent pas, comme les cellules du muscle squelettique.

3.3. La thérapie génique par le remplacement de gène

Pour les affections monogéniques résultant de l'absence ou de la réduction de l'expression d'un gène, un des objectifs de la thérapie génique consiste à délivrer une copie intacte du gène perturbé aux cellules de patients afin qu'elles puissent de nouveau exprimer une protéine fonctionnelle pour prévenir ou ralentir la maladie.

Bien qu'il ait été démontré que la séquence codant la dysferline peut être délivrée aux cellules musculaires de souris pathologiques en utilisant des plasmides (Ma et al., 2017), les AAV restent majoritairement utilisés dans les études de thérapie génique pour les dysferlinopathies. Or, leur

utilisation pose des problèmes techniques majeurs pour le gène *DYSF*. La taille d'encapsulation des AAV est limitée à 4 kb alors que la séquence codante de la dysferline représente 6,9 kb. Pour contourner ce problème, différentes stratégies ont alors été développées : transférer l'intégralité de la séquence codante de la dysferline en utilisant la concatémérisation de vecteurs ou transférer seulement une partie de la séquence après avoir identifié les domaines de la dysferline essentiels à ses fonctions. Il a également été proposé de compenser la perte d'expression de la dysferline par la surexpression d'autres protéines.

3.3.1. Le transfert du gène *DYSF* pleine longueur par concatémérisation de vecteurs AAV

Dans le but de délivrer des transgènes qui dépassent la taille d'encapsulation des vecteurs, plusieurs équipes de recherche ont proposé d'utiliser une propriété intrinsèque des AAV qui est la concatémérisation intermoléculaire (Xu et al., 2004; Yan et al., 2000). Ce procédé consiste à scinder le gène de la dysferline en deux et d'encapsider chaque partie dans deux vecteurs AAV indépendants ; l'un renfermant le début du gène, l'autre sa fin. Une fois la cellule musculaire co-infectée par les deux AAV, le transgène complet peut être reconstitué (Duan et al 2001), soit par un mécanisme de trans-épissage, soit par recombinaison homologue (Figure 23).

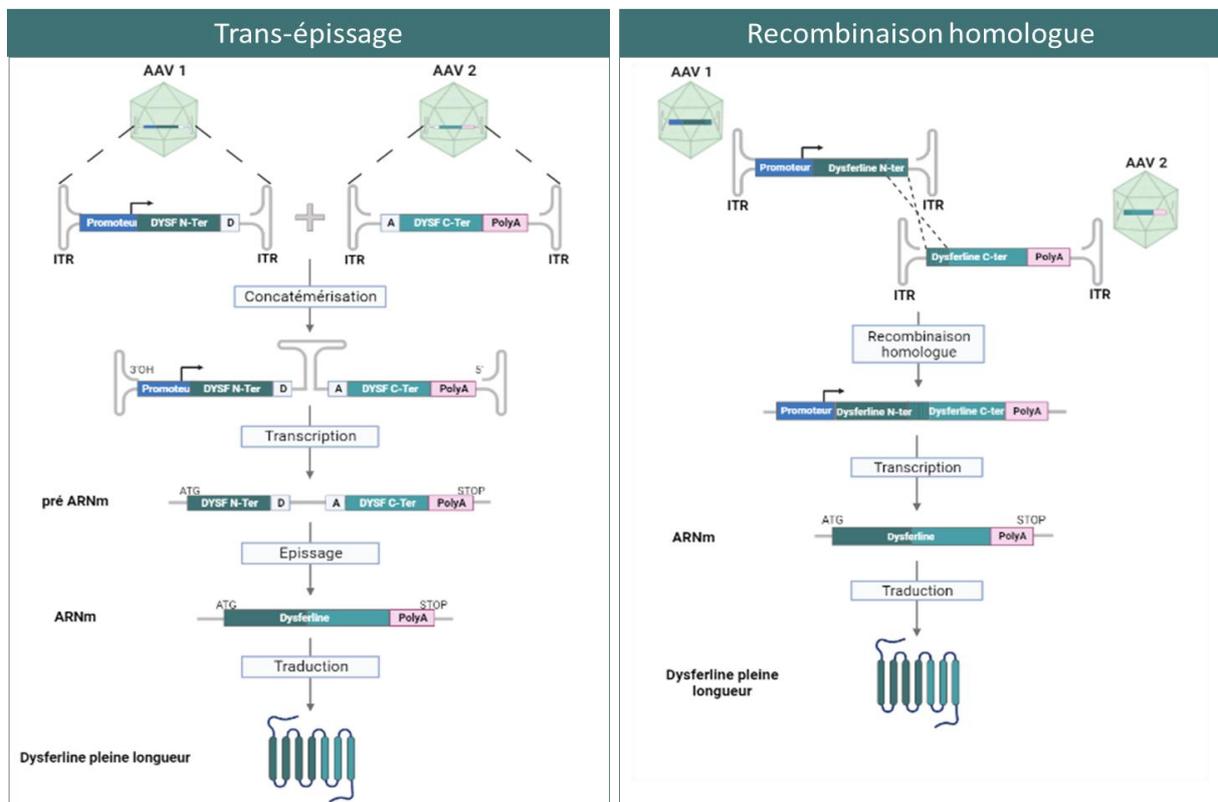


Figure 23. Le transfert du gène *DYSF* pleine longueur par concatémérisation de vecteurs AAV.

Gauche : la co-administration de vecteurs AAV contenant chacun une partie de la séquence codant la dysferline permet, par concatémérisation et épissage, de transférer l'intégralité de la séquence de la dysferline dans un organisme modèle. **Droite :** la co-administration de vecteurs AAV contenant chacun une partie de la séquence codant la dysferline ainsi qu'un fragment central commun permet, par recombinaison homologue, de transférer l'intégralité de la séquence de la dysferline dans un organisme modèle. Schéma créé sur le site BioRender.

Trans-épissage

Dans le cadre du trans-épissage, un premier vecteur AAV contient le promoteur ainsi que la partie 5' du gène thérapeutique fusionnée avec une séquence intronique qui porte un site d'épissage donneur. Le deuxième AAV est quant à lui composé d'une séquence intronique avec un site d'épissage accepteur et de la partie 3' du gène thérapeutique suivie d'une séquence polyA. Lors de la co-administration de ces deux vecteurs, la recombinaison intermoléculaire des répétitions terminales inversées (ITR pour inverted terminal repeat) des vecteurs permet la concatémérisation des deux AAV et donc l'expression du transgène thérapeutique dans sa totalité (Figure 23).

Une première étude en 2010 a démontré l'efficacité de cette méthode pour le traitement des dysferlinopathies en corrigeant plusieurs phénotypes de la pathologie après un trans-épissage de la séquence complète de la dysferline dans le muscle squelettique (Lostal et al., 2010). Pour cela, la séquence codant la dysferline a été scindée en deux au niveau de l'intron 28, puis chaque partie a été clonée dans deux vecteurs AAV indépendants. L'injection intramusculaire de ces deux vecteurs chez un modèle murin A/J a permis de restaurer l'expression de la dysferline dans sa totalité pendant au moins un an. Cette réexpression a été associée à une amélioration de l'aspect histologique du muscle, une réduction du nombre de fibres nécrotiques, une restauration de la capacité de PMR et une amélioration globale de l'activité motrice des animaux. Par ailleurs, l'injection systémique des deux vecteurs a conduit à une expression généralisée de la protéine associée à une amélioration de quelques symptômes. Cependant, par administration systémique, de faibles niveaux de transduction compris entre 1 et 4% ont été observés, ce qui constitue une limitation de l'approche à double vecteur. Les auteurs ont ainsi postulé que des niveaux d'expression de 30% de la dysferline seraient nécessaires pour obtenir des résultats cliniquement significatifs.

Recombinaison homologue

La stratégie de recombinaison homologue repose sur le chevauchement des fragments portés par les deux vecteurs AAV. Un des vecteurs contient le promoteur et la partie 5' du transgène thérapeutique alors que l'autre vecteur est composé de la partie 3' du transgène suivie d'une séquence polyA. A la différence de la stratégie par trans-épissage, un fragment central commun est présent dans les deux vecteurs. Lors de la co-administration de ces deux vecteurs, un processus de recombinaison homologue permet une reconstitution complète du transgène thérapeutique (Figure 23).

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de cette méthode pour le traitement des dysferlinopathies. Pour cela, deux vecteurs AAV rh74 ont été utilisés, chacun contenant une partie de la séquence codant la dysferline et un fragment de chevauchement de 1 kb. Dans une première étude (Sondergaard et al., 2015), jusqu'à ~90% des myofibres étaient positives pour la dysferline, six mois après une administration intramusculaire des vecteurs, et ~70% après une administration vasculaire régionale dans les membres inférieurs de modèles murins déficients en dysferline. L'expression du transgène a permis de restaurer la capacité de PMR des myofibres isolées des muscles traités, en plus d'améliorer la force spécifique des muscles

du diaphragme des souris à des niveaux similaires aux modèles contrôles. La sécurité de l'injection intramusculaire des vecteurs a également été évaluée chez des macaques rhésus. Le traitement a entraîné une surexpression robuste de la dysferline exclusivement dans les muscles injectés, sans signes histologiques de toxicité, d'inflammation, de nécrose ou de réponse immunitaire. L'administration systémique des vecteurs chez les souris permet également de restaurer l'expression de la dysferline dans les muscles squelettiques à des niveaux similaires (2-6%) à ceux obtenus avec la méthode de trans-épissage, indiquant un effet comparable des deux techniques. Par contre, la multiplication par trois de la dose injectée par voie systémique a considérablement amélioré les niveaux d'expression de la dysferline (15-27%), suffisamment pour rétablir les mesures fonctionnelles au niveau de souris saines. Ces résultats confirment ainsi l'hypothèse avancée dans l'étude de trans-épissage (30% de l'expression de la dysferline serait nécessaire pour obtenir des résultats cliniquement significatifs).

Les données ont par la suite été complétées par une autre étude démontrant l'efficacité, la sécurité et l'absence de toxicité de l'approche double vecteur par administration systémique sur des modèles souris et primates non humains pré- et post- symptomatiques (Potter et al., 2018). Il a été constaté que le moment de l'administration et la durée du traitement ont un impact sur le degré d'efficacité. Les résultats les plus frappants ont été obtenus avec de jeunes animaux traités avant l'apparition de la maladie. L'administration systémique des vecteurs AAV entraîne une expression généralisée et à long terme de la dysferline (pendant 24 mois sans réduction) ainsi que des améliorations histologiques et une récupération fonctionnelle dans les modèles jeunes de dysferlinopathie. Néanmoins, une amélioration histologique et un avantage fonctionnel ont également été observés après le traitement de souris post-symptomatiques, laissant penser que l'administration de l'AAVrh74.DYSF peut apporter un bénéfice clinique indépendamment de l'état de la maladie.

3.3.2. Le transfert de mini gène

Une autre alternative pour contrecarrer la capacité limitée d'encapsulation des AAV est d'apporter aux cellules de patients une forme partielle mais fonctionnelle du gène de la dysferline, et qui peut être intégrée dans un vecteur unique (Figure 24).

Cette stratégie thérapeutique a été inspirée par la découverte d'une mini-dysferline naturellement fonctionnelle chez un patient présentant une forme tardive et modérée de la maladie (Krahn et al., 2010). Cette mini-dysferline, composée uniquement des deux derniers domaines C2F et C2G de la protéine ainsi que de son domaine transmembranaire, est exprimée et correctement localisée à la membrane plasmique des cellules musculaires du patient. L'injection d'un AAV codant pour cette mini-dysferline dans des souris déficientes en dysferline confirme la production d'une protéine raccourcie qui s'insère au niveau du sarcolemme et qui permet d'améliorer la capacité de PMR des fibres. Néanmoins, cette mini-dysferline est partiellement fonctionnelle puisqu'aucune amélioration histologique n'a été observée chez les souris A/J ou Bla/J traitées (Krahn et al., 2010; Lostal et al., 2012). Ces résultats suggèrent que

la capacité de PMR n'est pas suffisante pour restaurer toute la fonctionnalité de la dysferline. Cela pourrait expliquer pourquoi, bien que modéré, un phénotype est toujours observé chez le patient.

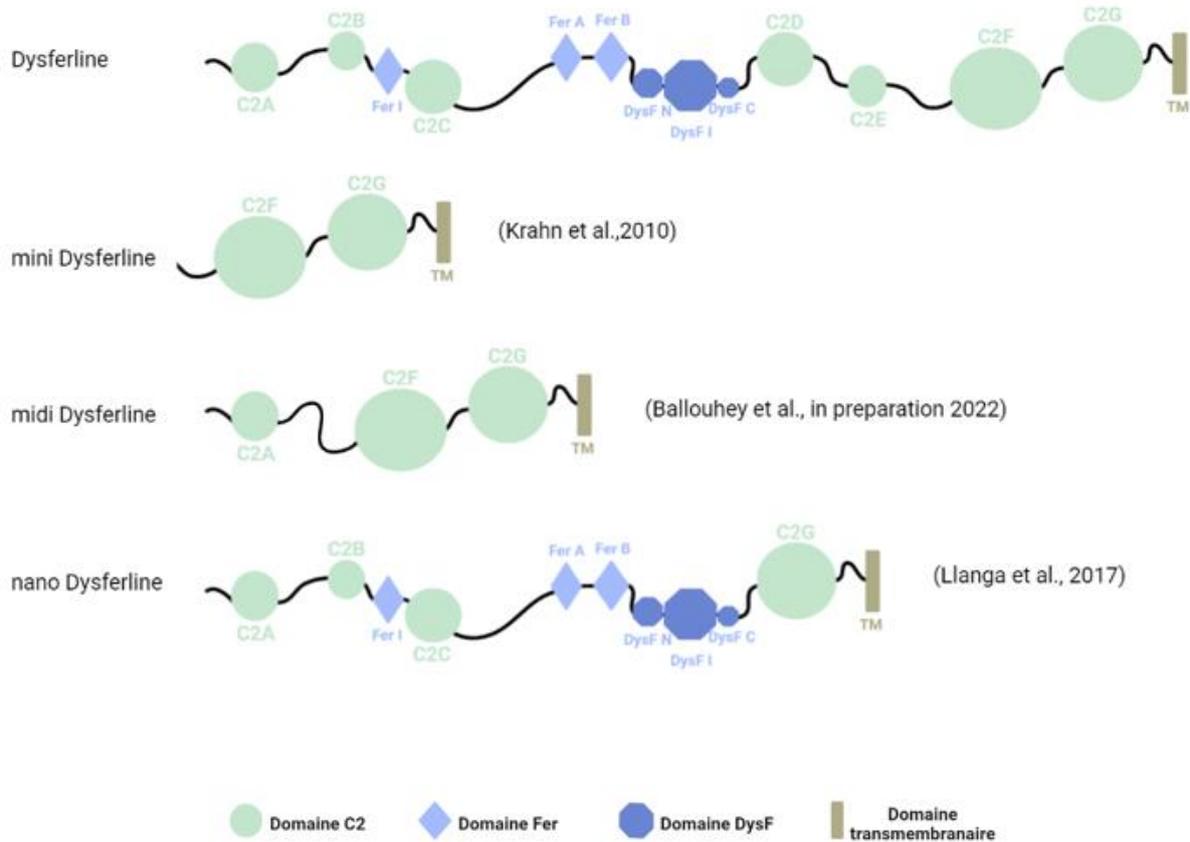


Figure 24. Le transfert de mini gène *DYSF*.

Plusieurs mini-gènes de *DYSF* ont été développés comme stratégie thérapeutique pour les dysferlinopathies. Chaque mini-gène est composé de différents domaines C2, Fer et DysF, associés au domaine transmembranaire de la dysferline. Schéma inspiré de la thèse *Etude d'un transcrit alternatif de la dysferline et mise en place d'un traitement pour les dysferlinopathies* par Océane BALLOUHEY, 2021, et créé sur le site BioRender.

Une mini-dysferline similaire, naturellement issue d'un clivage par des protéases, a par la suite été décrite (Lek et al., 2013; Redpath et al., 2014). Cette dysferline possède un exon alternatif, le 40a, qui est un site de coupure pour les calpaines qui sont activées par une entrée massive de calcium dans les cellules après une lésion membranaire. Le clivage entraîne alors la production d'une mini-dysferline_{C72} composée uniquement des domaines C2F, C2G et du domaine transmembranaire. De façon similaire à l'étude précédente, le traitement de souris pathologiques avec cette mini-dysferline permet d'améliorer leur capacité de PMR mais pas l'histologie de leurs muscles. Des domaines supplémentaires, absents de ces mini-dysferlines, pourraient donc conférer des rôles fonctionnels spécifiques à la protéine et être nécessaires pour sa fonctionnalité globale. C'est pourquoi les recherches suivantes se sont intéressées aux fonctions associées aux différents domaines de la dysferline, en particulier par le développement d'autres mini-dysferlines.

L'exon 40a ayant été récemment identifié comme essentiel dans la fonction de PMR de la

dysferline (Ballouhey et al., 2021), la mini-dysferline_{C72} a très récemment été optimisée en y ajoutant le domaine C2A qui permet de nombreuses interactions de la dysferline avec ses partenaires protéiques, mais aussi avec les phospholipides (Ballouhey et al., en préparation 2022). Tandis que cette midi-dysferline restaure complètement la capacité de PMR des cellules musculaires *in vitro* ainsi que le trafic des vésicules intracellulaires, la membrane plasmique ne semble que partiellement protégée contre un stress mécanique. D'autres domaines de la dysferline pourraient donc encore être nécessaires pour restaurer l'intégralité des fonctions de la dysferline.

Dans ce sens, une autre étude a entrepris la conception d'une nano-dysferline (Llanga et al., 2017). Celle-ci est composée des trois domaines Fer et Dysf, des domaines C2A, C2B, C2C et C2G, ainsi que du domaine transmembranaire. L'injection systémique de cette nano-dysferline chez de jeunes souris Bla/J, par l'intermédiaire d'un AAV, a rétabli les fonctions motrices et amélioré l'intégrité musculaire près de 8 mois après le traitement. De façon surprenante, seulement 10% des fibres musculaires expriment cette nano-dysferline après l'injection. Même si des études supplémentaires sont nécessaires pour démontrer la capacité de cette nano-dysferline à restaurer l'intégralité des fonctions de la protéine, ces données précliniques démontrent pour la première fois l'aptitude d'une dysferline raccourcie à restaurer une fonction motrice.

3.3.3. La thérapie compensatoire

Une autre stratégie de thérapie génique par remplacement de gène consiste à induire l'expression ou à surexprimer une protéine compensatrice qui peut totalement ou partiellement remplir les fonctions de la protéine déficiente.

Dans le cadre des dysferlinopathies, une première étude s'est demandé si la myoferline, le membre de la famille des ferlines le plus proche de la dysferline, pourrait compenser la perte de cette dernière (Lostal et al., 2012). Pour ce faire, des souris transgéniques surexprimant la myoferline ont été croisées avec des souris Bla/J. Bien que la surexpression de la myoferline compense le défaut de fusion membranaire observé dans les fibres musculaires déficientes en dysferline, elle n'est pas suffisante pour corriger l'histologie musculaire et pour empêcher la dégénérescence des fibres. Néanmoins, l'incapacité de la myoferline à compenser la dysferline malgré leur structure similaire indique que la dysferline remplit des fonctions indispensables pour l'homéostasie musculaire que la myoferline ne peut pas remplir. En effet, la nécessité de deux protéines hautement homologues dans le même tissu plaide en faveur d'une fonction unique avec une spécificité spatio-temporelle de chacune de ces protéines. Ces différences de fonction entre la dysferline et la myoferline peuvent être dues à des différences dans les protéines avec lesquelles elles interagissent, empêchant une fonction d'être remplie en leur absence. En effet, l'incapacité des mini-dysferline à compenser la perte de la protéine totale peut également être due à leur impossibilité à interagir avec certains partenaires protéiques ou à réguler les mêmes processus que la protéine totale.

Récemment, une autre équipe a développé une nouvelle thérapie génique qui permet de contourner les principaux obstacles associés aux dysferlinopathies que sont : l'intégration de la séquence codante de la dysferline dans un vecteur, le ciblage spécifique de muscles dégénératifs difficiles à atteindre, l'utilisation de fortes doses d'AAV. Pour ce faire, les auteurs se sont appuyés sur leur découverte précédente selon laquelle l'enzyme lysosomale ASM jouerait un rôle essentiel dans le processus de PMR (Defour et al., 2014). Comme expliqué précédemment, dans les secondes suivant une lésion membranaire, la dysferline semble faciliter l'exocytose de lysosomes à la membrane plasmique, ce qui permet la sécrétion de composants nécessaires au mécanisme de PMR. Or, une absence de dysferline semble retarder l'exocytose des lysosomes, ce qui réduit la sécrétion d'ASM par la cellule musculaire lésée et compromet par conséquent la réparation de son sarcolemme. Dans leur étude préclinique, les auteurs ont donc évalué l'efficacité d'une thérapie génique qui cible la réduction de la sécrétion d'ASM en utilisant un AAV spécifique du foie afin de maintenir un niveau thérapeutique constant d'ASM dans le sérum (Bittel et al., 2022). L'injection unique de la thérapie par intraveineuse dans un modèle murin A/J permet d'augmenter et de maintenir une expression constante d'ASM dans les cellules musculaires pendant au minimum 3 mois et de restaurer la capacité de PMR des fibres. De façon intéressante, l'histologie pathologique et la fonction musculaire ont également été rétablies après traitement des souris. Un essai clinique serait donc nécessaire pour évaluer l'utilité thérapeutique de cette approche sur des patients atteints de dysferlinopathies. Cependant, cette étude a une signification importante en termes de nouvelles approches thérapeutiques pour les dysferlinopathies. Elle fournit des données innovantes sur l'utilisation du foie comme site de production de transgènes pour compenser des déficiences génétiques des muscles squelettiques.

3.4. La thérapie génique par modification d'ARN

Les dysferlinopathies sont causées par des mutations qui, pour certaines, empêchent la production d'une dysferline fonctionnelle, soit par un décalage du cadre de lecture, soit par des mutations non-sens. Au-delà de la thérapie génique "classique", d'autres techniques ont ainsi été développées pour intervenir sur les ARN : le saut d'exon, le trans-épissage ou la translecture de codon stop.

3.4.1. Le saut d'exon

Une stratégie thérapeutique prometteuse qui a gagné du terrain ces dernières années est le saut d'exon (Niks and Aartsma-Rus, 2017). Elle consiste à moduler l'épissage du pré-ARNm afin de sauter les exons porteurs de mutations pendant la transcription, tout en maintenant un cadre de lecture ouvert permettant de produire une protéine partielle mais possiblement fonctionnelle (Aartsma-Rus et al., 2004; Goyenvallé et al., 2004; Lu et al., 2005). On peut y parvenir à l'aide d'oligonucléotides anti-sens (AON), de petits morceaux d'ADN ou d'ARN modifiés qui s'hybrident spécifiquement à un exon cible, le cachant alors de la machinerie d'épissage afin qu'il soit épissé avec ses introns adjacents. Cette approche de saut d'exon a été

développée comme stratégie thérapeutique pour les maladies neuromusculaires, avec notamment la commercialisation, dès 2016, de l'Eteplirsen (Exondys51) pour la DMD ou du Nusinersen (Spinraza) pour l'amyotrophie spinale (SMA).

La possibilité d'appliquer cette stratégie aux dysferlinopathies a d'abord été étayée par un cas clinique présentant un saut naturel de l'exon 32, associé à un phénotype dystrophique très léger et tardif chez la patiente (Sinnreich et al., 2006). Des études *in vitro* ont par la suite confirmé que l'exon 32 pouvait être ciblé par des AON dans des cellules de patients porteurs d'un variant pathogène dans cet exon (Wein et al., 2010) puisque la dysferline tronquée résultante est correctement localisée à la membrane plasmique et est capable d'assurer sa fonction de PMR (Barthélémy et al., 2018, 2015). De manière comparable, cette stratégie de saut d'exon peut potentiellement être appliquée à d'autres mutations de la dysferline, dans des parties de la protéine susceptibles d'être supprimées tout en conservant une séquence dont la fonctionnalité est préservée, au moins partiellement (Figure 25). Certaines études ayant néanmoins des points de vue divergents sur les exons pouvant être ciblés par cette stratégie (Aartsma-Rus et al., 2010; Lévy et al., 2010), il est indispensable d'avoir une compréhension plus approfondie de la fonction de chacun des 55 exons composant le gène *DYSF* et d'identifier les domaines indispensables. A partir de cas cliniques (Krahn et al., 2010, 2009; Nguyen et al., 2005) ou de modèles pathologiques (Bittner et al., 1999b; Vafiadaki et al., 2001), nous savons par exemple que les deux derniers domaines C2 de la dysferline et le domaine transmembranaire sont essentiels mais non suffisant pour empêcher l'apparition d'un phénotype pathologique, suggérant la nécessité de conserver d'autres parties de la dysferline entre les exons 2 et 40 (Krahn et al., 2010). En effet, l'exon 1 de la dysferline n'est pas une cible valide puisque son exclusion entraînerait une perte du cadre de lecture. Il a également été démontré que le saut d'un exon porteur d'une mutation peut engendrer le saut d'exons adjacents. En effet, une équipe a montré dans des cellules de patients qu'une thérapie ciblant un variant pathogène dans l'exon 27 ou l'exon 28 nécessite un saut des exons $\Delta 26-27$ et $\Delta 28-29$, respectivement, afin de conserver le cadre de lecture (Lee et al., 2018). De même, une étude *in vivo* sur le modèle murin MMex38, portant un variant faux-sens dans l'exon 38, a montré qu'un saut des exons 37-38 permet de restaurer la fonction de PMR de la dysferline contrairement à un saut de l'exon 38 seul (Malcher et al., 2018). Ces deux équipes ont également pu mettre en avant l'impact négatif de cette stratégie sur la capacité des cellules à réparer leur membrane plasmique avec le saut des exons $\Delta 19-21$, $\Delta 20-21$, $\Delta 46-48$.

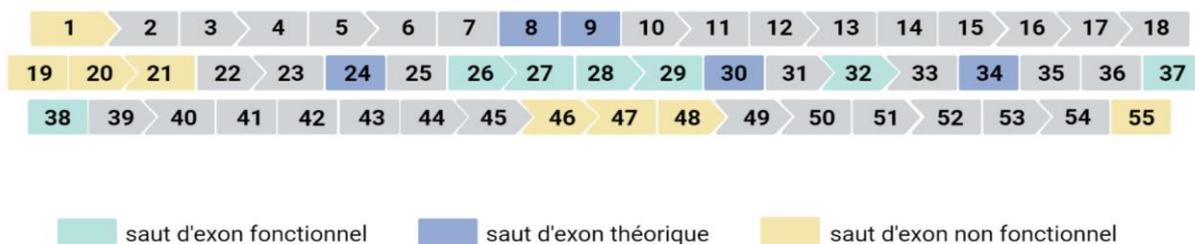


Figure 25. Les exons du gène *DYSF* pouvant être ciblés par la stratégie du saut d'exon.

Représentation des exons du gène *DYSF* pouvant être ciblés par un saut d'exon. Le saut des exons 26-27, 28-29, 32 et 37-38 entraîne la production d'une dysferline fonctionnelle. Schéma créé sur le site BioRender.

3.4.2. Le trans-épissage

Bien que la structure modulaire de la dysferline tolère des délétions internes, de nombreuses mutations qui affectent des domaines essentiels à la fonction de la protéine nécessitent des stratégies thérapeutiques alternatives. Parmi celles-ci, le trans-épissage, appelé aussi technique SMaRT (Spliceosome mediated RNA trans-splicing), permet de corriger des mutations au niveau post-transcriptionnel en remplaçant une région mutée d'un pré-ARNm par une séquence codante fonctionnelle (Puttaraju et al., 1999). Pour ce faire, un ARN exogène thérapeutique, appelé pre-mRNA trans-splicing molecule (PTM), est introduit dans la cellule cible, bloque l'épissage endogène et réoriente la machinerie d'épissage sur lui-même afin de remplacer le ou les exons mutés par la séquence normale (Figure 26).

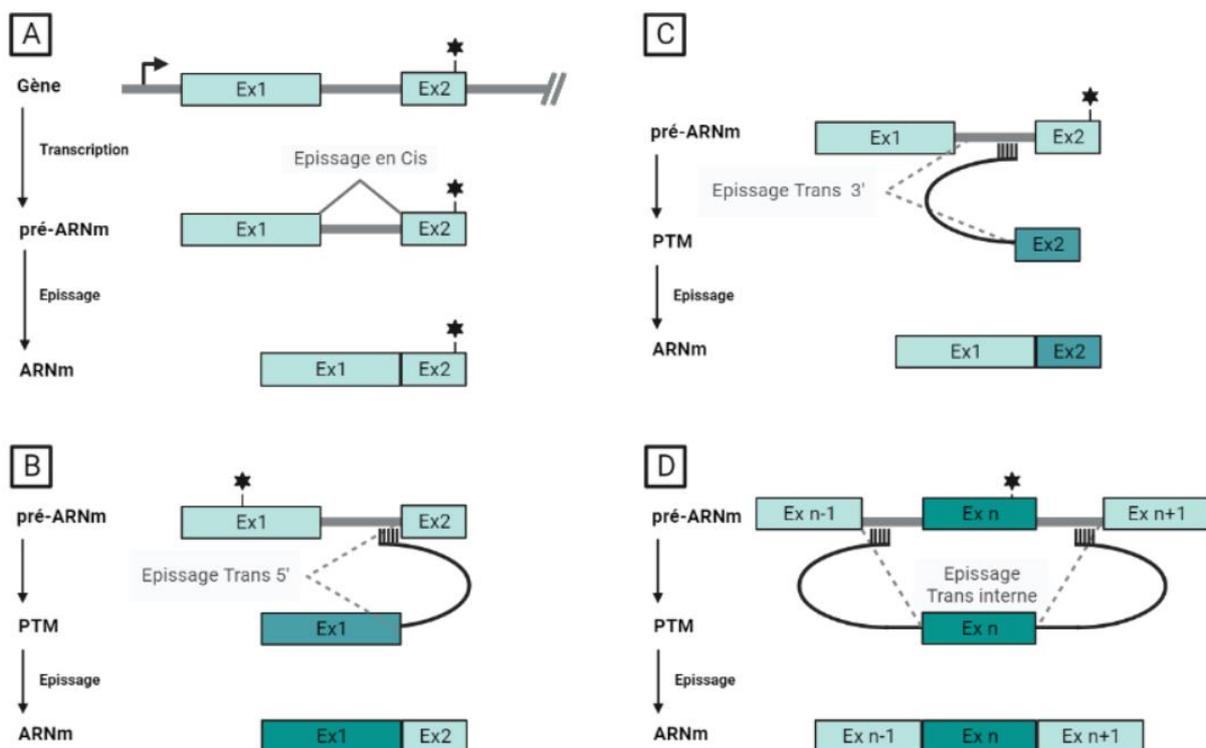


Figure 26. Les techniques de trans-épissage d'un pré-ARN messager de la dysferline.

(A) Le mécanisme classique d'épissage, ou épissage en cis, conduit à l'élimination des séquences introniques d'un pré-ARN messager. (B-D) Au contraire, l'épissage en trans se produit entre deux sites d'épissage situés sur deux pré-ARN messager différents. Dans la technologie SMaRT, un ARN exogène thérapeutique appelé PTM, est utilisé pour remplacer un ou plusieurs exons d'un pré-ARN messager endogène. Selon l'orientation du PTM, il est possible de remplacer plusieurs exons (B,C) et même des exons internes (D). Ex n : exon n ; * : mutation ponctuelle. Schéma adapté de (Berger et al., 2016) et créé sur le site BioRender.

La preuve de concept de la faisabilité de la technologie SMaRT a déjà été établie dans plusieurs modèles de maladies génétiques causées par des mutations récessives. Dans de tels cas, en effet, la réparation d'une partie seulement du pool d'ARNm mutants peut être suffisante pour obtenir un effet thérapeutique significatif (Coady and Lorson, 2010; Lorain et al., 2013). Dans le cadre des dysferlinopathies une première étude a démontré la possibilité d'échanger spécifiquement plusieurs exons endogènes de la dysferline *in vitro* et *in vivo* (Monjaret et al., 2014). Le transfert d'un PTM, par l'injection d'AAV en intramusculaire, a ainsi permis de

remplacer les six derniers exons de la dysferline qui représentent 20% des mutations identifiées jusqu'en 2014. Par la suite, une deuxième étude a réussi à remplacer les exons 32 à 55 et 36 à 55 dans des myoblastes portant un variant pathogène dans l'exon 38 et chez un modèle murin pathologique présentant une délétion des exons 53 à 55 (Philippi et al., 2015). Le trans-épissage a permis de restaurer partiellement l'expression de la dysferline avec le transport des PTM thérapeutiques par des vecteurs lentiviraux *in vitro* ou des AAV *in vivo*. Cependant, la protéine n'a pu être détectée au sarcolemme que d'environ 6 à 15% des fibres dans les muscles traités.

A ce jour, aucune étude n'a montré une restauration fonctionnelle de la dysferline grâce à cette technique de trans-épissage. Néanmoins, ces deux études ont montré des résultats encourageants pour remplacer des exons qui ne peuvent pas être ciblés par le saut d'exon.

3.4.3. La translecture de codon stop

Une dernière stratégie thérapeutique, la translecture de codon stop, est une technique qui ne cible pas directement l'ARNm mais le mécanisme associé à la traduction des ARNm en protéines (Figure 27). Certaines mutations non-sens dans un gène peuvent entraîner un codon stop prématuré (PTC pour premature termination codon) sur l'ARNm. Ceci conduit à la synthèse d'une protéine tronquée qui ne parvient plus à assurer ses fonctions ou potentiellement à la dégradation de cet ARNm par la voie NMD (nonsense mediated mRNA decay) qui reconnaît spécifiquement les ARNm contenant un codon stop prématuré. Néanmoins, certaines petites molécules peuvent se fixer sur le ribosome afin de forcer la lecture des PTC (événement appelé translecture) et permettre la synthèse de la protéine dans sa totalité. Les antibiotiques de la famille des aminoglycosides (gentamycine, amikacine, G418, ...) sont les premières molécules pour lesquelles un effet sur la translecture des cellules de mammifères a été mis en évidence (Burke and Mogg, 1985).

L'utilité potentielle des inducteurs de translecture comme approche thérapeutique a été démontrée dans un modèle murin de la DMD (Barton-Davis et al., 1999). L'une de ces études a notamment permis d'identifier l'Ataluren (PTC124) qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché conditionnelle en Europe pour la DMD (source : www.ema.europa.eu). L'intérêt thérapeutique de l'Ataluren a également été testé pour traiter les dysferlinopathies. Une première étude *in vitro* sur des myotubes portant un variant non-sens a montré que le traitement à l'Ataluren permet une production de dysferline suffisante (~15%) et fonctionnelle pour améliorer l'intégrité de la membrane des cellules musculaires lors d'un choc osmotique (Wang et al., 2010). L'efficacité de la molécule a également été testée chez un nouveau modèle murin porteur d'une mutation non-sens du gène *DYSF* (Seo et al., 2021). Le traitement des souris permet de restaurer l'expression de la dysferline en deux semaines et d'améliorer l'histologie musculaire. De plus, cette étude est la première à montrer une récupération des performances physiques des souris après traitement.

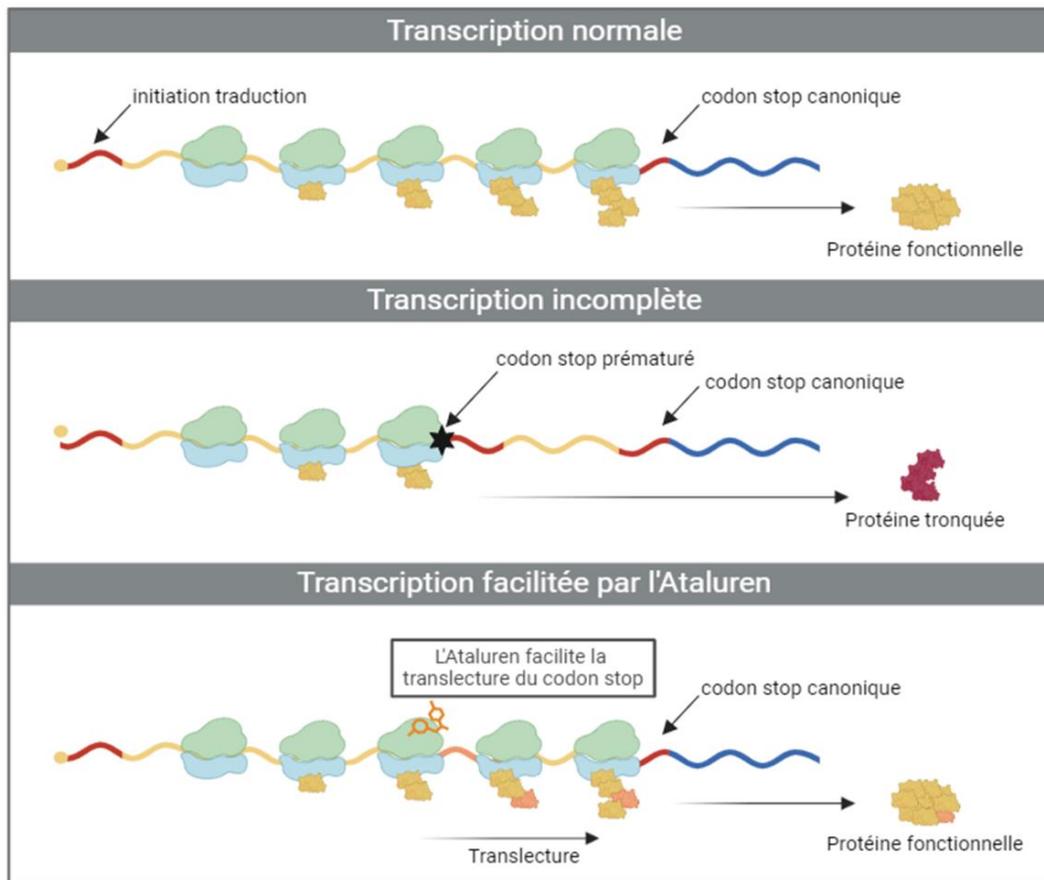


Figure 27. La translecture de codon stop.

En condition normale, la lecture complète d'un ARN messager, au cours du phénomène de traduction, permet la synthèse d'une protéine complète fonctionnelle. En cas de mutation non-sens, la traduction est interrompue à cause d'un codon stop prématuré, ce qui peut conduire à la synthèse d'une protéine tronquée, anormale. Par le phénomène de translecture, induit par certaines molécules (par exemple le PTC124-Ataluren®), un codon stop formé par une mutation non-sens peut être « corrigé » : un acide-aminé pris au-hasard sera incorporé à cet endroit au niveau de la protéine en cours de formation. Ceci permet alors la poursuite de la traduction et d'obtenir une protéine complète de longueur normale, qui peut être fonctionnelle à condition que l'incorporation de l'acide-aminé soit tolérée. Schéma créé sur le site BioRender.

Cette approche thérapeutique, applicable à toutes les mutations non-sens de la dysferline, pourrait théoriquement traiter plus de 15 % des patients atteints de dysferlinopathies (Jin et al., 2016; Mort et al., 2008). Cependant, le développement de cette stratégie doit passer par l'approfondissement de nos connaissances des mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la translecture. En effet, malgré les avantages de l'Ataluren à pouvoir être administré par voie orale et d'être bien toléré par les patients, son mode d'action reste mal caractérisé, en particulier sa cible moléculaire qui n'a pas encore été décrite.

3.5. La thérapie génique par l'édition de gène

Une autre thérapie génique alternative est l'édition du génome qui consiste à modifier durablement une séquence génomique. Cette stratégie s'est notamment accélérée ces deux dernières décennies avec le développement de nouvelles technologies qui permettent la modification précise et efficace d'une variété d'altérations génétiques. Il est possible d'inactiver ou d'insérer un gène, d'introduire ou de corriger une mutation ciblée.

Les outils d'édition du génome font référence à des nucléases dérivées de systèmes bactériens qui ont la capacité de couper la double hélice d'ADN au niveau d'une séquence spécifique. Un système de réparation de la cellule est alors activé pour recoller les deux extrémités libres générées par la coupure : le système NHEJ (non-homologous end-joining). Celui-ci est aléatoire et peut introduire des erreurs, conduisant à la mutation du gène ciblé par la nucléase. Il est également possible de modifier de façon spécifique la séquence visée après coupure. Il faut alors délivrer à la cellule, en plus des nucléases, un brin d'ADN présentant la séquence désirée (matrice), flanquée d'extrémités homologues à celles du site de coupure. Au moment de la réparation de la coupure d'ADN le système de recombinaison homologue HDR (homology directed repair) va incorporer la matrice fournie, conduisant à son insertion définitive dans le génome.

Les outils d'édition les plus populaires sont les nucléases à doigts de zinc (ZFN), les méganucléases, les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) ou encore le système CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (Gaj et al., 2013). Ce dernier a révolutionné le domaine de l'ingénierie génétique en 2012. Il est l'outil d'édition génomique le plus utilisé de ces dernières années grâce à sa simplicité et sa rapidité. Il a notamment permis des avancées majeures dans les approches thérapeutiques pour les MD (Ballouhey et al., 2020). Le système CRISPR permet de couper l'ADN à un endroit précis du génome. Il est constitué d'un ARN guide, qui reconnaît une séquence d'ADN particulière, et d'une nucléase Cas, le plus souvent Cas9, qui coupe l'ADN à cet endroit précis (Jiang and Doudna, 2017). Plus récemment, la technique d'édition de base, une adaptation du système CRISPR, s'est développée. Cette méthode d'édition précise consiste à changer des nucléotides uniques. Elle présente l'avantage de ne pas nécessiter la rupture des brins d'ADN, ce qui évite les insertions et délétions associées à cette rupture.

L'édition du génome est utilisée dans tous les domaines du vivant et particulièrement en recherche médicale car elle permet d'effectuer des modifications génétiques précises. Elle permet notamment de développer de nouveaux modèles animaux (Demonbreun et al., 2019), de produire des modèles cellulaires sur mesure à partir de cellules saines ou de créer des lignées isogéniques (Selvaraj et al., 2019a) pour progresser dans la connaissance des pathologies, ou encore pour tester des molécules thérapeutiques. L'édition génomique ouvre également la voie à de potentielles thérapies géniques en permettant d'inactiver ou de corriger des gènes responsables de maladies chez les patients. Des essais cliniques sont actuellement en cours pour des maladies monogéniques (Amaurose congénitale de Leber), certains cancers (myélome/sarcome) ou encore des hémoglobinopathies sévères (Drépanocytose/ β -thalassémie). Concernant les dysferlinopathies, aucune étude n'a eu recours à l'édition génomique pour traiter un modèle animal ou un patient. En 2016, une étude a cependant montré que cette stratégie est envisageable en corrigeant des hiPSC de patients LGMD R2 (Turan et al., 2016). L'édition de génome par CRISPR a permis de corriger une mutation non-sens de la dysferline, permettant une réexpression de la protéine. Malgré une faible efficacité d'édition d'environ 1.5%, ce système représente une stratégie thérapeutique prometteuse pour les maladies génétiques. Cela ouvre également la possibilité d'une thérapie cellulaire utilisant

des cellules corrigées par thérapie génique.

Bien que ces systèmes d'édition du génome semblent devenir des outils indispensables pour la thérapie génique, il convient de surmonter plusieurs défis pour pouvoir avoir une utilité en clinique (Doudna, 2020) : le transport efficace de ces systèmes, l'immunogénicité des outils d'ingénierie génomique et des vecteurs de livraison et l'identification et la réduction des modifications géniques hors cible.

Depuis le premier essai thérapeutique évaluant l'effet du Dantrolène sur deux patients atteints de dysferlinopathie (Hattori et al., 2007), des dizaines de stratégies ont été développées en préclinique, aboutissant à un essai clinique de phase I (NCT02710500). Néanmoins, à ce jour, il n'existe toujours pas de traitement thérapeutique efficace pour cette pathologie et aucun autre essai clinique interventionnel n'est en cours. Dans ce contexte, il semble donc nécessaire d'**identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques** pour les dysferlinopathies.

Par ailleurs, malgré les recherches intensives menées pour élucider les fonctions assurées par la dysferline, seul son rôle dans le mécanisme de PMR fait consensus. Or, comme nous venons de le voir, la récupération de la fonction de PMR perdue dans un contexte pathologique n'empêche pas la dégénérescence des fibres musculaires, soulignant ainsi la nécessité d'**identifier de nouveaux phénotypes pathologiques**. En effet, l'identification des mécanismes moléculaires induits par une déficience en dysferline est une étape cruciale pour le développement de traitements efficaces. L'identification d'une dérégulation des connexines dans des modèles de dysferlinopathie a, par exemple, abouti à l'identification de la boldine comme un traitement pharmacologique potentiel pour les patients (Cea et al., 2020).

Les avancées dans la compréhension des mécanismes sous-jacents aux dysferlinopathies permettent notamment de développer de nouvelles stratégies pharmacologiques, grâce à l'identification de cibles biologiques indépendantes de la dysferline. En effet, on constate que les études de repositionnement de molécules pour les dysferlinopathies sont uniquement basées sur la restauration de l'expression de la dysferline (Kokubu et al., 2019; Tominaga et al., 2022), et non sur la normalisation de défauts phénotypiques. On observe également que ces approches de repositionnement n'ont pas fait l'objet de stratégies à large échelle d'identification de molécules, jusqu'à très récemment (Kokubu et al., 2019). En effet, la réalisation de ce type d'approche nécessite d'utiliser un modèle cellulaire adapté aux contraintes d'amplification et de miniaturisation du criblage à haut débit, mais aussi de développer un test biologique pertinent et mesurable en microplaques.

Sur la base de ces constats, il semble donc pertinent de développer de nouveaux modèles d'étude capables de reproduire la physiopathologie des dysferlinopathies mais aussi adaptés

aux contraintes de robustesse et de reproductibilité imposées par le criblage à haut débit. Dans ce contexte, les progrès réalisés dans le domaine des cellules souches pluripotentes humaines permettent de proposer de nouvelles opportunités dont nous allons discuter dans le dernier chapitre de cette introduction.

CHAPITRE 4 : LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES HUMAINES

Définies au 19^{ème} siècle mais découvertes au milieu du 20^{ème} siècle, les cellules souches représentent une ressource biologique très attractive pour la communauté scientifique de par leurs deux propriétés cardinales qui les caractérisent : l'auto-renouveau et leur capacité à se différencier vers un type cellulaire spécialisé. Tout d'abord, leur propriété d'auto-renouveau permet à une cellule mère de générer deux cellules filles identiques par division mitotique symétrique et de manière quasi-infinie, faisant de ces cellules une source illimitée de matériel. Deuxièmement, les cellules souches ont un pouvoir de plasticité qui leur permet, au cours d'une division asymétrique, de donner une cellule fille identique et une autre qui se spécifie vers un lignage ou un type cellulaire déterminé. Au cours du développement, alors que le potentiel d'auto-renouveau est maintenu, la capacité de différenciation des cellules souches se restreint. Ainsi, on distingue plusieurs types de cellules souches selon leur capacité de différenciation : les cellules totipotentes, pluripotentes, multipotentes et unipotentes. Bien que les autres types de cellules souches présentent chacun des utilisations intéressantes, j'aborderai dans ce manuscrit uniquement les cellules souches pluripotentes (CSP) qui sont au centre de mon projet de thèse.

Comme nous le verrons dans ce chapitre, les CSP ont révolutionné la recherche médicale et sont devenues un outil incontournable à la fois pour la génération de nouveaux modèles cellulaires pathologiques mais également pour le développement de thérapies, en particulier la régénération tissulaire. Il me semble donc important d'en comprendre l'émergence, les applications mais aussi les limitations, pour en apprécier l'intérêt et le potentiel.

1. Les propriétés des cellules souches pluripotentes

A l'état indifférencié, les CSP ont une capacité d'auto-renouveau théoriquement infinie et ont le potentiel, sous l'influence de signaux spécifiques, de se différencier dans tous les types cellulaires qui composent un organisme adulte. Ces cellules sont capables de donner naissance aux trois lignages embryonnaires, à savoir l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme.

2. Les différentes sources de cellules souches pluripotentes

A ce jour, il existe deux principaux types de CSP qui se distinguent par leurs origines. Les cellules souches embryonnaires (ou ESC pour embryonic stem cells) et les cellules souches induites à la pluripotence (ou iPSC pour induced pluripotent stem cells). Les premières sont isolées de la masse cellulaire interne (MCI) d'embryons humains surnuméraires issus de fécondation *in vitro* (FIV) dans le cadre de programmes de procréation médicalement assistée (PMA) ou encore de diagnostics préimplantatoires (DPI). Les secondes sont issues de la reprogrammation génétique de cellules somatiques adultes humaines, différenciées et spécialisées.

2.1. Les cellules souches embryonnaires

2.1.1. L'origine des cellules souches embryonnaires

Les ESC de mammifère ont été isolées pour la première fois en 1981 chez la souris grâce aux travaux de Martin Evans et de Matthew Kaufman (Evans and Kaufman, 1981), ainsi que ceux de Gail Martin (Martin, 1981). Les auteurs ont pu démontrer la prolifération indifférenciée et illimitée *in vitro* de ces lignées de ESC issues d'embryon de souris, sans apparition d'anomalies caryotypiques. Chez l'homme, il faudra attendre dix-sept ans pour que James Thomson, accompagné de Joseph Itskovitz-Eldor et de Benjamin Reubinoff, parviennent à réaliser le même exploit à partir de la MCI d'un blastocyste humain préimplantatoire (Thomson et al., 1998). L'établissement de ces premières lignées humaines (hESC) a ensuite donné l'impulsion à la dérivation de plus d'un millier d'autres lignées d'origine humaine dans les laboratoires du monde entier (Löser et al., 2010). Pour leurs travaux, Evans, Kaufman et Martin ont obtenu le prix Nobel de médecine en 2007.

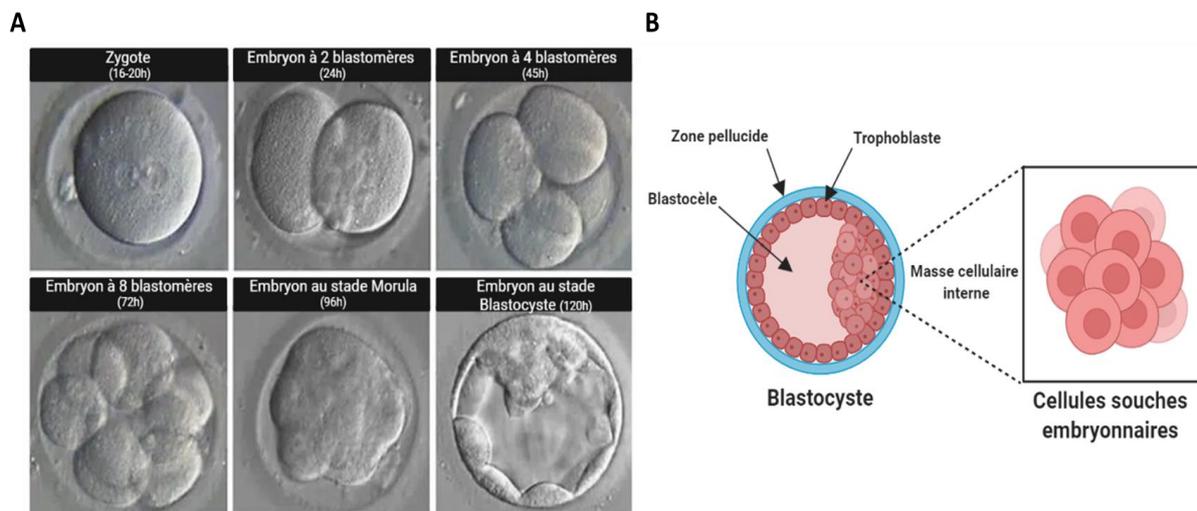


Figure 28. Description de la première semaine du développement embryonnaire humain.

(A) Cinétique de développement d'un embryon humain *in vitro*. (B) Représentation schématique de la structure d'un blastocyste. Schéma adapté du site internet de l'université de Lausanne et créé sur le site BioRender.

Les hESC sont issues d'embryons âgés de 5 à 7 jours après une FIV, correspondant au stade blastocyste du développement embryonnaire (Figure 28). Au début de l'embryogénèse humaine, l'œuf fécondé ou zygote va se diviser pour atteindre le stade morula au bout de quatre jours. Les cellules sont alors qualifiées de totipotentes car elles peuvent donner naissance à tous les types cellulaires de l'organisme, y compris les annexes extra-embryonnaires. Au cours des divisions suivantes, la masse cellulaire, alors qualifiée de blastocyste, se resserre et génère une nouvelle répartition des cellules. Les cellules périphériques se répartissent en une couche nommée trophoblaste qui entoure toute la surface de l'œuf fécondé et donnera naissance à la plupart des structures extra-embryonnaires (placenta, chorion, cordon ombilical), tandis que les cellules les plus internes forment une structure plus compacte appelée MCI. Alors que le trophoblaste commence à former une

structure de soutien spécialisée, la trentaine de cellules de la MCI restent indifférenciées, pluripotentes et prolifératives (Sukoyan et al., 1993). C'est donc à partir de la MCI du blastocyste, et plus particulièrement de l'épiblaste, que les premières hESC ont été isolées. En effet, la MCI est composée de deux structures : l'hypoblaste qui donnera naissance à l'endoderme pariétal (ou sac vitellin) et l'épiblaste, situé plus en profondeur, qui est constitué de cellules pluripotentes. Par la suite, une autre étude a proposé de générer des lignées de hESC sans détruire l'embryon *ex utero*, en prélevant une seule cellule au stade où l'embryon est formé de huit à dix cellules (Chung et al., 2006).

2.1.2. Le diagnostic préimplantatoire

Les lignées de hESC sont dérivées à partir d'embryons surnuméraires générés par FIV dans le cadre d'un projet parental abandonné. Cette démarche est encadrée légalement par la signature d'un consentement libre et éclairé des parents biologiques qui cèdent les embryons non utilisés à la recherche médicale. La majorité des lignées de hESC saines sont le plus souvent commercialisées par des laboratoires de recherche, évitant ainsi la destruction supplémentaire d'embryons. Les lignées de hESC pathologiques sont, pour leur part, générées à partir d'embryons porteurs d'une anomalie génétique ou chromosomique identifiée dans le cadre d'un DPI pratiqué suite à la FIV (Mateizel et al., 2006). Autorisé en France depuis 1999, le DPI est une pratique très encadrée, réservée aux couples qui, du fait de leur situation familiale, ont une forte probabilité de transmettre à l'enfant une maladie génétique particulièrement grave et incurable au moment du diagnostic (article L.2131-4 Code de la Santé Publique). Cette approche permet cependant la génération d'un nombre limité de lignées de hESC porteuses de pathologies d'origine génétique. Bien que l'on dénombre entre 6000 et 8000 maladies génétiques différentes (source : Orphanet), le DPI n'est autorisé que pour environ 20% (~366 maladies selon l'Agence de la biomédecine 2020). Au total, se sont approximativement 150 lignées de hESC pathologiques qui ont été dérivées au niveau international, ce qui représente une cinquantaine de maladies génétiques (Ilic and Ogilvie, 2017).

2.1.3. Les lois de bioéthique et les réglementations relatives à l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines : cadre législatif français

Malgré les opportunités de recherche et l'espoir de nouvelles thérapies qu'offrent les hESC, leur utilisation a toujours soulevé des questions éthiques et leur manipulation en France est régie depuis 1994 par les lois de Bioéthique. Initialement interdite dans la 1^{ère} loi de bioéthique, la recherche sur l'embryon et les hESC a connu une évolution législative lente mais régulière en fonction des avancées scientifiques, notamment à l'international où la réglementation de la recherche sur les hESC peut être plus permissive. Les premières dérivations de hESC et les études démontrant l'intérêt de ces cellules pour des applications biomédicales ont ainsi amené à la révision de la loi de bioéthique en 2004 qui autorisa leur utilisation dans certaines conditions strictes. La recherche sur les hESC dépendait ainsi d'une dérogation délivrée par l'Agence de la biomédecine pour une durée de 5 ans. Pour pouvoir bénéficier de cette

déroger et travailler sur les hESC, comme à l-STEM, les projets de recherche devaient être "susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition de ne pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques" (Loi de Bioéthique, 6 août 2004). Par la suite, la loi de bioéthique a successivement été révisée en 2011 et 2013 aboutissant à un assouplissement du système d'interdiction avec dérogation qui a été remplacé par un système d'autorisation encadré par l'Agence de la biomédecine. Bien que plus souple, cette nouvelle législation nécessitait que les programmes de recherche respectent quatre conditions : la pertinence du projet scientifique, la finalité médicale de la recherche, l'absence de techniques alternatives et le respect des principes éthiques. En 2018, les états généraux de la bioéthique ont abouti à la promulgation de la quatrième loi de bioéthique du 02 août 2021 qui distingue désormais le régime juridique des recherches sur l'embryon de celles menées sur les hESC. Le texte maintient le système actuel d'autorisation des recherches sur l'embryon mais simplifie celui des hESC en instituant un régime déclaratif auprès de l'Agence de la biomédecine.

2.2. Les cellules souches induites à la pluripotence

2.2.1. L'acquisition de l'identité cellulaire : un processus réversible

Le potentiel de pluripotence des cellules souches suscite un intérêt scientifique tant pour la recherche fondamentale que pour le développement thérapeutique. Or, il a été longtemps pensé que l'identité cellulaire est établie de manière unidirectionnelle au cours du développement embryonnaire, c'est-à-dire qu'une cellule évolue de façon irréversible d'un état immature (pluripotent) à un état mature (différencié), générant ainsi tous les types cellulaires de l'organisme. Ce concept a été illustré il y a plus de 50 ans par la métaphore de Conrad Waddington qui compare le processus de différenciation cellulaire à une balle qui descend du sommet de la montagne vers le fond d'une vallée (Figure 29). L'idée est que la balle atteint la vallée en empruntant des trajectoires différentes selon le relief de la montagne mais qu'une fois arrivée au fond de cette vallée elle ne peut plus en bouger. Cela illustre la perte progressive d'immaturité de la cellule au fur et à mesure qu'elle progresse dans sa voie de différenciation et acquiert son identité, et qu'une fois spécialisée elle est incapable de revenir à son état immature. Il était ainsi pensé qu'une cellule qui se spécialise perd l'information génétique non nécessaire à sa fonction. Il semblait en effet trop risqué qu'une cellule différenciée ait la capacité de réactiver de manière inappropriée des gènes spécifiques d'un autre type cellulaire. Pourtant, une série d'expériences marquantes ont montré ces dernières années que le destin cellulaire est finalement flexible et réversible. En effet, il est maintenant possible pour une cellule de passer d'un état différencié à un état pluripotent grâce à un processus dit de reprogrammation. D'un point de vue conceptuel, ce processus est décrit comme le passage de la balle d'une vallée à une autre en repassant par le sommet de la montagne (Figure 29). Trois méthodes de reprogrammation du génome d'une cellule différenciée en une cellule pluripotente ont ainsi été développées ces dernières années : le transfert nucléaire, la fusion cellulaire, et la transduction de facteurs de reprogrammation.

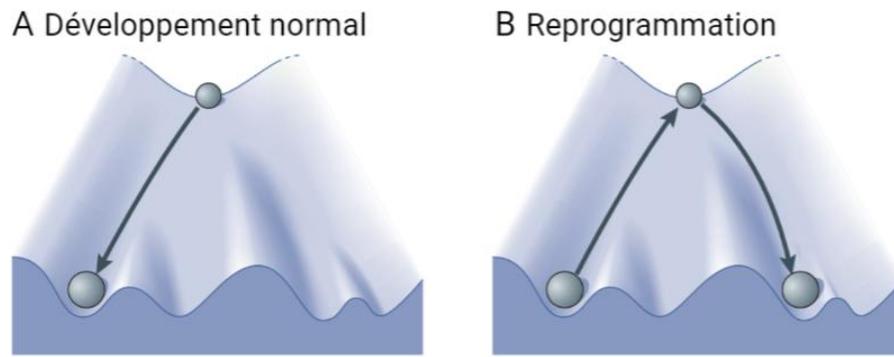


Figure 29. Acquisition de l'identité cellulaire.

Représentation schématique du modèle de Waddington. (A) Pendant un développement normal, une cellule pluripotente (représentée par une balle) dévale une montagne en empruntant des chemins différents. Selon la trajectoire empruntée, la cellule acquiert un destin tissulaire spécifique. (B) Une cellule différenciée, qui est reprogrammée à la pluripotence, est représentée par une balle remontant la montagne jusqu'au sommet. De là, la cellule réacquiert une capacité de pluripotence lui permettant de se différencier à nouveau vers un autre type cellulaire spécialisé. Source (Ladewig et al., 2013).

2.2.2. Les méthodes de reprogrammation

Le transfert nucléaire

Le transfert nucléaire a été la première méthode proposée pour reprogrammer une cellule spécialisée vers un stade pluripotent. Cette technique consiste à transférer le noyau d'une cellule somatique donneuse dans un ovocyte receveur énucléé (Figure 30). Quelques heures après le transfert nucléaire, la cellule germinale hybride se développe pour former un blastocyste. L'embryon généré peut ensuite être implanté *in utero* pour donner naissance à un organisme génétiquement identique à la cellule donneuse de départ (clonage reproductif) ou peut être utilisé pour récupérer les ESC (clonage thérapeutique).

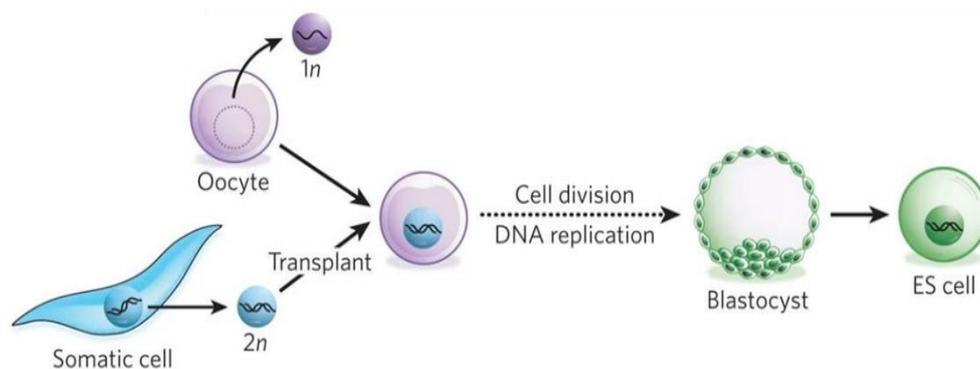


Figure 30. La reprogrammation par transfert nucléaire.

Dans cette approche, le noyau d'une cellule somatique (diploïde, $2n$) est transplanté dans un ovocyte énucléé. Dans l'environnement de l'ovocyte, le noyau de la cellule somatique est reprogrammé de façon à ce que les cellules qui en sont issues soient pluripotentes. À partir de cet ovocyte, un blastocyste est généré et des lignées de cellules souches embryonnaires (ES) peuvent être dérivées en culture. Si on laisse le développement se poursuivre jusqu'à son terme, un organisme entier cloné est généré. Source (Yamanaka and Blau, 2010).

Conceptualisé dès 1938 par Hans Spemann, le transfert nucléaire a été réalisé pour la première fois en 1952 par Thomas King et Robert Briggs chez des amphibiens (Briggs and King, 1952) en transférant le noyau de cellules embryonnaires à un stade précoce (blastocyste). Cette

technique de transplantation nucléaire a ensuite été développée en 1962 par l'équipe de John Gurdon (Gurdon, 1962) qui parvint à cloner le tout premier animal en transférant cette fois-ci le noyau d'une cellule somatique de xénope dans un ovocyte énucléé, démontrant pour la première fois que des cellules somatiques adultes pouvaient être reprogrammées en CSP par des facteurs présents dans le cytoplasme de l'ovocyte. Il a ainsi pu être établi que les cellules ne perdent pas d'informations au cours de leur différenciation mais que les gènes inutilisés sont réduits au silence et peuvent être réactivés en cas d'exposition à des stimuli appropriés. Plusieurs décennies plus tard, la technique de transfert nucléaire somatique a été transposée à une vingtaine d'espèces de mammifères dont le mouton avec la naissance de la célèbre brebis Dolly en 1996 (Wilmut et al., 1997), et plus récemment au clonage des premiers primates Zhong Zhong et Hua Hua (Z. Liu et al., 2018). Chez l'homme la démonstration du transfert nucléaire a fait l'objet de communications contradictoires et controversées. Après un rapport de 2004 ayant frauduleusement revendiqué la génération de hESC (Hwang et al., 2004), d'autres groupes ont réussi à générer ces cellules (Tachibana et al., 2013). Néanmoins l'utilisation de cette technique sur des cellules humaines se heurte à des questions éthiques majeures puisqu'elle pourrait mener à des dérives en matière de clonage humain. En France, elle est interdite par l'article 25 de la loi de bioéthique du 6 août 2004.

La fusion cellulaire

Une autre stratégie de reprogrammation des cellules somatiques repose sur leur fusion avec des ESC (Figure 31). La cellule hybride alors obtenue est appelée « hétérocaryon » et contient deux noyaux séparés dans le cytoplasme commun. Après deux à trois jours, les noyaux diploïdes fusionnent et produisent un hybride cellulaire qui contient un seul noyau tétraploïde capable de reprendre la division cellulaire. Cependant, malgré les démonstrations de plasticité des cellules somatiques, par l'acquisition de caractéristiques du partenaire pluripotent, cette technique de fusion cellulaire n'a aucune application thérapeutique de par la tétraploïdie des cellules générées.

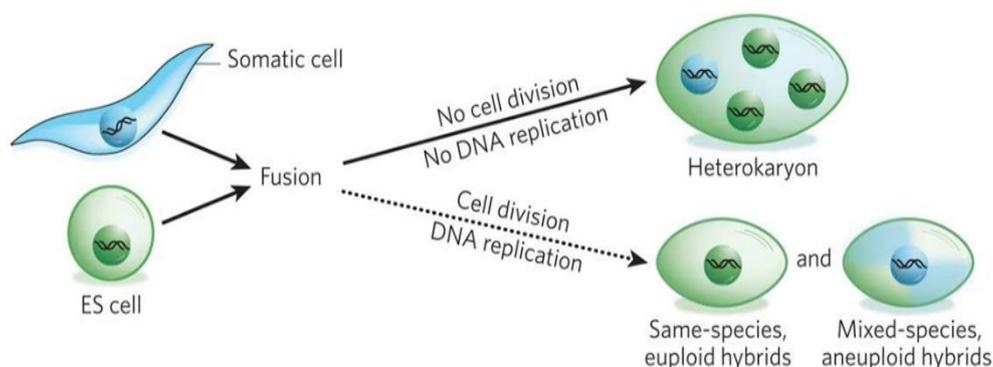


Figure 31. La reprogrammation par fusion cellulaire.

Dans cette approche, deux types de cellules sont combinés pour former une seule entité. Si les cellules fusionnées prolifèrent, elles deviendront des hybrides. Leur caryotype restera euploïde (c'est-à-dire qu'elles auront des jeux de chromosomes équilibrés) si les cellules proviennent de la même espèce; en revanche, si elles proviennent d'espèces différentes, les hybrides seront aneuploïdes, car des chromosomes seront perdus et réarrangés. Les hétérocaryons, en revanche, ont une durée de vie courte et ne se divisent pas. Par conséquent, ils sont multinucléés : les noyaux des cellules d'origine restent intacts et distincts, et l'influence d'un génotype sur un autre peut être étudiée dans un système stable dans lequel aucun chromosome n'est perdu. (Yamanaka and Blau, 2010).

La transduction de facteurs de reprogrammation

La dernière méthode de reprogrammation a été découverte en 2006 par l'équipe du professeur Shinya Yamanaka en partant du postulat que les facteurs ayant une fonction importante dans le maintien de l'identité des ESC pourraient également avoir un rôle central dans l'induction de la pluripotence dans les cellules somatiques (Figure 32). Dans son article, Shinya Yamanaka décrit comment obtenir, à partir de fibroblastes embryonnaires de souris, une population cellulaire similaire aux ESC via la surexpression de certains facteurs de transcriptions préalablement sélectionnés pour leur rôle dans le maintien de la pluripotence ou dans la prolifération cellulaire (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ainsi, parmi les 24 facteurs de transcription testés, la combinaison des 4 facteurs (OKSM) OCT3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4), KLF4 (Krüppel-like factor 4), SOX2 (sex determining region Y-box 2), et C-MYC (Myelocytomatosis oncogene), a été identifiée comme optimale pour reprogrammer des fibroblastes murins adultes en une population cellulaire pluripotente. Ces cellules, appelées iPSC (pour induced pluripotent stem cells), présentent une morphologie et des capacités d'auto-renouveau et de pluripotence comparables aux ESC, ainsi qu'une reprogrammation épigénétique de l'état somatique à l'état souche (Maherali et al., 2007).

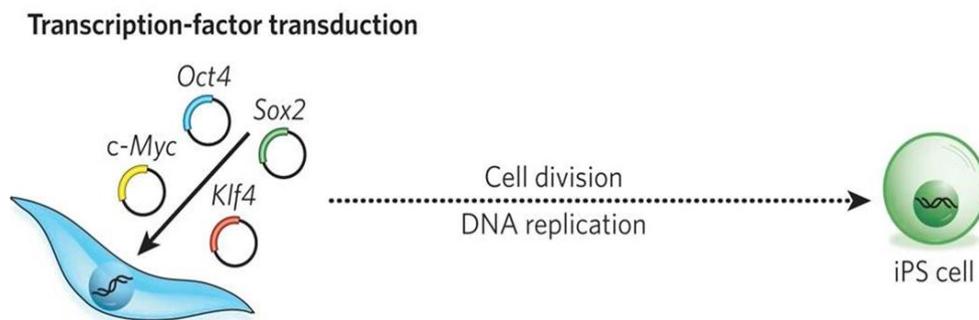


Figure 32. La reprogrammation par transduction de facteurs de reprogrammation.

Cette approche peut être utilisée pour obtenir des cellules souches induites à la pluripotence (iPS) qui ont des propriétés similaires à celles des cellules souches embryonnaires. Ces cellules peuvent être générées par l'introduction de quatre gènes (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc) à l'aide de rétrovirus. Source (Yamanaka and Blau, 2010).

L'année suivante, la même équipe a été en mesure de transposer ce modèle à l'homme et de générer la première lignée de iPSC humaines (hiPSC) en utilisant la même combinaison de facteurs (Takahashi et al., 2007), ouvrant ainsi la possibilité de générer des CSP humaines spécifiques à un patient ou une pathologie. La même année, l'équipe de James Thomson a démontré qu'une combinaison différente de facteurs de transcription, composée d'OCT4, SOX2, NANOG et LIN28, était également suffisante pour reprogrammer des cellules somatiques humaines sans anomalies chromosomiques apparentes (Yu et al., 2007). L'avantage de ce cocktail repose principalement sur l'absence de l'oncogène C-MYC qui a été décrit comme un inducteur d'apoptose et de différenciation des ESC d'origine humaine (Sumi et al., 2007). A la suite de ces travaux princeps, les protocoles ont été optimisés grâce aux études de caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans la reprogrammation. Il a été démontré par exemple que seuls OCT4 et KLF4 étaient indispensables à la reprogrammation, alors que SOX2 et C-MYC ne permettent que d'en améliorer le rendement *in vitro* (Park et al.,

2008b). Ces résultats ont été confirmés la même année par les équipes de Yamanaka et Jaenisch en démontrant la possibilité de générer des lignées de iPSC avec seulement 3 des 4 facteurs OKSM de Yamanaka ; en excluant l'oncogène C-MYC qui entravait les applications cliniques (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008).

Ces travaux sur la pluripotence et la reprogrammation de cellules somatiques en CSP ont été récompensés en 2012 par l'attribution du Prix Nobel de médecine à Shinya Yamanaka, conjointement avec John Gurdon pour ses travaux précurseurs menant à l'avènement du clonage. Les recherches de Yamanaka ont également ouvert la voie à d'autres pistes de reprogrammation, telle que la transdifférenciation identifiée dès 1979 (Davis et al., 1987). L'idée étant que l'expression ectopique de facteurs de transcription spécifiques pourrait également convertir une cellule différenciée en une cellule d'un autre lignage, sans nécessairement repasser par un stade pluripotent. D'un point de vue conceptuel, ce processus est décrit par la métaphore de Waddington comme le passage de la boule d'une vallée à une autre, sans repasser par le sommet.

Depuis leur première description, les iPSC sont apparues comme extrêmement prometteuses pour diverses applications biomédicales telles que la thérapie cellulaire personnalisée ou la modélisation pathologique combinée à l'identification de nouveaux composés thérapeutiques. Cependant, leur génération a nécessité de relever quelques défis comme l'amélioration des méthodes de vectorisation, l'augmentation de l'efficacité de reprogrammation ou la diversification des types de cellules somatiques à reprogrammer afin d'obtenir une ressource biologique plus sûre et adaptée à l'application souhaitée.

2.2.3. L'évolution des méthodes de vectorisation

Différentes méthodes de vectorisation ont été utilisées pour introduire les facteurs de reprogrammation et induire la pluripotence dans les cellules somatiques. Ces approches peuvent être catégorisées en méthodes intégratives, qui impliquent l'insertion de matériel génétique exogène dans le génome des cellules de départ, et en méthodes non intégratives (Figure 33).

Les premiers vecteurs décrits pour introduire les facteurs de reprogrammation dans les cellules somatiques sont les vecteurs viraux de type intégratif. Les rétrovirus ont été utilisés dans les études princeps de Shinya Yamanaka pour transporter les quatre facteurs OKSM tandis que les lentivirus ont été sélectionnés dans les recherches de James Thomson. Alors que les rétrovirus peuvent uniquement s'insérer dans les cellules en division, les lentivirus ont la capacité d'infecter à la fois les cellules qui prolifèrent et les cellules quiescentes, permettant ainsi une reprogrammation plus efficace pour la génération des iPSC. Malgré l'efficacité des vecteurs intégratifs, leurs intégrations multiples dans le génome des cellules hôtes représentent un risque de mutagenèse insertionnelle (Baum, 2007). De ce fait, le nombre de virus nécessaires à la reprogrammation des cellules somatiques a été réduit avec l'utilisation de vecteurs lentiviraux polycistroniques (Carey et al., 2009). Ces constructions permettent l'expression de tous les facteurs de reprogrammation dans un seul virus. Néanmoins, cette méthode

intégrative n'empêche pas les séquences transgéniques résiduelles dans le génome de l'hôte, ce qui peut entraîner des altérations imprévisibles du phénotype des iPSC ou de leurs dérivés, les rendant inadaptés, même pour des applications *in vitro*. Différentes méthodes innovantes ont donc tenté d'éliminer les transgènes insérés après la reprogrammation à l'aide de constructions de type transposon piggyBac (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009) ou des systèmes de recombinaison homologue fondés sur la technologie d'excision Cre-LoxP (Soldner et al., 2009). Malgré ces innovations, la reprogrammation cellulaire obtenue par des méthodes intégratives empêche l'application clinique des iPSC en raison du risque de tumorigénicité et d'instabilité génomique.

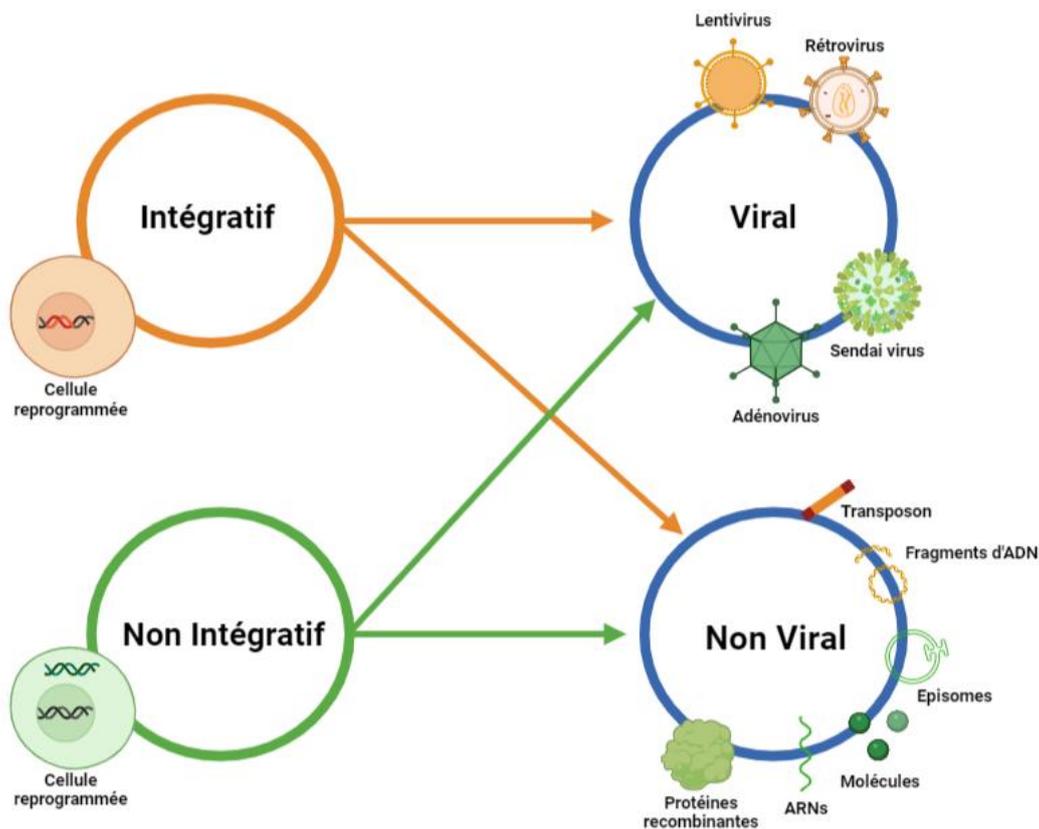


Figure 33. Evolution des méthodes de vectorisation pour la reprogrammation des cellules somatiques.

Les méthodes utilisées pour produire des iPSC peuvent être classées en quatre catégories selon leurs critères intégratif et viral. Les méthodes virales intégratives sont les lentivirus et les rétrovirus tandis que les méthodes non virales intégratives correspondent aux transposons et aux fragments d'ADN linéaires ou circulaires. En ce qui concerne les méthodes non intégratives, elles peuvent être virales avec les adénovirus ou le virus Sendai ; ou non virales avec l'ADN épisomal, les petites molécules, les ARNs ou les protéines recombinantes. Schéma adapté de (Gois Beghini et al., 2020) et créé sur le site BioRender.

Par conséquent, des méthodes alternatives non intégratives ont été proposées pour générer les iPSC, telles que les adénovirus (Stadtfield et al., 2008), les protéines recombinantes (Kim et al., 2009), les ARNs messagers (Warren et al., 2010) ou encore la surexpression de certains micro ARNs (Judson et al., 2009). Un autre système de reprogrammation cellulaire développé plus récemment est l'utilisation de composés chimiques. D'abord utilisés en complément des autres méthodes pour augmenter l'efficacité de reprogrammation (Huangfu et al., 2008), des combinaisons de molécules ont ensuite été identifiées pour remplacer les différents transgènes (Hou et al., 2013). Aujourd'hui, bien que les techniques utilisées soient très variées, les

méthodes privilégiées sont les approches non intégratives basées sur l'utilisation d'épisomes (Yu et al., 2009) ou celle du virus à ARN de Sendai (Fusaki et al., 2009).

2.2.4. Les lois de bioéthique et les réglementations relatives à l'utilisation des cellules souches humaines induites à la pluripotence : cadre législatif français

Jusqu'à la promulgation de la dernière loi de bioéthique le 02 août 2021, les hiPSC n'étaient pas légalement définies. Les hiPSC étant issues de cellules somatiques de patients, le cadre législatif qui s'appliquait jusqu'à présent était le même que ceux relatifs à l'utilisation de cellules d'origine humaine et à la production d'organismes génétiquement modifiés, c'est-à-dire un régime uniquement déclaratif. La loi de 2021 relative à la bioéthique a introduit un régime d'encadrement pour certaines recherches recourant à des hiPSC. Les programmes de recherche ayant pour objet « la différenciation des iPSC en gamètes, l'obtention de modèles de développement embryonnaire *in vitro* ou l'insertion de ces cellules dans un embryon animal dans le but de son transfert chez la femelle sont soumis à déclaration auprès de l'Agence de la biomédecine préalablement à leur mise en œuvre ». Comme pour le régime déclaratif des protocoles de recherche portant sur les hESC, le directeur général de l'Agence de la biomédecine peut s'opposer à la réalisation d'une expérimentation si celle-ci, ou ses conditions de mise en œuvre, ne respectent pas les principes fondamentaux de respect du corps humain (articles 16 à 16-8 du code civil) ou les principes éthiques régissant la recherche sur l'embryon ainsi que le don et l'utilisation des éléments et produits du corps humain. L'utilisation des hiPSC pour la recherche clinique fait cependant l'objet d'un encadrement plus contraignant, qui est celui des recherches biomédicales, ou « recherches organisées et pratiquées sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales ».

3. Les caractéristiques des cellules souches pluripotentes humaines

L'enjeu principal de la culture des CSP humaines, que ce soit les hESC ou les hiPSC, repose sur la conservation de leurs deux propriétés cardinales, à savoir l'auto-renouvellement et la pluripotence, tout en préservant leur intégrité génomique (Henry et al., 2019). Pour cela, de nombreuses études ont été consacrées à la compréhension des mécanismes impliqués dans le maintien de la pluripotence des cellules et dans leur différenciation vers un type cellulaire ou un tissu en particulier. Ainsi, des réseaux transcriptionnels, incluant une série de facteurs de transcription et des voies de signalisation spécifiques, ont été mis en évidence ces dernières années.

3.1. Les facteurs clés de la pluripotence

Les facteurs de transcription clés régulant les capacités de pluripotence des cellules souches, tant chez la souris que chez l'Homme, forment le « réseau de régulation transcriptionnelle de la pluripotence » (ou core transcriptional regulatory circuitry) (Boyer et al., 2005) (Figure 34).

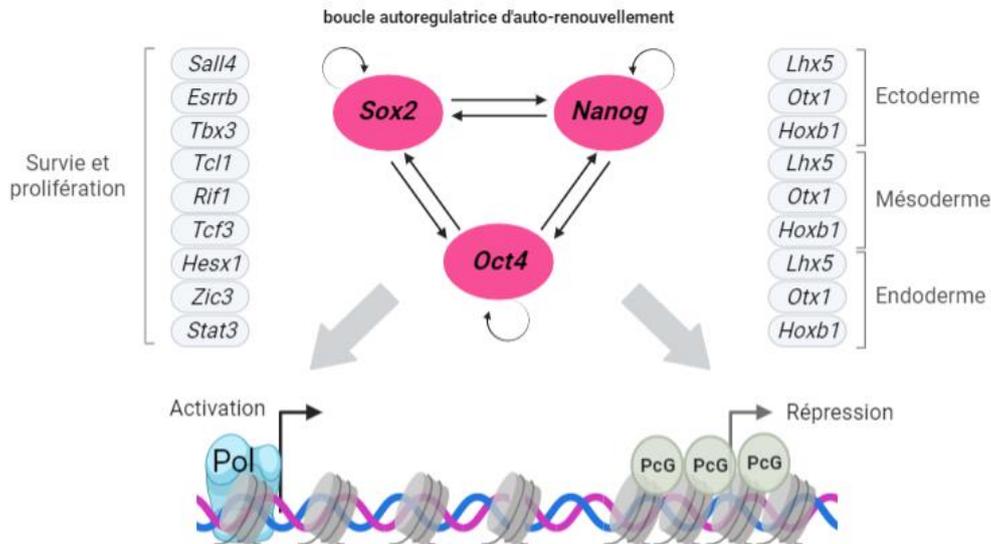


Figure 34. Le réseau de régulation transcriptionnelle de la pluripotence.

Le réseau de régulation transcriptionnelle de la pluripotence forme une boucle autorégulatrice ascendante qui active positivement l'ARN polymérase II pour initier la transcription des gènes de maintien de l'auto renouvellement et qui réprime négativement les gènes favorisant la différenciation cellulaire par l'action des protéines de la famille Polycomb (PcG) pour modifier les structures chromosomiques. Schéma adapté de (Han and Yoon, 2011) et créé sur le site BioRender.

Ce réseau est composé des trois facteurs *OCT4*, *NANOG* et *SOX2*, qui régulent de manière directe la transcription de nombreux autres gènes importants dans la physiologie des CSP. Ils activent l'expression de gènes spécifiques pour la survie et la prolifération des CSP, répriment des gènes cibles impliqués dans le processus de différenciation et régulent leur propre expression par des boucles de rétrocontrôle. La régulation de la pluripotence fait également intervenir un autre réseau interconnecté avec les trois facteurs. Ce réseau est composé de cofacteurs transcriptionnels, de régulateurs épigénétiques comme les microARNs (Marson et al., 2008) ou de modulateurs de la chromatine incluant des protéines du groupe polycomb et trithorax (Lee et al., 2006).

OCT4 a été le premier facteur de transcription identifié (Okamoto et al., 1990; Schöler et al., 1989). Son expression est nécessaire pour la mise en place de la pluripotence et de la formation de la MCI dans l'embryon précoce (Nichols et al., 1998), ainsi que pour la dérivation et le maintien des lignées de ESC (Pesce et al., 1998). Les études sur les iPSC ont ensuite montré que OCT4 était le seul facteur de transcription qui ne pouvait pas être remplacé par d'autres membres de la même famille de protéines dans le processus de reprogrammation des cellules somatiques. Les travaux réalisés par l'équipe d'Austin Smith en 2000 ont montré qu'un niveau d'expression précis de OCT4 permet de maintenir la pluripotence. Sa surexpression induit une différenciation des cellules en endoderme primitif et en mésoderme, tandis que sa répression entraîne une différenciation vers le trophoctoderme (Nishimoto et al., 1999; Niwa et al., 2000).

SOX2 est un facteur de transcription essentiel pour l'auto renouvellement des CSP. Il a été identifié comme nécessaire à la mise en place des cellules de la MCI (Avilion et al., 2003). Comme pour son partenaire OCT4 avec qui il s'hétérodimérise pour réguler des gènes cibles

en aval (Botquin et al., 1998), l'expression de SOX2 dans les ESC doit être maintenue dans une fourchette critique. Une expression en dehors de cette plage entraîne la différenciation des cellules (Fong et al., 2008; Kopp et al., 2008).

NANOG fonctionne de concert avec les deux autres facteurs de transcriptions, OCT4 et SOX2, pour établir l'identité des CSP. Son expression, similaire à celle de OCT4, diminue rapidement au fur et à mesure que les ESC se différencient (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Cependant, contrairement à OCT4, sa surexpression dans les ESC de souris permet leur auto-renouvellement (Chambers et al., 2003) et sa diminution dans les ESC murines et humaines prédispose à la différenciation vers les lignages extra embryonnaires (Chambers et al., 2003; Hyslop et al., 2005; Mitsui et al., 2003). La nécessité de Nanog pour le maintien de la pluripotence reste cependant controversée puisque les ESC conservent leur capacité d'auto-renouvellement en son absence (Chambers et al., 2007). Nanog a également été démontré comme non essentiel pour la reprogrammation des iPSC dans des conditions de culture optimisées (Schwarz et al., 2014). Ces observations apparemment contradictoires soulignent ainsi le manque de connaissances concernant les mécanismes reliant la signalisation extracellulaire et le réseau de régulation transcriptionnelle de la pluripotence.

3.2. Les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la pluripotence

Afin de maintenir la pluripotence des CSP en culture, des facteurs de croissance extrinsèques doivent être apportés. Ces facteurs agissent, d'une part, sur l'activation de voies de signalisation régulant le réseau de régulation transcriptionnelle de la pluripotence et, d'autre part, sur l'inhibition des voies de différenciation. Les voies de signalisation nécessaires au maintien de la pluripotence des CSP étant distinctes entre les espèces, je n'aborderai dans la suite de ce manuscrit que celles identifiées comme importantes pour la culture des CSP humaines (Figure 35).

La voie TGF β /Activin/Nodal

Les membres de la famille du TGF β (pour Transforming growth factor β), comme l'Activine A et Nodal, ont été décrits comme nécessaires pour le maintien de l'état indifférencié des hESC (Beattie et al., 2005; Xiao et al., 2006) et sont utilisés pour la culture *in vitro* des cellules pluripotentes. Il a ainsi été montré qu'un inhibiteur de la voie Activin/Nodal, le SB431542, pouvait induire la différenciation des hESC alors, qu'au contraire, l'ajout d'Activin et de Nodal en combinaison avec du bFGF (Basic fibroblast growth factor) pouvait en prévenir la différenciation (Vallier et al., 2005). D'autre part, il a été mis en évidence un lien direct entre la voie Activin/Nodal et la régulation transcriptionnelle de Nanog (Bertero et al., 2015; Xu et al., 2008). Les Smad2/3, effecteurs directs de la signalisation Activin/Nodal, se lient et contrôlent directement l'activité du gène Nanog dans les hESC (Vallier et al., 2009). Par conséquent, l'inhibition de la signalisation Activin/Nodal entraîne une perte de l'expression de Nanog tout en induisant une différenciation vers le neuroectoderme, soulignant ainsi le rôle de cette voie dans le maintien du caractère pluripotent des hESC et hiPSC. A l'inverse, Nanog interagit

directement avec les protéines Smad2/3 pour limiter leur activité transcriptionnelle, ce qui est crucial pour le choix du destin cellulaire entre la pluripotence et la différenciation des cellules souches.

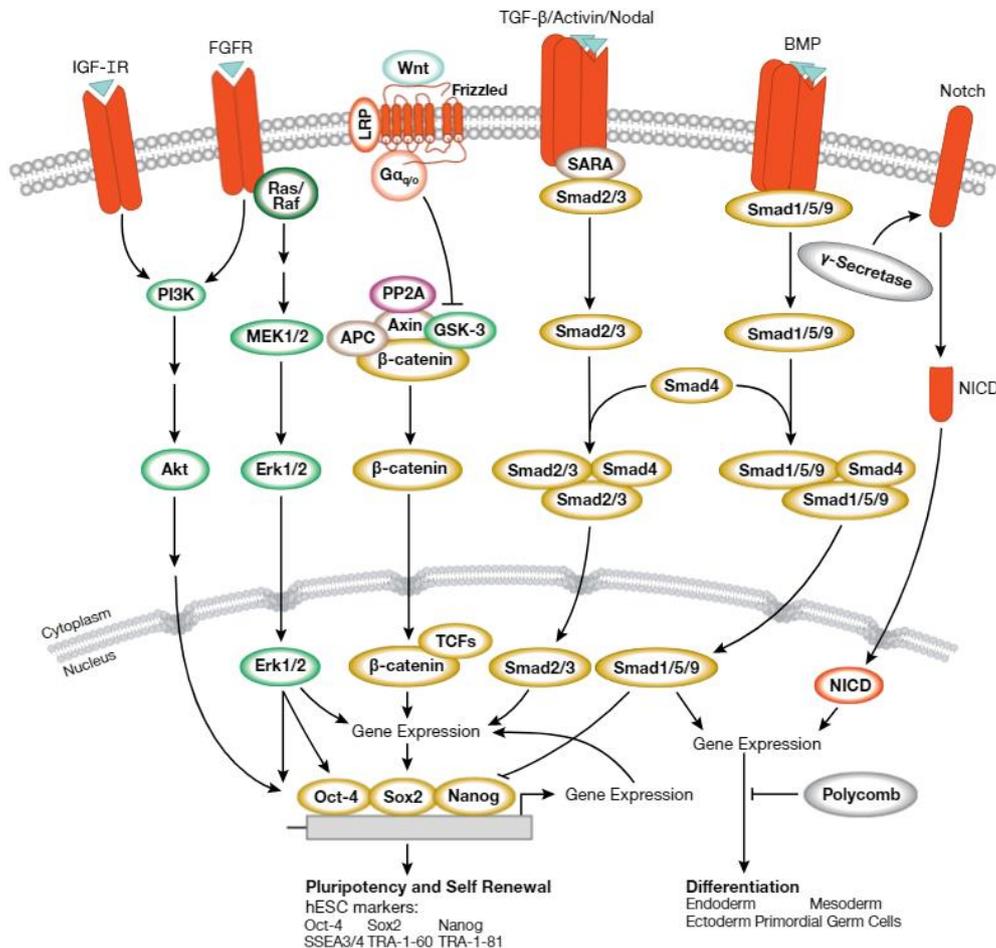


Figure 35. Les voies de signalisation impliquées dans le maintien de la pluripotence ou de la différenciation des cellules souches pluripotentes.

Les propriétés cardinales des cellules souches pluripotentes, qui leur permettent de se transformer en n'importe quel type de cellule de l'organisme et de se diviser continuellement à l'état indifférencié, sont régulées par un certain nombre de voies de signalisation. Source : <https://www.cellsignal.com/pathways/pluripotency-and-differentiation-pathway>.

La voie Wnt/β-caténine

Le rôle exact de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans la pluripotence des cellules souches humaines reste une question ouverte en raison de publications contradictoires. Certaines études suggèrent un rôle de la voie Wnt dans l'auto-renouveau des CSP humaines (Sato et al., 2004) par l'inhibition de GSK3β qui permet ainsi à la β-caténine, un coactivateur de la transcription des gènes OCT4 et NANOG, de ne pas être dégradée. A l'inverse, une autre équipe (Singh et al., 2012) a rapporté que la voie de signalisation canonique de Wnt n'est pas requise pour le maintien de la pluripotence dans les hESC et, sous certaines conditions, une activation importante de cette voie pourrait induire leur différenciation vers le mésoderme. En effet, une surexpression de la β-caténine à court terme soutiendrait l'auto-renouveau des hESC alors que sur un temps plus long la forte concentration de β-caténine

libre dans le cytoplasme entrainerait la différenciation des cellules (Huang et al., 2015).

La voie des FGFs

La voie de signalisation du FGF (pour Fibroblast growth factor) maintient également la pluripotence des hESC. Le FGF2, présent dans tous les milieux de culture, joue un rôle essentiel dans le maintien des capacités des cellules souches par l'inhibition de la voie BMP ou l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK, PLC γ et PI3K/AKT.

La voie BMP joue un rôle d'inhibiteur de pluripotence via l'action des SMAD1/5/8-9 qui répriment l'expression de Nanog (Suwinska and Ciemerych, 2011). L'inhibition de cette voie par le FGF2 empêche la phosphorylation des SMAD1/5/8-9 mais favorise celle des SMAD2/3, permettant ainsi la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le maintien de l'état indifférencié des CSP (James et al., 2005; Vallier et al., 2009).

La voie MAPK/ERK, activée par le FGF2, est généralement considérée comme favorisant l'auto-renouveau des hESC (Armstrong et al., 2006). Cependant, une autre équipe a mis en évidence par la suite un rôle de cette voie dans la différenciation des hESC (Singh et al., 2012). Des études supplémentaires permettraient d'établir le rôle de cette voie dans la balance pluripotence/différenciation des hESC.

Le FGF2 active également la voie de signalisation PI3K/AKT. Une fois activée, celle-ci module le niveau d'expression des SMAD2/3 de la voie Activin/Nodal et inhibe les voies MAPK/ERK et WNT/ β -caténine afin de maintenir une activité de GSK3 β , permettant ainsi de maintenir un état pluripotent des cellules souches par la transcription de Nanog. A l'inverse, lorsque la voie PI3K/AKT n'est pas activée, la voie Activin-SMAD2/3 est renforcée et les voies MAPK/ERK et WNT/ β -caténine ne sont plus inhibées. Les SMAD2/3, couplés à l'activité importante de β -caténine, favorisent alors l'activation de marqueurs du mésoderme.

Comme nous venons brièvement de l'aborder, la conservation des deux propriétés majeures des CSP, l'auto-renouveau et la pluripotence, nécessite la mise en place d'une balance finement régulée entre l'état pluripotent et l'état différencié. Bien que de nombreuses études se soient intéressées aux voies régulant le passage d'un état à l'autre, le mécanisme général de coordination des voies de signalisation intracellulaires dans les cellules pluripotentes humaines reste à élucider.

3.3. Le potentiel de différenciation des cellules souches pluripotentes

L'avancée de nos connaissances sur les signaux extracellulaires qui contrôlent la machinerie transcriptionnelle impliquée dans la pluripotence ainsi que des voies de signalisation activées pendant l'embryogénèse ont permis le développement d'une multitude de protocoles de différenciation des CSP vers un type cellulaire d'intérêt. Ces protocoles reposent soit sur une différenciation guidée à l'aide de petites molécules et cytokines jouant sur des voies de signalisation régulant la différenciation cellulaire, soit sur des systèmes de surexpression de facteurs de transcription pour activer un programme génétique spécifique à un type cellulaire.

3.3.1. La différenciation guidée

La différenciation guidée consiste à induire *in vitro* la différenciation des CSP en suivant l'ontogénèse embryonnaire. Les cellules sont traitées de façon séquentielle avec une concentration et une durée de traitement contrôlées de cytokines et de petites molécules identifiées sur la base de nos connaissances en biologie du développement (Figure 36).

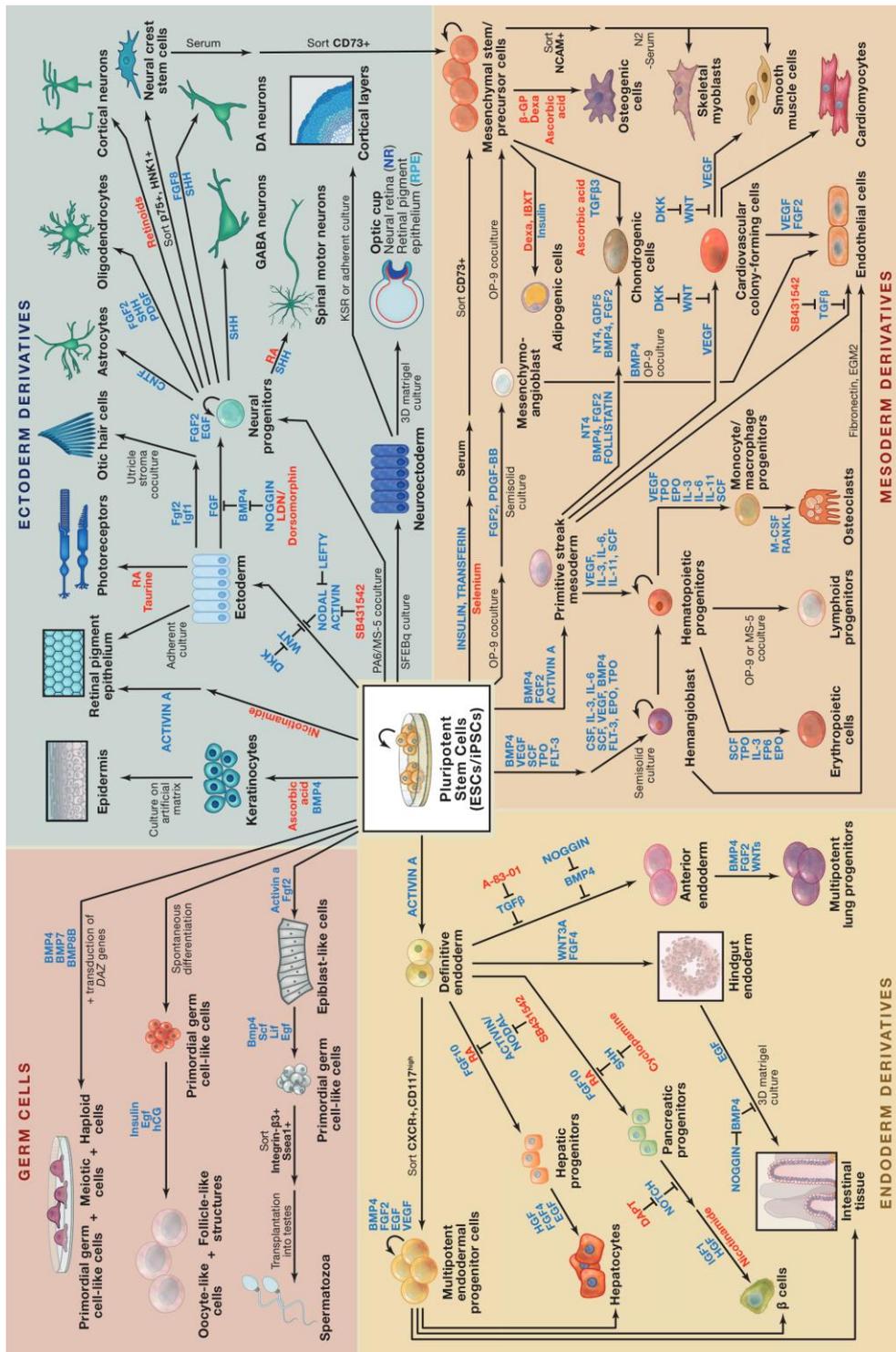


Figure 36. La différenciation guidée des cellules souches pluripotentes

Les facteurs de croissance et de différenciation clés pour chaque voie sont indiqués en bleu et les petites molécules le sont en rouge. Source (Williams et al., 2012).

Ainsi, pour diriger les CSP vers un type cellulaire en particulier, des voies de signalisation particulières sont modulées pour engager spécifiquement la différenciation des cellules vers l'un des trois feuilletts embryonnaires (Irion et al., 2008):

- l'ectoderme : il donnera l'épiderme, le système nerveux et les dérivés des crêtes neurales à l'origine de nombreux lignages (système nerveux périphérique, mélanocytes, ..) ;
- le mésoderme : il donnera tout ce qui se trouve entre l'épiderme et l'épithélium du tube digestif, c'est-à-dire le tissu conjonctif, l'appareil locomoteur (muscle, squelette), l'appareil cardio-vasculaire (cœur, vaisseaux et sang), l'appareil uro-génital ;
- l'endoderme : il donnera l'épithélium du tube digestif, l'arbre trachéo-bronchopulmonaire ainsi que les glandes annexes du tube digestif et la thyroïde.

Dans le cas où les molécules ciblant la voie de différenciation souhaitée ne sont pas connues, des approches de criblage chimique peuvent être utilisées afin d'identifier celles pouvant produire l'effet souhaité.

Malgré la tentative d'imiter fidèlement le développement *in vivo*, ces approches présentent plusieurs limitations. Premièrement, les protocoles de différenciation prennent du temps selon le type cellulaire relevant. Par exemple, la différenciation neuronale prend généralement entre quatre et six semaines et la maturation fonctionnelle plusieurs autres semaines selon les sous types neuronaux. La deuxième limite est l'hétérogénéité de la population cellulaire obtenue après différenciation. Toutefois cette limite peut être détournée par des protocoles de plus en plus optimisés faisant appel à une étape supplémentaire de purification par tri cellulaire ou sélection génétique.

3.3.2. La surexpression de facteurs de transcription

Les systèmes de surexpression ont pour objectif d'induire l'expression de facteurs de transcription liés aux stades de développement tardifs afin de contourner les processus précoces et de produire rapidement des cultures cellulaires relativement homogènes et fonctionnellement matures à partir de CSP (Figure 37).

Des travaux de recherche ont en effet montré que la reprogrammation du destin cellulaire par l'expression forcée de facteurs de transcription uniques (Chanda et al., 2014) ou multiples (Takahashi and Yamanaka, 2006) était efficace. A titre d'exemple, des hiPSC ont été converties en cellules musculaires squelettiques par la surexpression de *MYOD1* (Goudenege et al., 2012). Cependant, cette approche nécessite de connaître le facteur ou la combinaison de facteurs de transcription nécessaire à l'obtention de chaque lignage cellulaire. De plus, même si les protocoles ne sont pas encore tous optimisés en terme d'efficacité ou de maturité fonctionnelle des cellules, il semblerait que des obstacles épigénétiques soient responsables des échecs de différenciation pour certains lignages. Des inhibiteurs épigénétiques pourraient ainsi être utiles afin que les CSP soient réceptrices aux facteurs de transcription. Un autre inconvénient majeur de la différenciation par facteurs de transcription par rapport à la méthode dirigée est son incompatibilité, pour le moment, avec des applications cliniques.

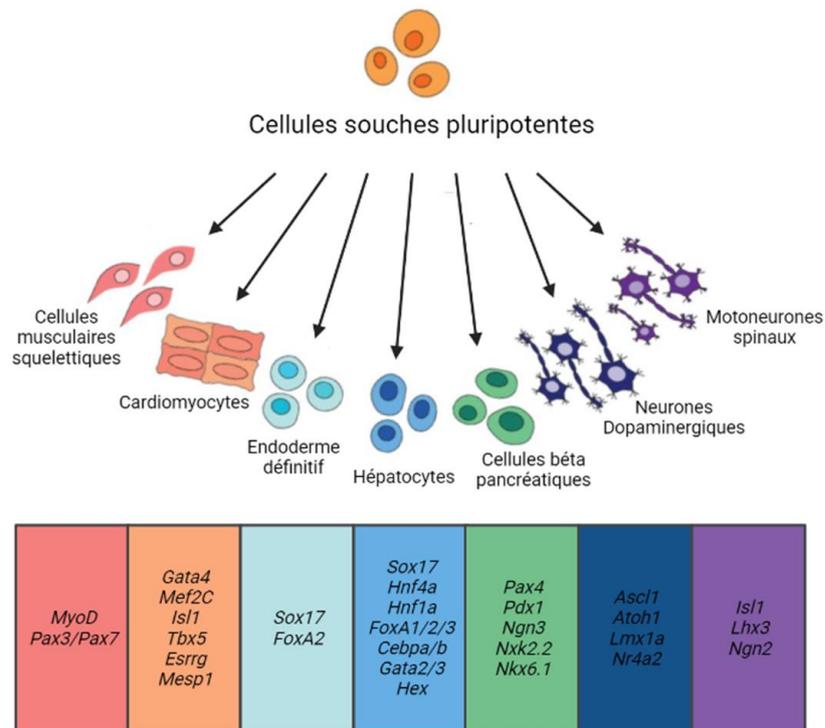


Figure 37. La spécification des cellules souches pluripotentes par la surexpression de facteurs de transcription.

Les cellules souches pluripotentes peuvent être dérivées en différents types cellulaires spécialisés selon les facteurs de transcription surexprimés. Schéma adapté de (Hammelman et al., 2022) et créé sur le site BioRender.

4. Les enjeux et applications biomédicales des cellules souches pluripotentes

Grâce à leurs capacités d'auto-renouveau et de pluripotence qui viennent d'être décrites, les CSP humaines représentent une source illimitée de cellules dont on peut induire la différenciation « à la demande » dans l'ensemble des types cellulaires de l'organisme. Quelque que soient leurs origines, de nombreuses études ont donc cherché à utiliser le potentiel de cette ressource biologique pour comprendre et traiter des pathologies humaines (Figure 38). Ainsi, j'aborderai dans ce chapitre l'utilisation des CSP pour réparer des tissus par thérapie cellulaire mais aussi pour modéliser et corriger des processus pathologiques d'origine génétique.

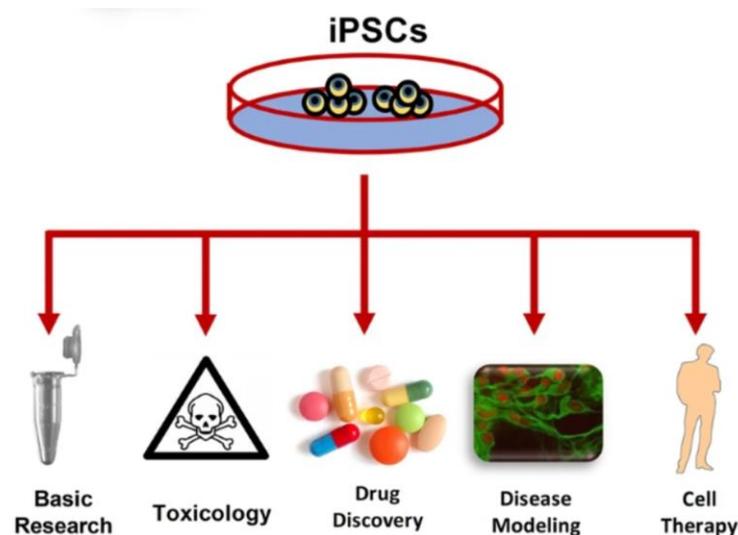


Figure 38. Les applications biomédicales des cellules souches pluripotentes.

En raison de leur capacité d'auto-renouveau et de leur potentiel de différenciation, les cellules souches induites à la pluripotence (iPSCs) présentent toutes les applications biomédicales potentielles des cellules souches embryonnaires. Elles peuvent être utilisées pour des études développementales, des tests de toxicité, pour cribler et découvrir de nouveaux médicaments, établir des modèles de maladies et pour la médecine régénérative/thérapie cellulaire. Source (Moradi et al., 2019).

4.1. La thérapie cellulaire : de la greffe allogénique à la greffe autologue

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules saines afin de remplacer des cellules absentes, non fonctionnelles ou perdues dans le contexte d'une maladie. Cette thérapie existe depuis plus de 100 ans avec la transfusion sanguine, puis le développement de greffes à partir de cellules souches adultes multipotentes comme les cellules souches mésenchymateuses, hématopoïétiques et cutanées. Plus récemment, de nouvelles perspectives de thérapie cellulaire pour des maladies et des lésions incurables ont été envisagées avec la découverte des CSP qui offrent à la médecine régénérative une source cellulaire potentiellement illimitée de matériel biologique pour le traitement de, théoriquement, n'importe quel organe. Ainsi, les premières évidences d'efficacité de la thérapie cellulaire à partir de CSP ont été apportées *in vivo* chez des modèles animaux pour plusieurs pathologies telles que l'infarctus du myocarde (Ménard et al., 2005), le diabète (Kroon et al., 2008), les rétinites pigmentaires (Ben M'Barek et

al., 2017; Haruta et al., 2004), les génodermatoses (Guenou et al., 2009) ou la maladie de parkinson (Roy et al., 2006). Le transfert de la technologie au modèle humain nécessite cependant de répondre aux problèmes de « sûreté » et de « tolérance » qui limitent l'utilisation des CSP humaines, notamment de par leurs propriétés inhérentes de tumorigénicité, d'hétérogénéité et d'immunogénicité.

Un avantage important des CSP est leur potentiel de prolifération infini, grâce auquel des milliards de cellules peuvent être produites pour la transplantation. Toutefois, cette propriété est une arme à double tranchant, car elle peut donner naissance à des tératomes ou des tumeurs. Ces derniers peuvent en effet être le résultat de la prolifération de cellules indifférenciées ou immatures conservées dans le produit de thérapie cellulaire final, de facteurs de reprogrammation restés actifs dans les cellules différenciées à partir de iPSC ou de mutations génétiques qui se sont produites au cours de la culture *in vitro* des CSP. Il est donc nécessaire d'optimiser la culture des CSP afin de les orienter vers le type cellulaire désiré tout en garantissant leur stabilité après l'implantation. Pour cela, il a été proposé d'utiliser des méthodes de tri cellulaire (Kikuchi et al., 2017; Sougawa et al., 2018) ou des gènes suicides (Kojima et al., 2019) pour sécuriser le produit de thérapie. Les anomalies génétiques engendrées pendant la culture des CSP ou le processus de différenciation sont également systématiquement analysées.

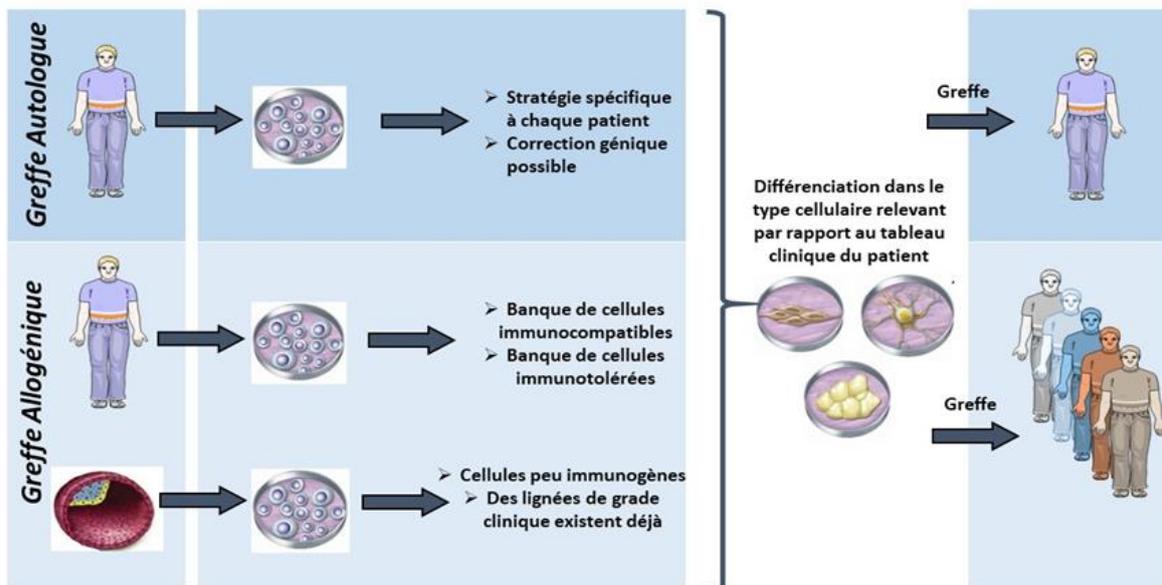


Figure 39. Description des stratégies de thérapie cellulaire autologues et allogènes avec les cellules souches pluripotentes humaines.

Il existe deux formes de thérapie cellulaire. Elles impliquent l'isolement de cellules soit du patient (autologue), soit d'un donneur sain (allogène).

Un autre aspect important à prendre en considération en médecine régénérative est le potentiel rejet immunitaire de la population cellulaire transplantée. Jusqu'à la découverte des hiPSC, la seule stratégie envisageable avec les CSP était la greffe allogénique qui consiste à greffer des cellules d'un individu à un autre individu de la même espèce (Figure 39). L'avantage principal de cette méthode est la possibilité de greffer un grand nombre de patients grâce à

des banques de lignées de hESC de grade clinique prêtes à l'emploi. Cependant, bien que certaines études aient montré que les hESC étaient faiblement immunogènes, leur utilisation peut poser des problèmes de tolérance immunitaire. De façon systématique, les allogreffes sont donc accompagnées d'un traitement par immunosuppresseurs à plus ou moins long terme selon le tissu ciblé afin d'éviter un rejet. Malheureusement, les patients sous immunosuppresseurs peuvent souffrir d'effets secondaires graves comme des infections. Depuis la découverte des hiPSC, la réponse immunitaire déclenchée par le greffon peut maintenant être contournée par la greffe autologue qui consiste à greffer chez un individu des cellules issues de son propre organisme. La transplantation autologue ne nécessite pas de régime immunosuppresseur et favorise une survie optimale des cellules. Cependant, à l'heure actuelle, les greffes allogéniques sont préférées aux autologues à cause des durées et des coûts de production allongés avec les hiPSC. Par exemple, dans le cas d'indications graves, notamment l'insuffisance cardiaque et les lésions de la moelle épinière, le délai inhérent à la production de produits thérapeutiques autologues de grade clinique ne permet pas de traiter avec succès ces affections aiguës. Ainsi, d'autres stratégies sont proposées pour limiter le rejet immunitaire des greffes allogéniques, telles que les banques de cellules marquées selon leur profil immun (HLA antigène leucocytaire humain) (Taylor et al., 2005; Wilmut et al., 2015), de manière à pouvoir correspondre à une grande partie de la population d'un pays donné et de pouvoir choisir des cellules thérapeutiques compatibles avec le profil des patients receveurs. Plus récemment, la technologie d'édition de gène CRISPR-Cas9 a été proposée afin de créer des cellules donneuses invisibles pour le système immunitaire, permettant ainsi de traiter n'importe quel patient (Lanza et al., 2019). Le développement de telles cellules implique l'inactivation de gènes nécessaires à la reconnaissance immunitaire, en particulier les gènes du locus HLA. Par exemple, tous les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I peuvent être inactivés en supprimant leur composant commun qui est codé par le gène de la microglobuline bêta 2. En parallèle, d'autres techniques tirent parti de nos connaissances sur les stratégies de dissimulation immunitaire utilisées par certaines bactéries, virus, parasites ou cellules cancéreuses en modifiant les cellules à transplanter afin qu'elles expriment des gènes réprimant la stimulation des lymphocytes T (par exemple, CTLA et PD-L1) ou régulant la fonction immunitaire (par exemple, CD47 et CD200).

Le potentiel des CSP humaines en matière de thérapie cellulaire est important. A ce jour, on dénombre trente essais cliniques interventionnels basés sur les CSP (70% hESC / 30% hiPSC) qui sont réalisés pour plus de 14 maladies (Deinsberger et al., 2020; Yamanaka, 2020).

4.2. La modélisation pathologique : comprendre les causes de la maladie

Une autre application des CSP humaines consiste à utiliser leur capacité à générer des populations cellulaires pertinentes afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans le développement de certaines maladies génétiques (Figure 40).

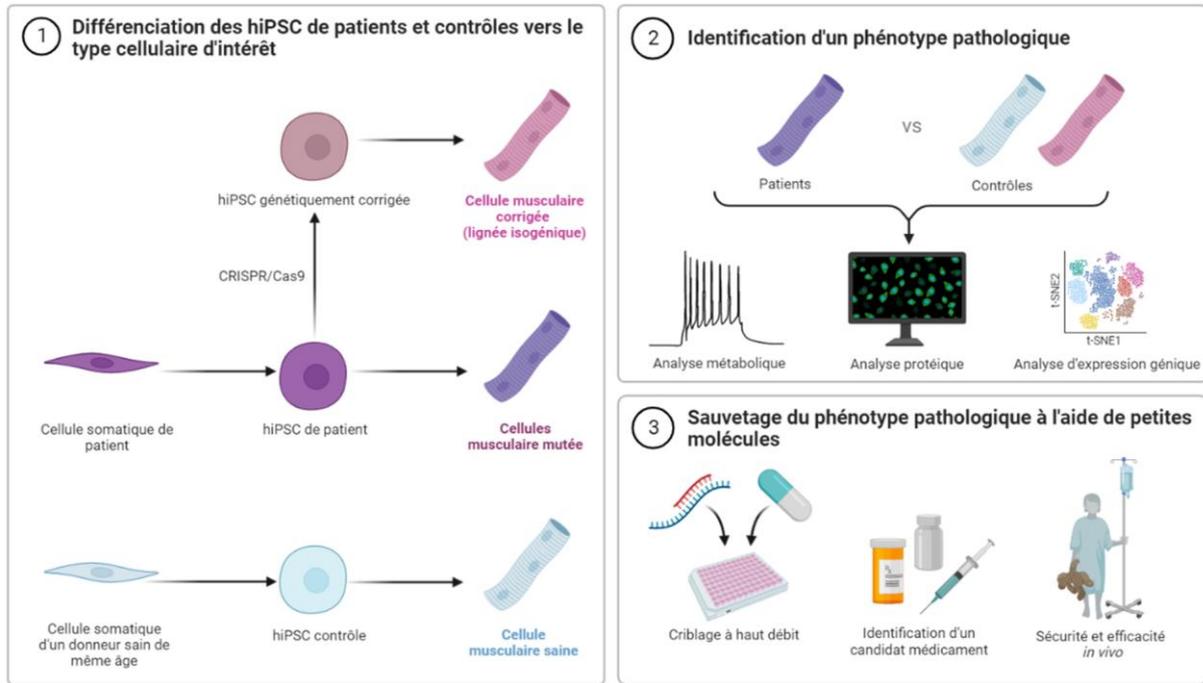


Figure 40. Description de la stratégie de modélisation pathologique avec les cellules souches humaines induites à la pluripotence.

(1) Les cellules somatiques dérivées de patients sains ou porteurs d'une mutation génétique sont reprogrammées en cellules souches induites à la pluripotence (hiPSC) par l'induction de facteurs de transcription définis, puis (2) différenciées vers le type cellulaire pertinent pour la maladie. Ensuite, les phénotypes de chaque condition peuvent être comparés par diverses méthodes expérimentales, telles que des analyses métaboliques, transcriptomiques ou protéomiques, afin d'identifier un phénotype pathologique ou un biomarqueur de la maladie. (3) Enfin, l'efficacité de petites molécules à normaliser ce phénotype pathologique peut être testée par la technique de criblage à haut débit, permettant d'identifier de potentiels candidats médicaments. Schéma créé sur le site BioRender.

4.2.1. La pertinence du modèle cellulaire

L'étude des processus cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les maladies à long terme repose sur l'utilisation de modèles animaux ou de cellules primaires humaines issues de biopsies de patients. Même si ces modèles ont permis de grandes avancées sur nos connaissances actuelles, ils présentent plusieurs limitations majeures telles que des dissimilitudes de phénotypes ou des difficultés d'obtention et une capacité proliférative limitée en culture. Ainsi, les CSP d'origine humaine constituent une ressource biologique alternative pour la modélisation pathologique. En effet, le développement de protocoles efficaces de différenciation pour un nombre croissant de types cellulaires, combiné à celui des analyses pangénomiques, a créé la possibilité d'interroger les conséquences biochimiques et cellulaires d'une mutation génétique. A ce jour, une cinquantaine de types cellulaires différents ont été obtenus à partir de CSP et utilisés pour modéliser des pathologies d'origines génétiques différentes. C'est notamment le cas des cellules gliales (Hong et al., 2008; Reubinoff et al., 2001), de divers sous-types de neurones (Hong et al., 2008; Perrier et al., 2004), des cardiomyocytes (Mummery et al., 2007), des cellules vasculaires et endothéliales (Levenberg et al., 2010), des précurseurs hématopoïétiques (Chadwick et al., 2003), des cellules sécrétrices d'insuline (Van Hoof et al., 2009), ou encore des hépatocytes (Baharvand et al., 2008), des kératinocytes (Metallo et al., 2008) et des mélanocytes (Fang et al., 2006).

4.2.2. La génération de modèles pathologiques

Les études utilisant des CSP humaines pour la modélisation de maladies génétiques commencent par l'établissement de lignées cellulaires portant les défauts moléculaires d'intérêt. Grâce au DPI, des hESC porteuses de mutations ont été obtenues pour une cinquantaine de maladies génétiques comme la maladie de Huntington, la dystrophie myotonique de type 1 ou le syndrome de l'X fragile. La découverte des hiPSC a par la suite permis d'augmenter considérablement le nombre de pathologies en rendant possible la modélisation de maladies pour lesquelles le DPI n'était pas possible. Un grand nombre de maladies ont ainsi pu être étudiées ces dernières années. Bien que les maladies monogéniques représentent le groupe pathologique le plus étudié, des maladies complexes impliquant des gènes multiples ou inconnus ont également été modélisées telles que les troubles du spectre autistique (DeRosa et al., 2012) ou la schizophrénie (Brennand et al., 2011). Cependant, un des inconvénients à utiliser les CSP repose sur la persistance de l'identité embryonnaire ou fœtale dans les cellules dérivées (Hrvatin et al., 2014), ce qui peut représenter un obstacle pour la modélisation de pathologies à phénotype tardif (apparition des symptômes de l'adolescence à l'âge adulte). Ainsi, plusieurs stratégies ont été développées ces dernières années afin de forcer la maturation des cellules différenciées. Par exemple, certaines études ont proposé d'accélérer le processus de vieillissement des cellules en les stimulant avec des facteurs de stress (Byers et al., 2011; Nguyen et al., 2011), des inducteurs du métabolisme ou via l'induction d'acteurs du vieillissement comme la progérine (Miller et al., 2013).

Un autre défi majeur de la modélisation pathologique réside dans la discrimination entre les phénotypes résultant de la mutation causale de la maladie et ceux issus de simples variations interindividuelles. Ainsi, pour éviter que les fonds génétiques des lignées cellulaires soient source d'erreurs d'interprétation, certaines instances internationales recommandent de générer au moins trois lignées de hiPS à partir de trois patients différents afin de s'affranchir de la variabilité possible du modèle. Il est également recommandé d'utiliser les technologies d'édition du génome (ZFN, TALEN ou CRISPR-Cas9) pour générer des contrôles isogéniques, soit par la correction des mutations génétiques pathogènes dans les hiPSC dérivées de patients, soit par l'introduction de mutations spécifiques dans des hiPSC de type sauvage non affectées par la maladie. Ces approches permettent d'avoir comme seule variable la mutation, ce qui garantit l'identification du phénotype pathologique tout en évitant la confusion avec toutes disparités de fond génétique ou d'épiphénomènes résultant d'éventuelles variations d'une lignée à l'autre.

4.2.3. Les différentes stratégies de modélisation

Différentes stratégies ont été mises en place pour comprendre les biomécanismes impliqués dans le développement des maladies génétiques grâce aux CSP. Dans la majorité des cas, les études consistent à confirmer la présence de biomarqueurs ou de phénotypes connus ou déjà associés à la pathologie étudiée afin d'en étudier les conséquences. Ce fut par exemple le cas

en 2009 pour l'atrophie musculaire spinale où les auteurs ont montré pour la première fois que les hiPSC représentaient une source biologique relevante pour modéliser une maladie génétiquement héritée (Ebert et al., 2009). Depuis, un nombre croissant d'études ont également montré que les modèles cellulaires dérivés de CSP pouvaient être utilisés pour identifier de nouveaux défauts pathologiques, notamment par des approches transcriptomiques ou protéomiques (Marteyn et al., 2011). Dans certains cas, des analyses complémentaires de gain mais surtout de perte de fonction ont même permis de relier ces biomarqueurs à de nouveaux phénotypes pathologiques (Denis et al., 2013; Feyeux et al., 2012). Dans les prochaines années, il est fort probable que les mécanismes physiopathologiques puissent être explorés de façon plus fine avec notamment la sophistication des modèles *in vitro* à partir de CSP, comme les organoïdes ou les organes sur puces (Organ-on-chip), ou la standardisation des outils d'édition du génome.

5. L'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour la modélisation des LGMD

Bien qu'elle ait été appliquée avec succès à un certain nombre de maladies génétiques, la modélisation pathologique à l'aide de CSP est restée difficile à appliquer aux dystrophies musculaires pendant près d'une décennie en raison de l'absence de protocoles permettant de générer des populations homogènes de myotubes, les cellules d'intérêt de ces pathologies.

5.1. La différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules musculaires squelettiques

On distingue deux méthodes principales pour obtenir *in vitro* de cellules musculaires striées squelettiques à partir de CSP humaines : la reprogrammation directe en forçant l'expression de facteurs de transcription myogéniques ou la différenciation dirigée à l'aide de petites molécules (Figure 41).

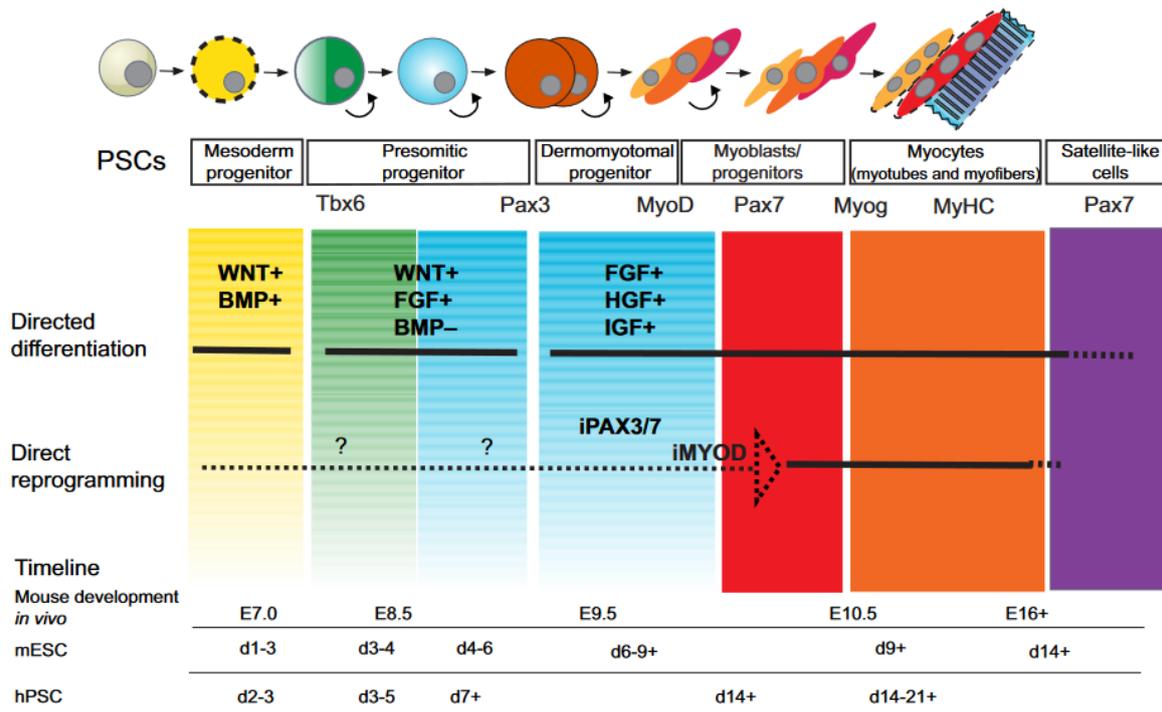


Figure 41. Comparaison des approches de différenciation des cellules souches pluripotentes en muscles squelettiques.

Les approches de différenciation dirigée visent à récapituler les étapes de développement de la spécification et de la différenciation du mésoderme paraxial en manipulant des voies de signalisation telles que WNT et BMP. La séquence des étapes du développement et les voies de signalisation importantes associées à chaque étape sont indiquées. Les approches de reprogrammation directe visent à contourner les premières étapes du développement en surexprimant un régulateur myogénique. Dans certains cas, les événements cellulaires qui se produisent au cours de la différenciation restent très peu clairs (ligne pointillée). La différenciation dirigée en muscle squelettique se produit selon des calendriers légèrement différents. Source (Chal and Pourquié, 2017).

5.1.1. La reprogrammation directe

La reprogrammation directe est une approche qui consiste à surexprimer des facteurs de transcription jouant un rôle essentiel dans la myogenèse embryonnaire tels que myoD (Maffioletti et al., 2015) ou Pax3/7 (Darabi et al., 2012; Filareto et al., 2015) (Tableau 5). MyoD a été initialement considéré comme le régulateur principal de la spécification myogénique, car il peut directement reprogrammer des cellules non musculaires vers un lignage myogénique (Constantinides et al., 1977; Davis et al., 1987). Depuis la preuve de son efficacité sur des ESC, la surexpression de myoD a été adoptée comme une approche standard pour l'induction de CSP en cellules musculaires squelettiques (Albini et al., 2013; Goudenege et al., 2012; Tanaka et al., 2013; Warren et al., 2010). Cependant, MyoD est un marqueur de la spécialisation terminale du lignage musculaire et ne permet pas d'induire de progéniteurs myogéniques. D'autres équipes ont alors forcé la différenciation myogénique des CSP par la surexpression de Pax3 ou de Pax7, des facteurs précédant myoD pendant le développement embryonnaire, dans le but d'obtenir des progéniteurs myogéniques. La fonctionnalité de ces progéniteurs a pu être analysée par transplantation chez un modèle murin de la DMD. En plus de contribuer à la régénération musculaire, il a été démontré que ces progéniteurs étaient capable de générer des fibres saines exprimant la dystrophine (Darabi et al., 2012). Depuis, d'autres équipes ont

amélioré les protocoles avec notamment une étape d'enrichissement des cellules musculaires par des méthodes de tri cellulaire (Darabi et al., 2012; Rao et al., 2018; Selvaraj et al., 2019b; Shoji et al., 2015; Tanaka et al., 2013). Néanmoins cette méthode de surexpression de facteurs tardifs de la myogenèse contourne les étapes précoces du développement musculaire et peut ne pas être adaptée à l'étude de maladies avec des atteintes développementales (Chal and Pourquié, 2017). L'insertion d'un transgène peut également engendrer des modifications génétiques.

5.1.2. La différenciation dirigée

A l'opposé, la différenciation dirigée repose sur l'utilisation séquentielle de molécules de signalisation, de facteurs de croissance et/ou d'inhibiteurs afin de récapituler *in vitro* la myogenèse développementale (Tableau 5). Les protocoles princeps étaient caractérisés par une phase d'induction relativement longue avec des corps embryoides (Awaya et al., 2012; Chang et al., 2009; Mizuno et al., 2010) qui fut rapidement abandonnée au profit d'une phase en 2D avec une différenciation directe vers le lignage mésodermique, à l'origine des précurseurs myogéniques, plutôt que vers les trois feuilletts embryonnaires. En effet, la différenciation dirigée des CSP se déroule en trois grandes étapes : une première phase d'induction vers le lignage mésodermique, suivie d'une phase proliférative des progéniteurs mésodermiques et d'une phase de différenciation terminale. Malgré la diversité des protocoles, la majorité utilisent des inhibiteurs de GSK3 β dans les étapes précoces de la différenciation musculaire, comme le CHIR99021 (Borchin et al., 2013; Chal et al., 2015; Rao et al., 2018; Sakai-Takemura et al., 2018; Shelton et al., 2016; Swartz et al., 2016) ou un dérivé d'indirubine (Iovino et al., 2016), afin d'activer la voie de signalisation WNT et d'induire le mésoderme paraxial. En parallèle, certaines équipes utilisent des inhibiteurs de la voie BMP tels le LDN193189 ou le SB431542 (Chal et al., 2015; Sakai-Takemura et al., 2018) afin d'empêcher le mésoderme paraxial nouvellement spécifié de dériver vers un mésoderme latéral et d'enrichir la population obtenue en progéniteurs présomitiques. Dans les étapes suivantes de la différenciation, l'insuline est utilisée pour conserver l'activation de la voie Wnt et promouvoir la myogenèse (Chal et al., 2015). Ensuite, l'ajout de facteurs de croissance comme le FGF2 ou l'HGF permettent la prolifération des myoblastes, leur migration et l'expression de Myf5, un marqueur terminal spécifique du lignage musculaire. La différenciation terminale, caractérisée par la fusion des myoblastes en myotubes polynucléés, est finalement induite en appauvrissant le milieu de culture en sérum (Hosoyama et al., 2014; Swartz et al., 2016). Des facteurs additionnels peuvent également être ajoutés dans le milieu de culture tels que l'IGF pour promouvoir la myogenèse terminale et la fusion cellulaire ou la Dexaméthasone pour initier la synthèse des protéines structurales des cellules musculaires et améliorer l'organisation des sarcomères (Maffioletti et al., 2018; Rao et al., 2018).

L'ensemble de ces protocoles dirigés sont relativement plus longs que ceux par transgènes avec une durée comprise entre 25 et 50 jours ou supérieure à 10 semaines quand les cultures en EB et en 2D sont combinées (Hosoyama et al., 2014; Sakai-Takemura et al., 2018). De plus, malgré l'obtention de cellules musculaires positives pour les marqueurs de différenciation

terminale, comme la desmine ou la titine, et la présence de sarcomères organisés l'inconvénient majeur de cette méthode reste la maturité limitée des cellules. Les myotubes conservent un phénotype fœtal/périnatal qui empêche par exemple la formation d'un réseau de tubules-t organisé, caractéristique des fibres musculaires matures (Skoglund et al., 2014). Dans le but d'améliorer le niveau de maturation des cellules, certains protocoles ont été optimisés et proposent d'utiliser des inhibiteurs de la voie du TGF β afin d'augmenter le potentiel de fusion des cellules et l'organisation sarcomérique (Hicks et al., 2018), ou de combiner cinq molécules identifiées par criblage pour améliorer de façon synergique la différenciation myogénique (Selvaraj et al., 2019b). Plus récemment, il a été proposé d'exploiter le potentiel de la bio-ingénierie (hydrogels, bio impression) pour développer des systèmes cellulaires plus complexes et plus matures comme les modèles tridimensionnels.

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis intéressée à un protocole en 2D identifié par la société Genea Biocells (Caron et al., 2016) qui permet de différencier efficacement les hiPSC en cellules musculaires squelettiques matures en moins de 26 jours. Il consiste à utiliser trois milieux de culture successifs contenant des combinaisons de petites molécules et de facteurs de croissance qui ont été identifiées par criblage à haut débit pour leur potentiel à initier et promouvoir la différenciation myogénique. Ce protocole repose sur une première induction des CSP vers le lignage musculaire, suivie d'une différenciation des précurseurs myogéniques en myoblastes puis une maturation de ces cellules en myotubes. Ainsi différenciées, plus de 80% des cellules expriment les principaux marqueurs des cellules musculaires, tels que la myogénine, l'alpha-actinine ou MF20 (myosine sarcomérique), mais présentent toutefois un niveau de fusion plus faible que des cellules primaires. Malgré cet inconvénient, plusieurs études ont démontré la fiabilité de ce modèle cellulaire dérivé de CSP à récapituler des dystrophies musculaires telles que la FSHD (Caron et al., 2016) ou la SMA (Hellbach et al., 2018).

Référence	Durée	Cytokines	Transgène	Tri cellulaire	Fonctionnalité	Maladie
Goudege, 2012	5 weeks	X	MYOD1	X	Transplantation souris RAG mdx	DMD
Tedesco, 2012	4 weeks		MYOD1			LGMD2D, DMD
Darabi, 2012	2 weeks		Pax7	X	Transplantation souris mdx	
Awaya, 2012	63 days	X			Transplantation souris NOG	
Borchin, 2013	35 days	X		X		
Tanaka, 2013	2 weeks		MYOD1		Transplantation souris NOD/SCID-DMD	MM
Abujarour, 2014	2 weeks		MYOD1			DMD, BMD
Hosoyama, 2014	8 weeks	X			Contractions musculaires sporadiques	BMD, SMA, ALS
Skoglund, 2014	2-8 weeks		Pax7		Electrophysiologie, Flux de calcium	
Chal, 2015	4 weeks	X		X	Contractions	DMD
Shoji, 2015	2 weeks		MYOD1		Contractions sous stimulation, Flux de calcium	DMD
Demestre, 2015	4 weeks	X		X	Contractions sous stimulation, Formation NMJ	
Maffioletti, 2015	3 weeks		MYOD1		Transplantation souris NOD/SCID	DMD, LGMD2D
Choi, 2016	40 days	X		X	Transplantation souris NRG Contractions spontanées	DMD, FSHD, ALS
Caron, 2016	26 days	X				FSHD, BMD
Yoshida, 2017	10 days		MYOD1			Maladies de Pompe
Jiwlawat, 2017	12 weeks	X			Contractions spontanées	NMD
Uchimura, 2017	15 days		MYOD1			
Sakai-Takemura, 2018	10 weeks	X		X	Transplantation souris NSG-mdx	CMS
Van der Wal, 2018	30-40 days	X		X	Transplantation souris NSG	Maladies de Pompe
Selvaraj, 2019	2 weeks		Pax7	X	Transplantation souris C3KO-NSG	LGMD2A

Tableau 5. Résumé des protocoles de différenciation de cellules musculaires à partir de cellules souches pluripotentes.

5.2. La contribution de la modélisation pathologique dans l'étude des LGMD

Les dystrophies musculaires, et particulièrement les LGMD, sont caractérisées par des corrélations génotype-phénotype hétérogènes. Tandis que des mutations dans différents gènes peuvent engendrer un phénotype similaire, différentes mutations dans le même gène peuvent causer des phénotypes dystrophiques variés. Au cours de la dernière décennie, des efforts importants ont donc été déployés pour déchiffrer les mécanismes moléculaires associés aux LGMD afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. La compréhension de ces voies moléculaires nécessite le développement de modèles cellulaires et animaux appropriés qui récapitulent au moins partiellement les caractéristiques de ces maladies.

Les génomes des mammifères étant très conservés au cours de l'évolution, les modèles animaux sont actuellement préférés aux modèles *in vitro* pour les études des dystrophies musculaires (Allamand, 2000; Ng et al., 2012) et l'évaluation des stratégies thérapeutiques (McGreevy et al., 2015). Des modèles murins sont par exemple disponibles pour la majorité des LGMD (Gawlik, 2018). Cependant, bien que la plupart de ces modèles animaux récapitulent les phénotypes pathologiques observés chez l'homme, certains apparaissent relativement normaux ou avec un léger phénotype dystrophique (Ackroyd et al., 2008), voire présentent des déficiences qui ne sont pas rapportées chez les patients LGMD (Vafiadaki et al., 2001). De plus, il n'est pas envisageable de créer des modèles animaux pour chaque mutation à l'origine d'une LGMD en raison du temps, des efforts et du coût financier que cela engendrerait. De ce fait, plusieurs modèles humains *in vitro* ont été développés en parallèle pour étudier les phénotypes pathologiques associés aux LGMD. Parmi ceux-ci, les cellules musculaires primaires provenant de biopsies de patients représentent la ressource biologique la plus couramment rapportée, malgré la difficulté de leur génération et leur capacité proliférative limitée (Aas et al., 2013). Pour surmonter ces problèmes, d'autres modèles *in vitro* ont été développés comme la transdifférenciation de cellules non musculaires en cellules squelettiques par l'expression forcée de facteurs de transcription myogéniques (Bar-Nur et al., 2018). Par ailleurs, l'immortalisation de cellules primaires avec hTERT et CDK4 a été rapportée pour la modélisation des LGMD (Mamchaoui et al., 2011; Thorley et al., 2016) telles que la LGMD D4/R1 (Lasa-Elgarresta et al., 2022), la LGMD R2 (Carmeille et al., 2016; Cea et al., 2016; Philippi et al., 2012) et la LGMD R12 (Chandra et al., 2019). Plusieurs études ont également mis en évidence l'utilisation des CSP, et plus particulièrement des hiPSC, comme un modèle alternatif aux cellules primaires ou génétiquement modifiées pour étudier les maladies neuromusculaires (Dimos et al., 2008; Ebert et al., 2009; Lin et al., 2015; Park et al., 2008a; Shoji et al., 2015), dont les LGMD (El-Battrawy et al., 2018; Mateos-Aierdi et al., 2021; Tanaka et al., 2013; Tedesco et al., 2012; Wu et al., 2017). En plus de leur capacité illimitée de prolifération, les CSP ont démontré leurs capacités à se différencier vers des types cellulaires particulièrement affectés dans les pathologies, en particulier les cellules musculaires squelettiques. Ce modèle présente également l'intérêt d'être issu de la reprogrammation de cellules purifiées à partir d'échantillons sanguins facilement accessibles.

Jusqu'à présent, les hiPSC ont principalement été utilisées pour reproduire certains phénotypes pathologiques des LGMD ou pour découvrir de nouveaux mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents. Une première preuve de concept utilisant les hiPSC pour modéliser la LGMD R2 a été rapportée en 2013 (Tanaka et al., 2013). Les auteurs ont réussi à recréer *in vitro* les conditions pathologiques de la myopathie en démontrant une capacité de réparation membranaire défectueuse après une lésion au laser, qui fut corrigée après réexpression de la dysferline par transfert de gène. Plus récemment, la génération d'un modèle myogénique dérivé de hiPSC de patients LGMD R1 a permis d'identifier un potentiel mécanisme commun à un ensemble de mutations de la calpaïne 3 (Mateos-Aierdi et al., 2021). La capacité de pluripotence des hiPSC fait de ces cellules un modèle attractif pour les LGMD, notamment pour les cellules difficiles à atteindre comme les cellules cardiaques humaines. Une récente étude a ainsi pu identifier une anomalie de l'homéostasie du calcium qui semblerait impliquée dans la cardiomyopathie dilatée observée chez les patients atteints de LGMD R9, en utilisant des cardiomyocytes humains dérivés de hiPSC (El-Battrawy et al., 2018). Au-delà de leur utilisation pour l'étude des LGMD, les hiPSC de patients représentent également une ressource biologique standardisée unique pour la découverte de médicaments, compatible avec les contraintes imposées par le criblage à haut débit. Cependant, bien que l'application des hiPSC pour le criblage de médicaments ait commencé en 2009, elle a été retardée pour les LGMD. Seules quelques études de preuve de concept ont été rapportées au cours des cinq dernières années, identifiant l'effet de 4BPPN^{it} dans la régulation de la glycosylation de l'alpha dystroglycane dans la LGMD R9 (Kim et al., 2019) et le nocodazole comme candidat médicament pour le traitement de la LGMD R2 (Kokubu et al., 2019).

TRAVAUX DE RECHERCHE

PROBLEMATIQUE & DEMARCHES EXPERIMENTALES

Malgré des avancées majeures réalisées dans le champ des biothérapies au cours de ces dernières années, il n'existe pas, à ce jour, de traitement curatif disponible pour la LGMD R2, et plus généralement pour les dysferlinopathies. Cet échec peut s'expliquer en partie par notre manque de compréhension des fonctions assurées par la dysferline au sein de la fibre musculaire. En effet, malgré l'identification du rôle de la dysferline dans la réparation membranaire, le trafic vésiculaire intracellulaire ou l'homéostasie calcique, on ne sait pas laquelle de ces fonctions ou combinaison de fonctions est la plus impliquée dans le développement physiopathologique des dysferlinopathies. Il semble également très probable que d'autres fonctions de la dysferline soient encore à découvrir. Par ailleurs, on constate que peu d'études ont procédé à l'identification de nouveaux mécanismes pathologiques sous-jacents à une déficience en dysferline. La plupart des recherches tendent à restaurer l'expression de la dysferline ou s'appuient sur la récupération de la fonction de PMR des fibres pathologiques pour valider leur stratégie thérapeutique.

Ainsi, en utilisant la technologie des cellules souches pluripotentes humaines, l'objectif général de ma thèse était d'**identifier de nouveaux mécanismes moléculaires et cellulaires associés aux LGMD R2**. Pour cela, la première partie du projet consistait à identifier un protocole de différenciation myogénique robuste me permettant de générer, à partir de hiPSC, une population homogène de cellules musculaires squelettiques. De plus, ces cellules devaient être capables de récapituler des phénotypes pathologiques identifiés dans les LGMD. Une fois ce modèle cellulaire caractérisé, la deuxième partie du projet avait pour objectif d'évaluer les conséquences moléculaires associées à une perte d'expression de la dysferline dans des cellules musculaires dérivées de hiPSC de patients LGMD R2.

En parallèle de ces travaux, un deuxième objectif de ma thèse visait à **mettre en place un modèle pharmacologique des formes mal conformées mais fonctionnelles de la dysferline**, afin d'identifier de petites molécules capables d'empêcher leur dégradation. En effet, plusieurs études soulignent le potentiel thérapeutique de l'inhibition des voies de dégradation des protéines mal repliées. Dans ce contexte, un test *in vitro* à haut débit, utilisant des myoblastes immortalisés, a été développé afin de suivre l'expression et la réaffectation d'une forme mutante agrégée de dysferline (L1341P).

L'ensemble de ces travaux vont être détaillés dans la suite de ce manuscrit. Les différentes parties qui vont être abordées sont les suivantes :

Partie 1 : Mise en place d'un protocole de dérivation de cellules musculaires squelettiques à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence.

Ces travaux ont été valorisés par une publication dans Biomedicines en 2022.

Partie 2 : Identification de nouveaux mécanismes moléculaires associés à une déficience primaire des cellules musculaires en dysferline.

Cette partie vous est présentée sous forme de résultats.

Partie 3 : Mise en place d'un modèle pharmacologique de la LGMD R2 afin d'identifier des molécules capables d'empêcher la dégradation des formes mal conformées mais fonctionnelles de la dysferline.

Les résultats ont été valorisés par une publication qui est en cours de soumission.

Ces résultats sont également complétés par différentes annexes :

- Article 1 : Identification du thiostrepton comme approche pharmacologique pour sauver de la dégradation les protéines mutantes mal repliées de l'alpha-sarcoglycane. *Cette étude, à laquelle j'ai participé en tant que support technique, a été publiée dans Scientific Reports en 2019 par Lucile Hoch. Elle a permis de faire la preuve de concept sur l'utilisation du criblage à haut débit, combiné au repositionnement de médicaments, pour identifier des molécules capables d'empêcher la dégradation de protéines mal conformées qui sont impliquées dans les LGMD.*
- Article 2 : Double blocage de la dégradation de l'alpha-sarcoglycane mal repliée par l'association du bortézomib et du givinostat. *Ces travaux, auxquels j'ai également contribué, ont été publiés dans Frontiers in Pharmacology en 2022 par Lucile Hoch. Ils ont permis de démontrer que l'utilisation de modulateurs de l'autophagie pouvait être une approche thérapeutique pour les patients LGMD porteurs de mutations faux-sens.*
- Brevet 1 : Utilisation du bazédoxifène pour augmenter la survie musculaire. *Cette demande de dépôt de brevet fait suite aux résultats obtenus dans la partie 3.*

RESULTATS

PARTIE 1 : Mise en place d'un protocole de dérivation de cellules musculaires squelettiques à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence.

Article 1

Publié en 2022, Biomedicines

Skeletal muscle cells derived from induced pluripotent stem cells: a platform for limb girdle muscular dystrophies.

Celine Bruge ^{1,2,3,†}, Marine Geoffroy ^{4,†}, Manon Benabides ^{1,2,3}, Emilie Pellier ^{1,2,3}, Evelyne Gicquel ⁴, Jamila Dhiab ⁵, Lucile Hoch ^{1,2,3}, Isabelle Richard ⁴ and Xavier Nissan ^{1,2,3}

¹ CECS, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

² INSERM U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

³ UEVE U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

⁴ INTEGRARE, Genethon, Inserm, Université Evry, Université Paris-Saclay, 91002 Evry, France

⁵ Centre de Recherche en Myologie, Institut de Myologie, Inserm, Sorbonne Université, 75013 Paris, France

† These authors have contributed equally to this work.

1. Contexte

Au cours de la dernière décennie, des efforts ont été déployés pour déchiffrer les mécanismes moléculaires associés aux LGMD R2 et de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été évaluées en préclinique, soit en restaurant l'expression de la dysferline, soit en corrigeant les phénotypes pathologiques identifiés. Néanmoins, à ce jour, les seules options de traitement pour les patients atteints de LGMD R2 sont de nature palliative, soulignant la nécessité d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires associés à une déficience en dysferline. L'identification des processus biologiques qui sous-tendent les pathologies humaines est en effet cruciale dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

La compréhension de ces mécanismes physiopathologiques nécessite le développement de modèles cellulaires et animaux appropriés qui récapitulent au moins partiellement les caractéristiques de la maladie. Dans le domaine des dysferlinopathies, comme des dystrophies musculaires en général, la recherche a longtemps reposé sur l'utilisation de modèles animaux qui ont permis de grandes avancées sur nos connaissances actuelles mais qui, cependant, ne permettent pas de récapituler l'étendue des mutations pathogènes de la dysferline. En parallèle, les cellules musculaires squelettiques (skMC) primaires provenant de biopsies de patients représentent la ressource biologique la plus couramment rapportée *in vitro* pour étudier les phénotypes associés aux dysferlinopathies. Ces cellules étant difficiles à générer et leur capacité proliférative étant limitée, leur immortalisation avec hTERT et CDK4 est devenue

une procédure commune pour modéliser les dysferlinopathies (Carmeille et al., 2016; Cea et al., 2016; Mamchaoui et al., 2011; Philippi et al., 2012). Malgré les avantages des skMC primaires en termes de prolifération et de maturité, les hiPSC constituent une ressource biologique alternative pour le développement de modèles cellulaires sans transgène à partir de procédures non invasives. En plus de leur capacité illimitée de prolifération, les hiPSC ont démontré leur potentiel à se différencier en skMC. De plus, au-delà de leur utilisation pour la modélisation pathologique, les hiPSC de patients représentent une ressource standardisée pour la découverte de médicaments, compatible avec les contraintes imposées par le criblage à haut débit.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse était d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires associés à une déficience primaire des cellules musculaires en dysferline, en m'appuyant sur la technologie des hiPSC. Ainsi, la première étape du projet consistait à mettre en place les conditions expérimentales qui permettent la production de skMC à partir de hiPSC. Les premières études à avoir proposé ce type de protocole datent de 2012 et consistaient majoritairement à forcer l'expression des facteurs de régulation myogénique, tels que *PAX7* ou *MYOD*, dans des hiPSC (Darabi et al., 2012; Goudenege et al., 2012; Tedesco et al., 2012). Bien que ces premiers papiers aient mis en place les bases des conditions expérimentales permettant d'obtenir des cellules musculaires, ils ne permettaient pas de satisfaire les besoins d'homogénéité et de fonctionnalité nécessaires à la modélisation pathologique et au criblage à haut débit. Quelques années plus tard, deux équipes ont réussi à relever ce challenge (Caron et al., 2016; Chal et al., 2016, 2015). La première en identifiant les signaux moléculaires impliqués dans le développement embryonnaire du tissu musculaire, la seconde en recherchant des petites molécules capables de stimuler les principales étapes de ce processus de différenciation. Un effort important a donc été réalisé au début de ma thèse pour comparer ces deux protocoles. D'une part, le protocole de différenciation devait me permettre de modéliser les LGMD R2 et, d'autre part, il devait servir aux autres programmes de l'équipe qui consistent à mettre en place des modèles pharmacologiques des LGMD. Le second protocole de différenciation a été retenu puisque, dans nos mains, il permettait d'obtenir à large échelle des populations homogènes de skMC dérivés de hiPSC qui étaient adaptées à nos programmes de modélisation pathologique et à l'identification de cibles thérapeutiques.

Ce protocole permet de différencier des hiPSC en skMC matures en 26 jours sans tri cellulaire ou manipulation génétique, grâce à l'utilisation successive de trois milieux de culture. Il repose sur une première induction de la différenciation par un traitement des hiPSC au CHIR99021, à l'EGF (epidermal growth factor), l'insuline, la dexaméthasone et l'acide ascorbique. Au 10^{ème} jour de différenciation, les cellules sont dissociées et remises en culture en présence d'insuline, d'EGF, d'HGF (hepatocyte growth factor), de PDGF (platelet-derived growth factor), de bFGF (basic fibroblast growth factor), d'oncostatine, d'IGF1 (Insulin-like growth factor 1), de SB431542 et d'acide ascorbique pour obtenir, au bout de 7 jours supplémentaires, des cellules positives pour MyoD et desmine, que nous appellerons par la suite myoblastes ou skMb. La maturation de ces skMb en myotubes multinucléés, appelés skMt, est ensuite obtenue en cultivant les cellules dans un milieu contenant de l'insuline, de l'oncostatine, du

necrosulfonamide et de l'acide ascorbique.

2. Résultats

2.1. Dérivation et caractérisation des skMC différenciées à partir de hiPSC

La première étape de cette étude consistait à générer des skMC à partir de hiPSC contrôles et à les caractériser.

Dans un premier temps, nous avons démontré que les trois lignées de hiPSC engagées dans le processus de différenciation musculaire respectaient la chronobiologie du développement embryonnaire du muscle squelettique humain (Figure 1 de l'article qui suit). L'analyse par PCR quantitative du profil d'expression des hiPSC au fur et à mesure de la différenciation montre que les cellules perdent leurs capacités de pluripotence, caractérisées par la diminution d'expression des marqueurs *Oct4* et *Nanog*, pour acquérir au bout de 17 jours un phénotype de myoblastes, exprimant les marqueurs *MyoD* et *desmine*, avant de fusionner en myotubes et d'exprimer les marqueurs *MyoG* et *titine* (Figures 1E, 1F, 1G). L'ensemble de ces données ont été confirmées au niveau protéique par des immunomarquages montrant une homogénéité d'expression de *MyoD* et de *desmine* au stade skMb, ainsi que de *myogénine* et de *titine* au stade skMt (Figures 1C, 1D).

Dans un second temps, nous avons évalué la maturité des skMt générés à partir des hiPSC (Figure 2). Pour cela, nous avons différencié deux lignées hiPSC génétiquement éditées pour exprimer les protéines *titine* (TTN) ou *troponine I* (TNN) fusionnées à la GFP, afin de suivre en temps réel la formation des sarcomères pendant l'étape de fusion/maturation des skMb en skMt (Figure 2A). Ainsi, l'analyse par microscopie confocale de l'expression de la GFP montre que 50% des cellules expriment ce marqueur dès le troisième jour de maturation, jusqu'à atteindre plus de 80% au cinquième jour (Figure 2B, 2C). Par ailleurs, l'analyse par microscopie confocale des différentes structures sarcomériques, nommées Z-disk, I-band et M-line, confirme que plus de 80% des skMt générés à partir de hiPSC présentent une organisation régulière, transversale et répétitive de leurs sarcomères après 5 jours de maturation (Figure 2E, 2F).

2.2. Utilisation des skMC différenciées à partir de hiPSC pour modéliser les LGMD

Dans la suite de notre étude, nous avons exploré la possibilité d'utiliser ces dérivés musculaires de hiPSC pour modéliser les LGMD R2, et plus généralement tous les sous-types génétiques des LGMD.

Dans un premier temps, nous avons évalué le niveau d'expression de l'ensemble des gènes responsables de LGMD et des protéines correspondantes dans les skMt dérivés de hiPSC contrôles. L'analyse par PCR quantitative des profils d'expression des myotubes révèle que ces cellules sont suffisamment matures pour exprimer la majorité des gènes responsables de LGMD, de façon comparable à des myotubes primaires immortalisés obtenus à partir de biopsies musculaires (Figure 3). L'ensemble de ces données ont ensuite été confirmées au niveau protéique par des immunomarquages ciblant les protéines correspondantes (Figure 4),

démontrant ainsi que les skMt dérivés de hiPSC peuvent être utilisés pour modéliser un large panel de LGMD.

Dans un second temps, nous avons évalué la pertinence de notre modèle cellulaire pour l'identification de processus biologiques qui sous-tendent les LGMD. Comme preuve de concept, nous avons étudié les caractéristiques pathologiques de la LGMD R9 en générant des skMC mutées pour le gène *FKRP* à partir de lignées hiPSC de patients (Figure 5). La caractérisation moléculaire de ces cellules n'a révélé aucune différence avec des cellules contrôles, suggérant que l'absence de *FKRP* n'affecte ni les stades initiaux, ni les étapes terminales de la différenciation (Figure 5A, 5B). D'un point de vue moléculaire, *FKRP* est impliquée dans la glycosylation de l'alpha dystroglycane (α -DG) (Brockington et al., 2001). Cependant, alors que la régulation de la glycosylation de l' α -DG semble être une cible thérapeutique pour le traitement de la LGMD R9 (Cataldi et al., 2018), d'autres études indiquent, d'une part, que plusieurs mutations de *FKRP* n'affectent pas ce mécanisme (Henriques et al., 2019) et, d'autre part, qu'il n'y a pas de corrélation entre la sévérité de la LGMD R9 et le taux de glycosylation de l' α -DG (Alhamidi et al., 2017). Dans notre étude, l'analyse du taux de glycosylation de l' α -DG par imagerie confocale ou par western blot confirme que l'absence de *FKRP* dans les lignées LGMD R9 n'entraîne pas une diminution systématique de la glycosylation de l' α -DG (Figure 5B, 5C). Seule une lignée cellulaire s'est avérée affectée par ce phénotype, en accord avec une étude précédente (Henriques et al., 2019). Ainsi, ces résultats démontrent la capacité des skMt dérivés de hiPSC déficientes en *FKRP* à récapituler une caractéristique phénotypique de la LGMD R9.

3. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons démontré la fiabilité et la reproductibilité d'un protocole de différenciation *in vitro* permettant de dériver des populations pures et homogènes de skMb et de skMt à partir de hiPSC. Ces skMC peuvent être utilisées comme une ressource biologique commune pour modéliser un large panel de LGMD. En effet, nous montrons ici que les skMt dérivés de hiPSC sont suffisamment matures pour exprimer la majorité des gènes causant les LGMD ainsi que les protéines résultantes, de manière comparable à des myotubes immortalisés obtenus à partir de biopsies musculaires. Nous avons également mis en évidence la pertinence biologique de ce modèle dérivé de hiPSC par sa capacité à récapituler un phénotype pathologique identifié dans la LGMD R9. Globalement, cette étude ouvre de nouvelles perspectives sur l'utilisation de ce modèle cellulaire pour l'étude des mécanismes moléculaires associés aux LGMD.

De plus, grâce aux capacités de prolifération illimitées des CSP, un tel protocole de différenciation représente une source potentiellement inépuisable de skMC et ouvre de nouvelles perspectives de recherche pour le développement de tests phénotypiques à haut contenu et le criblage de médicaments associés.

Article

Skeletal Muscle Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells: A Platform for Limb Girdle Muscular Dystrophies

Celine Bruge ^{1,2,3,†}, Marine Geoffroy ^{4,†}, Manon Benabides ^{1,2,3}, Emilie Pellier ^{1,2,3}, Evelyne Gicquel ⁴, Jamila Dhiab ⁵, Lucile Hoch ^{1,2,3}, Isabelle Richard ⁴ and Xavier Nissan ^{1,2,3,*}

- ¹ CECS, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France; cbruge@istem.fr (C.B.); mbenabides@istem.fr (M.B.); epellier@istem.fr (E.P.); lhoch@istem.fr (L.H.)
² INSERM U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France
³ UEVE U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France
⁴ INTEGRARE, Genethon, Inserm, Université Evry, Université Paris-Saclay, 91002 Evry, France; mgeoffroy@genethon.fr (M.G.); gicquel@genethon.fr (E.G.); richard@genethon.fr (I.R.)
⁵ Centre de Recherche en Myologie, Institut de Myologie, Inserm, Sorbonne Université, 75013 Paris, France; jamila.dhiab@sorbonne-universite.fr
* Correspondence: xnissan@istem.fr
† These authors have contributed equally to this work.



Citation: Bruge, C.; Geoffroy, M.; Benabides, M.; Pellier, E.; Gicquel, E.; Dhiab, J.; Hoch, L.; Richard, I.; Nissan, X. Skeletal Muscle Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells: A Platform for Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Biomedicines* **2022**, *10*, 1428. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061428>

Academic Editors: France Piétri-Rouxel, Sestina Falcone and Edoardo Malfatti

Received: 28 April 2022
Accepted: 9 June 2022
Published: 16 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Limb girdle muscular dystrophies (LGMD), caused by mutations in 29 different genes, are the fourth most prevalent group of genetic muscle diseases. Although the link between LGMD and its genetic origins has been determined, LGMD still represent an unmet medical need. Here, we describe a platform for modeling LGMD based on the use of human induced pluripotent stem cells (hiPSC). Thanks to the self-renewing and pluripotency properties of hiPSC, this platform provides a renewable and an alternative source of skeletal muscle cells (skMC) to primary, immortalized, or overexpressing cells. We report that skMC derived from hiPSC express the majority of the genes and proteins that cause LGMD. As a proof of concept, we demonstrate the importance of this cellular model for studying LGMDR9 by evaluating disease-specific phenotypes in skMC derived from hiPSC obtained from four patients.

Keywords: limb girdle muscular dystrophies; induced pluripotent stem cells; skeletal muscle cells; pathological modeling

1. Introduction

Limb girdle muscular dystrophies (LGMD) refer to a heterogeneous group of rare genetic neuromuscular diseases which lead to progressive weakness and wasting of proximal pelvic and shoulder girdle muscles [1–3]. With an estimated prevalence of 1.63 per 100,000 people LGMD represent the fourth most common group of muscular dystrophies [4]. From a genetic point of view, LGMD subtypes are caused by genetic alterations of various genes playing a critical role in muscle function, maintenance, and repair [5,6]. Since the first LGMD gene identification reported in 1995 [7], the number of LGMD subtypes has grown to a total of 29, according to the last revised nomenclature [8]. Classified according to their inheritance pattern, LGMD subtypes are autosomal dominant (LGMD D) or autosomal recessive (LGMD R) types affecting 27 different proteins of the nucleus, sarcoplasm, sarcomere, sarcolemma, and extracellular matrix (Table S1). While several gene replacement therapies [9–14] have been proposed over the years, no curative treatment is currently available for any types of LGMD.

Over the past decade, considerable efforts have been reported in deciphering the molecular mechanisms associated with LGMD. Understanding the multiple molecular pathways associated with LGMD requires the development of appropriate cellular and animal models that at least partially recapitulate the characteristics of these diseases. Animal models are

currently preferred to *in vitro* models for studies on muscular dystrophies [15,16] and the assessment of therapeutic strategies [17]. However, although most of these animal models recapitulate the pathological phenotypes observed in humans, some of these models appear relatively normal or with a mild dystrophic phenotype [18] or even present impairments that are not reported in patients [19]. Alternatively, over the past decades, several *in vitro* human models have been developed to study phenotypes associated with LGMD. Among these, primary skeletal muscle cells (skMC) from muscle biopsies represent the most commonly reported biological resource, despite the difficulty of their generation and their limited proliferative capacity [20]. To overcome these issues, several *in vitro* models were developed through transdifferentiation of non-muscle cells into skeletal cells by forced expression of myogenic transcription factors [21]. More recently, immortalization of primary cells with hTERT and CDK4 was reported as successful for modeling LGMD [22,23], including LGMDD4/R1 [24], LGMDR2 [25–27], and LGMDR12 [28]. While these different models present several advantages in terms of proliferation and maturity, the development of transgene-free cellular models from noninvasive procedures was proposed through the use of pluripotent stem cells.

Derived from embryos [29–32] or generated through reprogramming [33,34], pluripotent stem cells have the unique capacity to unlimitedly self-renew and differentiate into any cell type in the organism [35]. Over the years, thanks to the development of efficient protocols of differentiation for a growing number of cell types, embryonic stem cells (ES) and human induced pluripotent stem cells (hiPSC) have been reported as efficient alternative models to primary or genetically modified cells. Since their discovery in humans, respectively in 1998 and 2007, the use of these cells has been explored for a broad range of applications, leading to the identification of new molecular mechanisms [36,37], new pathological phenotypes [38–41], and the development of new therapies [42–45] (reviewed in Karagiannis et al., 2019) [46]. Although successfully applied to a number of genetic diseases, pathological modeling using pluripotent stem cells remained challenging for application to muscular disorders over almost a decade because of the lack of protocols for generating homogeneous populations of myotubes. Since 2012, several studies have reported methods to overcome this limitation by differentiating hiPSC into myogenic cells using transgene-based methods [47–49] or small molecules recapitulating developmental myogenesis [50–57]. Among these protocols, Caron et al. described a three-step process that efficiently differentiated hiPSC into mature skMC in less than 26 days using combinations of small molecules and growth factors identified by high-throughput screening [51]. Recently, several studies have highlighted the use of human pluripotent stem cells—and, more particularly, hiPSC—for studying neuromuscular disorders [58–62], including LGMD [49,63–66]. In the present study, we report that hiPSC-derived skMC provide a reliable and robust *in vitro* tool for investigating LGMD subtypes. To do so, we used a robust protocol of differentiation to generate pure populations of skeletal myoblasts (skMb) and terminally differentiated myotubes (skMt) from hiPSC [51]. Taking advantage of this model, we monitored and characterized the expression and localization of all of the genes and proteins that cause LGMD subtypes. As a proof of concept, such a cellular model was used to model LGMDR9 by analyzing alpha-dystroglycan (α -DG) glycosylation in fukutin-related protein (FKRP)-deficient skMt derived from the hiPSC of four patients.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Lines

Experiments were performed with human immortalized myoblasts from unaffected individuals or with hiPSC from control and LGMDR9-affected patients. The myoblast cell lines were established from human muscular biopsies and obtained from the MyoLine immortalization platform of the Institut de Myologie (Paris, France), with the agreement of the subjects through their signature on an informed consent form and anonymization before immortalization, in line with the EU GDPR regulation. The four cell lines used are the following: C25, AB678, AB1079, AB1167. The WT1 and WT2 hiPSC lines were

reprogrammed from healthy IMR-90 lung fibroblasts obtained from the ATCC Cell Lines Biology Collection (Washington, DC, USA) and from GM1869 provided by the Coriell Cell Repository (Camden, NJ, USA) [67,68]. The WT3 hiPSC line is a commercial cell line provided by Phenocell (Grasse, France). Wild type eGFP-tagged hiPSC lines, AICS-37 and AICS-48, were provided by the Allen Institute and distributed by the Coriell Cell Repository (Camden, NJ, USA): troponin I (TNN) and titin (TTN) were endogenously tagged with mEGFP at the C-terminus site using CRISPR-Cas9 technology. The FKRP1 hiPSC line was reprogrammed by Phenocell (Grasse, France) from LGMDR9 fibroblasts (heterozygous *FKRP* c.899T > C c.962C > A) provided by Genethon's Cell Bank (Evry, France). FKRP2 and FKRP3 hiPSC lines were also reprogrammed by Phenocell (Grasse, France) from LGMDR9 fibroblasts (heterozygous c.826C > A c.534G > T and c.826C > A c.872delA, respectively) provided by the Coriell Institute (Camden, NJ, USA). The FKRP4 hiPSC line (heterozygous c.826C > A c.135C > T) was provided by the LGMD2I Research Fund.

2.2. Cell Culture and Differentiation

Immortalized myoblasts were cultivated in a growth medium: 1 volume of 199 medium (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for 4 volumes of DMEM (Invitrogen, Waltham, MA, USA), supplemented with 20% FCS (Sigma, Saint Louis, MO, USA), 25 µg/mL fetuin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 5 ng/mL hEGF (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.5 ng/mL bFGF (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0.2 µg/mL dexamethasone (Sigma, Saint Louis, MO, USA), and 5 µg/mL insulin (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Cells were seeded on 0.1% gelatin and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Differentiation was induced at confluence by replacing the growth medium with DMEM supplemented with 10 µg/mL insulin (Sigma, Saint Louis, MO, USA) for 7 days. Control and LGMDR9 hiPSC lines were maintained and expanded using a single-cell method on feeder-free coated dishes (Matrigel, Corning, NY, USA) with iPS-Brew XF medium (Macs, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). hiPSC were differentiated into skMC following a protocol developed by GeneabioCell® (Caron et al., 2016). Briefly, hiPSC were seeded in collagen I-coated plates (Biocoat, DB Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and maintained for 10 days in skeletal muscle induction medium (SKM01, AMSBIO, Abingdon, United Kingdom) with a passage at day 7. Cells were then dissociated with 0.05% trypsin and seeded once again onto collagen I-coated plates for 7 days in skeletal myoblast medium (SKM02, AMSBIO, Abingdon, United Kingdom) until freezing. skMb were thawed on collagen I-coated glass slides in skeletal myoblast medium and incubated at confluence with skeletal muscle differentiation medium (SKM03, AMSBIO, Abingdon, United Kingdom) for 5 to 7 supplementary days. hiPSC, skMb, and skMt were analyzed at days 0, 17, and 24 of differentiation, respectively.

2.3. Flow Cytometry

A single-cell suspension of hiPSC was collected after chemical dissociation with accutase (Invitrogen, Waltham, MA, USA), centrifuged at 900 rpm for 5 min, and resuspended in 2% FBS in cold PBS. Cells were stained with fluorescent dye-conjugated antibodies for 30 min on ice and protected from light. Antibodies: APC-conjugated TRA1-80 (Millipore, Burlington, MA, USA) and PE-conjugated SSEA4 (Millipore, Burlington, MA, USA). Cells were washed in cold PBS before being sorted by a MACSquant analyzer (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany). Data were analyzed with FlowJo Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.4. Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization (m-FISH) Karyotype Analysis

Cells were blocked in metaphase with colchicine (Eurobio, Paris, France) for 90 min, warmed with a hypotonic solution, and fixed with a Carnoy fixative. A M-FISH 24Xcite probe (MetaSystems, Heidelberg, Germany) and ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used for m-FISH staining. Seventy metaphases were acquired with Metafer MetaSystems software coupled to an Axiolm-

ager Z2 (Zeiss, Oberkochen, Germany) microscope equipped with a camera cool cube and 10X and 63X objectives. Images were analyzed with Isis software (MetaSystems).

2.5. Immunofluorescence Analysis

Cells at days 0, 17, or 24 of skMc differentiation were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. For two antibodies (FKTN and TCAP), cells were pre-fixed and then fixed in cold methanol for 5 min at room temperature. After 3 washes in phosphate-buffered saline (PBS), cells were permeabilized, or not, with 0.5% Triton X-100 for 5 min and blocked in PBS solution supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma, Saint Louis, MO, USA) for 1 h at room temperature. Cells were stained for specific markers overnight at 4 °C using the antibodies listed in Table S3. After 3 washes in PBS, staining was revealed by appropriate Alexa Fluor secondary antibodies (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1:1000) in the dark for 1 h at room temperature, and nuclei were visualized with Hoechst 33,342 (Invitrogen; 1:2000). Cell imaging was carried out with a Zen Black software-associated LSM-800 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 20X or 63X objective.

2.6. Time-Lapse Imaging of skMt Differentiation

Time-lapses of skMt were recorded as previously described, from day 0 to day 5 of differentiation. Imaging of endogenous GFP-tagged titin and troponin signaling was carried out with an Incucyte® S3 Live-Cell Analysis system (Sartorius, Gottingen, Germany) or a LSM-800 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a 20X objective, using Zen Black software. Differentiation efficiency was measured as the percentage of GFP-tagged cells at each time point using ImageJ software and normalized to the total number of skMt. An algorithm was used to determine the percentage of cells when at least 50% of the area of an identified nucleus was covered by GFP staining. Differentiation efficiency was calculated from 5 random fields comprising at least 300 cells. The results are expressed as mean values \pm S.E.M. *** $p < 0.005$ (Student's *t*-test).

2.7. Quantitative PCR

Total RNAs were isolated using the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. A DNase I digestion was performed to degrade DNA in the sample. RNA levels and quality were checked using the NanoDrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the SuperScript III reverse transcription kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis was performed using a QuantStudio 12 K Flex real-time PCR system (Applied biosystem, Waltham, MA, USA) and Luminaris Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturers' instructions. Gene expression analysis was performed using the TaqMan gene expression Master Mix (Roche, Basel, Switzerland), following the manufacturer's protocol. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt method and normalized to 18S expression (Assay HS_099999). The primers and probe sequences that were designed are listed in Table S2. The sequences of the remaining genes are commercially available (Applied biosystem, Waltham, MA, USA): *DYSF* (Hs01002513), *FKRP* (Hs00748199), *TTN* (Hs00399225), *ANO5* (Hs01381106), and *DAG1* (Hs00189308).

2.8. Western Immunoblotting

Whole-cell lysate of control and LGMDR9-skMt were collected after 7 days of differentiation. Proteins were extracted with RIPA lysis buffer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 1X Protease Inhibitor-Complete ULTRA tablets mini (Roche, Basel, Switzerland) and 1X benzonase nuclease HC (Millipore, Burlington, MA, USA) for 1 h at 4 °C. Protein concentration was measured using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and the absorbance at 562 nm was evaluated using a CLARIOstar® microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). For α -DG

protein detection, a total of 130 µg of protein was loaded and run on Mini-PROTEAN 4–12% bis-tris protein gels (BioRad, Hercules, CA, USA) and then transferred to nitrocellulose membranes with a Trans-Blot Turbo Transfer system (Biorad, Hercules, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Membranes were then blocked in Odyssey blocking buffer (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) for 1 h at room temperature. Incubation with primary antibodies diluted in Odyssey blocking buffer was carried out at 4 °C for between 2 h and overnight for the mouse anti-α-DG-IIH6 1:50 (DSHB, Iowa city, IA, USA), the mouse anti-α-DG-IIH6 1:1000 (Millipore, Burlington, MA, USA), and the mouse anti-β-DG 1:200 (DSHB, Iowa city, IA, USA). Washing was carried out 3 times for 10 min at room temperature with TBS + 0.1% Tween20, and the membranes were incubated with a donkey anti-mouse antibody IRDye-800CW 1:5000 (Li-Cor, Lincoln, NE, USA) in blocking buffer. Washing was carried out, and proteins were detected by fluorescence (Odyssey, Li-Cor, Lincoln, NE, USA), following the manufacturer's instructions.

2.9. Statistical Analysis

Data are presented as means ± SD unless otherwise specified. Statistical analysis was performed using the Student's *t*-test, and *p*-values ≤ 0.05 (*), 0.01 (**), and 0.005 (***) were considered significant.

3. Results

3.1. Generation and Characterization of Skeletal Muscle Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells

The workflow to generate skMb and multinucleated skMt from hiPSC is represented in Figure 1A. First, the pluripotency capacities of three healthy hiPSC lines (WT1,2,3) were characterized by analyzing the expression of Oct4 and Nanog through immunostaining (Figure 1B) and quantifying SSEA4/TRA1-80 by flow cytometry (Figure S1). Myogenic differentiation was then induced using a three-step protocol of differentiation [51]. Briefly, SKM01 medium was used for 10 days to initiate the differentiation of hiPSC into myogenic precursors before their maturation into myoblasts in SKM02 medium and their terminal differentiation into myotubes in SKM03 medium. To demonstrate the efficacy and robustness of this protocol of differentiation, MyoD and desmin expressions were assessed by immunostaining in skMb, showing homogeneity of labeling (Figure 1C). Terminal differentiation of skMt was then characterized by measuring the expression of myogenin and titin by immunostaining (Figure 1D). To quantify gene expression changes throughout the differentiation protocol, the same markers were monitored by qPCR, revealing, on the one hand, a significant time-dependent decrease in *Oct4* and *Nanog* in skMb and skMt compared to hiPSC (Figure 1E) and, on the other hand, a significant induction of *MyoD*, *desmin*, *MyoG*, and *titin* in skMb and skMt (Figure 1F,G).

To further characterize the terminal differentiation of skMt derived from hiPSC and visualize sarcomeric structure formation in real time, we used two gene-edited hiPSC lines expressing titin (TTN) or troponin I (TNN) proteins fused to GFP (AICS-48 and AIC-37). After having validated their pluripotency capacities by measuring the expression of SSEA4/TRA1-80 using flow cytometry (Figure S2A), TTN-GFP and TNN-GFP hiPSC were differentiated using the same protocol. Analysis by qPCR confirmed the efficient myogenic differentiation of these cells by showing a significant decrease in *Oct4* and *Nanog* expression in skMb and skMt compared to undifferentiated hiPSC (Figure S2B) and a significant increase in *MyoD*, *desmin*, *MyoG*, and *titin* in skMb and skMt (Figure S2B). Terminal differentiation of TTN-GFP and TNN-GFP skMt was then followed in real time using a time-lapse analysis of GFP expression from day 0 to day 7 (Movies S1 and S2). Confocal microscopy analysis of GFP expression and localization in skMt derived from these two hiPSC cell lines revealed the appearance of GFP in both cell lines from day 3 onwards (Figure 2A). Quantification of GFP-positive cells showed that half of the cells expressed GFP from day 3 of maturation and up to 80% at day 5 (Figure 2B,C). Organization of the sarcomeric structures in skMt was further analyzed by characterizing the Z-disk,

I-band, and M-line using specific antibodies, as shown in Figure 2D. Confocal analysis of immunostaining and the GFP signal was performed in TTN-GFP skMt (Figure 2E) and TNN-GFP skMt (Figure S2C), revealing a regular, transverse, and repetitive organization of sarcomeres. Finally, quantification of TTN-GFP skMt presenting a striated pattern revealed a time-dependent maturation from 40% at day 2 to 80% at day 5 (Figure 2F).

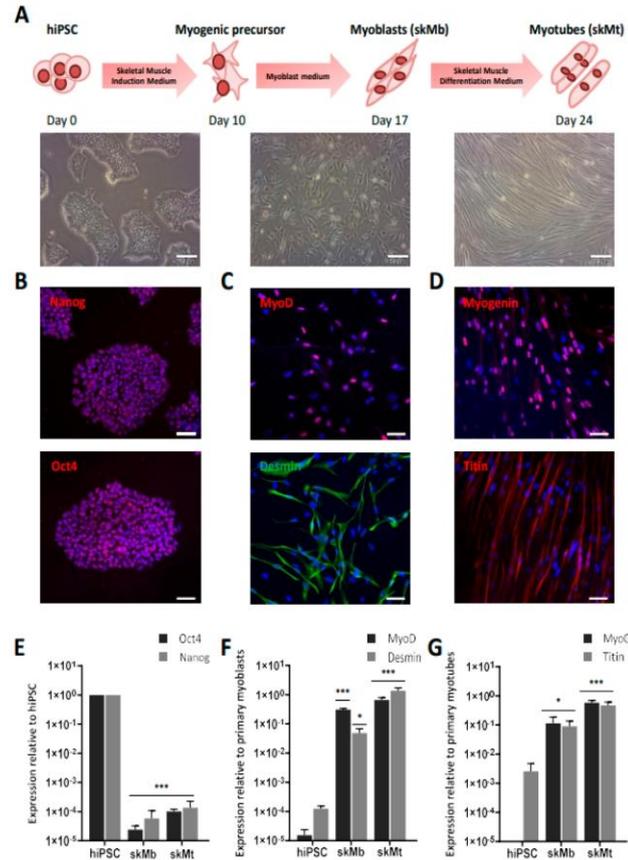


Figure 1. Differentiation of hiPSC into skMC. (A) Experimental workflow of skMC differentiation from hiPSC using the Genea Biocells protocol. Representative pictures of hiPSC, skeletal myoblasts (skMb), and myotubes (skMt) with bright field acquisition. Scale bar = 50 μ m. (B) Characterization of the expression of pluripotency markers Oct4 and Nanog by immunostaining in hiPSC (C) Characterization of the expression of MyoD and desmin by immunostaining in skMb (D) Characterization of the expression of MyoG and titin by immunostaining in skMt. Nuclei are labeled by Hoechst staining (blue). Scale bar = 50 μ m. (E) Measurement of *Oct4* and *Nanog* expression by qPCR in hiPSC, skMb, and skMt. (F) Measurement of *MyoD* and *desmin* expression by qPCR in hiPSC, skMb, and skMt. (G) Measurement of *MyoG* and *titin* expression by qPCR in hiPSC, skMb, and skMt. Gene expression analyses are normalized to hiPSC, primary myoblasts, or primary myotubes. Data are shown as the mean of skMC differentiations of three control cell lines +/- SD. * $0.01 < p \leq 0.05$ or *** $p \leq 0.005$ (Student's *t*-test). Abbreviations: hiPSC, human induced pluripotent stem cells; skMb, skeletal myoblasts; skMt, skeletal myotubes; MyoG, myogenin.

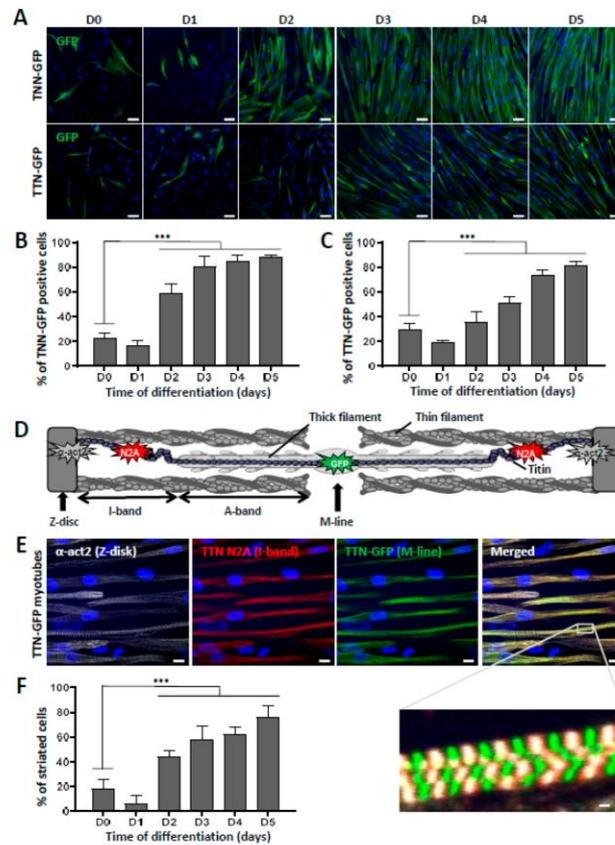


Figure 2. Striation pattern appears during terminal myogenic differentiation. (A–C): Troponin I(TNN)- and titin(TTN)-eGFP dynamics during myotube maturation. (A) Confocal images of TNN- and TTN-eGFP-tagged cell lines were obtained from day 0 to day 5 after induction of myotube maturation. Nuclei were labeled by Hoechst staining. Scale bar = 50 μ m. Quantification of the percentage of cells terminally differentiated, presented as the percentage of (B) TNN- or (C) TTN-positive cells out of the total number of myotubes. Each chart represents the mean \pm SD (n = 5) for a representative experiment; *** $p \leq 0.005$ (Student’s *t*-test). (D–F): Analysis of sarcomeric organization during myotube maturation. (D) Schematic representation of sarcomeric architecture in skeletal muscle: Z-disk composed of α -actinin, I-band made up of actin thin filaments, A-band comprised of myosin thick filaments, and the M-line where filaments are anchored. Titin spans the entire half-sarcomere: from the Z-disk with the N-terminal extremity to the M-line, by way of the I-band, specifically recognized by the titin N2A antibody. (E) Immunofluorescent staining and confocal acquisition of sarcomere structures with TTN-eGFP-tagged cells at day 5 of myotube maturation. Nuclei are labeled by Hoechst staining. Scale bar = 10 μ m. White box denotes an enlargement of co-staining to visualize the cross-striation pattern of myotubes. Scale bar = 1 μ m. (F) Quantification of the number of striated cells relative to the total number of skMt during time course differentiation of the TTN-eGFP-tagged cell line. Each chart represents the mean \pm SD (n = 10) for a representative experiment; *** $p \leq 0.005$ (Student’s *t*-test). Abbreviations: TNN, troponin I; TTN, titin; α -act2, alpha-actinin-2.

3.2. Characterization of LGMD Genes and Proteins in Myotubes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Mutations in 27 genes are reported to cause 29 distinct LGMD (Table S1). The expression of these 27 genes was measured by qPCR in skMt derived from three healthy hiPSC lines (WT1,2,3) and myotubes derived from four healthy immortalized myoblast cell lines (C25, AB678, AB1079, AB1167) (Figure 3). Given that collagen type 6 is composed of three genetic components, from alpha 1 to alpha 3 chains, three genes were monitored for this LGMD subtype, resulting in a total of 29 genes measured by gene expression in these two sources of myotubes. Analysis of this qPCR revealed similar levels of expression for the majority of these genes, both in skMt and immortalized myotubes: *DNAJB6*, *TNPO3*, *HNRNPDL*, *CAPN3*, *COL6A3*, *DYSF*, *SGCB*, *SGCG*, *SGCD*, *TCAP*, *TRIM32*, *POMT1*, *FKTN*, *POMT2*, *DAG1*, *TRAPPC11*, *GMPPB*, and *POGLUT1*. Among these 29 genes, two genes revealed significant differences (10x fold change); on the one hand, *ANO5*, which was upregulated in skMt and, on the other hand, *LAMA2*, which was significantly upregulated in immortalized myotubes.

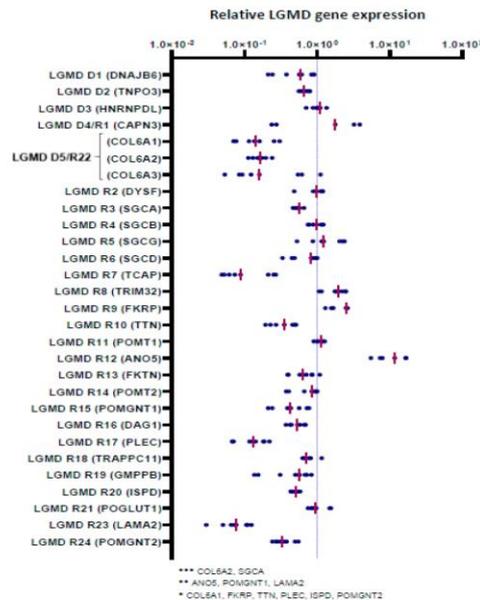


Figure 3. Gene expression analysis of LGMD genes in skMt. Gene expression analysis of LGMD genes in skMt derived from three healthy hiPSC lines (WT1,2,3) at day 7 of myotube maturation. Fold changes (on log 10 scale) for $\Delta\Delta CT$, relative to myotubes derived from four healthy primary myoblast cell lines (C25, AB678, AB1079, AB1167), are plotted as a group of data points and organized by gene according to the last revised LGMD classification. The pink horizontal line in each group of data points represents the mean for the group; * $0.01 < p \leq 0.05$ or ** $0.005 < p \leq 0.01$ or *** $p < 0.005$. Abbreviations: *ANO5*, anoctamin 5; *CAPN3*, calpain 3; *COL6*, collagen 6; *DAG1*, dystroglycan 1; *DNAJB6*, DnaJ heat shock protein family member B6; *DYSF*, dysferlin; *FKRP*, fukutin-related protein; *FKTN*, fukutin; *GMPPB*, GDP-mannose pyrophosphorylase B; *HNRNPDL*, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like; *ISPD*, isoprenoid synthase domain-containing protein; *LAMA2*, laminin subunit alpha 2; *PLEC*, plectin; *POGLUT1*, protein O-glycosyltransferase 1; *POMGNT*, protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase; *POMT*, protein O-mannosyltransferase; *SGC*, sarcoglycan; *TCAP*, titin-cap; *TNPO3*, transportin 3; *TRAPPC11*, trafficking protein particle complex subunit 11; *TRIM32*, tripartite motif-containing 32; *TTN*, titin.

We then evaluated the expression of the corresponding proteins by immunostaining in skMt derived from one representative control hiPSC line (Figure 4). Confocal analysis of the expression of the dystrophin-associated glycoprotein complex (DGC) components revealed positive staining of dystroglycan 1 (DAG1) and beta, delta, and gamma sarcoglycans (SGCB, SGCD, and SGCG), while the alpha subunit (SGCA) was not detected in skMt. Analysis of sarcomeric components showed positive expression and localization within sarcomeres of calpain-3 (CAPN3), telethonin (TCAP), and titin (TTN), while a more diffuse, cross-striated pattern of plectin (PLEC) was also detected in skMt. We then evaluated the expression of proteins involved in DG glycosylation. Immunostaining of POMT2, POGLUT1, and FKRP showed a punctiform perinuclear localization of proteins, while localization was cytoplasmic for POMGnt1 and 2, POMT1, FKTN, GMPBB, and ISPD. Regarding the proteins involved in trafficking, analysis of dysferlin expression by immunostaining revealed the presence of the protein at the plasma membrane and also in the cytoplasm of skMt, whereas TNPO3 and TRAPPC11 labeling was cytoplasmic. Staining of DNAJB6 resulted in a signal in the nucleus and the cytoplasm, whereas that of anoctamin 5 (ANO5/TMEM16E) and tripartite motif-containing protein 32 (TRIM32) revealed a punctiform signal in the cytoplasm. With regard to the nuclear HNRNPDL protein, staining was observed in the nucleus of skMt, as expected. Finally, analysis of the extracellular matrix proteins performed in non-permeabilized conditions confirmed the presence of laminin-2 (LAMA2) in the sarcolemma. Immunostaining of collagen 6 alpha subunits 1–3 (COL6A1, COL6A2, COL6A3) revealed a punctiform signal across skMt. Altogether, qPCR and immunostaining data show that hiPSC-derived skMt express the majority of LGMD genes at a comparable level to immortalized myotubes and that the related encoded proteins are present in the expected cellular compartment.

3.3. Derivation and Characterization of Myotubes from FKRP-Deficient Human Induced Pluripotent Stem Cells

As a proof of concept, we investigated the pathological features of LGMDR9 using hiPSC. To do so, a hiPSC cell line from one patient was provided by the LGMD2I Research Fund, and three additional hiPSC lines carrying mutations in the *FKRP* gene were generated by reprogramming patient cells. Pluripotency of the four LGMDR9 hiPSC lines was confirmed by measuring the expression of *Oct4* and *Nanog* using qPCR (Figure S3A) and immunostaining (Figure 5A). The pluripotency status of these hiPSC lines was also validated by measuring the expression of SSEA4 and TRA1-80 using flow cytometry (Figure S3B). Finally, chromosomal stability was analyzed using the multiplex fluorescence in situ hybridization (m-FISH) technique, revealing the absence of significant abnormalities (Figure S3C). Following this quality control assessment, the four FKRP-deficient hiPSC lines were further differentiated into skMb and skMt and compared to one representative healthy hiPSC line. Molecular characterization of skMb derived from FKRP-deficient hiPSC revealed no difference from the healthy skMb in terms of MyoD expression (Figure S4A). FKRP-deficient skMb were secondarily differentiated into skMt, showing positive sarcomeric staining for myosin heavy chain (MHC), titin, and α -actinin (Figure 5B and Figure S4B), which suggested that the absence of FKRP does not affect either the initial or the terminal stages of differentiation. Analysis of α -DG glycosylation was then performed by immunostaining in FKRP-deficient skMt and compared to the representative healthy relatives. Confocal analyses of IIIH6 staining revealed the absence of a glycosylated α -DG signal in the FKRP1 line (c.899T > C c.962C > A mutation) but not in the other cell lines (FKRP2,3,4) when compared to the healthy control (Figure 5B). This result was subsequently confirmed by Western blot, showing that IIIH6 staining was decreased in the same cell line (Figure 5C).

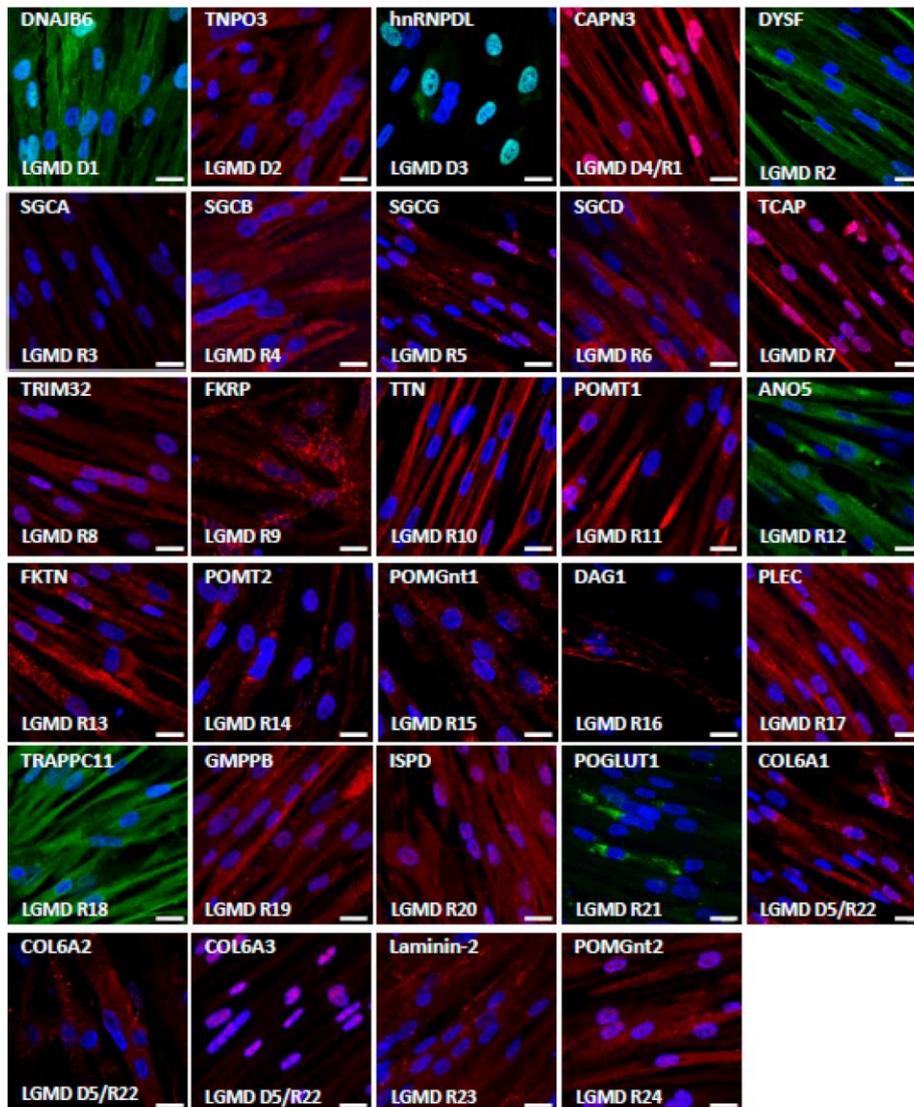


Figure 4. Characterization of LGMD proteins in skMt. Representative images of LGMD protein immunostaining in skMt derived from one control hiPSC line at day 5 of maturation. Nuclei are labeled by Hoechst staining. Scale bar = 20µm. Abbreviations: ANO5, anoctamin 5; CAPN3, calpain 3; COL6, collagen 6; DAG1, dystroglycan 1; DNAJB6, Dnaj heat shock protein family member B6; DYSF, dysferlin; FKRP, fukutin-related protein; FKTN, fukutin; GMPPB, GDP-mannose pyrophosphorylase B; hnRNPD, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like; ISPD, isoprenoid synthase domain-containing protein; LAMA2, laminin subunit alpha 2; PLEC, plectin; POGLUT1, protein O-glucosyltransferase 1; POMGnt, protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase; POMT, protein O-mannosyltransferase; SGC, sarcoglycan; TCAP, titin-cap; TNPO3, transportin 3; TRAPPC11, trafficking protein particle complex subunit 11; TRIM32, tripartite motif-containing 32; TTN, titin.

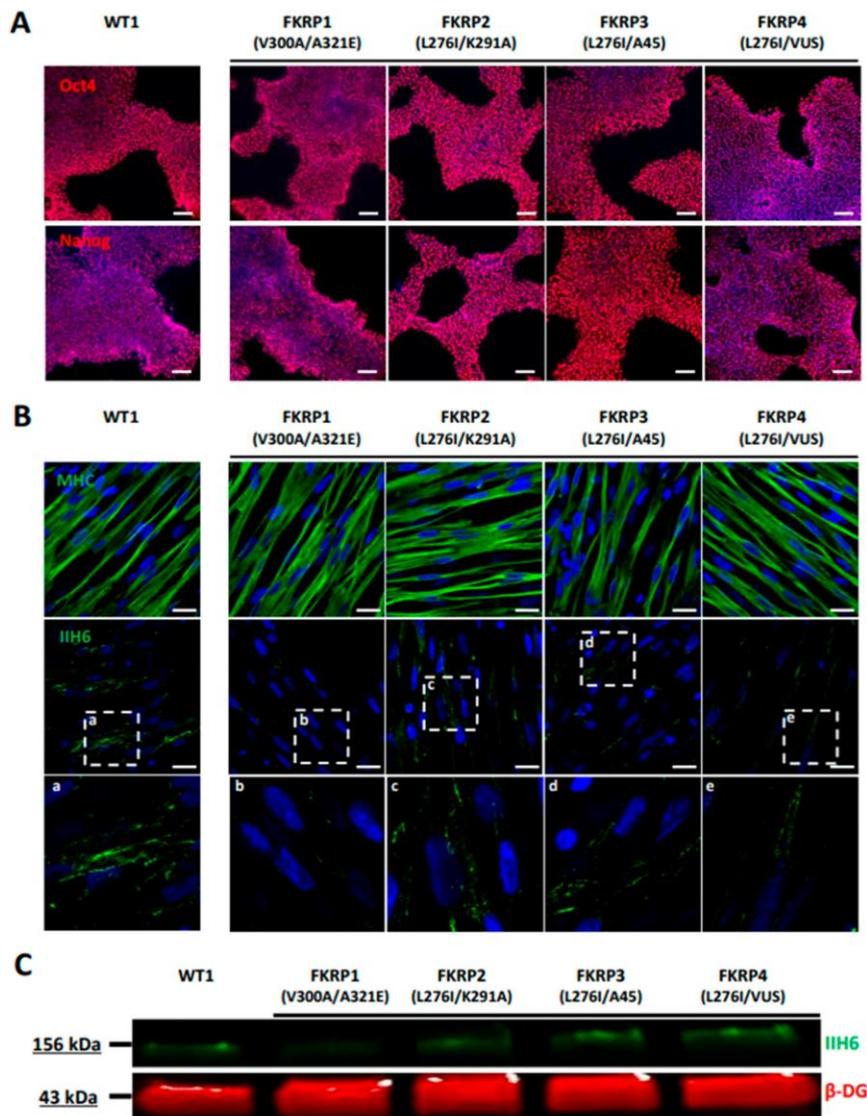


Figure 5. Differentiation and characterization of LGMDR9-affected hiPSC into SkMC. (A) Immunostaining analysis of Oct4 and Nanog in one control and four LGMDR9 hiPSC lines at day 0 of differentiation. (B) Immunostaining images of MHC (upper panel) and α -DG glycosylation with IIH6 antibody (middle panel) in one control and four LGMDR9-derived skMt at day 24 of differentiation. White boxes, annotated from “a” to “e”, delineate enlargement of IIH6 staining to visualize higher magnification of α -DG glycosylation in the bottom panel. Nuclei are labeled by Hoechst staining. Scale bar = 20 μ m. (C) Immunoblot analysis of α -DG glycosylation in skMt at day 24 of differentiation. β -DG was used as the loading control. Abbreviations: MHC, myosin heavy chain; β -DG, beta-dystroglycan.

4. Discussion

The main result of this study is the demonstration that myotubes derived from hiPSC can be used as a common biological resource to study a variety of LGMD. Following terminal differentiation, we reveal here that skMt are sufficiently mature to express the majority of LGMD-causing genes as well as their related encoded proteins, comparably to immortalized myotubes obtained from muscle biopsies. As a proof-of-concept study, we further demonstrated that skMt derived from FKRP-deficient hiPSC express the hallmark of LGMDR9 according to their mutations. Altogether, our results demonstrate that hiPSC represent a valuable unlimited resource for modeling LGMD and assessing in vitro efficacy of future LGMD therapies.

While similar in terms of clinical features, LGMD represent a highly heterogeneous group of diseases. Despite the high number of clinical or molecular studies of LGMD subtypes, our current knowledge of the molecular mechanisms underlying these diseases poses many challenges. In this context, the development of a common cellular platform to compare pathological pathways in multiple LGMD would provide a major step forward in their comprehension. So far, hiPSC have been used to explore individual LGMD [64,66], but no studies have documented the possibility of using these cells for all types of LGMD. A first study using hiPSC to model one LGMD was reported in 2013 [49]. In this proof-of-concept study, the authors showed that LGMDR2 hiPSC-derived myotubes obtained by stable genomic MyoD1 induction exhibited a defective membrane repair capacity following laser lesion that was rescued by full-length dysferlin gene transfer. More recently, El-Battrawy et al. [63] explored ion channel dysfunctions in cardiomyocytes derived from LGMDR9 hiPSC and successfully identified a significant reduction of systolic and diastolic intracellular calcium concentrations in those cells compared to healthy cells. In our study, we explored the possibility of going further by using hiPSC derivatives to model all LGMD genetic subtypes. To do so, we first evaluated the level of expression of all of the genes that cause LGMD and related proteins in myotubes differentiated from healthy hiPSC. qPCR and immunostaining data revealed that the majority of these genes and proteins were expressed in hiPSC-derived skMt at similar levels to primary myotubes. Beyond the overview of the LGMD that can be studied using hiPSC, this result suggests the use of hiPSC-derived skMt as a platform to improve our understanding of common pathways or phenotypes of several LGMD in a unique cellular model. Although useful to decipher pathological mechanisms or the development of new therapies, two-dimensional (2D) culture models of skeletal muscle cannot fully recapitulate the organization and the function of living muscle tissues, as shown with the recent development of functional 3D muscle tissues such as “myo bundles” [69].

As a proof of concept, we then generated and studied hiPSC carrying several mutations of the *FKRP* gene. Genetic variants in the *FKRP* gene cause a broad spectrum of phenotypes in LGMDR9 patients [70], ranging from mild muscle weakness and atrophy to more severe symptoms, with loss of ambulation, dilated cardiomyopathy, and respiratory [71] and mental impairment [72]. From a molecular perspective, FKRP is involved in α -DG glycosylation, as shown by Brockington et al. [73]. While the regulation of α -DG glycosylation appears to be a valuable therapeutic target for the treatment of LGMDR9 [74], other studies indicate, on the one hand, that several *FKRP* mutations do not affect α -DG glycosylation [75] and, on the other hand, that there is no correlation between the severity of LGMDR9 and α -DG glycosylation [76]. Taken together, these studies suggest that the detailed molecular mechanisms underpinning muscular symptoms and pathological pathways in LGMDR9 are still to be elucidated. In our study, we used one hiPSC line provided by the LGMD2I Research Fund and generated three extra hiPSC lines with different mutations. After differentiation into skMt, our results confirmed that the absence of FKRP does not lead to a systematic decrease in α -DG glycosylation in LGMDR9. Only one cell line (FKRP1 with the V300A/A321E mutation) was shown to affect this phenotype, in line with previous studies [75].

5. Conclusions

In the current study, we demonstrated that skMt derived from hiPSC can be used to model a large panel of LGMD. We showed that almost all genes and proteins involved in LGMD were expressed. We also demonstrated the biological relevance of this model derived from hiPSC through its ability to recapitulate the pathological phenotype identified for LGMDR9. Overall, this study opens up new perspectives on the use of this cellular model to study molecular mechanisms associated with LGMD but also for the development of high-content phenotypic assays and associated drug screenings.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10061428/s1>, Figure S1. Pluripotency characterization of control hiPSC lines Figure S2. Molecular characterization of TNN- and TTN-eGFP hiPSC and skMC Figure S3. Characterization of control and LGMDR9-affected hiPSC Figure S4. Characterization of FKRP-affected hiPSC differentiation into SkMC. Movie S1. Troponin I-eGFP skMt maturation. Movie S2. Titin-eGFP skMt maturation Table S1. Classification and nomenclature of LGMD. Table S2. Primers used for the measurement of the 27 genes causing LGMD by qPCR Table S3. Antibodies used for immunostaining of the 27 proteins causing LGMD.

Author Contributions: X.N. and I.R. were responsible for the experimental design and project management. C.B. and M.G. performed the characterization of TTN and TNN hiPSC differentiations. C.B., M.G., M.B., E.P., L.H. and E.G. developed the hiPSC differentiation protocol and carried out molecular analysis of LGMD genes and proteins. M.B. generated, characterized, and differentiated FKRP-deficient cells. J.D. generated the immortalized cells. C.B., X.N. and I.R. wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: I-Stem and Genethon are part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases, supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This research was funded by grants from INSERM, the domaine d'intérêt majeur (DIM) Biothérapies, université Paris-Saclay, Genopole, and the European Commission. The authors thank Marc Peschanski (I-Stem) for helpful discussions, the "technological research team" of I-Stem and Marine Faivre (Genethon) for technical support; and the Platform for Immortalization of Human Cells from the Centre of Research in Myology, Institute of Myology, Paris for providing immortalized muscular cells. In memory of our friend and colleague Jackie Gide.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Guglieri, M.; Straub, V.; Bushby, K.; Lochmüller, H. Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *Curr. Opin. Neurol.* **2008**, *21*, 576–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nigro, V.; Savarese, M. Genetic Basis of Limb-Girdle Muscular Dystrophies: The 2014 Update. *Acta Myol.* **2014**, *33*, 1–12. [[PubMed](#)]
3. Walton, J.N.; Nattrass, F.J. On the Classification, Natural History and Treatment of the Myopathies. *Brain* **1954**, *77*, 169–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mah, J.K.; Korngut, L.; Fiest, K.M.; Dykeman, J.; Day, L.J.; Pringsheim, T.; Jette, N. A Systematic Review and Meta-Analysis on the Epidemiology of the Muscular Dystrophies. *Can. J. Neurol. Sci.* **2016**, *43*, 163–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Liewluck, T.; Milone, M. Untangling the Complexity of Limb-girdle Muscular Dystrophies. *Muscle Nerve* **2018**, *58*, 167–177. [[CrossRef](#)]
6. Wicklund, M.P.; Kissel, J.T. The Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *Neurol. Clin.* **2014**, *32*, 729–749. [[CrossRef](#)]
7. Richard, I.; Broux, O.; Fougereuse, F.; Chiannikulchai, N.; Bourg, N.; Brenguier, L.; Devaud, C.; Pasturaud, P.; Roudaut, C.; Hillaire, D.; et al. Mutations in the Proteolytic Enzyme Calpain 3 Cause Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. *Cell* **1995**, *81*, 27–40. [[CrossRef](#)]

8. Straub, V.; Murphy, A.; Udd, B.; Corrado, A.; Aymé, S.; Bönneman, C.; de Visser, M.; Hamosh, A.; Jacobs, L.; Khizanishvili, N.; et al. 229th ENMC International Workshop: Limb Girdle Muscular Dystrophies—Nomenclature and Reformed Classification Naarden, The Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscul. Disord.* **2018**, *28*, 702–710. [[CrossRef](#)]
9. Holt, K.H.; Lim, L.E.; Straub, V.; Venzke, D.P.; Duclos, F.; Anderson, R.D.; Davidson, B.L.; Campbell, K.P. Functional Rescue of the Sarcoglycan Complex in the BIO 14.6 Hamster Using δ -Sarcoglycan Gene Transfer. *Mol. Cell* **1998**, *1*, 841–848. [[CrossRef](#)]
10. Li, J.; Dressman, D.; Tsao, Y.P.; Sakamoto, A.; Hoffman, E.P.; Xiao, X. RAAV Vector-Mediated Sarcoglycan Gene Transfer in a Hamster Model for Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Gene* **1999**, *6*, 74–82. [[CrossRef](#)]
11. Xiao, X.; Li, J.; Tsao, Y.-P.; Dressman, D.; Hoffman, E.P.; Watchko, J.F. Full Functional Rescue of a Complete Muscle (TA) in Dystrophic Hamsters by Adeno-Associated Virus Vector-Directed Gene Therapy. *J. Virol.* **2000**, *74*, 1436–1442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Allamand, V.; Donahue, K.M.; Straub, V.; Davisson, R.L.; Davidson, B.L.; Campbell, K.P. Early Adenovirus-Mediated Gene Transfer Effectively Prevents Muscular Dystrophy in Alpha-Sarcoglycan-Deficient Mice. *Gene* **2000**, *7*, 1385–1391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bartoli, M.; Roudaut, C.; Martin, S.; Fougerousse, F.; Suel, L.; Poupiot, J.; Gicquel, E.; Noulet, F.; Danos, O.; Richard, I. Safety and Efficacy of AAV-Mediated Calpain 3 Gene Transfer in a Mouse Model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. *Mol. Ther.* **2006**, *13*, 250–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sondergaard, P.C.; Griffin, D.A.; Pozsgai, E.R.; Johnson, R.W.; Grose, W.E.; Heller, K.N.; Shontz, K.M.; Montgomery, C.L.; Liu, J.; Clark, K.R.; et al. AAV-Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2015**, *2*, 256–270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Allamand, V. Animal Models for Muscular Dystrophy: Valuable Tools for the Development of Therapies. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2459–2467. [[CrossRef](#)]
16. Ng, R.; Banks, G.B.; Hall, J.K.; Muir, L.A.; Ramos, J.N.; Wicki, J.; Odom, G.L.; Konieczny, P.; Seto, J.; Chamberlain, J.R.; et al. Animal Models of Muscular Dystrophy. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2012**, *105*, 83–111. [[CrossRef](#)]
17. McGreevy, J.W.; Hakim, C.H.; McIntosh, M.A.; Duan, D. Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy: From Basic Mechanisms to Gene Therapy. *Dis. Models Mech.* **2015**, *8*, 195–213. [[CrossRef](#)]
18. Ackroyd, M.R.; Skordis, L.; Kaluarachchi, M.; Godwin, J.; Prior, S.; Fidanboyly, M.; Piercy, R.J.; Muntoni, F.; Brown, S.C. Reduced Expression of Fukutin Related Protein in Mice Results in a Model for Fukutin Related Protein Associated Muscular Dystrophies. *Brain* **2008**, *132*, 439–451. [[CrossRef](#)]
19. Vafiadaki, E.; Reis, A.; Keers, S.; Harrison, R.; Anderson, L.V.B.; Raffelsberger, T.; Ivanova, S.; Hoger, H.; Bittner, R.E.; Bushby, K.; et al. Cloning of the Mouse Dysferlin Gene and Genomic Characterization of the SJL-Dysf Mutation. *Neuroreport* **2001**, *12*, 625–629. [[CrossRef](#)]
20. Aas, V.; Bakke, S.S.; Feng, Y.Z.; Kase, E.T.; Jensen, J.; Bajpeyi, S.; Thoresen, G.H.; Rustan, A.C. Are Cultured Human Myotubes Far from Home? *Cell Tissue Res.* **2013**, *354*, 671–682. [[CrossRef](#)]
21. Bar-Nur, O.; Gerli, M.F.M.; Di Stefano, B.; Almada, A.E.; Galvin, A.; Coffey, A.; Huebner, A.J.; Feige, P.; Verheul, C.; Cheung, P.; et al. Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Skeletal Muscle Progenitors. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 1505–1521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mamchaoui, K.; Trollet, C.; Bigot, A.; Negroni, E.; Chaouch, S.; Wolff, A.; Kandalla, P.K.; Marie, S.; Di Santo, J.; St Guily, J.L.; et al. Immortalized Pathological Human Myoblasts: Towards a Universal Tool for the Study of Neuromuscular Disorders. *Skelet. Muscle* **2011**, *1*, 34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Thorley, M.; Duguez, S.; Mazza, E.M.C.; Valsoni, S.; Bigot, A.; Mamchaoui, K.; Harmon, B.; Voit, T.; Mouly, V.; Duddy, W. Skeletal Muscle Characteristics Are Preserved in HTERT/Cdk4 Human Myogenic Cell Lines. *Skelet. Muscle* **2016**, *6*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Lasa-Elgarresta, J.; Mosqueira-Martín, L.; González-Imaz, K.; Marco-Moreno, P.; Gerenu, G.; Mamchaoui, K.; Mouly, V.; López de Munain, A.; Vallejo-Illarramendi, A. Targeting the Ubiquitin-Proteasome System in Limb-Girdle Muscular Dystrophy With CAPN3 Mutations. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 822563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cea, L.A.; Bevilacqua, J.A.; Arriagada, C.; Cárdenas, A.M.; Bigot, A.; Mouly, V.; Sáez, J.C.; Caviades, P. The Absence of Dysferlin Induces the Expression of Functional Connexin-Based Hemichannels in Human Myotubes. *BMC Cell Biol.* **2016**, *17*, 15. [[CrossRef](#)]
26. Carmelle, R.; Bouvet, F.; Tan, S.; Croissant, C.; Gounou, C.; Mamchaoui, K.; Mouly, V.; Brisson, A.R.; Bouter, A. Membrane Repair of Human Skeletal Muscle Cells Requires Annexin-A5. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* **2016**, *1863*, 2267–2279. [[CrossRef](#)]
27. Philippi, S.; Bigot, A.; Marg, A.; Mouly, V.; Spuler, S.; Zacharias, U. Dysferlin-Deficient Immortalized Human Myoblasts and Myotubes as a Useful Tool to Study Dysferlinopathy. *PLoS Curr.* **2012**, *4*, RRN1298. [[CrossRef](#)]
28. Chandra, G.; Defour, A.; Mamchoui, K.; Pandey, K.; Mishra, S.; Mouly, V.; Sreetama, S.; Mahad Ahmad, M.; Mahjneh, I.; Morizono, H.; et al. Dysregulated Calcium Homeostasis Prevents Plasma Membrane Repair in Anoctamin 5/TMEM16E-Deficient Patient Muscle Cells. *Cell Death Discov.* **2019**, *5*, 118. [[CrossRef](#)]
29. Evans, M.J.; Kaufman, M.H. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature* **1981**, *292*, 154–156. [[CrossRef](#)]
30. Martin, G.R. Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 7634–7638. [[CrossRef](#)]

31. Shambloot, M.J.; Axelman, J.; Wang, S.; Bugg, E.M.; Littlefield, J.W.; Donovan, P.J.; Blumenthal, P.D.; Huggins, G.R.; Gearhart, J.D. Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Human Primordial Germ Cells. *Dev. Biol.* **1998**, *95*, 13726–13731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Sci. New Ser.* **1998**, *282*, 1145–1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872. [[CrossRef](#)]
35. Wobus, A.M.; Boheler, K.R. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 635–678. [[CrossRef](#)]
36. Laustriat, D.; Gide, J.; Barrault, L.; Chautard, E.; Benoit, C.; Auboeuf, D.; Boland, A.; Battail, C.; Artiguenave, F.; Deleuze, J.-F.; et al. In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2015**, *4*, e262. [[CrossRef](#)]
37. Nissan, X.; Blondel, S.; Navarro, C.; Maury, Y.; Denis, C.; Girard, M.; Martinat, C.; De Sandre-Giovannoli, A.; Levy, N.; Peschanski, M. Unique Preservation of Neural Cells in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Is Due to the Expression of the Neural-Specific MiR-9 MicroRNA. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 1–9. [[CrossRef](#)]
38. Allouche, J.; Bellon, N.; Saidani, M.; Stanchina-Chatrousse, L.; Masson, Y.; Patwardhan, A.; Gilles-Marsens, F.; Delevoye, C.; Domingues, S.; Nissan, X.; et al. In Vitro Modeling of Hyperpigmentation Associated to Neurofibromatosis Type 1 Using Melanocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 9034–9039. [[CrossRef](#)]
39. Estronca, L.; Francisco, V.; Pitrez, P.; Honório, I.; Carvalho, L.; Vazão, H.; Blerch, J.; Rai, A.; Nissan, X.; Simon, U.; et al. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Vascular Networks to Screen Nano–Bio Interactions. *Nanoscale Horiz.* **2021**, *6*, 245–259. [[CrossRef](#)]
40. Lo Cicero, A.; Saidani, M.; Allouche, J.; Egesipe, A.L.; Hoch, L.; Bruge, C.; Sigaudy, S.; De Sandre-Giovannoli, A.; Levy, N.; Baldeschi, C.; et al. Pathological Modelling of Pigmentation Disorders Associated with Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) Revealed an Impaired Melanogenesis Pathway in IPS-Derived Melanocytes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9112. [[CrossRef](#)]
41. Moreau, A.; Reisque, J.; Delanoe-Ayari, H.; Pierre, M.; Janin, A.; Deliniere, A.; Bessière, F.; Meli, A.C.; Charrabi, A.; Lafont, E.; et al. Deciphering DSC2 Arrhythmogenic Cardiomyopathy Electrical Instability: From Ion Channels to ECG and Tailored Drug Therapy. *Clin. Transl. Med.* **2021**, *11*, e319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Egesipe, A.-L.; Blondel, S.; Lo Cicero, A.; Jaskowiak, A.-L.; Navarro, C.; Sandre-Giovannoli, A.D.; Levy, N.; Peschanski, M.; Nissan, X. Metformin Decreases Progerin Expression and Alleviates Pathological Defects of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome Cells. *npj Aging Mech. Dis.* **2016**, *2*, 16026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Harhour, K.; Navarro, C.; Depetris, D.; Mattei, M.; Nissan, X.; Cau, P.; De Sandre-Giovannoli, A.; Lévy, N. MG 132-induced Progerin Clearance Is Mediated by Autophagy Activation and Splicing Regulation. *EMBO Mol. Med.* **2017**, *9*, 1294–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Lo Cicero, A.; Jaskowiak, A.-L.; Egesipe, A.-L.; Tournois, J.; Brinon, B.; Pitrez, P.R.; Ferreira, L.; de Sandre-Giovannoli, A.; Levy, N.; Nissan, X. A High Throughput Phenotypic Screening Reveals Compounds That Counteract Premature Osteogenic Differentiation of HGPS IPS-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Pitrez, P.R.; Estronca, L.; Monteiro, L.M.; Colell, G.; Vazão, H.; Santinha, D.; Harhour, K.; Thornton, D.; Navarro, C.; Egesipe, A.-L.; et al. Vulnerability of Progeroid Smooth Muscle Cells to Biomechanical Forces Is Mediated by MMP13. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4110. [[CrossRef](#)]
46. Karagiannis, P.; Takahashi, K.; Saito, M.; Yoshida, Y.; Okita, K.; Watanabe, A.; Inoue, H.; Yamashita, J.K.; Todani, M.; Nakagawa, M.; et al. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 79–114. [[CrossRef](#)]
47. Darabi, R.; Arpke, R.W.; Irion, S.; Dimos, J.T.; Grskovic, M.; Kyba, M.; Perlingeiro, R.C.R. Human ES- and IPS-Derived Myogenic Progenitors Restore DYSTROPHIN and Improve Contractility upon Transplantation in Dystrophic Mice. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 610–619. [[CrossRef](#)]
48. Maffioletti, S.M.; Gerli, M.F.M.; Ragazzi, M.; Dastidar, S.; Benedetti, S.; Loperfido, M.; VandenDriessche, T.; Chuah, M.K.; Tedesco, F.S. Efficient Derivation and Inducible Differentiation of Expandable Skeletal Myogenic Cells from Human ES and Patient-Specific IPS Cells. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 941–958. [[CrossRef](#)]
49. Tanaka, A.; Woltjen, K.; Miyake, K.; Hotta, A.; Ikeya, M.; Yamamoto, T.; Nishino, T.; Shoji, E.; Sehara-Fujisawa, A.; Manabe, Y.; et al. Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human IPS Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy In Vitro. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61540. [[CrossRef](#)]
50. Borchin, B.; Chen, J.; Barberi, T. Derivation and FACS-Mediated Purification of PAX3+/PAX7+ Skeletal Muscle Precursors from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **2013**, *1*, 620–631. [[CrossRef](#)]
51. Caron, L.; Kher, D.; Lee, K.L.; McKernan, R.; Dumevska, B.; Hidalgo, A.; Li, J.; Yang, H.; Main, H.; Ferri, G.; et al. A Human Pluripotent Stem Cell Model of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Affected Skeletal Muscles. *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 1145–1161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Chal, J.; Oginuma, M.; Al Tanoury, Z.; Gobert, B.; Sumara, O.; Hick, A.; Bousson, F.; Zidouni, Y.; Mursch, C.; Moncuquet, P.; et al. Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Muscle Fiber to Model Duchenne Muscular Dystrophy. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 962–969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Chal, J.; Al Tanoury, Z.; Hestin, M.; Gobert, B.; Aivio, S.; Hick, A.; Cherrier, T.; Nesmith, A.P.; Parker, K.K.; Pourquié, O. Generation of Human Muscle Fibers and Satellite-like Cells from Human Pluripotent Stem Cells in Vitro. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 1833–1850. [[CrossRef](#)]
54. Shelton, M.; Metz, J.; Liu, J.; Carpenedo, R.L.; Demers, S.-P.; Stanford, W.L.; Skerjanc, I.S. Derivation and Expansion of PAX7-Positive Muscle Progenitors from Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **2014**, *3*, 516–529. [[CrossRef](#)]
55. Shelton, M.; Kocharyan, A.; Liu, J.; Skerjanc, I.S.; Stanford, W.L. Robust Generation and Expansion of Skeletal Muscle Progenitors and Myocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Methods* **2016**, *101*, 73–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Swartz, E.W.; Baek, J.; Pribadi, M.; Wojta, K.J.; Almeida, S.; Karydas, A.; Gao, F.-B.; Miller, B.L.; Coppola, G. A Novel Protocol for Directed Differentiation of C9orf72-Associated Human Induced Pluripotent Stem Cells Into Contractile Skeletal Myotubes. *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 1461–1472. [[CrossRef](#)]
57. Xu, C.; Tabebordbar, M.; Iovino, S.; Ciarlo, C.; Liu, J.; Castiglioni, A.; Price, E.; Liu, M.; Barton, E.R.; Kahn, C.R.; et al. A Zebrafish Embryo Culture System Defines Factors That Promote Vertebrate Myogenesis across Species. *Cell* **2013**, *155*, 909–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Dimos, J.T.; Rodolfa, K.T.; Niakan, K.K.; Weisenthal, L.M.; Mitsumoto, H.; Chung, W.; Croft, G.F.; Saphier, G.; Leibel, R.; Golland, R.; et al. Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Sci. New Ser.* **2008**, *321*, 1218–1221. [[CrossRef](#)]
59. Ebert, A.D.; Yu, J.; Rose, F.F.; Mattis, V.B.; Lorson, C.L.; Thomson, J.A.; Svendsen, C.N. Induced Pluripotent Stem Cells from a Spinal Muscular Atrophy Patient. *Nature* **2009**, *457*, 277–280. [[CrossRef](#)]
60. Lin, B.; Li, Y.; Han, L.; Kaplan, A.D.; Ao, Y.; Kalra, S.; Bett, G.C.L.; Rasmussen, R.L.; Denning, C.; Yang, L. Modeling and Study of the Mechanism of Dilated Cardiomyopathy Using Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Individuals with Duchenne Muscular Dystrophy. *Dis. Models Mech.* **2015**, *8*, 457–466. [[CrossRef](#)]
61. Park, I.-H.; Arora, N.; Huo, H.; Maherali, N.; Ahfeldt, T.; Shimamura, A.; Lensch, M.W.; Cowan, C.; Hochedlinger, K.; Daley, G.Q. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* **2008**, *134*, 877–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Shoji, E.; Sakurai, H.; Nishino, T.; Nakahata, T.; Heike, T.; Awaya, T.; Fujii, N.; Manabe, Y.; Matsuo, M.; Sehara-Fujisawa, A. Early Pathogenesis of Duchenne Muscular Dystrophy Modelled in Patient-Derived Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. El-Battrawy, I.; Zhao, Z.; Lan, H.; Li, X.; Yücel, G.; Lang, S.; Sattler, K.; Schünemann, J.-D.; Zimmermann, W.-H.; Cyganek, L.; et al. Ion Channel Dysfunctions in Dilated Cardiomyopathy in Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Circ. Genom. Precis. Med.* **2018**, *11*, e001893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Mateos-Aierdi, A.J.; Dehesa-Etxebeste, M.; Goicoechea, M.; Aiastui, A.; Richaud-Patin, Y.; Jiménez-Delgado, S.; Raya, A.; Naldaiz-Gastesi, N.; López de Munain, A. Patient-Specific iPSC-Derived Cellular Models of LGMDR1. *Stem Cell Res.* **2021**, *53*, 102333. [[CrossRef](#)]
65. Tedesco, F.S.; Gerli, M.F.M.; Perani, L.; Benedetti, S.; Ungaro, F.; Cassano, M.; Antonini, S.; Tagliafico, E.; Artusi, V.; Longa, E.; et al. Transplantation of Genetically Corrected Human iPSC-Derived Progenitors in Mice with Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 140ra89. [[CrossRef](#)]
66. Wu, J.; Hunt, S.D.; Matthias, N.; Servián-Morilla, E.; Lo, J.; Jafar-Nejad, H.; Paradas, C.; Darabi, R. Generation of an Induced Pluripotent Stem Cell Line (CSCRMi001-A) from a Patient with a New Type of Limb-Girdle Muscular Dystrophy (LGMD) Due to a Missense Mutation in POGUT1 (Rumi). *Stem Cell Res.* **2017**, *24*, 102–105. [[CrossRef](#)]
67. Boissart, C.; Poulet, A.; Georges, P.; Darville, H.; Julita, E.; Delorme, R.; Bourgeron, T.; Peschanski, M.; Benchoua, A. Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells of Cortical Neurons of the Superficial Layers Amenable to Psychiatric Disease Modeling and High-Throughput Drug Screening. *Transl. Psychiatry* **2013**, *3*, e294. [[CrossRef](#)]
68. Darville, H.; Poulet, A.; Rodet-Amsellem, F.; Chatrousse, L.; Pernelle, J.; Boissart, C.; Héron, D.; Nava, C.; Perrier, A.; Jarrige, M.; et al. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome. *EBioMedicine* **2016**, *9*, 293–305. [[CrossRef](#)]
69. Rao, L.; Qian, Y.; Khodabukus, A.; Ribar, T.; Bursac, N. Engineering Human Pluripotent Stem Cells into a Functional Skeletal Muscle Tissue. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 126. [[CrossRef](#)]
70. Mercuri, E.; Brockington, M.; Straub, V.; Quijano-Roy, S.; Yuva, Y.; Herrmann, R.; Brown, S.C.; Torelli, S.; Dubowitz, V.; Blake, D.J.; et al. Phenotypic Spectrum Associated with Mutations in the Fukutin-Related Protein Gene. *Ann. Neurol.* **2003**, *53*, 537–542. [[CrossRef](#)]
71. Poppe, M.; Bourke, J.; Eagle, M.; Frosk, P.; Wrogemann, K.; Greenberg, C.; Muntoni, F.; Voit, T.; Straub, V.; Hilton-Jones, D.; et al. Cardiac and Respiratory Failure in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2I. *Ann. Neurol.* **2004**, *56*, 738–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Beltran-Valero de Bernabe, D. Mutations in the FKRP Gene Can Cause Muscle-Eye-Brain Disease and Walker-Warburg Syndrome. *J. Med. Genet.* **2004**, *41*, e61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Brockington, M.; Blake, D.J.; Prandini, P.; Brown, S.C.; Torelli, S.; Benson, M.A.; Ponting, C.P.; Estournet, B.; Romero, N.B.; Mercuri, E.; et al. Mutations in the Fukutin-Related Protein Gene (FKRP) Cause a Form of Congenital Muscular Dystrophy with Secondary Laminin A2 Deficiency and Abnormal Glycosylation of α -Dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, *69*, 1198–1209. [[CrossRef](#)]

74. Cataldi, M.P.; Lu, P.; Blaaser, A.; Lu, Q.L. Ribitol Restores Functionally Glycosylated α -Dystroglycan and Improves Muscle Function in Dystrophic FKRP-Mutant Mice. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 3448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Henriques, S.F.; Gicquel, E.; Marsolier, J.; Richard, I. Functional and Cellular Localization Diversity Associated with Fukutin-related Protein Patient Genetic Variants. *Hum. Mutat.* **2019**, *40*, 1874–1885. [[CrossRef](#)]
76. Alhamidi, M.; Brox, V.; Stensland, E.; Liset, M.; Lindal, S.; Nilssen, Ø. Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2I: No Correlation between Clinical Severity, Histopathology and Glycosylated α -Dystroglycan Levels in Patients Homozygous for Common FKRP Mutation. *Neuromuscul. Disord.* **2017**, *27*, 619–626. [[CrossRef](#)]

PARTIE 2 : Identification de nouveaux mécanismes moléculaires associés à une déficience primaire des cellules musculaires en dysferline.

1. Contexte

En se basant sur l'utilisation de notre modèle cellulaire précédemment décrit dans l'article 1 (Brugé et al., 2022), j'ai cherché à modéliser la LGMD R2 dans le but d'identifier de nouvelles voies moléculaires régulées par l'absence de dysferline.

Ces dernières années, la plupart des études visant à élucider les mécanismes pathologiques qui sous-tendent les dysferlinopathies se sont principalement concentrées sur le rôle de la dysferline dans la réparation du sarcolemme. En effet, des défauts de PMR sont observés dans des fibres musculaires de souris déficientes en dysferline (Bansal et al., 2003) et des myocytes de patients (Philippi et al., 2012). Bien que cela semble être le principal événement contrôlant l'atrophie musculaire, plusieurs études démontrent néanmoins que la restauration du défaut de PMR (Krahn et al., 2010) n'est pas suffisante pour empêcher ou améliorer le phénotype dystrophique des tissus déficients en dysferline (Lostal et al., 2012). Plus récemment, plusieurs études ont mis en évidence un rôle élargi de la dysferline par son implication dans la formation et le maintien des tubules-t (Demonbreun et al., 2014; Kerr et al., 2013; Klinge et al., 2010), le trafic membranaire intracellulaire (Demonbreun et al., 2011), ainsi que dans l'homéostasie calcique (Cea et al., 2016; Kerr et al., 2014) et le métabolisme lipidique (Srivastava et al., 2018). Néanmoins, à ce jour, les mécanismes moléculaires par lesquels la déficience en dysferline conduit à la dégénérescence musculaire sont encore inconnus. Ainsi, une compréhension plus approfondie du rôle de la dysferline dans le tissu musculaire semble nécessaire pour déterminer les fonctions cruciales de la protéine qui sont pertinentes pour l'apparition et la progression de la pathologie.

Depuis la découverte des CSP, plusieurs études ont souligné l'intérêt majeur des CSE et des hiPSC pour des applications de modélisation pathologique (Karagiannis et al., 2019). Au sein d'Istem, la pertinence de ce modèle cellulaire a été démontrée par l'identification de nouveaux mécanismes moléculaires et phénotypes pathologiques, menant au développement d'approches thérapeutiques pour plusieurs indications dont la dystrophie myotonique de type 1 (Laustriat et al., 2015), les cardiomyopathies (Moreau et al., 2021), la neurofibromatose de type 1 (Allouche et al., 2015) et le syndrome de Hutchinson Gilford progeria (Egesipe et al., 2016; Estronca et al., 2021; Harhour et al., 2017; Lo Cicero et al., 2016; Nissan et al., 2012; Pitrez et al., 2020).

2. Résultats

2.1. Caractérisation des cellules musculaires squelettiques dérivées à partir de hiPSC déficientes en dysferline

La première étape de cette étude a consisté à générer des skMC à partir de lignées de hiPSC de patients LGMD R2. Pour cela, deux lignées non-sens et une lignée faux-sens pour la dysferline ont été utilisées. Les trois lignées non affectées utilisées précédemment ont également été utilisées comme lignées contrôles.

Tout d'abord, la pluripotence des six lignées de hiPSC a été confirmée par une analyse par cytométrie en flux montrant que plus de 80% des cellules exprimaient les marqueurs SSEA4 et TRA1-80 avant d'être induites en différenciation myogénique (Figure 42). L'intégrité génomique des lignées a également été vérifiée par un génotypage des polymorphismes nucléotidiques et caryotypage (données non présentées).

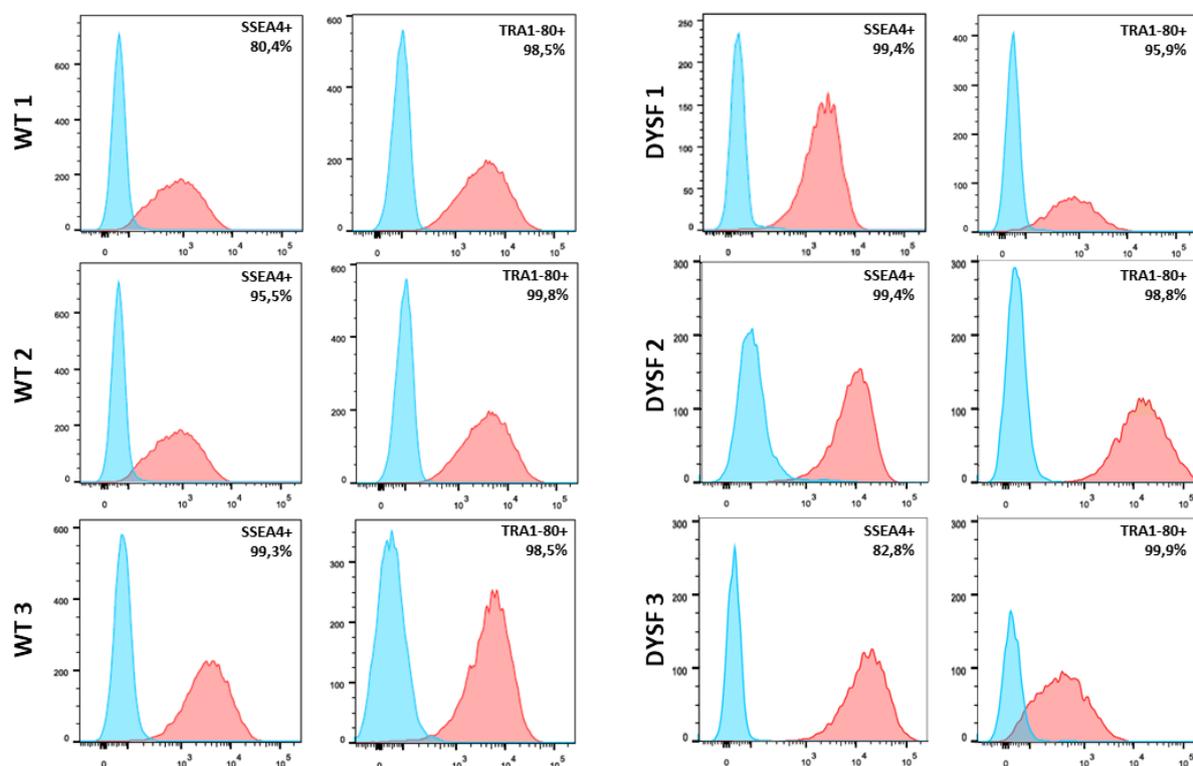


Figure 42. Caractérisation de la pluripotence des lignées hiPSC contrôles et LGMD R2.

Analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs SSEA4 et de TRA1-80 dans trois lignées hiPSC contrôles (WT) et trois lignées hiPSC LGMD R2 (DYSF) (PE-A+ = SSEA4; APC-A+ = TRA1-80).

Les six lignées ont ensuite été différenciées en populations homogènes de skMb et de skMt selon le protocole précédemment décrit et résumé dans la Figure 43A. Ainsi, l'analyse par PCR quantitative des changements d'expression génique des cellules au fur et à mesure de leur différenciation révèle, d'une part, une diminution significative du marqueur de pluripotence *OCT4* dans les skMb et skMt par rapport aux hiPSC (Figure 43B) et, d'autre part, une induction significative des marqueurs myogéniques *MYOD* (Figure 43C) et *MYOG* (Figure 43D) dans les skMb et skMt, respectivement. Par ailleurs, la caractérisation moléculaire des skMt pathologiques ne montre aucune différence avec les skMt contrôles en termes d'expression du

gène de la titine (Figure 43E). A jour 24, les skMt présentent également un bon degré de différenciation comme l'atteste l'organisation sarcomérique révélée par un immunomarquage de la titine (Figure 43F). Dans leur globalité, ces résultats démontrent ainsi que les mutations de la dysferline n'altère ni la différenciation des hiPSC en skMC, ni sa temporalité. Les lignées hiPSC déficientes en dysferline se différencient en skMC avec la même efficacité que des lignées non affectées.

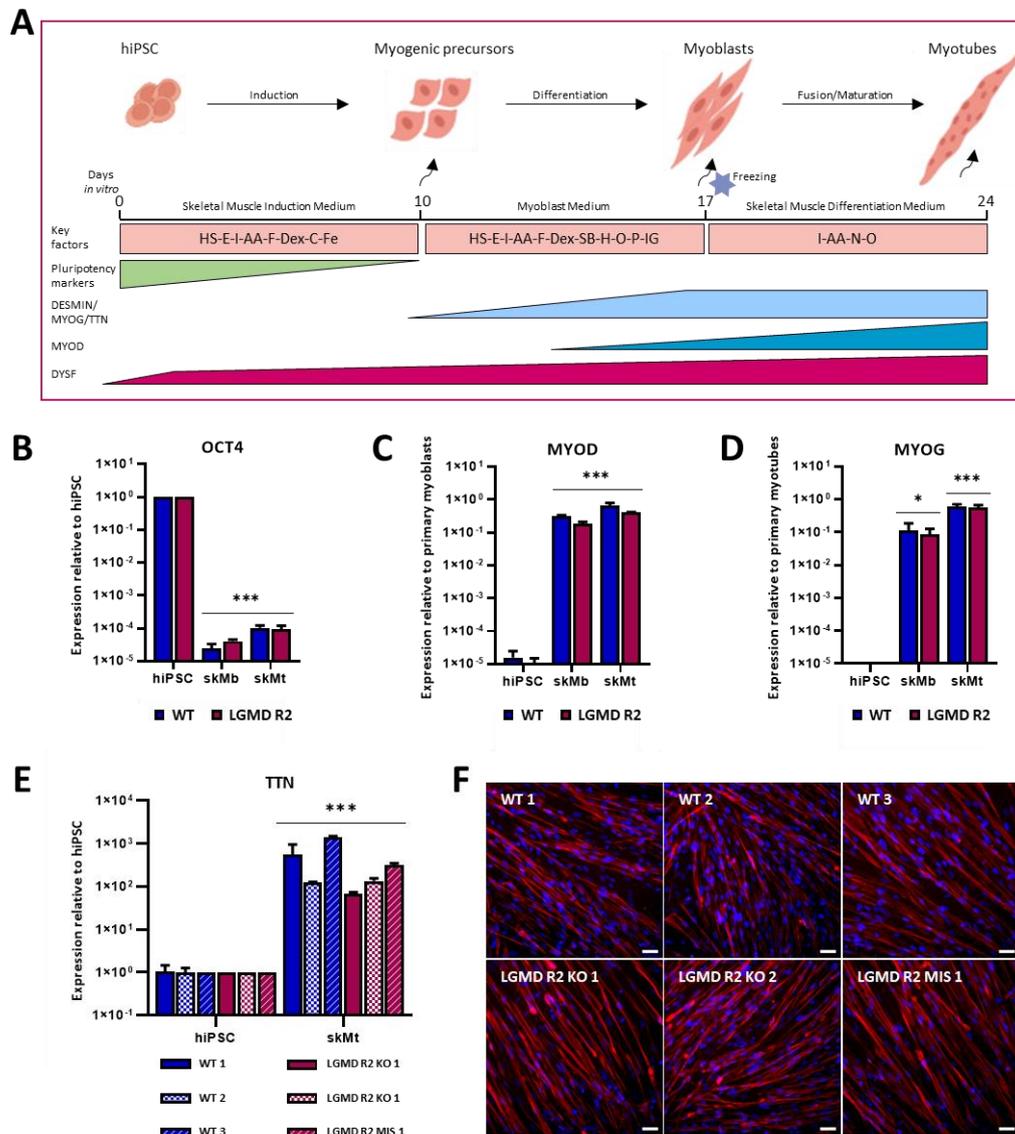


Figure 43. Différenciation et caractérisation des skMC dérivées de hiPSC contrôles et LGMD R2.

(A) Représentation schématique du protocole de différenciation des skMC à partir de hiPSC. Les flèches indiquent les étapes importantes où des phénotypes particuliers ont été observés. Les facteurs clés appliqués sont indiqués pour chaque étape de la différenciation. Les niveaux d'expression des gènes et des protéines marqueurs de chaque étape sont indiqués. (B,C,D) Mesure de l'expression de *Oct4*, *MyoD* et *MyoG* par PCR quantitative aux stades hiPSC, skMb et skMt. L'expression génique est normalisée par rapport aux hiPSC, aux myoblastes primaires ou aux myotubes primaires. Les données sont représentées comme la moyenne des différenciations de skMC à partir de trois lignées contrôles (bleu) ou LGMD R2 (rose) +/- SD. ***p < 0.005 (test de Student). (E) Mesure de l'expression de *TTN* par PCR quantitative aux stades hiPSC et skMt de trois lignées contrôles (bleu) et trois lignées LGMD R2 (rose). L'expression génique est normalisée par rapport à la moyenne des hiPSC contrôles. Les données sont représentées comme la moyenne de trois différenciations par condition +/- SD. *0.01 < p < 0.05 ou ***p < 0.005 (test de Student). (F) Caractérisation de l'expression de titine par immunofluorescence dans les skMt. Barre d'échelle = 20 μm. Abréviations: AA, ascorbic acid; C, CHIR99021; Dex, dexaméthasone; E, epidermal growth factor; F, basic fibroblast growth factor; Fe, fetuin; H, hepatocyte growth factor; HS, horse serum; I, insuline; IG, insuline-croissance; N, néocrosulfonamide; O, oncostatine; P, sérum dérivé de plaquettes; SB, SB431542; hiPSC, cellules souches humaines induites à la pluripotence; skMb, myoblaste; skMt, myotube MYOG, myogénine; TTN, titine.

Enfin, la pertinence de notre modèle cellulaire à modéliser les LGMD R2 a été évaluée. D'une part, le marquage de la dysferline par immunofluorescence confirme la présence de la protéine dans les skMb et skMt dérivés de hiPSC non affectés et son absence, ou sa diminution, dans les cellules pathologiques non-sens et faux-sens respectivement (Figure 44A et 44B). De façon comparable aux skMC primaires, la dysferline est distribuée à la membrane plasmique des skMC dérivés de hiPSC contrôles alors que les mutations pathogènes entraînent soit une absence totale de la protéine (ko 1 et ko 2) soit son agrégation intracellulaire (mis 1) (Figure 44C). D'autre part, un test de réparation membranaire effectué après une lésion au laser démontre que les skMt dérivés de hiPSC pathologiques réparent moins efficacement leur sarcolemme que des cellules contrôles (Figure 44D et 44E). Brièvement, la lésion de la membrane plasmique est réalisée à l'aide d'un microscope bi-photon en présence du FM4-64, un colorant lipophile et imperméable aux cellules qui devient fluorescent en se liant aux phospholipides chargés négativement lorsqu'il pénètre dans la cellule par la blessure. La quantification de la fluorescence à proximité de la lésion membranaire permet alors de suivre la capacité des cellules à refermer cette blessure. Ainsi, en comparant les skMt représentatifs d'une lignée pathologique et ceux d'une lignée non affectée, une incorporation plus importante de la sonde FM4-64 a été observée au sarcolemme des cellules LGMD R2 (Figure 44D). Ces observations ont été renforcées par la quantification de la sonde FM4-64 montrant une augmentation de l'intensité de fluorescence dans les skMt dépourvus de dysferline par rapport aux skMt contrôles. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent la capacité de notre modèle cellulaire dérivé de hiPSC à récapituler des caractéristiques phénotypiques identifiées dans les dysferlinopathies et, par conséquent, sa pertinence pour identifier de nouvelles voies moléculaires régulées par la dysferline.

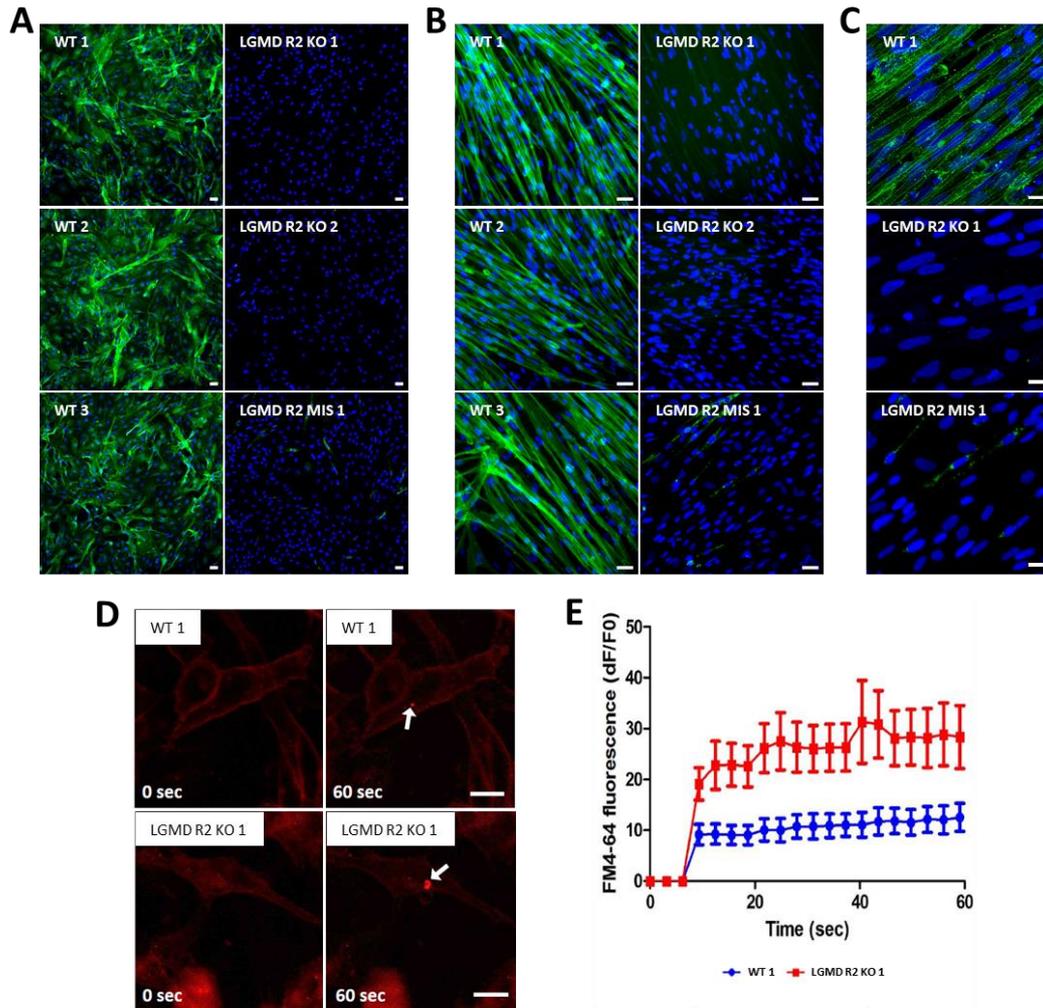


Figure 44. Caractérisation phénotypique des skMC dérivées de hiPSC LGMD R2.

(A,B) Caractérisation de l'expression de la dysferline par immunofluorescence aux stades (A) skMb et (B) skMt dans trois lignées contrôles (panel gauche) et trois lignées LGMD R2 (panel droit). Barre d'échelle = 20µm, (C) Agrandissement du marquage dysferline au stade skMt. Barre d'échelle = 10µm. (D,E) Test de réparation membranaire effectué sur 1 lignée contrôle et 1 lignée LGMD R2 au stade skMt. L'insertion de la sonde fluorescente FM4-64 au niveau de la lésion est observée pendant 60 secondes (D) puis quantifiée (E). Les données sont représentées comme la moyenne +/- SEM de n=20 cellules. Abréviations: DYSF, dysferline; hiPSC, cellules souches humaines induites à la pluripotence; skMb, myoblaste; skMt, myotube.

2.2. Profil transcriptomique des myotubes LGMD R2 dérivés de hiPSC

Dans le but d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires associés à la dysferline, une analyse transcriptomique comparative entre les skMt dérivés de hiPSC contrôles et ceux dérivés de patients LGMD R2 a été réalisée grâce à la technologie de séquençage ciblé AmpliSeq. Tout d'abord, l'analyse en composante principale (PCA) a montré un profil transcriptomique distinct entre chaque condition (Figure 45A). La comparaison entre les deux catégories de skMt a ensuite conduit à l'identification de 52 gènes différentiellement exprimés (DEG), 13 étant régulés à la baisse et 39 à la hausse dans les skMt LGMD R2 (Figure 45B). Le regroupement hiérarchique, évaluant les similitudes et les changements dans les profils d'expression globale entre les différentes conditions, liste ces 52 gènes et confirme la similitude d'expression intra-conditions, c'est-à-dire entre les trois lignées contrôles ou entre les trois lignées pathologiques (Figure 45C). De plus, la mesure par PCR quantitative de l'expression d'une partie de ces 52 gènes dans les skMt a permis de confirmer les résultats du transcriptome (Figure 45D et 45E). Par conséquent, les fonctions collectives de l'ensemble des gènes dérégulés ont été analysées avec l'outil web Enrichr. L'analyse des gènes régulés à la baisse dans les skMt LGMD R2 révèle un enrichissement de la voie de signalisation du TGF β et du métabolisme lipidique, d'après la base de données KEGG 2021 Human (Figure 45F), tandis que les gènes dérégulés à la hausse seraient préférentiellement impliqués dans des mécanismes d'adhésion à la MEC, selon la base de données GO molecular function 2021 (Figure 45G).

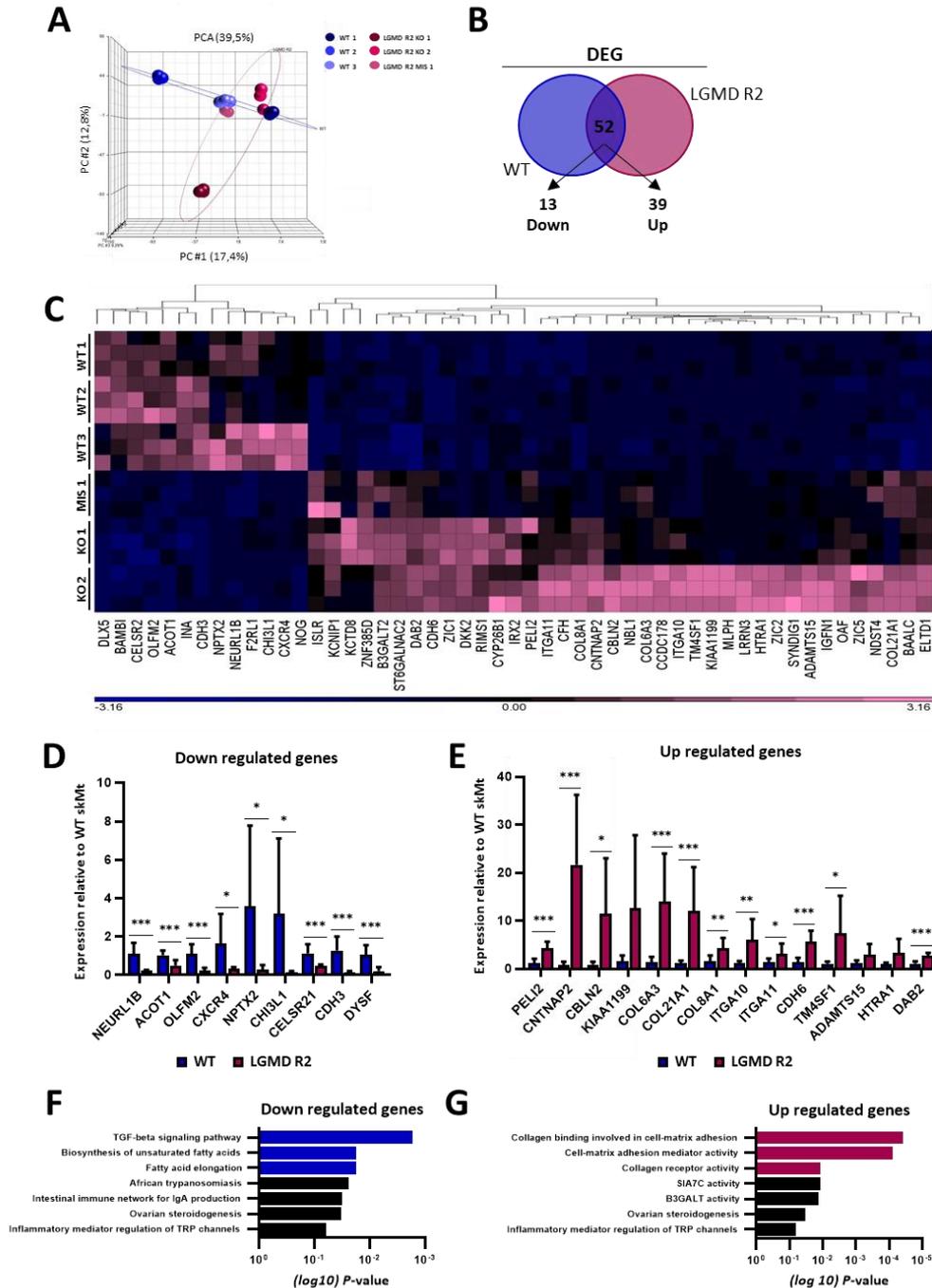


Figure 45. Analyse transcriptomique comparative des skMt contrôles et LGMD R2.

(A) Analyse en composantes principales (PCA) des profils transcriptomiques distincts obtenus à partir de skMt dérivés des trois lignées contrôles et trois lignées LGMD R2. Chaque point représente un échantillon et les échantillons présentant des profils d'expression génique similaires sont regroupés. (B) Représentation schématique du nombre de gènes dérégulés dans les skMt LGMD R2 (rose) en comparaison aux skMt contrôles (bleu). (C) Regroupement hiérarchique des gènes dérégulés de manière significative dans les skMt LGMD R2 en comparaison aux skMt contrôles. (D, E) Mesure par PCR quantitative de l'expression d'une partie des gènes identifiés comme étant dérégulés (D) à la baisse ou (E) à la hausse au stade skMt. L'expression génique est normalisée par rapport à la moyenne des skMt dérivés de 3 lignées contrôles. Les données sont représentées comme la moyenne des différenciations de skMt à partir de trois lignées contrôles (bleu) ou trois lignées LGMD R2 (rose) +/- SD. * $0.01 < p \leq 0.05$ ou ** $0.005 < p \leq 0.01$ ou *** $p < 0.005$ (test de Student). (F) Analyse d'enrichissement des gènes dérégulés à la baisse dans les skMt issus de trois lignées LGMD R2 (13 gènes – analyse EnrichR utilisant la base de données KEGG 2021 Human). (G) Analyse d'enrichissement des gènes dérégulés à la hausse dans les skMt issus de trois lignées LGMD R2 (39 gènes – analyse EnrichR utilisant la base de données GO molecular function 2021). Abréviations: DEG, gènes différenciellement exprimés.

2.3. Identification de Disabled-2 (*dab2*) comme un marqueur potentiel de la physiopathologie des LGMD R2

La liste des 52 gènes dérégulés dans les skMt pathologiques a ensuite été comparée aux données recueillies par le professeur Eric Hoffman sur des biopsies musculaires de patients LGMD R2 (Dadgar et al., 2014). Dans son étude, les profils transcriptomiques Affymetrix de 10 biopsies musculaires issues de patients LGMD R2 ont été comparés à ceux de 13 patients non affectés en utilisant les puces d'hybridation HG-U133A et HG-U133B (n° d'accès GEO = GSE3307) qui permettent d'évaluer l'expression de plus de 22 000 transcrits. Cette étude transcriptomique comparative entre nos deux études a conduit à l'identification d'un gène, Disabled-2 (*dab2*), régulé en commun à la hausse dans les biopsies musculaires de patients LGMD R2 et les skMt pathologiques (Figure 46A). La surexpression de *dab2* dans les skMt dérivés de hiPSC LGMD R2, en comparaison aux lignées saines, a ensuite été confirmée par PCR quantitative (Figure 46B) puis validée au niveau protéique par western blot (Figure 46C) et immunomarquage (figure 46D).

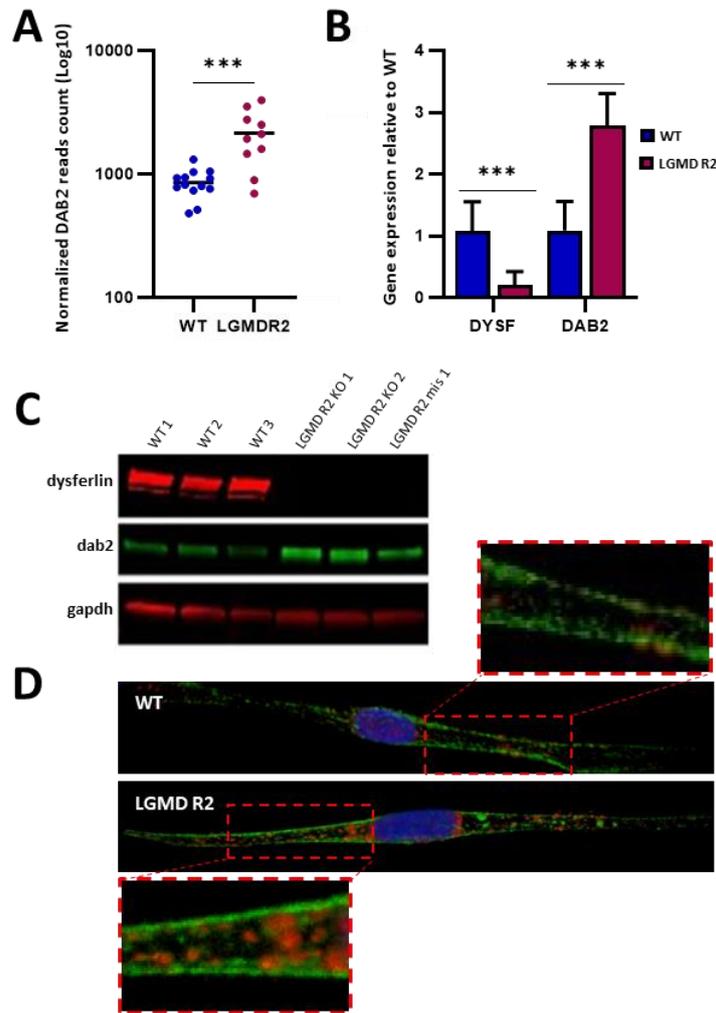


Figure 46. Identification d'un gène, Disabled-2 (*dab2*), régulé à la hausse dans les biopsies musculaires et les skMt dérivés de hiPSC.

(A) Analyse de l'expression de DAB2 (nombre de reads) dans les données collectées par Eric Hoffman sur des biopsies musculaires contrôle (bleu) et de patients LGMD R2 (rose). Chaque point représente un patient. Un test statistique de Student a été appliqué pour comparer les valeurs de DAB2 entre chaque groupe, *** $p < 0.005$. (B) Mesure de l'expression de *DYSF* et *DAB2* par PCR quantitative dans les skMt dérivés de trois lignées hiPSC contrôles (bleu) ou trois lignées LGMD R2 (rose). L'expression génique est normalisée par rapport à la moyenne des skMt dérivés des 3 lignées contrôles. Les données sont représentées comme la moyenne de trois lignées +/- SD. *** $p < 0.005$ (test de Student). (C) Analyse par western blot de l'expression de la dysferline et de *dab2* dans les skMt dérivés de hiPSC contrôles et LGMD R2. Gapdh est un contrôle de charge. (D) Caractérisation de l'expression de *dab2* (rouge) par immunofluorescence au stade skMt (α -actinine/vert) dans une lignée représentative contrôle (panel haut) et LGMD R2 (panel bas). Abréviations: *DYSF*, dysferline; *DAB2*, disabled-2.

2.4. Régulation de l'expression de *dab2* *in vivo*

Dans le but de confirmer le rôle de *dab2* dans la physiopathologie des LGMD R2, nous avons par la suite étudié son expression dans le modèle pathologique murin Bla/J (Figure 48), développé par notre collaboratrice Isabelle Richard au sein de Généthon/INTEGRARE UMR951 (Evry). Pour rappel, ces souris résultent du rétrocroisement de la souche consanguine A/J, un modèle naturellement déficient en dysferline, avec le fond génétique caractérisé C57BL/6. Les souris homozygotes Bla/J développent une MD progressive et récapitulent les principales caractéristiques histopathologiques de la maladie humaine (Lostal et al., 2010). Les premiers signes de dystrophie sont observés à l'âge de 8 semaines et se caractérisent par la présence de fibres centronucléées et des zones d'inflammation. Les altérations morphologiques s'aggravent à l'âge de 4 mois et altèrent la majorité des muscles à 8 mois. Par ordre de gravité, les muscles les plus touchés sont le psoas, le glutéal, le quadriceps fémoral, le tibial antérieur et le gastrocnémien.

Ainsi, l'analyse de l'expression génique de *dab2* dans des biopsies musculaires de souris Bla/J révèle une corrélation entre la progression de la pathologie et la surexpression de *dab2*. En effet, l'expression de *Dab2* est augmentée dès l'âge de 3 mois dans le psoas des souris Bla/J (Figure 47B) qui présente déjà des caractéristiques dystrophiques, comme indiqué par la présence de quelques fibres centronucléées et zones d'inflammation (Figure 47A). Cette surexpression de *dab2* est exacerbée au cours du temps avec le développement de la pathologie. A l'âge de 6 mois, *dab2* est surexprimé dans le psoas et le glutéal des souris Bla/J (Figure 47D), qui présentent alors des altérations morphologiques importantes (Figure 47C).

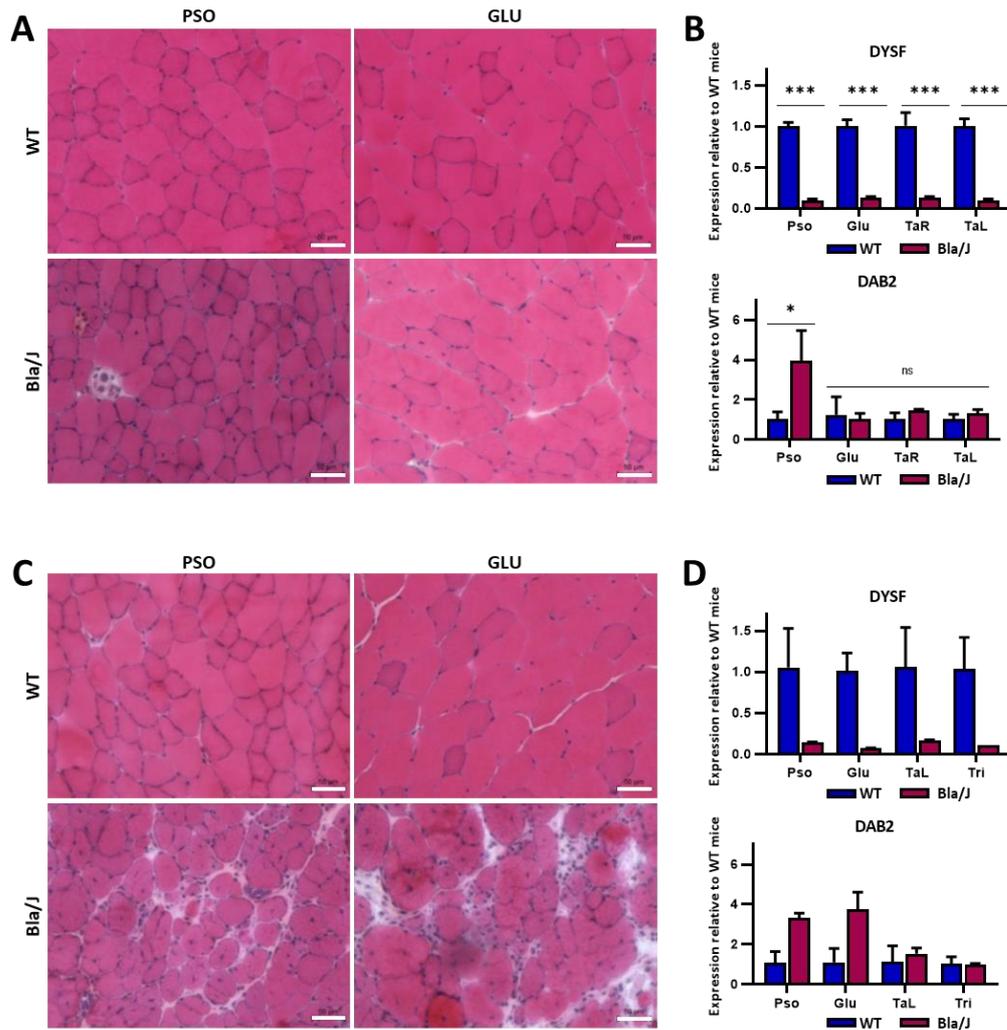


Figure 47. Régulation de l'expression de dab2 in vivo.

(A) Analyse histologique comparative par coloration au HPS (Hémalum, Phloxine, Safran) des muscles PSO et GLU de souris contrôle et Bla/J âgées de trois mois. Barre d'échelle = 50 μ m. (B) Analyse de l'expression de *DYSF* et *DAB2* par PCR quantitative dans les muscles Pso, Glu, TaR et TaL de souris contrôle (bleu, WT) ou déficiente en dysferline (rose, Bla/J) âgées de 3 mois. L'expression génique est normalisée par les souris contrôle. Les données sont représentées comme la moyenne de trois souris par condition +/- SD. *0.01 < p \leq 0.05 ou ***p < 0.005 (test de Student). (C) Analyse histologique comparative par coloration au HPS (Hémalum, Phloxine, Safran) des muscles PSO et GLU de souris contrôle et Bla/J âgées de six mois. Barre d'échelle = 50 μ m. (D) Analyse de l'expression de *DYSF* et *DAB2* par PCR quantitative dans les muscles Pso, Glu, TaL et Tri de souris contrôle (bleu, WT) ou déficiente en dysferline (rose, Bla/J) âgées de 6 mois. L'expression génique est normalisée par les souris contrôles. Les données sont représentées comme la moyenne de deux souris par condition. Abréviations: Pso, psoas; Glu, glutéal; TaR, tibial antérieur droit; TaL, tibial antérieur gauche; Tri, triceps.

L'expression de *dab2* a également été évaluée dans le psoas de souris Bla/J pré-symptomatiques traitées avec un système de double vecteurs AAV permettant la réexpression de la dysferline pleine longueur (Pryadkina et al., 2015) (Figure 48A). Au niveau histologique, l'effet positif de la thérapie génique est clairement observé puisque la réexpression de la dysferline empêche l'apparition des caractéristiques dystrophiques dans le psoas des souris traitées, en comparaison aux souris Bla/J contrôles (traitées au sérum physiologique) (Figure 48B), que ce soit un mois ou cinq mois après l'injection. De plus, la réexpression de DYSF est associée à une diminution significative de l'expression de *dab2* dans les muscles des souris Bla/J traitées pendant un mois (Figure 48C) ou cinq mois (Figure 48D) par thérapie génique. Dans l'ensemble, ces résultats révèlent donc que *dab2* est inversement régulé par la teneur en dysferline et suggèrent un rôle potentiel de *dab2* dans la physiopathologie de la LGMD R2.

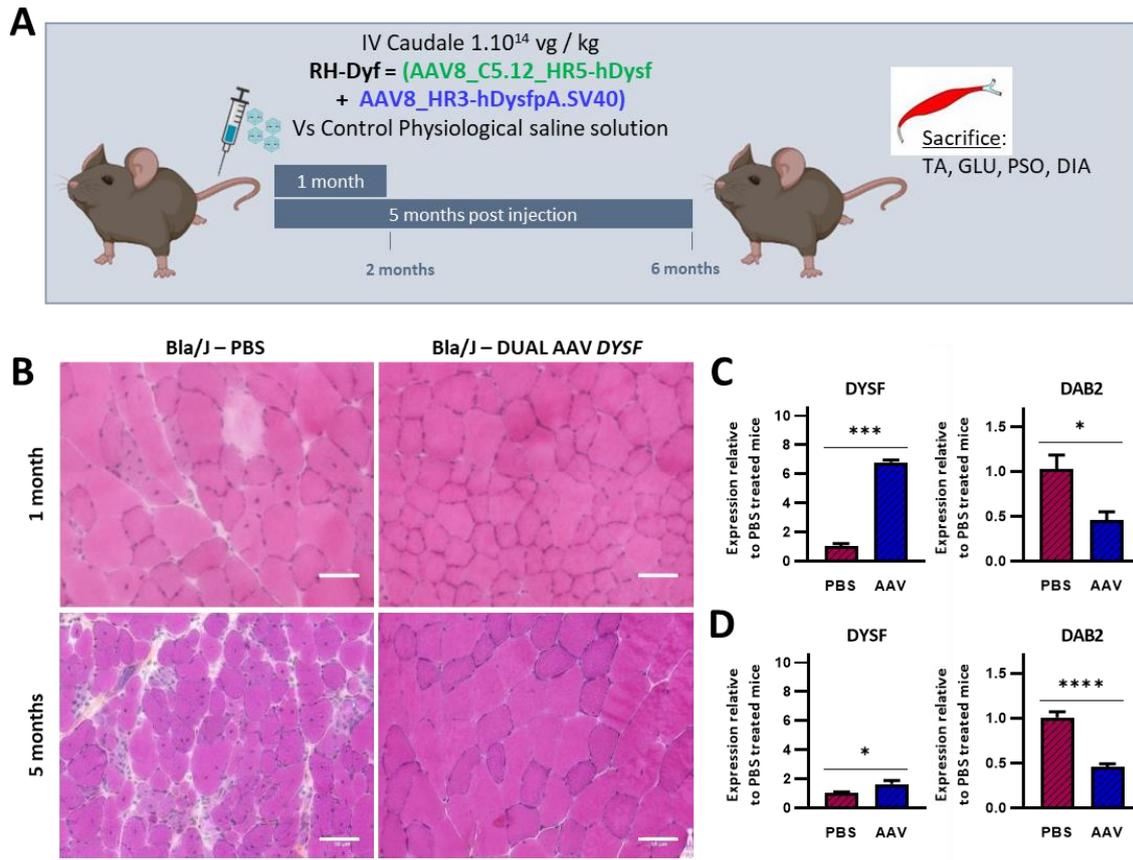


Figure 48. L'expression de *dab2* est inversement régulée à celle de la dysferline.

(A) Représentation schématique du protocole de traitement par thérapie génique de souris Bla/J avec un double vecteurs AAV capable de rétablir l'expression de la dysferline. Les souris sont traitées une seule fois. La durée du traitement est indiquée dans les rectangles bleus ainsi que l'âge du sacrifice sous les tirets. (B) Zones représentatives de coupes musculaires de psoas colorées à l'HPS (Hémalum, Phloxine, Safran) provenant de souris Bla/J après un mois (panel haut) ou cinq mois (panel bas) de traitement avec du PBS (panel gauche) ou par thérapie génique (panel droite). Barre d'échelle = 50 μ m. (C) Analyse de l'expression de *DYSF* et *DAB2* par PCR quantitative dans le psoas de souris Bla/J âgées de 2 mois, après un mois de traitement au PBS (red) ou par thérapie génique (bleu). L'expression génique est normalisée par les souris traitées au PBS. Les données sont représentées comme la moyenne de cinq souris par condition +/- SD. $*0.01 < p \leq 0.05$ ou $***p < 0.005$ (test de Student). (D) Analyse de l'expression de *DYSF* et *DAB2* par PCR quantitative dans le psoas de souris Bla/J âgées de 6 mois, après cinq mois de traitement au PBS (red) ou par thérapie génique (bleu). L'expression génique est normalisée par les souris traitées au PBS. Les données sont représentées comme la moyenne de cinq souris par condition +/- SD. $*0.01 < p \leq 0.05$ ou $***p < 0.005$ (test de Student). Abréviations: Pso, psoas; Glu, gluteal; Ta, tibialis anterior; Dia, diaphragm.

2.5. Régulation de l'expression de Dab2 dans des biopsies musculaires de patients LGMD R2

Cette corrélation entre l'augmentation de dab2 et la progression de la pathologie a ensuite été renforcée par l'analyse de l'expression de dab2 dans des biopsies musculaires prélevées chez des patients atteints de dysferlinopathie. Grâce à notre collaboration avec le Dr Gorka Fernandez (APHP, Paris), 14 patients ont été sélectionnés sur la base des critères suivants : (1) autant d'hommes que de femmes, (2) absence de dysferline mise en évidence par immunohistologie ou western blot, (3) hétérogénéité clinique (LGMD R2/MM/myopathie atypique) et (4) hétérogénéité du degré d'atteinte au moment du prélèvement (échelle de Walton) (Figure 49A). De plus, les variants génétiques des patients devaient être répartis le long du gène de la dysferline (Figure 49B). Ainsi, l'analyse transcriptomique de dab2 confirme que son expression est augmentée chez la majorité des patients atteints de dysferlinopathie, en comparaison à des personnes non affectées (Figure 49C), et cela, sans corrélation avec le phénotype clinique ou le genre des patients (Figure 49D). Par ailleurs, de façon similaire aux résultats obtenus avec le modèle pathologique Bla/J, l'expression de dab2 est plus importante chez les patients présentant un stade plus avancé de la pathologie (Figure 49E). Au-delà du fait que dab2 pourrait être utilisé comme un marqueur de la progression de la maladie, nos résultats soulignent également que l'augmentation de dab2 pourrait jouer un rôle actif dans le développement des dysferlinopathies. Ainsi, pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui pourraient être associés à la dérégulation de dab2 et, possiblement, à la sévérité de l'atteinte des patients, le profil transcriptomique des biopsies musculaires a été comparé. Les patients que l'on considérait comme peu atteints, avec une expression de dab2 inférieure à 750 reads, ont été comparés aux patients plus atteints, avec une expression de dab2 supérieure à 750 reads (Figure 49F). Cette analyse entre les deux catégories a conduit à l'identification de 14 gènes dérégulés à la hausse chez les patients les plus atteints (Figure 49G) et qui semblent être majoritairement impliqués dans le métabolisme lipidique.

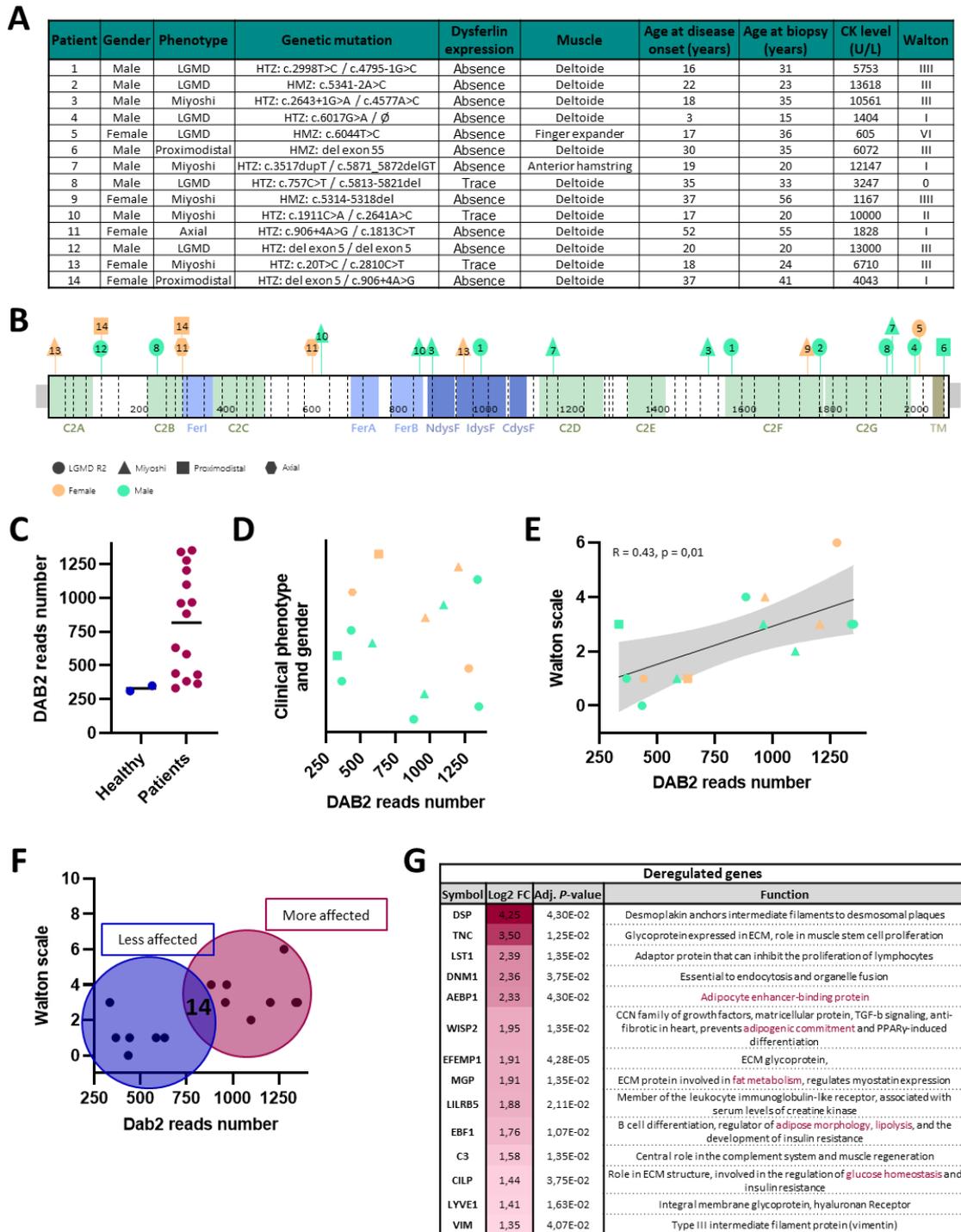


Figure 49. Régulation de l'expression de dab2 dans des biopsies musculaires de patients atteints de dysferlinopathie.

(A) Tableau récapitulatif des caractéristiques génétiques et cliniques des patients prélevés. (B) Représentation des mutations affectant les patients, selon leur position sur le gène DYSF. Les domaines spécifiques de la protéine sont représentés. Chaque numéro correspond à un patient et permet de se référer au tableau précédent. Chaque forme représente le phénotype clinique de dysferlinopathie dont est atteint le patient. Le sexe du patient est distingué par une couleur. (C) Mesure de l'expression de DAB2 par séquençage de l'ARNm (QuantSeq, Illumina) dans les biopsies contrôles (bleu) ou de patients (rose). Chaque point représente une biopsie. (D) Visualisation de l'expression de DAB2 selon le phénotype clinique attribué au patient. (E) Visualisation de l'expression de DAB2 selon l'atteinte du patient (peu atteint $0 \leq$ échelle de Walton ≤ 10 très atteint). (F) Représentation schématique du nombre de gènes dérégulés dans les biopsies de patients considérés comme plus atteints (rose, DAB2 > 750 reads) en comparaison aux patients considérés comme moins atteints (bleu, DAB2 < 750 reads) après analyse transcriptomique (QuantSeq, Ion Torrent). (G) Liste des gènes dérégulés chez les patients considérés comme plus atteints en comparaison aux patients considérés comme moins atteints. Abréviations : ECM, matrice extracellulaire.

2.6. Dérégulation du métabolisme lipidique dans des skMC dérivés de hiPSC LGMD R2 en réponse à une supplémentation en lipides

Partant du constat précédent, nous nous sommes demandé si l'augmentation de l'expression de *dab2* ne pourrait pas entraîner une dérégulation de l'homéostasie lipidique chez les patients atteints de dysferlinopathie. En effet, plusieurs éléments vont dans ce sens. D'un côté, des données récentes suggèrent une contribution majeure de la dérégulation du métabolisme des lipides dans la phase la plus précoce des LGMD R2 (Srivastava et al., 2018). D'un point de vue clinique, cette modification contribue au remodelage du muscle squelettique (Haynes et al., 2019), comme le révèle le dépôt excessif de lipides dans les myofibres des patients (Diaz-Manera et al., 2018; Grounds et al., 2014). D'un autre côté, *dab2* est une molécule adaptatrice du mécanisme d'endocytose médiée par la clathrine (CME) qui permet d'internaliser un sous-ensemble de récepteurs (Lampe et al., 2016). De manière intéressante, *dab2* semble être spécifiquement impliquée dans la régulation de l'internalisation du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLR) et de l'absorption des LDL riches en cholestérol (Mettlen et al., 2010; Tao et al., 2016). L'expression accrue de *dab2* pourrait donc jouer un rôle clé dans l'homéostasie défectueuse du cholestérol chez les patients LGMD R2, en particulier en augmentant l'absorption du cholestérol par le LDLR.

Afin d'explorer la fonction de *dab2* dans l'endocytose du LDLR et l'homéostasie du cholestérol dans les skMt dérivés de hiPSC LGMD R2, la première étape a donc consisté à vérifier que notre modèle cellulaire était capable de récapituler un défaut du métabolisme lipidique. Dans ce sens, l'utilisation d'un colorant lipidique fluorescent (LipidSpot) a montré que les skMt dérivés de hiPSC LGMD R2 accumulent des gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme, en comparaison aux skMt contrôles, lorsque le milieu de maturation des myotubes est supplémenté en acides gras (Figure 50A). Cette dérégulation lipidique a également été confirmée avec un microscope holotomographique qui permet de détecter, sans colorant ni sonde, les gouttelettes lipidiques grâce à leur indice de réfraction spécifique (Figure 50B). Par ailleurs, la résolution d'image de ce système a permis de valider un défaut du métabolisme lipidique dans les skMt LGMD R2, en l'absence de supplémentation lipidique du milieu de culture.

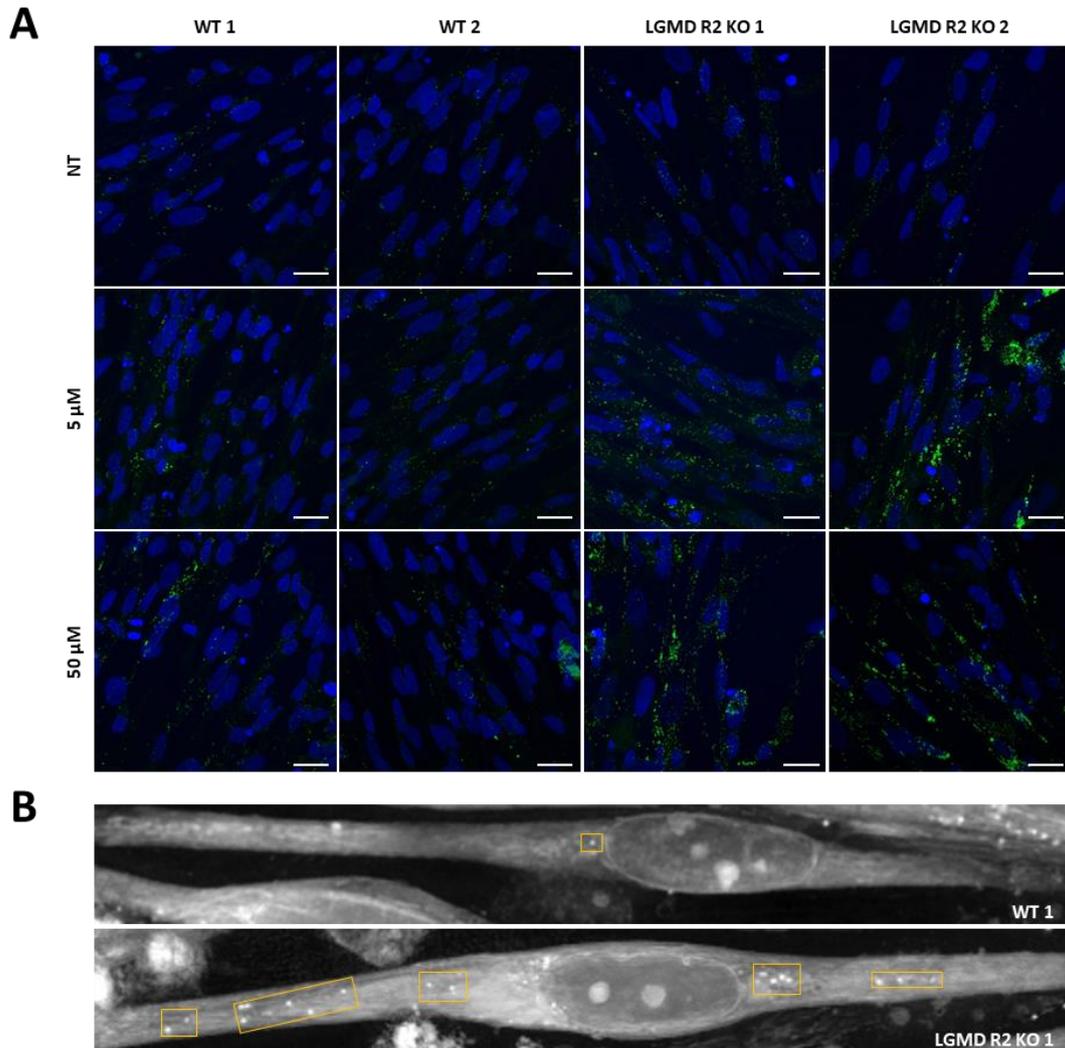


Figure 50. Accumulation de gouttelettes lipidiques dans les skMt dérivés de hiPSC LGMD R2.

(A) Photos représentatives du marquage LipidSpot 488 détectant les gouttelettes lipidiques dans les skMt dérivés de hiPSC contrôles ou LGMD R2 non traités (panel haut) ou supplémentés pendant 24 heures avec 5 μ M (panel centre) ou 50 μ M (panel bas) d'acides gras. Barre d'échelle = 20 μ m. (B) Analyse de la dynamique des gouttelettes lipidiques par holotomographie (Smart Lipid Droplet Assay, NanoLive) dans des skMt non traités dérivés d'une lignée contrôle et d'une lignée LGMD R2 représentatives. Images représentatives d'une acquisition vidéo de 3 minutes.

3. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons utilisé notre modèle cellulaire de skMt dérivés de hiPSC afin d'identifier de nouveaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans les dysferlinopathies. Par une approche transcriptomique, une dérégulation du niveau d'expression de *dab2* a été identifiée. Dans l'ensemble, les résultats démontrent que *dab2* est inversement régulé par les niveaux de dysferline et que son expression est corrélée au degré de sévérité de la pathologie dans des souris Bla/J et des biopsies musculaires de patients. *Dab2* étant impliqué dans la régulation de l'internalisation du LDLR et de l'absorption des LDL riches en cholestérol, nous avons alors émis l'hypothèse que sa dérégulation pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la LGMD R2, et plus particulièrement dans l'homéostasie défectueuse du cholestérol observée chez les patients.

4. Matériel et méthode

4.1. Etudes *in vitro*

4.1.1. Lignées cellulaires et culture

Les expériences ont été réalisées à partir de six lignées de hiPSC : 3 lignées provenant de personnes non affectées dites "contrôles" (WT1, WT2, WT3) et 3 lignées de patients LGMD R2 (KO1, KO2, MIS1). Les lignées hiPSC WT1 et WT2 ont été reprogrammées à partir de fibroblastes pulmonaires IMR-90 sains obtenus auprès de l'ATCC Cell Lines Biology Collection (Washington, DC, USA) et de GM1869 fournis par le Coriell Cell Repository (Camden, NJ, USA) [67,68]. La lignée hiPSC WT3 est une lignée cellulaire commerciale fournie par Phénocell (Grasse, France). Les lignées de hiPSC KO1 (JFNY1 : hétérozygote non-sens c.5713C>T, p.Arg1905X ; c.3517dupT, p.Ser1173PhefsX2) et KO2 (JFRBi1 : hétérozygote non-sens c.5946+1G>A ; c.5497G>T ; p.Glu1833X) font partie des lignées déficientes en dysferline déposées par la Jain Foundation auprès du WiCell Research Institute (Madison, WI, USA). La lignée de hiPSC MIS1 (814 : homozygote faux-sens c.4022T>C, p.L1341P) a été fournie par le Dr. Simone Spuler du Max Delbrück Center (Berlin, Allemagne). Toutes les lignées de hiPSC ont été cultivées dans des boîtes de culture recouvertes de matrigel (Corning) ou de vitronectine (Gibco) et maintenues dans du milieu iPS-Brew XF (Miltenyi Biotec). Le passage des cellules a été effectué manuellement tous les 5 à 7 jours et le milieu de culture a été changé tous les deux jours.

Les niveaux de maturation des skMb et skMt ont été comparés à une lignée musculaire primaire contrôle (myoblastes C25CL48) établie à partir d'une biopsie musculaire humaine et fournie par la plateforme d'immortalisation MyoLine de l'Institut de Myologie (Paris, France), avec l'accord du sujet par la signature d'un formulaire de consentement éclairé et son anonymisation avant immortalisation, conformément au règlement européen GDPR. La lignée immortalisée a été cultivée dans un milieu de croissance composé de 1 volume de milieu 199 (Invitrogen, 41150020) pour 4 volumes de milieu Dulbecco's modified Eagle's (Invitrogen, 61965-025), complété par 20% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma-Aldrich), 25 µg/ml de fœtine (Life Technologies, 10344026), 5 ng/ml de facteur de croissance épidermique EGF (Life

Technologies, PHG0311), 0,5 ng/ml de facteur de croissance basique des fibroblastes bFGF (Life Technologies, PHG0026), 0,2 µg/ml de dexaméthasone (Sigma, D4902) et 5 µg/ml d'insuline (Sigma, 91077). Les cellules ont étéensemencées sur des plaques recouvertes de gélatine à 0,1% et maintenues dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂ et contrôlée à 37°C jusqu'à l'expérimentation.

3.1.2. Cytométrie en flux

Les hiPSC ont été recueillies après dissociation chimique avec de l'acutase (Invitrogen), centrifugées à 900 rpm pendant 5 minutes et remises en suspension dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) froide supplémentée avec 2% de SVF. Les cellules ont été marquées avec des anticorps primaires conjugués à un fluorochrome pendant 30 minutes sur glace et à l'abri de la lumière. Les anticorps sont les suivants : TRA1-80 conjugué à l'APC (Covance) et SSEA4 conjugué au PE (Millipore). Les cellules ont ensuite été lavées dans du PBS froid avant d'être triées par un analyseur MACSquant (MiltenyiBiotec). Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo (BD Biosciences).

3.1.3. Dérivation de cellules musculaires squelettiques

Les différenciations de hiPSC en skMC ont été réalisées en utilisant les milieux commerciaux développés par Geneabiozell® selon le protocole décrit précédemment (Caron et al., 2016). En résumé, les hiPSC ont été dissociées avec le réactif de dissociation cellulaire StemPro Accutase (Gibco®),ensemencées dans des plaques recouvertes de collagène I (Biocoat, DB Biosciences) et maintenues pendant 10 jours dans un milieu d'induction en muscle squelettique (SKM01, AMSBIO). Les cellules ont ensuite été dissociées avec de la trypsine à 0,05% etensemencées à nouveau sur des plaques recouvertes de collagène I pendant 7 jours dans un milieu de différenciation en myoblastes (SKM02, AMSBIO). Au jour 17, les skMb obtenus ont été dissociés et congelés. Pour la différenciation terminale, les cellules ont été décongelées dans du SKM02 jusqu'à atteindre la confluence puis incubées dans le milieu de fusion et de maturation (SKM03, AMSBIO) pendant 5 à 7 jours pour obtenir des skMt. Les hiPSC, les skMb et les skMt ont été respectivement analysés aux jours 0, 17 et 24 de la différenciation.

3.1.4. Analyse transcriptomique

Des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur des skMt dérivés de hiPSC ou sur des biopsies musculaires humaines grâce à la plateforme de séquençage d'Istem et au Pôle Scientifique de Modélisation Numérique (PSMN) de l'École Normale Supérieure de Lyon.

L'analyse d'expression différentielle des gènes entre les skMt dérivés de hiPSC a été réalisée avec la technologie de séquençage QuantSeq 3'mRNA sur une plateforme Ion Torrent. Cette méthode ne génère qu'un seul fragment par transcrit, ce qui permet d'établir un lien direct entre le nombre de lectures (« reads ») correspondant à un gène donné et l'expression de ce dernier. Les ARNm ont été isolés à l'aide du kit d'extraction RNeasy Micro (Qiagen) et la qualité

des ARN a été vérifiée à l'aide d'une puce RNAnano (Agilent technologies) conformément au protocole du fabricant. Pour chacun des 18 échantillons, 100 ng d'ARNm ont été rétro-transcrits (sens inverse) avec le kit *QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep* pour Ion Torrent afin de générer les librairies à partir de l'extrémité 3' polyadénylée de l'ARN. Les librairies ont été amplifiées par PCR et étiquetées d'un code barre (barcode). Les ADN complémentaires (ADNc) amplifiés ont ensuite été quantifiés à l'aide du kit ADN haute sensibilité d'Agilent et 100 pM de chacune des librairies ont été combinés. La PCR en émulsion et l'enrichissement ont été réalisés sur le système Ion OT2 en utilisant le kit Ion PI Hi-Q OT2 200 (ThermoFisher Scientific). Les échantillons ont été déposés sur une puce Ion PI v3 et séquencés avec le système Ion Proton en utilisant le kit *Ion PI Hi-Q sequencing 200 (200 bp read length)*, Thermo Fisher). Le contrôle qualité de ces données de séquençage a été évalué à l'aide de l'outil FastQC (v0.11.2). Les lectures générées ont été rognées (trimming) à l'aide de Prinseq (v0.20.4)(--trim-right 20) et filtrées par le Phred score (--trim-qual 20)(Schmieder and Edwards, 2011). Les lectures ont été alignées avec le génome de référence EnSEMBL GRCh37.87 (gènes codant les protéines uniquement - 19311 gènes, 143 832 transcrits) en utilisant RNA-STAR (v2.4.1d)(Dobin et al., 2013) et filtrées à l'aide de samtools (v0.1.19)(Li et al., 2009). Le niveau d'expression génique de chaque échantillon a été quantifié avec HTSeq-count (v0.8.0)(Anders et al., 2015). Le niveau d'expression des transcrits a été quantifié quant à eux avec Kallisto (v0.43.1)(Bray et al., 2016). Enfin, l'expression différentielle des gènes et des transcrits (DEG) entre les conditions a été calculée avec DESeq2 (v1.18.1 en utilisant R v3.4.1, Modèle GLM avec test de Wald)(Love et al., 2014). Nous avons considéré que les gènes sont différentiellement exprimés de façon significative lorsque leur p-value corrigée est inférieure à 0.05 et que le $|\log_2\text{FoldChange}|$ est supérieur à 0.04 (options : lfcThreshold=0.4, altHypothesis="greaterAbs").

Une analyse d'expression différentielle des gènes entre des biopsies musculaires humaines a également été réalisée avec la technologie de séquençage QuantSeq 3'mRNA mais sur une plateforme Illumina (Machine NextSeq 550). Les ARN ont été extraits des biopsies musculaires à l'aide du réactif TRI Reagent (Zymo research). Brièvement, les tissus musculaires congelés dans l'azote ont été coupés et un morceau a été lysé avec du TRI reagent dans un tube eppendorf contenant une bille de Tungstène. Le tissu a été homogénéisé mécaniquement par des cycles de 30 secondes avec le TissueLyser (Qiagen), un broyeur à billes. Le lysat obtenu a été complété avec du chloroforme, incubé 15 minutes à température ambiante et centrifugé 15 minutes à 12 000g à +4°C afin de séparer l'échantillon en trois phases : une phase rouge contenant les protéines, une interphase avec l'ADN et la phase aqueuse incolore contenant l'ARN. Le surnageant (phase aqueuse) a été récupéré, incubé 10 minutes à température ambiante avec du propanol puis centrifugé 15 minutes à 12 000g à +4°C afin de précipiter l'ARN. Le culot d'ARN a été lavé avec de l'éthanol 75% avant d'être centrifugé 15 minutes à 7 500 g à +4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché à l'air libre pendant 15 minutes. Enfin, le culot d'ARN a été resuspendu avec de l'eau sans RNases, dosé au Nanodrop et la qualité des ARN a été vérifiée à l'aide d'une puce RNAnano (Agilent technologies) conformément au protocole du fabricant. Ensuite, les librairies ont été générées avec le kit *QuantSeq 3' mRNA-Seq Library* pour Illumina à partir de 100ng d'ARNm par échantillon.

Comme pour la technologie Ion Torrent, elles ont été amplifiées par PCR puis étiquetées d'un code barre. Les ADNc amplifiés ont été quantifiés à l'aide du kit ADN haute sensibilité d'Agilent et combinés pour le séquençage. Un total de 2nM des bibliothèques combinées a été dénaturé et 1,8pM a été utilisé pour générer des groupes avant le séquençage en *Paired-end* sur le séquenceur (High output 2x75bp run). Le contrôle qualité des données issues du séquençage a été évalué à l'aide de FastQC (v0.11.9). Les séquences polyA et les adaptateurs Illumina restants ont été supprimés avec cutadapt (v1.18). Les lectures générées ont été rognées à l'aide de Prinseq (v0.20.4)(--trim-right 20) et filtrées par le Phred score (--trim-qual 20). Les lectures ont été alignées avec le génome de référence Ensembl GRCh37.87 (gènes codant les protéines uniquement - 19311 gènes) en utilisant RNA-STAR (v2.7.6a) et filtrées à l'aide de samtools (v0.1.18). Le niveau d'expression génique de chaque échantillon a été quantifié avec HTSeq-count (v0.12.4). Enfin, la DEG entre les conditions a été calculée avec DESeq2 (utilisant R v4.1.0). Nous avons considéré que les gènes sont différentiellement exprimés de façon significative lorsque leur p-value ajustée est inférieure à 0.05 et que le $|\log_2\text{FoldChange}|$ est supérieur à 0.04 (options : lfcThreshold=0.4, altHypothesis="greaterAbs").

3.1.5. Croisement de données transcriptomiques

La liste des 52 gènes dérégulés dans les skMt pathologiques a été comparée aux données publiques recueillies par le professeur Eric Hoffman sur des biopsies musculaires de patients LGMD R2 (Dadgar et al., 2014). Les données publiques de puces GSE3307 sont issues de deux technologies (GPL96 pour [HG-U133A] Affymetrix Human Genome U133A Array et GPL97 pour [HG-U133B] Affymetrix Human Genome U133B Array). Dans ce projet, l'expression génique (probes set) d'échantillons musculaires sains et LGMD2B (WT : n=13, LGMD2B : n=10 pour chacune des technologies) a été analysée. Une analyse d'expression différentielle des probesets (LGMD2B vs WT) a été réalisée avec l'outil GEO2R (Lima) disponible sur la plateforme GEO, avec comme seuils de significativité la p-value corrigée < 0.01 et un $|\log_2\text{FC}| \geq 0.4$. 513 gènes sont différentiellement exprimés de façon significative pour GPL96 et 63 pour GPL97. Ces résultats ont été croisés avec notre propre liste de DEG exprimés dans les skMt dérivées de hiPSC LGMD R2 (p-value corrigée < 0.05 & $|\log_2\text{FC}| \geq 0.4$) par Diagramme de Venn. Les gènes *DAB2* et *CFH* ont été identifiés en commun et régulés de façon similaire.

3.1.6. Analyse par immunofluorescence

Les cellules dérivées de hiPSC ont été fixées aux jours 17 (skMb) et 24 (skMt) de la différenciation avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Après 3 lavages PBS, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,5% pendant 5 minutes puis saturées avec du PBS supplémenté par 1% d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été incubées sur la nuit à +4°C avec les anticorps primaires suivants : titine (US biological, 1:200), dysferline (abcam, 1:200), dab2 (abcam, 1:200), α -actinine (ThermoFisher, 1:1000). Après 3 lavages PBS, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante et dans l'obscurité avec des

anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (Alexa fluor, ThermoFisher Scientific, 1:1000). Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst 33342 (Invitrogen, 5µg/ml). Les acquisitions d'images ont été réalisées à l'aide de la plateforme d'imagerie automatisée Cell Insight CX7 HCS (Cellomics Inc) à l'aide des objectifs 10X ou 20X. Les grossissements du marquage dysferline ont été acquis en utilisant l'objectif 63X et le module "Stack" d'un microscope confocal (LSM-800, Zeiss). Les piles d'images capturées dans un axe Z ont ensuite été combinées avec le logiciel Zen Black (Zeiss) pour obtenir une image unique et résolutive.

3.1.7. PCR quantitative

Gene	Forward	Reverse
ACOT1	ATCTGGAGTACTTTGAAGAAGCTGT	CCAACTCCTGGACCTTTTACCTCA
ADAMTS15	AACAAGCACAGGGTGGATGG	TGCAGGATCGGTATTTACCCC
CBLN2	ACCATCCAGGTCAGTTTAATGC	AACACCAAGAAGCCCCGAGAA
CDH3	CAGCTACCGCATCCTGAGAG	GTGGGAGGGCTTCCATTGTC
CDH6	CCCATTCCCCAGAGTACAT	CGTCGCTGGCTTTGATTCTG
CELSR2	ATGTGTGTGACCTGAACCCG	GGCTGGTCAATCCTGGTCTC
CHI3L1	AAGAACAGGAACCCCAACCTG	TGCTGTTTGTCTCTCCGTCC
CNTNAP2	ACCCAGATGGAAGCCCTTA	GATCTGTGCAATTGCGTTCCG
COL21A1	CCTGGAACACCGGGATCTAA	TGCTCCTGGTTCTCCCTTGA
COL6A3	TGCGGGAAGCAGGATAACAG	CATCATCCCCAGACCTGTCCG
COL8A1	CCTGGGTCAGCAAGTACCTC	TGGTATTTCTTGCCTTTCTTGGG
CXCR4	TGGTCTATGTTGGCGTCTGG	GTCATTGGGGTAGAAGCGGT
DAB2	GACCAGATGGATTTGTTTGGGG	GAACAGGAGGTGATGCCGTT
HTRA1	TGCTACTCACGTCCAGCAAA	GACATCATTGGCGGAGACCA
ITGA10	GGGGGAGCAGATTGGTTCAT	GTTCTTGGAGGGTCAGCAA
ITGA11	AATAAGTGGCTGGTCGTGGG	GTGACCCTCCCAGGTTGAG
KIAA1199	ACTCAGGGCTGTTGTTCTCTG	TCGGTGAACCTGGGGTAAGC
MYOD	GGGGCTAGGTTTCAGCTTTCT	CTACATTTGGGACCGGAGTG
MYOG	TAAGGTGTGTAAGAGGAAGTCG	CCACAGACACATCTTCCACTGT
NEURL1B	GTGAGTCCGTCCAGTTGAGG	GGGACTCGGATAAGACAGCG
NPTX2	TTGGACAAGAGCAGGACACC	GAGCAGTTGGCGATGTTGAC
OCT4	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA
OLFM2	TGGAGCAGTACAAGGCAGAC	ATACCCGTAGGCACCCATCT
PELI2	CGGATATGTTTCAGGTGGGC	CTGTGTGATCTGGGCTTCGT
TM4SF1	GCAAACGATGTGCGATGCT	GGCCGAGGGAATCAAGACAT

Tableau 6. Liste des amorces humaines utilisées pour la PCR quantitative.

Les ARNm des hiPSC, skMb et skMt ont été isolés à l'aide du kit d'extraction RNeasy Mini (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant, puis leur concentration et leur qualité ont été vérifiées à l'aide d'un NanoDrop. Un total de 500 ng d'ARN a ensuite été utilisé pour la transcription inverse en utilisant le kit SuperScript III (Invitrogen). La PCR quantitative a été réalisée à l'aide du système QuantStudio 12 K Flex (Applied biosystem) et du Luminaris Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific) ou du TaqMan gene expression Master Mix (Roche). La quantification de l'expression génétique a été basée sur la méthode du DeltaCt et normalisée

par rapport à l'expression du 18S (Assay HS_099999). Les séquences des amorces qui ont été conçues sont énumérées dans le [tableau 6](#). Les séquences des autres gènes sont disponibles dans le commerce (Applied biosystem, Waltham, MA, USA) : DYSF (Hs01002513) et TTN (Hs00399225).

3.1.8. Extraction protéique et western blot

Les lysats de skMt dérivés de hiPSC ont été collectés après 24 jours de différenciation. Les protéines ont été extraites avec le tampon de lyse RIPA (Thermo Scientific), complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) et de nucléases (Millipore). Après une centrifugation de 15 minutes à 10 000g et +4°C, la concentration en protéines du surnageant a été mesurée à l'aide d'un kit commercial de dosage BCA (Thermo Scientific) et évaluée à l'aide d'un lecteur de microplaques CLARIOstar® (BMG Labtech). Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel Criterion™ XT (4–15% tris-glycine, Biorad) puis transférées sur une membrane de PVDF grâce au système Trans-Blot Turbo Transfert (Biorad), conformément aux instructions du fabricant. La membrane a été bloquée dans un tampon de blocage commercial (Odyssey, LiCor) pendant 1 heure à température ambiante avant d'être incubée pendant la nuit à +4°C avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage. Trois lavages ont été effectués pendant 10 minutes à température ambiante avec du TBS + 0,1% de Tween20 et les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires appropriés dilués dans le tampon de blocage. Enfin, trois lavages avec du TBS + 0,1% de Tween20 ont été réalisés avant la révélation des membranes grâce au système d'imagerie fluorescente (Odyssey, LiCor). Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : Mouse anti-dysferline (abcam,1 :200), Rabbit anti-dab2 (abcam, 1:200), Mouse anti-GAPDH (ThermoFisher, 1:1000). Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants : Donkey anti-mouse IRDye-680 (LiCor, 1:5000) et Donkey anti-rabbit IRDye-800 (LiCor, 1:5000).

3.1.9. Test de réparation des membranes après lésion au laser

La capacité de réparation de la membrane plasmique des skMt dérivés de hiPSC a été évaluée par la cinétique d'absorption intracellulaire du colorant lipophile fluorescent FM4-64, normalement imperméable à la membrane, après blessure du sarcolemme par laser. Pour cela, les lésions membranaires ont été induites dans une solution de tyrode avec 2 mM de calcium à l'aide d'un système confocal à balayage laser multiphotonique (Olympus FV1000, 63X) et en présence de 2.5µM de FM4-64 (Life Technologies). Une zone circulaire a été sélectionnée le long du bord de la membrane des skMt et irradiée à une puissance laser de 20% pendant 5 secondes. Des images pré- et post- lésion ont été capturées toutes les 3 secondes, pendant 57 secondes. L'étendue des dommages membranaires a été analysée à l'aide du logiciel ImageJ, en mesurant l'intensité de fluorescence englobant le site des dommages. Pour éviter tout risque de biais, toutes les expériences ont été réalisées en aveugle. Ces expériences ont été réalisées par notre collaborateur, le Dr Weisleder (Ohio state university, USA).

3.1.10. Analyse des gouttelettes lipidiques

L'accumulation de gouttelettes lipidiques dans les skMt dérivés de hiPSC a été observée avec une sonde fluorescente, le LipidSpot (Biotum), après supplémentation ou non du milieu de culture en acides gras. Pour cela, les skMb ont été décongelés en SKM02 jusqu'à confluence puis induits en différenciation terminale en remplaçant le milieu par du SKM03. Au troisième jour de maturation, le milieu SKM03 a été supplémenté par une combinaison d'acides oléiques et linoléiques à 5 μ M ou 50 μ M final. Les cellules contrôles non traitées sont restées incubées dans du SKM03 classique. Les skMt ont été fixés au cinquième jour de maturation avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Après 3 lavages PBS, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,5% pendant 5 minutes puis saturées avec du PBS supplémenté par 1% de BSA (Sigma) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été incubées sur la nuit à +4°C avec un anticorps primaire α -actinine (ThermoFisher, 1:1000). Après 3 lavages PBS, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante et dans l'obscurité avec du Hoechst 33342 (Invitrogen, 5 μ g/ml) et du LipidSpot (Biotum, 1:1000). Après les étapes de lavage, les lamelles ont été montées dans une solution de fluoromount (ThermoScientific). Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal LSM 800 (Zeiss) avec un objectif haute résolution 63X et le module stack. Les piles d'images capturées dans un axe Z ont ensuite été combinées avec le logiciel Zen Black (Zeiss) pour obtenir une image unique et résolutive.

Les gouttelettes lipidiques ont également pu être observées dans les skMt dérivés de hiPSC par la technologie d'holotomographie proposée par la société NanoLive. Cette technologie permet de faire de l'imagerie cellulaire sur cellules vivantes, sans marquage et avec une résolution confocale équivalente à un objectif 63X. Pour cela, les skMb ont été décongelés en SKM02 jusqu'à confluence puis induits en différenciation terminale pendant 5 jours en remplaçant le milieu par du SKM03. Les cellules ont ensuite été imagées avec le 3D Cell Explorer (Nanolive) toutes les 10 secondes pendant 3 minutes dans une atmosphère contrôlée à 37°C et 5% de CO₂. Une image représentative du film est présentée dans les résultats. Les gouttelettes lipidiques sont observables sans marqueur fluorescent grâce à leur signal d'indice de réfraction élevé et unique.

4.2. Etudes *in vivo*

3.2.1. Modèles animaux

La souche de souris pathologique Bla/J (B6.A-Dysfprmd/GeneJ) qui contient un rétrotransposon ETn (5-6kb) dans l'intron 4 du gène de la dysferline, a été obtenue par notre collaboratrice le Dr Isabelle Richard (Généthon, France). Les souris contrôles C57BL6/J, du même fond génétique, proviennent des laboratoires Charles River (USA). Tous les animaux ont été élevés dans des conditions EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) avec accès à volonté à la nourriture et à l'eau. Toutes les procédures sur animaux ont été réalisées par l'équipe du Dr Richard, soit au Généthon, soit au Centre pour l'Exploration et la Recherche Fonctionnelle Expérimentale (CERFE, Généthon), conformément aux directives européennes

pour le soin et l'utilisation humaine des animaux de laboratoire (2010/63/UE). Les protocoles ont été approuvés par le comité d'éthique de Généthon sous les numéros CE11-013, A-013-CE11 et C2AE-51, ainsi que par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, sous le numéro APAFIS#19736.

3.2.2. Etudes *in vivo* et administration de vecteurs

Les études *in vivo* ont été réalisées sur des souris Bla/J mâles et les mâles contrôles C57Bl6/J associés. Pour les études visant à restaurer l'expression de la dysferline par thérapie génique, des souris BLA/J âgées de 1 mois ont été traitées, soit avec un mélange équimolaire des vecteurs AAV8_C5.12_HR5-hDysf et AAV8_HR3-DysfpA.SV40 dans du sérum physiologique à raison de $1.10e14$ vg/kg (génome viral par kilogramme d'animaux), soit uniquement avec du sérum physiologique pour les animaux contrôles, par une injection unique au niveau de la veine caudale par voie intraveineuse. Les souris ont été sacrifiées 1 mois ou 5 mois après l'injection.

3.2.3. Sacrifice

Les souris ont été sacrifiées par élongation cervicale et les muscles d'intérêt (Tibial Antérieur (TA), Psoas (PSO), Glutéal (GLU), Triceps (TRI) et le Diaphragme (DIA)) ont été prélevés. Les muscles issus du côté gauche de la souris ont été congelés pour les analyses histologiques dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide après avoir été montés en transversal sur un bouchon de liège par de la gomme Tracaganth (Sigma) à 6%. Les muscles droits ont été congelés directement dans l'azote liquide dans des tubes Eppendorf de 1.5ml. Tous les échantillons sont conservés à -80°C .

3.2.4. Caractérisation histologique des lignées murines

Dans le but d'observer les caractéristiques dystrophiques des muscles déficients en dysferline, des analyses histologiques ont été réalisées. Des coupes transversales de $8\ \mu\text{m}$ d'épaisseur ont été réalisées au cryostat (Leica) à partir des muscles et organes congelés en isopentane refroidi. Les lames sur lesquelles reposent les coupes ont été conservées à -80°C en attendant une coloration de type Hématoxyline-Phloxine-Safran ou un marquage immunohistofluorescent. Les coupes et colorations ont été réalisées par la plateforme d'Histologie de Généthon.

La coloration histopathologique à l'Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) permet de mettre en évidence les différentes structures tissulaires et cellulaires. La solution d'hématoxyline est un colorant basique qui contient de l'hématéine et des sels d'aluminium ou de fer. Elle colore les acides nucléiques en bleu (chromatine – bleu pourpre et nucléoles – violacés). La phloxine est un colorant acide qui colore les structures éosinophiles (cytoplasme – rose, érythrocytes – rouge). Le safran, quant à lui, colore les fibres conjonctives (collagène) en jaune-orangé. En ce qui concerne la procédure, les lames sont sorties du congélateur, séchées sous la hotte 10 minutes puis incubées 5 minutes dans un bain d'hématoxyline de Harris (Sigma, réf. HHS32-

1L). Les coupes sont rincées à l'eau pendant 2 minutes puis à l'alcool chlorhydrique à 0,2 % (v/v) pendant 10 secondes et à nouveau avec de l'eau pendant une minute. Les coupes sont ensuite plongées dans un bain en eau de Scott (0,5 g/L de bicarbonate de sodium et 20 g/L de sulfate de magnésium) pendant 1 minute avant d'être rincées à l'eau pendant 1 minute. La coloration continue avec un bain de phloxine à 1 % (m/v) (Sigma, réf. 1159260025) pendant 30 secondes. Les coupes sont rincées à l'eau pendant 1 minute 30, déshydratées à l'éthanol à 70 % pendant une minute puis à l'éthanol absolu pendant 30 secondes. Enfin, la coloration se termine par un bain au safran à 1 % (v/v en éthanol absolu) pendant 3 minutes, suivi d'un rinçage en éthanol absolu. Les coupes sont éclaircies en bain de xylène pendant 2 minutes et montées avec lamelle en milieu Eukitt (Labonord, réf. 05347505). Les lames sont laissées à sécher au minimum 24 heures puis scannées à l'aide de l'AxioScan (Zeiss). Les lames sont conservées à température ambiante.

3.2.5. PCR quantitative

L'ARN a été extrait par la méthode du NucleoZOL. Tout d'abord, les tissus musculaires congelés dans l'azote ont été coupés en trois afin qu'un bout soit lysé dans du réactif NucleoZOL (Macherey-Nagel) et homogénéisé mécaniquement via le FastPrep-24 (MP Biomedicals). Le lysat obtenu a été complété avec de l'eau, incubé 10 minutes à température ambiante et centrifugé 15 minutes à 12 000g à température ambiante afin de précipiter les contaminants. Le surnageant a été récupéré, incubé 10 minutes à température ambiante avec de l'isopropanol et centrifugé 10 minutes à 12 000g à température ambiante afin de précipiter l'ARN total. Le culot d'ARN a été lavé avec de l'éthanol 75% avant d'être centrifugé 3 minutes à 8 000 g à température ambiante. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché à l'air libre pendant 15 minutes. Enfin, le culot d'ARN a été resuspendu avec de l'eau sans RNases puis dosé au Nanodrop.

Un total de 500 ng d'ARN a ensuite été utilisé pour la transcription inverse en utilisant le kit SuperScript III (Invitrogen). La PCR quantitative a été réalisée à l'aide du système QuantStudio 12 K Flex (Applied biosystem) et du Luminaris Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific). La quantification de l'expression génétique a été basée sur la méthode du DeltaCt et normalisée par rapport à l'expression du gène de référence murin Po. Les séquences des amorces qui ont été conçues sont énumérées dans le [tableau 7](#).

Gene	Forward	Reverse
Po	CTCCAAGCAGATGCAGCAGA	ATAGCCTTGCGCATCATGGT
DYSF	GGTGTTCGAGAACCAGACCC	GCTGTACTIONCCAGCCTTGTT
DAB2	GACATGTCTACACCTCCTGACCT	AGGATGCCTGAGGCTTTGGTCG

Tableau 7. Liste des amorces murines utilisées pour la PCR quantitative.

PARTIE 3 : Mise en place d'un modèle pharmacologique de la LGMD R2 afin d'identifier des molécules capables d'empêcher la dégradation des formes mal conformées mais fonctionnelles de la dysferline.

Article 2

Identification of Saracatinib and Bazedoxifene for the treatment of LGMD R2: An in vitro pharmacological approach to rescue misfolded dysferlin degradation.

Celine Bruge¹²³, Emilie Pellier¹²³, Johana Tournois¹²³, Jerome Polentes¹²³, Nathalie Bourg⁴, Manon Benabides¹²³, Noella Grossi¹²³, Lucile Hoch¹²³, Anne Bigot⁵, Isabelle Richard⁴ and Xavier Nissan¹²³

¹ CECS, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

² INSERM U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

³ UEVE U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

⁴ INTEGRARE, Genethon, Inserm, Université Evry, Université Paris-Saclay, 91002 Evry, France

⁵ Centre de Recherche en Myologie, Institut de Myologie, Inserm, Sorbonne Université, 75013 Paris, France

1. Contexte

Un tiers des défauts génétiques à l'origine des dysferlinopathies sont des mutations faux-sens (Cacciottolo et al., 2011; Izumi et al., 2020; Jin et al., 2016), entraînant la production de protéines mal conformées et agrégées, reconnues par le contrôle qualité du réticulum endoplasmique, puis dégradées par la voie de dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique (ERAD) par l'intermédiaire du système ubiquitine-protéasome (Fujita et al., 2007). Bien qu'aucun traitement ne soit actuellement disponible pour les dysferlinopathies, une stratégie de choix pour corriger un maximum des traits cliniques de la pathologie est de restaurer l'expression de la dysferline. Dans ce sens, la recherche orientée vers le repliement/la maturation des protéines faux-sens ou ciblant les voies de dégradation des protéines avec des petites molécules, afin de relocaliser les protéines mutées à la membrane et restaurer leurs fonctions, ouvre une voie thérapeutique pour les dysferlinopathies. Des preuves à l'appui de cette stratégie de sauvetage des mutations faux-sens ont été récemment décrites par notre groupe, au cours de deux études sur la LGMD R3 auxquelles j'ai participé pendant ma thèse (Annexes 1 et 2). Dans la première (Hoch et al., 2019), notre groupe a développé un modèle pharmacologique de la LGMD R3 afin d'identifier des molécules capables d'empêcher la dégradation de la protéine mutante faux-sens α -sarcoglycane (R77C). Nous avons rapporté que parmi les 2000 médicaments repositionnables testés, un seul, le thiostrepton, était capable de restaurer la localisation membranaire de l' α -sarcoglycane mal conformée via une inhibition directe du protéasome. Dans la seconde étude (Hoch et al., 2022), la même protéine mutante α -sarcoglycane (R77C) a pu être relocalisée vers la membrane plasmique par l'association de deux molécules, le givinostat et le bortezomib, en perturbant les systèmes de dégradation du protéasome et de l'autophagie. Dans ce contexte, un des objectifs de ma thèse a consisté à **mettre en place un modèle pharmacologique de la**

LGMD R2 afin d'identifier des médicaments capables d'empêcher la dégradation des formes mal conformées mais fonctionnelles de la dysferline.

Parmi le large panel des mutations faux-sens pathogéniques de *DYSF*, je me suis intéressée au variant L1341P (c.4022T>C) qui est l'un des plus décrits dans la littérature. Identifié il y a 15 ans (Wenzel et al., 2006), ce mutant entraîne l'agrégation intracellulaire de la dysferline dans les fibres musculaires dystrophiques de patients LGMD R2. Bien que mal conformée, une étude a démontré que cette forme mutante de la dysferline conservait au moins une partie de sa fonctionnalité, dont sa capacité de réparation membranaire, si elle était relocalisée à la membrane (Schoewel et al., 2012). Plus récemment, sur la base de l'hypothèse selon laquelle le sauvetage des formes mutantes de la dysferline pourrait constituer une option thérapeutique intéressante, une autre étude a évalué l'efficacité d'une dizaine de composés à empêcher la dégradation de la dysferline mal conformée à l'aide d'un test de cytométrie en flux qui quantifie la localisation de la protéine à la membrane plasmique (Tominaga et al., 2022). Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence l'effet positif du correcteur CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) corr-2b et du chaperon chimique 4-PBA sur la relocalisation membranaire des mutants *DYSF*^{W992R}, *DYSF*^{E1335G}, *DYSF*^{L1341P}, et *DYSF*^{F1867L} et, plus particulièrement, le bénéfice fonctionnel du traitement avec le 4-PBA dans la restauration des capacités de réparation membranaire des myotubes exprimant la dysferline L1341P. Ainsi, en me référant à ces études démontrant la fonctionnalité du variant mal conformé L1341P de la dysferline, l'objectif de mon programme a été de développer un test *in vitro* à haut débit permettant de suivre l'effet de centaines de composés sur l'expression et la localisation de la dysferline mutante L1341P à la membrane plasmique.

2. Résultats

2.1. Développement et optimisation d'un essai de criblage à haut contenu

La première étape de cette étude consistait à développer un test *in vitro* à haut débit permettant de quantifier la localisation de la dysferline L1341P à la membrane plasmique. Pour cela, nous avons tiré parti du modèle cellulaire de myoblastes immortalisés *DYSF*^{L1341P} qui récapitule l'agrégation de la dysferline dans le réticulum endoplasmique et le phénotype pathologique de défaut de PMR (Philippi et al., 2012). Tout d'abord, plusieurs tests d'immunomarquage ont été développés en plaque 384 puits à l'aide de plateformes automatisées pour tenter d'évaluer la localisation au sarcolemme de la dysferline mutante et normale. La partie extracellulaire de la dysferline étant trop petite (<20 acides aminés) pour être ciblée par un anticorps primaire, seuls les domaines intracellulaires de la protéine peuvent être marqués en conditions perméabilisées, nous empêchant alors de certifier une localisation membranaire de la dysferline par cette technique. Les immunomarquages ont donc été optimisés en utilisant des colorants fluorogènes spécifiques de la membrane plasmique (MemBrite, membrane cell stain, mCling, Wheat Germ Agglutinin) permettant d'envisager de mesurer un pourcentage de colocalisation avec la dysferline. Cependant, ces sondes n'étant pas résistantes aux procédures d'immunofluorescence telles que la fixation ou la perméabilisation, les tests se sont révélés infructueux. Finalement, l'essai a été basé sur la

quantification de l'expression de la dysferline mutante dans les myoblastes immortalisés L1341P en utilisant la plateforme d'imagerie automatisée CellInsight CX7 HCS. Le test repose sur (1) la détection des agrégats de dysferline par immunofluorescence et (2) la quantification du nombre de cellules exprimant strictement plus d'un agrégat (Figure S1A et Figure 1A et 1B). Dans le but de valider ce modèle pharmacologique et d'identifier un contrôle positif pour le criblage de molécules, la capacité d'une quinzaine de composés à augmenter l'expression du variant L1341P a ensuite été évaluée (Figure S1B, S1C et S1D). En se référant à des données précédentes démontrant que l'expression de mutants mal conformés de la dysferline pouvait être modulée par des inhibiteurs des voies de dégradation des protéines (Azakir et al., 2012)(rétracté) (Fujita et al., 2007), l'efficacité d'inhibiteurs du protéasome, d'inhibiteurs de l'ERAD et de régulateurs de l'autophagie a été mesurée, montrant une augmentation significative et dose dépendante du nombre de cellules positives à la dysferline après un traitement avec la bafilomycine (Figure 1D). Enfin, les différentes étapes de ce test ont été améliorées pour aboutir à l'obtention d'un Z' facteur (valeur statistique gageant de la fiabilité du test) supérieur à 0,5 permettant de passer à l'étape du criblage.

2.2. Identification de candidats médicaments empêchant la dégradation la dysferline L1341P mal repliée

Par la suite, une campagne de criblage de 2239 médicaments repositionnables, répartis dans deux librairies différentes, a été réalisée (Figure 2A et 2B). La Prestwick Chemical library regroupe une collection de 1280 petites molécules dont 95% sont approuvées pour des applications cliniques par la FDA ou l'EMA. Cette librairie présente l'avantage de contenir des molécules peu toxiques chez l'homme, recouvrant une grande diversité pharmacologique. La Selleckchem library est une librairie de 959 composés bioactifs dont la plupart sont des médicaments approuvés par la FDA. L'analyse de ce criblage nous a permis d'identifier 13 molécules efficaces (Figure 2C et 2D). Parmi celles-ci, 9 ont montré une efficacité croissante en fonction de la dose testée, sans toxicité apparente aux doses efficaces (Figure 3C).

2.3. Caractérisation de l'effet des candidats médicaments sur l'expression et la localisation de la dysferline

Dans la suite de notre étude, nous avons caractérisé l'effet des 9 candidats médicaments sur l'expression et la localisation de la forme mutante L1341P de la dysferline.

Dans un premier temps, nous avons évalué le niveau d'expression du gène *DYSF* afin de déterminer si l'augmentation de la dysferline était la conséquence du sauvetage de la protéine ou d'une activité transcriptionnelle accrue. Ainsi, l'analyse par PCR quantitative du profil d'expression des myoblastes L1341P traités 24 heures avec la dose maximale efficace de chacun des 9 composés montre une dérégulation transcriptionnelle significative du gène *DYSF* avec 5 candidats médicaments (diminution d'un facteur 2 ou augmentation d'un facteur 1.5 au maximum) (Figure S3).

Dans un second temps, nous avons confirmé la pertinence des composés identifiés à relocaliser

la dysferline mutante L1341P en dehors du réticulum endoplasmique. En effet, les immunomarquages révèlent que le traitement des myoblastes *DYSF*^{L1341P} avec les 9 molécules entraîne une augmentation de l'expression de la dysferline mutante et une absence de marquage dans le réticulum endoplasmique, soulignant un effet positif des molécules identifiées sur l'agrégation de la dysferline.

2.4. Caractérisation fonctionnelle des candidats médicaments avec un test secondaire

Enfin, la dernière partie de cette étude consistait à évaluer le potentiel thérapeutique des 9 candidats médicaments. Pour cela, nous avons mesuré la capacité des cellules à réparer leur membrane plasmique après un stress en développant un test secondaire basé sur la résistance des myoblastes immortalisés à un choc osmotique. Ce test consiste à placer les cellules dans une solution hypotonique composée de 75% PBS/25% H₂O puis à surveiller l'intégrité de la membrane plasmique en mesurant, dans le temps, le taux de mortalité des cellules grâce à un colorant des caspases 3/7 (apoptose).

Dans un premier temps, nous avons validé la pertinence du test secondaire en démontrant le lien entre l'expression de la dysferline et son rôle protecteur de la membrane plasmique contre le stress mécanique induit par un choc osmotique. En effet, un choc osmotique réalisé sur des myoblastes contrôles entraîne 50% de mortalité en 12 heures alors que ce taux est augmenté à 100% lorsque ces mêmes cellules sont déplétées en dysferline à l'aide d'un siRNA (Figure S4). Dans un second temps, nous avons utilisé le test secondaire afin d'évaluer la fonctionnalité des candidats médicaments. Parmi les 9 molécules identifiées, seuls le saracatinib et le bazédoxifène ont montré un intérêt thérapeutique en améliorant la résistance des myoblastes L1341P au choc osmotique (Figure 5A et 5B). Par ailleurs, nous démontrons dans cette étude que l'effet du saracatinib sur le choc osmotique n'est observé que dans les myoblastes exprimant la dysferline L1341P alors que celui du bazédoxifène a été mesuré dans toutes les lignées cellulaires testées, y compris des cellules saines. Ainsi, ces données suggèrent que l'effet du saracatinib sur la résistance cellulaire serait lié au sauvetage de la dysferline mutante L1341P alors que le mécanisme d'action du bazédoxifène serait différent et non lié à la dégradation du mutant L1341P.

3. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons développé un test à haut débit qui peut être utilisé pour identifier de petites molécules capables de sauver les formes mutantes de la dysferline de leur rétention dans le réticulum endoplasmique et de leur dégradation précoce. Grâce à cette plateforme, l'effet de 2239 médicaments repositionnables a été évalué sur l'expression et la localisation du mutant L1341P de la dysferline, aboutissant à l'identification du saracatinib et du bazédoxifène comme des médicaments candidats à explorer pour le traitement des patients LGMD R2 porteurs de la mutation *DYSF*^{L1341P}. Au-delà de ce résultat, cette étude décrit

également une procédure réutilisable pour évaluer l'effet de milliers de médicaments repositionnables sur des troubles musculaires similaires causés par des mutations faux-sens dégradées par l'ERAD.

Identification of saracatinib and bazedoxifene for the treatment of LGMD R2: An *in vitro* pharmacological approach to rescue misfolded dysferlin degradation

Celine Bruge¹²³, Emilie Pellier¹²³, Johana Tournois¹²³, Jerome Polentes¹²³, Nathalie Bourg⁴, Manon Benabides¹²³, Noella Grossi¹²³, Lucile Hoch¹²³, Anne Bigot⁵, Isabelle Richard⁴ and Xavier Nissan^{123#}

¹ CECS, I-Stem, Corbeil-Essonnes, 91100, France.

² INSERM U861, I-Stem, Corbeil-Essonnes, 91100, France.

³ UEVE U861, I-Stem, Corbeil-Essonnes, 91100, France.

⁴ INTEGRARE, Genethon, Inserm, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, 91002, France.

⁵ Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, Paris, 75013, France.

#Correspondence: Xavier NISSAN xnissan@istem.fr

Keywords: limb-girdle muscular dystrophies; misfolded protein; high-throughput screening; saracatinib; bazedoxifene; autophagy.

ABSTRACT

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) are a group of rare genetic disorders characterized by progressive proximal muscle weakness and wasting. Among them, LGMD R2 is caused by a recessive loss of dysferlin function, a transmembrane protein that plays a key role in plasma membrane repair in skeletal muscles. Over the years, more than a thousand mutations in the *DYSF* gene have been described in patients with LGMD R2. One third of these mutations are missense mutations, leading to dysferlin misfolding, aggregation within the endoplasmic reticulum or subsequent degradation by the endoplasmic reticulum-associated protein degradation machinery (ERAD). We report here on the development of an *in vitro* high-throughput assay using immortalized myoblasts that allows monitoring of the expression and reallocation of an aggregated mutant form of dysferlin (*DYSF*^{L1341P}). Using this assay, we screened a library of 2239 clinically approved drugs and bioactive compounds, and identified two autophagy inducers, saracatinib and bazedoxifene, as potential drugs to repurpose for LGMD R2 patients carrying the *DYSF*^{L1341P} mutation. Functional characterization of these drugs with an osmotic shock assay revealed that saracatinib and bazedoxifene had a protective effect on the plasma membrane. While saracatinib restores functionality in membrane resealing through a specific rescue of L1341P dysferlin from degradation, the effect of bazedoxifene was unrelated. Beyond the identification of a new therapeutic option for LGMD R2 patients, our results shed light on a reusable procedure to evaluate the effect of thousands of repurposable drugs on similar muscular disorders caused by missense mutations that are degraded by ERAD.

INTRODUCTION

Limb-girdle muscular dystrophies (LGMD) refer to a genetically heterogeneous group of autosomal inherited muscular dystrophies, characterized by progressive muscle weakness and wasting of the shoulder or pelvic girdles (Walton and Nattrass, 1954). Among these, dysferlinopathies are a subgroup caused by mutations in the dysferlin gene (*DYSF*) (Bashir et al., 1998; Liu et al., 1998) and are mainly defined by the two most frequently encountered clinical phenotypes (Nguyen et al., 2007): distal Miyoshi myopathy type 1 (MM) and proximal LGMD R2 (previously named 2B). Dysferlinopathies are characterized by phenotypic heterogeneity with a high degree of variability in disease onset, from adolescence to early adulthood, in disease severity, from asymptomatic mutation to severe functional disability, and in rate of progression, from a slight decline in ambulatory function to the loss of ambulation 10 to 20 years after onset (LoMauro et al., 2021). The protein encoded by the *DYSF* gene, dysferlin, is a type-II transmembrane protein mainly expressed in the sarcolemma of striated skeletal muscles (Anderson et al., 1999). Dysferlin belongs to the ferlin family and contains a large intracellular domain composed of seven calcium-binding C2-domains, a carboxy-terminal transmembrane region and a very short extracellular domain. While the clinical features of dysferlinopathies are well described, the molecular mechanisms related to these diseases are still not fully characterized. Over recent years, studies on dysferlin have mostly focused on its role in membrane repair of injured sarcolemma in skeletal muscle fibers; a critical calcium-dependent machinery for maintaining muscle integrity and function (Blazek et al., 2015). Ultrastructural analysis of dysferlinopathy muscle fibers showed disruption of the plasma membrane and its replacement by layers of small vesicles (Cenacchi et al., 2005; Selcen et al., 2001). Loss of membrane integrity and accumulation of subsarcolemmal vesicles were also observed in muscle fibers from dysferlin-deficient mice (Bansal et al., 2003). Other suggested functions of dysferlin, that could contribute toward the pathophysiology of dysferlinopathies, include vesicular trafficking (Bansal et al., 2003; Lek et al., 2012), monocyte adhesion (de Morrée et al., 2013), inflammation (Han, 2011; McNally et al., 2000) and calcium homeostasis (Cea et al., 2016; Kerr et al., 2014). Recent evidence indicates that dysferlin may also contribute toward the regulation of the T-tubule system (Demonbreun et al., 2014; Kerr et al., 2013; Klinge et al., 2010, 2007), lipid metabolism and fat deposition (Grounds et al., 2014; Haynes et al., 2019). While several therapeutic strategies using gene therapy or exon skipping have been investigated (Barthélémy et al., 2018; Lee et al., 2018; Lostal et al., 2010; Potter et al., 2018; Pryadkina et al., 2015; Verwey et al., 2020), there is currently no treatment for LGMD R2. Recent studies highlight the potential of targeting pathological phenotypes, as revealed through the use of galectin-1 (Gal-1, a soluble carbohydrate-binding protein), to increase the membrane repair capacity and myogenic potential of dysferlin-deficient muscle cells and muscle fibers (Vallecillo-Zúniga et al., 2020). Identification of new phenotypes is consequently the key to identifying new pharmacological strategies. A first step was recently reported based on the observation of signs of oxidative stress in skeletal muscle in patients with dysferlinopathy, leading the authors to evaluate the effect of 10-weeks dietary supplementation with the antioxidant agent N-acetylcysteine in dysferlin-deficient mice (García-Campos et al., 2020).

Analyses of large cohorts of patients have revealed that more than 1000 mutations in the *DYSF*

gene can lead to dysferlinopathies (Leiden Open Variation UMD-DYSF)(Krahn et al., 2009), without any apparent mutational hotspots. At least a third of these mutations are missense mutations (Cacciottolo et al., 2011; Jin et al., 2016; Schoewel et al., 2012, 2012), leading to the production of misfolded proteins, aggregation in the endoplasmic reticulum (ER) and subsequent degradation by the ER-associated protein degradation machinery (ERAD). Although no treatment is currently available for LGMD R2, research directed towards missense protein refolding, or targeting cellular quality control to inhibit premature degradation of proteins in the ER with small molecules, opens up a therapeutic avenue for LGMD R2. Evidence in support of this strategy to rescue missense mutations that cause LGMD has recently been described by our group for LGMD R3, as revealed by the positive impact of the combination of givinostat and bortezomib on α -sarcoglycan missense mutant protein reallocation to the plasma membrane (Hoch et al., 2022), by disrupting proteasomal and autophagic degradation systems. Among the large panel of missense *DYSF* mutations that cause LGMD R2, we focused here on exploring the *DYSF*^{L1341P} mutant, in particular. This mutant was identified 15 years ago (Wenzel et al., 2006) and initially shown to cause patchy sarcolemmal immunostaining and intracellular aggregates of dysferlin in the muscle fibers of patients. In 2007, Fujita et al. reported that aggregates of this dysferlin mutant on the ER membrane stimulated autophagosome formation via the activation of ER stress-eIF2 α phosphorylation (Fujita et al., 2007). These results subsequently led to the investigation of pharmacological compounds that modulate autophagy, on one hand showing that the autophagy inducer rapamycin inhibited the accumulation of the *DYSF*^{L1341P} mutant, reducing its aggregation from 38% to 18%. On the other hand, the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) was shown to increase accumulation from 36% to 44%. While misfolded, Simone Spuler later reported in 2012 that relocating this mutant form of dysferlin in the membrane with peptides could restore part of its functionality, including the defective membrane repair capacities of muscular cells (Schoewel et al., 2012). More recently, based on the hypothesis that rescuing mutant forms of dysferlin could be a valuable therapeutic option, another study evaluated a selection of compounds using a 96-well plate cell-based flow cytometry assay that quantifies dysferlin localization in the plasma membrane (Tominaga et al., 2022). In this study, the authors highlighted the positive effect of the CFTR corrector corr-2b and the chemical chaperone 4-PBA in rescuing *DYSF*^{W992R}, *DYSF*^{E1335G}, *DYSF*^{L1341P}, and *DYSF*^{F1867L} mutant localization in the plasma membrane and, more particularly, the functional benefit of 4-PBA treatment in restoring the membrane repair capacities of myotubes expressing the L1341P dysferlin.

We report here on the development of a high-throughput assay to identify any drugs capable of reallocating the aggregated *DYSF*^{L1341P} mutant form of dysferlin, by hypothesizing that this treatment might secondarily improve membrane repair function in patients' cells. Taking advantage of the *DYSF*^{L1341P} immortalized myoblast cellular model, recapitulating aggregation of dysferlin in ER and the pathological phenotype of disrupted membrane repair (Philippi et al., 2012), we screened a library of 2239 drug candidates comprising off-patent small molecules, of which 95% are approved drugs, and bioactive compounds. Following primary screening and secondary assays, our results describe the discovery of the positive impact of two compounds, saracatinib and bazedoxifene, on reallocating misfolded L1341P dysferlin outside the ER and

improving myotubes resistance to osmotic shock.

RESULTS

Development and optimization of the high-content screening assay. A 384-multiwell assay was developed on LGMD R2 immortalized myoblasts, to identify pharmacological compounds capable of rescuing L1341P dysferlin aggregation and reallocating the protein to the plasma membrane. The assay is based on the detection of dysferlin-positive cells by immunostaining and their quantification by high-content imaging, as described in Figure 1A. Immunofluorescence was performed using the desmin and dysferlin antibodies, 24 hours after treatment with either 0.1% DMSO as the negative control or the positive control. Images were acquired using the automated imaging CellInsight CX7 HCS platform and analyzed with the HCS Reader software. Masks of fluorescent signals were developed to delimit the nuclei (Hoechst), to segment the myoblasts (desmin) and to identify dysferlin aggregates (dysferlin) (Figures 1B and S1A). A co-localization algorithm was applied to quantify dysferlin-positive cells, i.e. the number of myoblasts containing more than one dysferlin aggregate in their cytoplasm, and a threshold on the level of dysferlin intensity was applied, such that less than 10% of cells were dysferlin-positive after treatment with the negative control, 0.1% DMSO. The first step in the development of the screening procedure was to identify a positive control. To do so, the effect of proteasome inhibitors (Figure S1B), ERAD inhibitors (Figure S1C) and autophagy regulators (Figure S1D) was measured on *DYSF*^{L1341P} myoblasts, showing a significant increase of up to 60% in the number of dysferlin-positive cells after 24 hours of treatment with bafilomycin and chloroquine. Dose-response experiments were performed using these two autophagy inhibitors, bafilomycin and chloroquine (Figures 1C and 1D), confirming a dose-dependent effect of these drugs on the number of L1341P dysferlin-positive myoblasts. The most efficient treatment was bafilomycin, inducing an increase in dysferlin-positive cells with an EC_{50} of 20nM and reaching maximum efficacy without toxicity at 64nM (Figure 1C). Chloroquine was also a potent drug with an EC_{50} of 2 μ M, but exhibited more toxic side effects on *DYSF*^{L1341P} myoblasts, with a decrease in viability of 20% at the maximum effective concentration of 20 μ M (Figure 1D). Quantification of dysferlin-positive cells in *DYSF*^{L1341P} myoblasts treated with 0.1% DMSO or increasing concentrations of bafilomycin was used to assess the robustness of the assay through calculation of a Z' factor. The concentrations of bafilomycin that were compatible with high-throughput screening were the two most effective doses of 64 and 160nM, leading to Z' factors of 0.58 and 0.63, respectively (Figure 1E).

Identification of drug candidates for rescuing misfolded L1341P dysferlin from degradation by high-throughput screening. A total of 2239 compounds were screened at 5 μ M for their capacity to rescue L1341P misfolded dysferlin from degradation in *DYSF*^{L1341P} myoblasts. This library comprises 1280 FDA- and EMA-approved drugs from the Prestwick Chemical library and 959 FDA-approved drugs and bioactive compounds from the Selleckchem library. Quality of the screening assay was ensured by a statistically relevant difference between the negative 0.1% DMSO and positive 64nM bafilomycin controls (Figure 2A) that was measured for each of the 8 plates, giving a mean Z' factor of 0.55 (Figure 2B). Compounds were

considered as potential candidates when their effect was superior to five standard deviations from the mean for all the tested compounds, without affecting cell viability by more than 50% (Figure 2C). This led to an initial list of 13 hits (Figure 2D), with the number of L1341P dysferlin-positive myoblasts comprising between 24% and 53% for the least and most effective compound, respectively. Successive retest experiments were performed to validate the effect of these 13 candidates on the dysferlin read-out (Figure 3A). A first retest step was conducted in quadruplicate on *DYSF*^{L1341P} myoblasts under the same screening conditions for each of the 13 compounds, identifying PHA-665752 and SRT1720 as false positives with less than 24% of dysferlin-positive cells after 24 hours of treatment (Figure 3B). Moreover, detection of green-stained myoblasts without the dysferlin primary antibody after 24h of treatment with obatoclax mesylate revealed fluorescence interference for this drug and thus excluded it from the list of primary compounds (Figure S2). Dose-response experiments were then carried out on the remaining 10 confirmed hits, with increasing concentrations from the nanomolar to micromolar range (Figure 3C). Of these, the drug quinacrine was discarded because of the absence of efficacy on the dysferlin-positive cell readout. The 9 remaining compounds were validated as hits of interest with EC₅₀ comprised between 345nM to 3.9µM. Of these, GSK1070916, NVP-BSK805, saracatinib and bazedoxifene induced an effect equal to or greater than 60% on dysferlin-positive cell numbers after 24 hours of treatment with their maximum effective dose, 2µM or 5µM, and an associated toxicity of less than 20%. Crenolanib and SGI-1776 were the least effective compounds, with 24% and 30% dysferlin-positive cells, respectively, and a toxicity of 40% for crenolanib.

Characterization of the effect of the nine validated hits on *DYSF*^{L1341P} mutant expression and localization. To determine whether the effect of the nine validated compounds on the *DYSF*^{L1341P} mutant protein is transcriptional or post-transcriptional in origin, the *DYSF* gene expression was evaluated on myoblasts after 24h of treatment with the maximum effective dose of the drugs, as determined previously by dose-response experiments (10µM: azithromycin; 5µM: bazedoxifene, crenolanib, GSK1070916, saracatinib; 2µM: BI2536, fedratinib, NVP-BSK805, SGI-1776) (Figure S3). No significant difference was observed following treatment with azithromycin, bazedoxifene, GSK1070916 and NVP-BSK805 in comparison to 0.1% DMSO. In contrast, *DYSF* gene expression was significantly reduced (0.5-fold change) after treatment with BI2536 and crenolanib or increased (1.3 to 1.7-fold change) after treatment with fedratinib, saracatinib and SGI-1776, indicating a slight transcriptional deregulation in the *DYSF* gene after treatment. Dysferlin protein level and subcellular localization were then investigated by immunostaining and confocal analysis after treatment with the nine validated hits, at the same concentrations as those used for gene expression analysis (Figure 4). ER was labeled using the KDEL antibody to monitor the capacity of the drugs to relocate L1341P dysferlin outside this organelle. Immunostaining revealed that treatment of *DYSF*^{L1341P} myoblasts with the nine validated drugs leads to an increase in dysferlin expression and an absence of staining in the endoplasmic reticulum.

Evaluation of the effect of the nine validated hits on impaired membrane repair. To explore the potential of compounds to improve the LGMD R2 pathological phenotype, we then measured the ability of cells to repair their plasma membrane following stress by performing a hypo-osmotic shock assay (Barthélémy et al., 2015; Kerr et al., 2013). First, an osmotic shock assay was developed by adding 75% PBS/25% H₂O to healthy human myoblasts that had been transfected for 48 hours with a small interfering RNA specific to dysferlin, siDysferlin, or a negative control, siScrambled. Plasma membrane integrity was monitored by following cell mortality (calculated by the number of cells positive for green dye, a marker of apoptosis) over time compared to the number of cells positive for red dye, a nuclear marker, at the beginning of experiment (green/red dye ratio) (Figure S4A). Prior to the osmotic shock assay, knockdown expression of dysferlin was evaluated in healthy myoblasts by immunofluorescence, showing a reduction in the protein after 48 hours of treatment with siDysferlin compared to siScrambled (Figure S4B). The percentage of cell mortality in healthy myoblasts that had been pre-treated with siScrambled (or not) increased from 50% after 12 hours of osmotic shock to 100% after 16 hours (Figures S4A and S4C), showing mechanical stress on cells induced by osmotic shock. Conversely, osmotic shock on myoblasts lacking dysferlin induced an exacerbated mortality that reached 50% after 6 hours and 100% after 12 hours (Figures S4A and S4C), demonstrating the link between dysferlin expression and its protective role in the plasma membrane against osmotic shock. Using this procedure, functionality of the 9 validated hits was thus evaluated in *DYSF*^{L1341P} myoblasts pre-treated with the compounds at EC₅₀ for 24 hours (Figure 5A). Of these validated hits, our results indicated that saracatinib and bazedoxifene improved the resistance of cells to osmotic shock, with 50% mortality in 20 hours and more than 50 hours, respectively, compared to 15 hours after treatment with 0.1% DMSO (Figure 5B). The effect of increasing concentrations of these two molecules, saracatinib and bazedoxifene, was then evaluated in *DYSF*^{L1341P} myoblasts, demonstrating the dose-response effect of the compounds on the cells' resistance to osmotic shock (Figure 5C and 5C). At 2 μ M and 1 μ M, the maximum effective dose for saracatinib and bazedoxifene, osmotic shock induced 50% cell mortality in 37 hours and 63 hours, respectively, compared to about ten hours with the 0.1% DMSO control. The specificity of the effect of saracatinib and bazedoxifene on osmotic shock resistance was then assessed in healthy (Figure 5E), null-dysferlin (Figure 5F) and L1341P dysferlin (Figure 5G) immortalized myoblasts that had been pre-treated with the maximum effective dose of the two compounds. At the 2 μ M concentration, saracatinib only improved resistance of myoblasts to osmotic shock in the L1341P dysferlin aggregated model, while bazedoxifene (1 μ M) was efficient in all three models, with only 30% mortality in healthy immortalized myoblasts in more than 100 hours of osmotic shock.

DISCUSSION

The main result of this study is the identification of the protective effect of two drugs, saracatinib and bazedoxifene, as potential therapeutic options for the treatment of LGMD R2 patients carrying the *DYSF*^{L1341P} mutation. In addition, this study also describes a reusable procedure for evaluating the effect of thousands of repurposable drugs on muscular disorders caused by missense mutations degraded by ERAD.

While our drug screening described a positive effect of 9 drugs on L1341P dysferlin aggregation, secondary assays highlighted the therapeutic potential of two drugs in also rescuing osmotic shock resistance in LGMD R2 cells. As previously described, the capacity of LGMD R2 cells to resist osmotic shock reflects their membrane repair properties (Barthélémy et al., 2015; Kerr et al., 2013). We report here that the effect of saracatinib on osmotic shock is only observed in cells expressing L1341P dysferlin, while that of bazedoxifene was measured in all the cell lines tested, including healthy cells. These results suggest that the effect of saracatinib on cell resistance to osmotic shock is related to the rescue of L1341P dysferlin from degradation, whereas the effects of bazedoxifene on this readout and L1341P degradation are unrelated. Bazedoxifene is a third generation selective estrogen receptor modulator (SERM) (De Villiers et al., 2011), developed by Pfizer. In late 2013, Pfizer received approval for bazedoxifene as part of the combination drug DUAVEE for the prevention (not treatment) of postmenopausal osteoporosis. Thereafter, a few studies highlighted the potential of this drug to improve cell viability. In 2019, it was reported that bazedoxifene treatment prevented apoptosis of satellite cells through the estrogen receptor, suggesting a pro-survival effect on muscular cells (Collins et al., 2019). More recently, two studies suggested bazedoxifene played a role as an inducer of autophagy, on one hand, through PDGF-BB regulation in vascular smooth muscle cells (Song et al., 2020) and, on the other hand, by inducing autophagosome formation and LC3B-II protein expression through Akt/mTOR signaling in macrophages infected with *M. tuberculosis* (Ouyang et al., 2020). Bazedoxifene belongs to the same class of drugs as tamoxifen, another SERM associated with inducing autophagy, and some recent evidence gathered on the effect of this drug on muscular dystrophies (Kuşçu et al., 2022) supports the potential benefit of the effects of bazedoxifene on LGMD R2. Tamoxifen was recently investigated in a phase 3 clinical trial on safety and efficacy (NCT03354039) and was initially reported to improve cardiac, respiratory, and skeletal muscle function in the Duchenne muscular dystrophy mouse model (Dorchies et al., 2013; Gayi et al., 2018).

Saracatinib (AZD-0530) is a drug developed by AstraZeneca with an anti-invasive and anti-tumor mechanism of action that acts as a dual kinase inhibitor, with selective actions as a Src inhibitor and a Bcr-Abl tyrosine-kinase inhibitor. In 2010, inhibition of Src by siRNA or inhibitors was shown to promote autophagy in cancer cells through Akt/mTOR signaling (Wu et al., 2010). More recently, saracatinib was reported to be a potent molecule for clearing aggregates of misfolded phosphorylated Tau protein in Alzheimer's disease (Nygaard et al., 2015; Tang et al., 2020). Similarly, in 2020, the saracatinib-mediated blockade of Src activation was shown to inhibit the release of prion-like propagation of α -synuclein aggregates in Parkinson's disease via the activation of autophagy (Choi et al., 2020). Our data describing the positive impact of saracatinib on L1341P misfolded dysferlin and osmotic shock resistance are in line with this literature and earlier data showing the positive impact of rapamycin, a potent autophagy inducer, on muscle cells expressing L1341P dysferlin.

Autophagy is an evolutionarily conserved catabolic process that participates in the degradation of damaged cellular organelles and misfolded protein aggregates in a cellular homeostasis context and in response to biological stress. Since its discovery, autophagy and its regulation have been shown to be involved in a wide range of pathological conditions, most notably in

neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's disease, and Huntington's disease. While displaying different symptoms, several studies have reported 1/ common autophagy impairments and 2/ a clear relationship between toxic protein aggregation and the progressive lysosomal dysfunction in these diseases (Nixon and Yang, 2011). This degradation process has been intensively studied in neurodegenerative diseases and plays a key role in maintaining cellular homeostasis in skeletal muscles, both during rest and exercise (Jokl and Blanco, 2016; Lira et al., 2013; Masiero et al., 2009). In myopathies, the main downstream effect of autophagy impairment is the accumulation of damaged cellular proteins and organelles that activate signaling cascades leading to fiber atrophy and apoptosis and, in some cases, to a reduction in the mechanical force generated during muscle contraction and a failure of muscle regeneration. Over the years, several treatments stimulating autophagy (such as starvation, a low-protein diet, or pharmacologic inhibition of mTOR kinase) have been shown to have a positive impact in animal models of multiple myopathies, confirming that autophagy deficiency plays an important role in the pathogenesis of skeletal muscular disorders. Recently, promising results in a limited proof-of-principle clinical trial on a low-protein diet have been reported in eight adult patients with collagen VI-related congenital muscular dystrophies (NCT01438788). In addition to the intrinsic positive effect of autophagy inducers, our data infer that saracatinib and bazedoxifene may have a second positive impact in patients carrying the *DYSF*^{L1341P} mutation and other missense proteins degraded by the same pathway.

Materials and Methods

Myoblast cell lines and culture. Experiments were performed with human immortalized myoblasts from unaffected individuals or LGMD R2 patients. The LGMD R2 cell lines were established from muscle biopsies from patients bearing the relevant mutations: homozygous missense *DYSF* c.4022T>C; p.L1341P (*DYSF*^{L1341P}) and heterozygous nonsense c.342-1G>A/c.3516_3517delTT; p.Ser1173X. All cell lines were obtained from the immortalization platform of human cells from the Institut de Myologie (Paris, France), with agreement of the subjects through signature of an informed consent and anonymization before immortalization, according to the EU GDPR regulation. Immortalized myoblast cell lines were cultured in growth medium consisting of 1 volume of 199 medium (Invitrogen, 41150020) for 4 volumes of Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, 61965-025), supplemented with 20% fetal bovine serum (research grade, Sigma-Aldrich), 25 µg/ml fetuin (Life Technologies, 10344026), 5 ng/ml epidermal growth factor (Life Technologies, PHG0311), 0.5 ng/ml basic fibroblast growth factor (Life Technologies, PHG0026), 0.2 µg/ml dexamethasone (Sigma, D4902) and 5 µg/ml insulin (Sigma, 91077). Cells were seeded on plates coated with 0.1% gelatin and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C until experimentation.

Transient transfection. Healthy immortalized myoblasts were seeded on 96-well plates and maintained in growth medium for up to 60% confluence. Myoblasts were transfected by using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, with siRNA-containing sequences either specific to dysferlin, 5'- TTGGATCAGCTCAGACATATT-3' or a

nonspecific “scrambled” control (Invitrogen). Forty-eight hours after transfection, cells were subjected either to osmotic shock or fixed for dysferlin immunostaining.

High-throughput screening. The high-throughput screening was conducted using a Biocell 1800 system (Agilent). To this end, *DYSF*^{L1341P} myoblasts were seeded in 38 μ l of culture medium into black 384-well clear-bottom plates. Twenty-four hours after seeding, 2 μ l of 20x compounds from the chemical libraries were transferred into cell assay plates in monoplicate. In each plate, the negative control (0.1% DMSO) and positive control (64 nM bafilomycin) were added in columns 1–23 and 2–24, respectively. Plates were then incubated for 24 hours and processed for the dysferlin quantification assay. Briefly, each of the 8 plates used in screening were fixed and stained with anti-dysferlin antibody. To prevent the discovery of toxic molecules, the number of cells was monitored in parallel by counting the Hoechst stained cells per field and molecule candidates presenting a mortality superior to 50% were excluded.

Chemical library. Two different small molecule libraries were screened using the 384-well plate format, including 1280 FDA- and EMA-approved drugs from the Prestwick Chemical library and 959 FDA-approved drugs and bioactive compounds from the Selleckchem library. Both libraries were tested at 5 μ M.

Dysferlin quantification and viability cell-based assay. After 24 hours of drug treatment, myoblasts were fixed in 4% paraformaldehyde (10min, room temperature). Immunofluorescence was performed in a phosphate-buffered saline (PBS) solution supplemented with 0.1% Triton X-100 (ThermoScientific) for permeabilization (5 min, room temperature) and then with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma) for blocking (1 hour, room temperature). For primary hybridization, step cells were incubated (overnight, 4°C) with rabbit anti-dysferlin (abcam, ab124684) and goat anti-desmin (R&D, AF3844) antibodies. Cells were then stained (1 hour, room temperature) with fluorophore-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, anti-rabbit green and anti-goat red) and nuclei were visualized with Hoechst staining (Invitrogen, 33342). Dysferlin expression was analyzed with a CellInsight CX7 imager (Cellomics Inc). The first channel was used for identification of nuclei, the second for cell segmentation with desmin labeling, and the third one for identification and quantification of dysferlin aggregates. Images were acquired with a 20x high-resolution objective and were analyzed using a colocalization bioapplication. Using thresholding on the dysferlin staining intensity level, the number of dysferlin-labeled positive cells (cell containing strictly more than one dysferlin aggregate) was calculated so as to be less than 10% with the negative control treatment. The total number of cells was determined by counting the Hoechst-stained cells per well, allowing quantification of cell viability by normalization to the negative control.

Screening data analysis. Data analysis on the screening was performed using a customized Hiscreen application (Discngine) connected to Spotfire software (Tibco Software Inc.). The robustness of the assay was evaluated by calculating the Z' factor on the percentage of dysferlin-labeled positive cells for each plate as follows $Z' = 1 - [3(SDP + SDN) / (MP - MN)]$; where

MP and MN correspond to the means of the positive (64 nM bafilomycin) and negative (0.1% DMSO) controls, respectively, and SDP and SDN correspond to their standard deviations. Raw data related to cell number per field were normalized to the mean for the negative controls, which is defined as 100%. Hit selection was performed by using the number of standard deviations from the mean in parallel for each readout value (Z-score) calculated per run where all plate data were pooled. Only hits with a Z-score run ≥ 5 and that did not decrease the cell number by more than 50% compared to the 0.1% DMSO condition were selected for the subsequent validation step. Hits were then re-tested in quadruplicate using the same assay conditions to check that the activity of the molecule was reproducible. Finally, compounds were tested over a range of concentrations (10 nM - 100 μ M) for parallel exploration of their efficacy and toxicity, and determination of their half maximal effective concentration (EC_{50}).

Quantitative PCR. Total RNAs were isolated using the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. A DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA levels and quality were checked using the NanoDrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the SuperScript III reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis was performed using a QuantStudio 12 K Flex real-time PCR system (Applied Biosystems) and Luminaris color probe qPCR master mixes (ThermoScientific), following the manufacturers' instructions. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt method and normalized to 18S expression (Assay HS_099999).

Immunostaining assay. Immunofluorescence was performed according to standard protocols. Briefly, after 24 hours of drug treatment, myoblasts were fixed in 4% paraformaldehyde (10min, room temperature). Permeabilization was performed in PBS supplemented with 0.1% Triton X-100 (5 min, room temperature) and blocking in PBS supplemented with 1% BSA (1 hour, room temperature). Incubation with primary antibodies (overnight, +4°C) diluted in blocking buffer was carried out with the following antibodies: rabbit anti-dysferlin 1:200 (ab124684, Abcam), goat anti-desmin 1:200 (AF3844, R&D), mouse anti-Kdel 1:200 (ADI-SPA-827-D/F, EnzoLife). Washing was carried out 3 times (5 min, room temperature) and cells were stained with fluorophore-conjugated secondary antibodies and Hoechst staining solution for the visualization of nuclei (1 hour, room temperature). After the washing steps, coverslips were mounted in fluoromount solution (ThermoScientific). Images were acquired using a LSM 800 confocal microscope (Zeiss) with a 63x high-resolution objective and were analyzed with Zen software (Zeiss).

Osmotic shock injury assay. Myoblasts were seeded in 96-well plates and treated for 24 hours with pharmacological hits. Cells were incubated for 3 hours with a red viability probe (1/3000, Incucyte® Nuclight Rapid Red Dye - Sartorius) incorporated by the nuclei of living cells. Hypo-osmotic shock solution composed of 25% PBS and 75% water was then applied to the cells in the presence of a green mortality probe (1/3000, Incucyte® Caspase-3/7 Green Dye - Sartorius). Red and green fluorescence was immediately followed every 90 or 120 minutes with

an Incucyte® S3 Live-Cell Analysis system (Sartorius). Images were analyzed with Incucyte software, allowing measurement of the resistance of cells to osmotic shock (green to red ratio) in comparison to the negative control (DMSO).

Quantification and statistical analysis. Data are presented as means \pm SD. Student's unpaired t-test was used to compare differences between two samples, and values of $*0.01 < p \leq 0.05$, $**0.005 < p \leq 0.01$, $***p < 0.005$ were considered significant. Curve-fitting and determination of EC₅₀ were performed using GraphPad Prism (v9.2.0).

Funding

I-Stem and Genethon are part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD), supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This research was funded by grants from INSERM, the domaine d'intérêt majeur (DIM) Biothérapies, Université Paris-Saclay, Genopole, and the European Commission.

Acknowledgments

The authors thank Marc Peschanski (I-Stem, Corbeil-Essonnes) for helpful discussions, the research and innovation team of I-Stem for providing expertise and technical support in imaging, bioproduction and screening, the "Imaging and Cytometry Core Facility" of Généthon for technical support and the Platform for Immortalization of Human Cells from the Centre of Research in Myology, Institute of Myology, Paris, for providing immortalized myoblasts. We thank Simone Spuler for providing some of the cellular models used in this study.

Author contributions

X.N. and I.R. were responsible for the experimental design and project management. C.B. performed the cell culture experiments, generated the cell banks for screening, developed the screening assay and carried out screening analysis. C.B. and E.P. developed the osmotic shock method and realized functional characterization of the drugs. J.T. performed the screening and J.P. developed imaging analysis. A.B. provided the cellular model. E.P., N.B., M.B., L.H., N.G. provided technical assistance for cell culture and pharmacological studies. C.B. and X.N. wrote the manuscript.

Figure 1

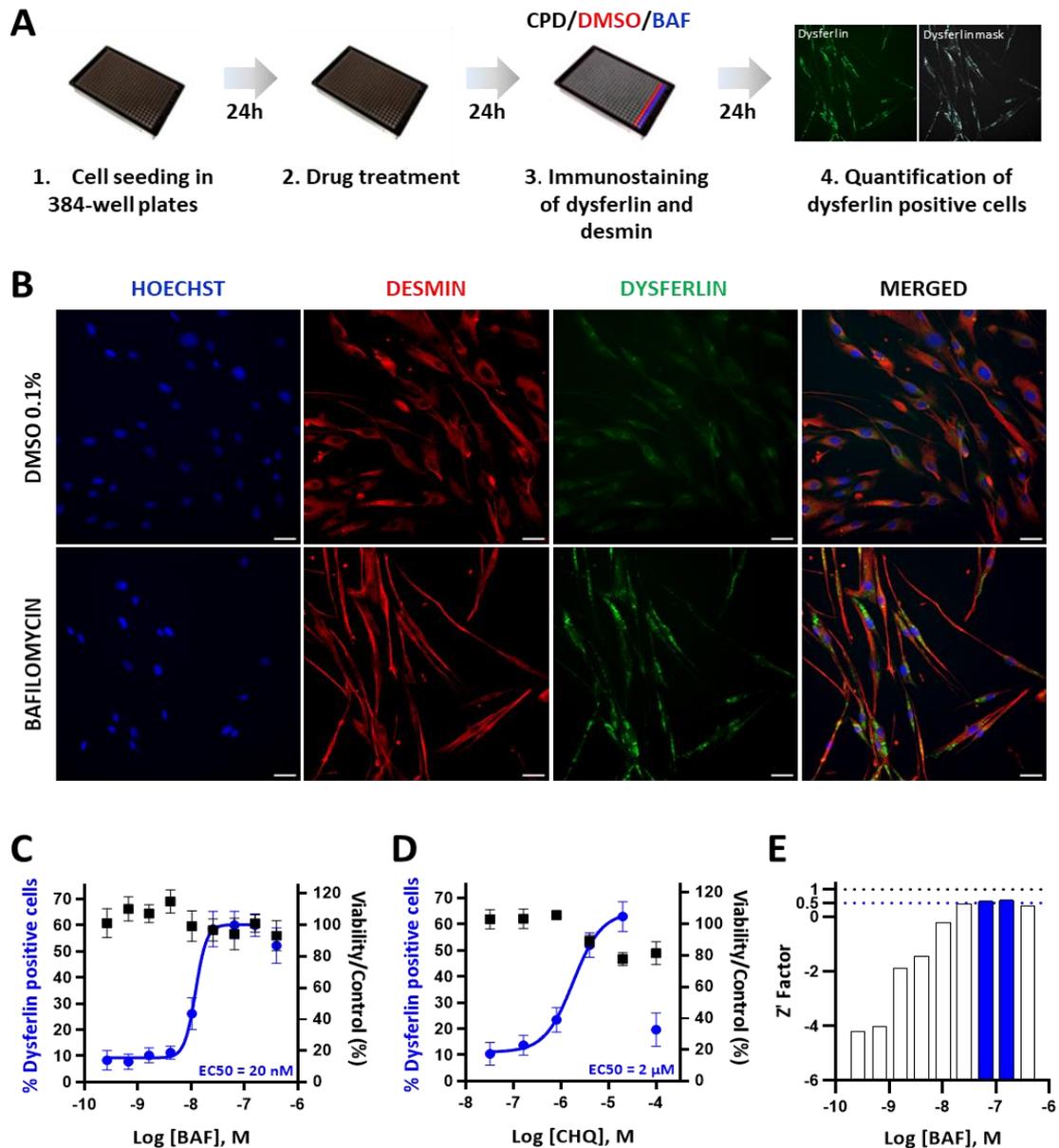


Figure 1. Development of a high content screening assay to quantify the effect of drugs on *DYSF*^{L1341P} mutant expression. (A) Workflow for the high-content screening of L1341P dysferlin expression in 384-well plates. (B) Desmin (red) and dysferlin (green) staining in *DYSF*^{L1341P} immortalized myoblasts treated with 0.1% DMSO or 64 nM bafilomycin. Nuclei are labeled by Hoechst staining (blue). Scale bar = 30 μm. (C,D) Quantification of dysferlin-positive myoblasts (blue) and viability (black) following treatment with increasing concentrations of two autophagy inhibitors; bafilomycin (C) or chloroquine (D). Each point represents the mean ± SD of four replicates and viability is normalized to the response induced by 0.1% DMSO. (E) Determination of the Z' factor for each concentration of bafilomycin that was tested. Abbreviations: CPD, tested compounds; BAF, bafilomycin; CHQ, chloroquine.

Figure 2

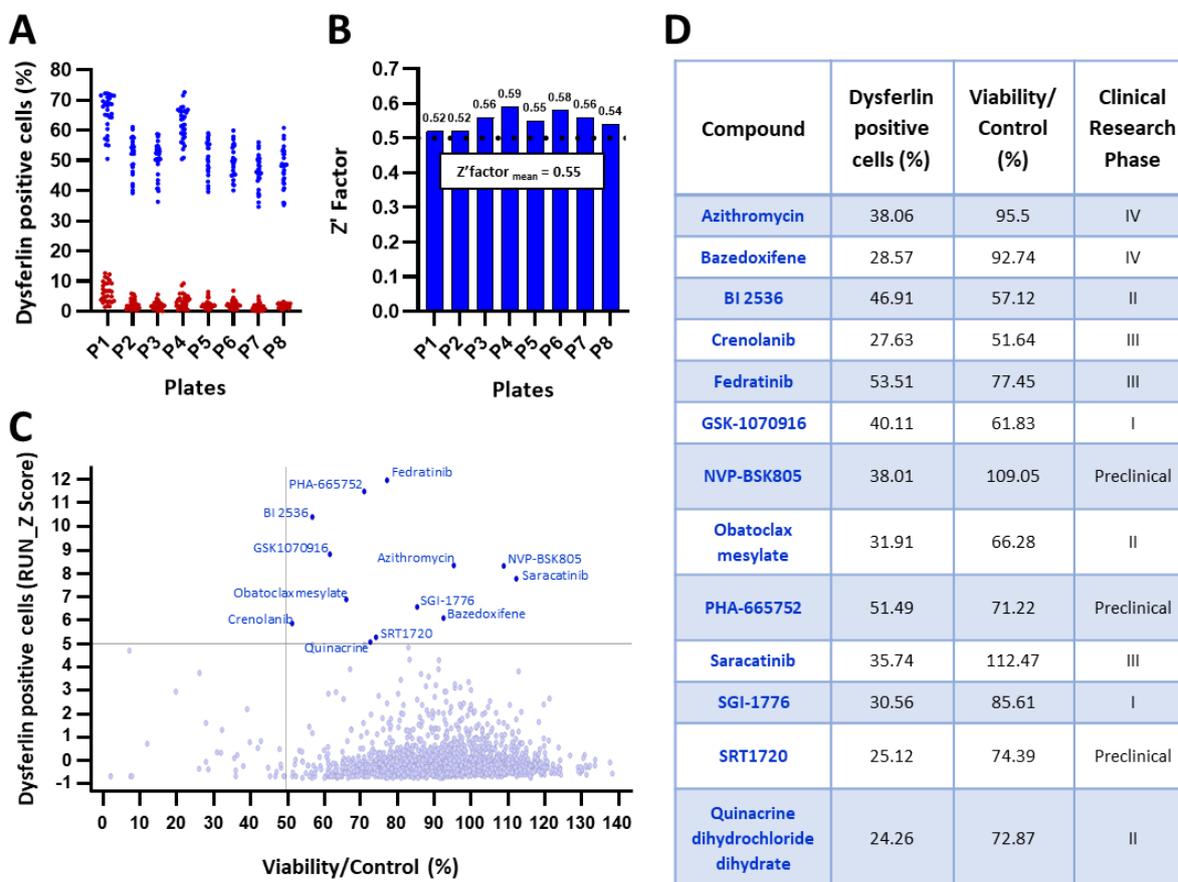


Figure 2. High-content screening for L1341P dysferlin expression. (A) High-throughput screening validation of L1341P dysferlin expression in myoblasts treated with the negative control, 0.1% DMSO (red), or the positive control, 64 nM bafilomycin (blue), in each of the 384-well plates used for screening (16 replicates/plate). (B) Determination of the Z' factor for each of the 384-well plates used for screening and measurement of the mean for all plates. (C) Primary screen cell-based assay for L1341P dysferlin expression. Dot plot representation of the effects of the 2239 drugs on the number of dysferlin-positive cells (Z score >5) and cell viability (viability >50%). (D) List of the 13 compounds identified as primary hits during screening and the corresponding percentage of dysferlin-positive cells, percentage of viability and the maximum clinical research phase achieved by the compound.

Figure 3

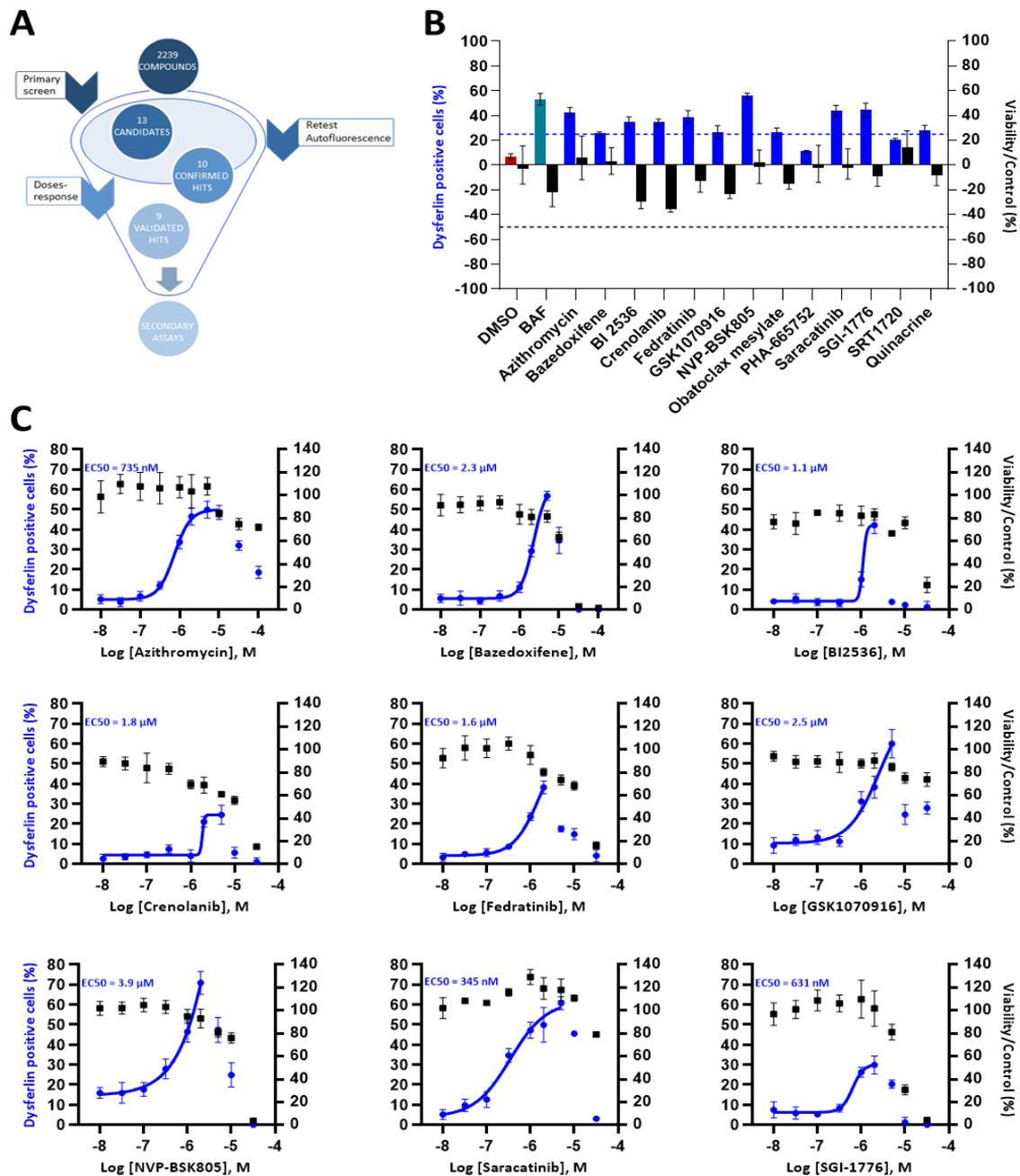


Figure 3. Validation of the effect of primary hits on L1341P dysferlin expression. (A) Schematic representation of the retest experiments to validate the effect of the 13 primary candidates that were identified. (B) Hit confirmation: quantification of dysferlin-positive cells (blue) and viability (black) following treatment in quadruplicate for 24 hours with the candidate compounds at the single 5 μ M dose used in screening. Each bar represents the mean \pm SD of the four replicates. (C) Hit validation: quantification of dysferlin-positive cells (blue) and viability (black) following treatment for 24 hours with increasing concentrations of confirmed hits. Each graph is a representative experiment (n=3). Each point represents the mean \pm SD of four replicates. Abbreviations: BAF, bafilomycin.

Figure 4

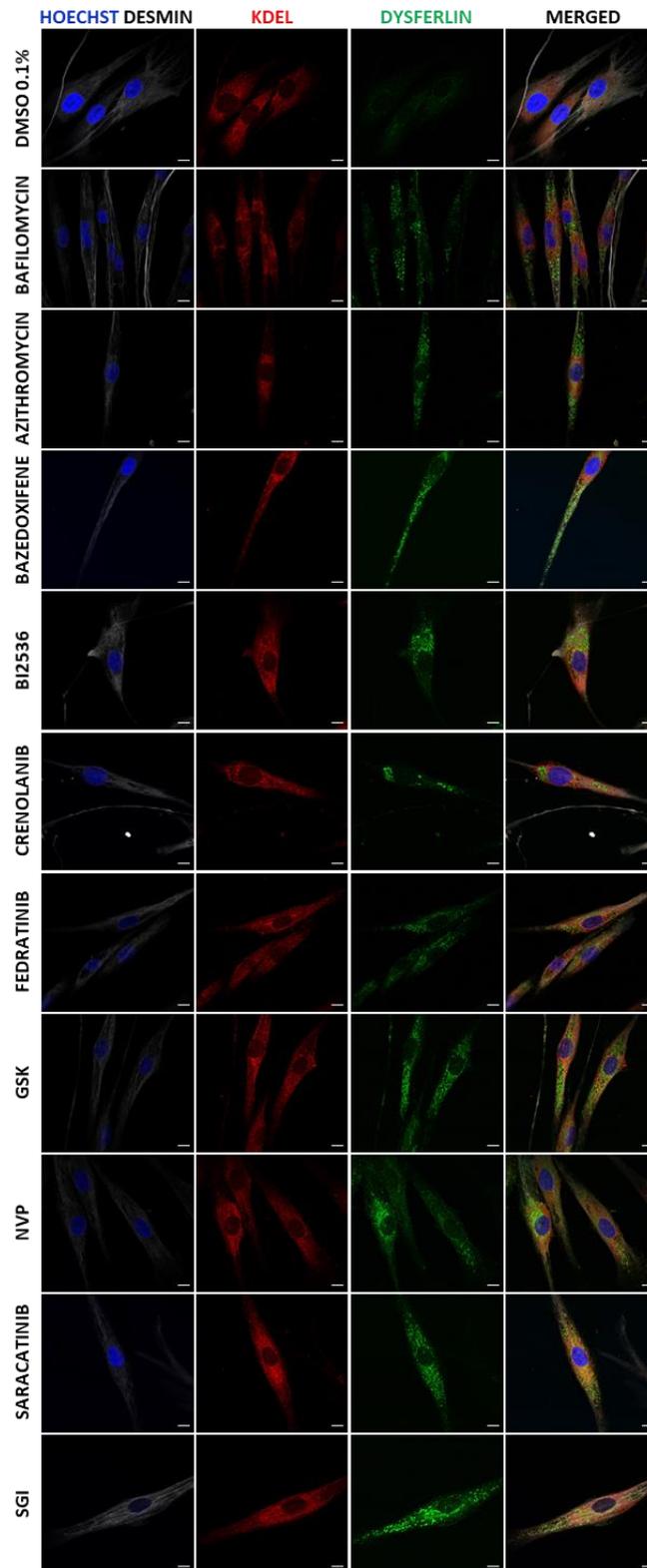


Figure 4. Evaluation of the effect of the nine validated hits on L1341P dysferlin protein localization. Desmin (white), KDEL (red) and dysferlin (green) staining in *DYSF*^{L1341P} myoblasts treated with 0.1% DMSO, 64 nM bafilomycin or the nine validated hits at the dose of 5 μ M. Nuclei are labeled by Hoechst staining (blue). Scale bar = 100 μ m.

Figure 5

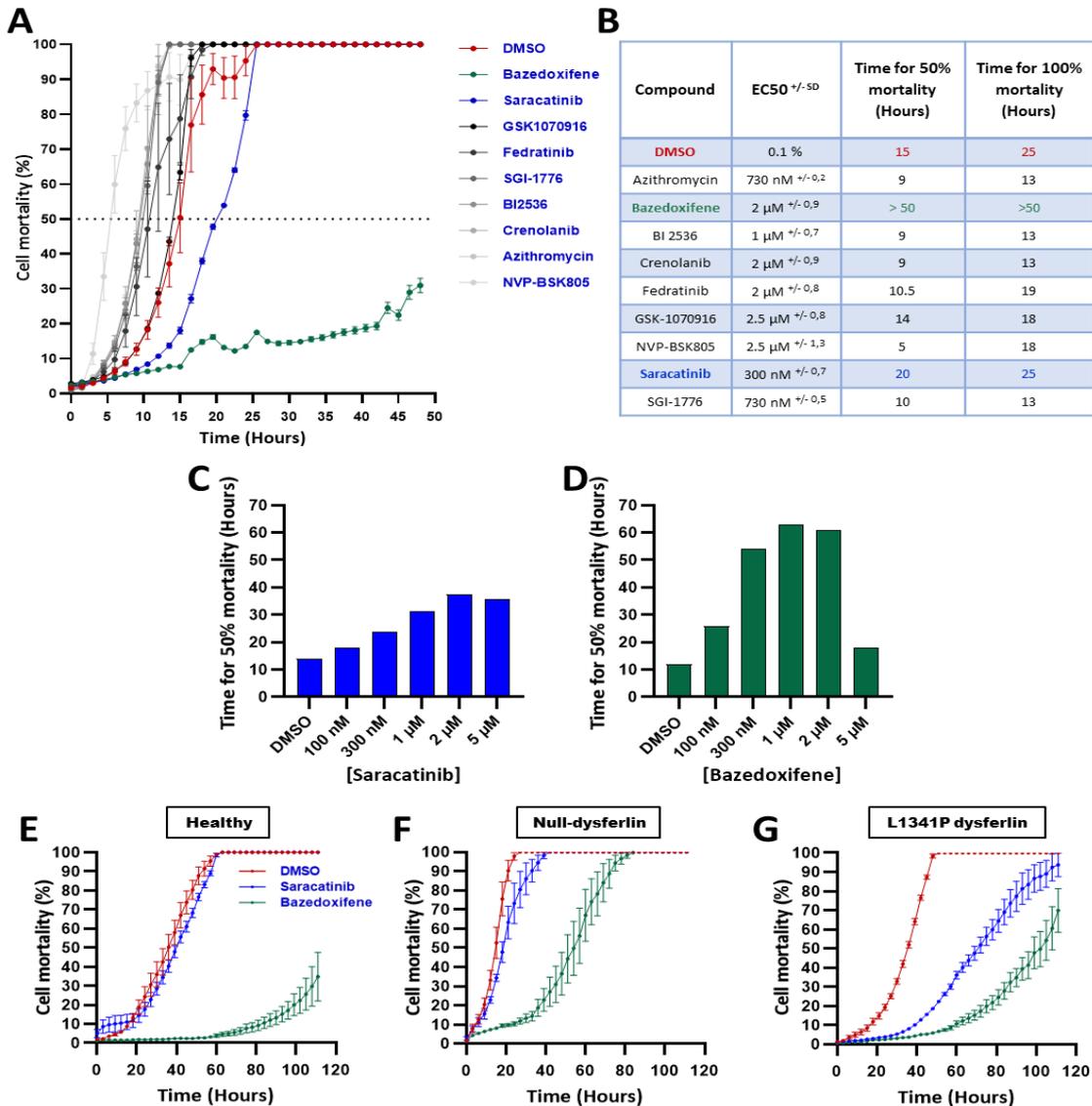


Figure 5. Effect of the nine validated compounds on the *DYSF*^{L1341P} impaired membrane repair.

(A) Measure of cell mortality following hypo-osmotic shock on *DYSF*^{L1341P} myoblasts pre-treated for 24 hours with the 9 validated hits at half maximal effective concentration (EC₅₀). Each point represents the mean \pm SD of four replicates. (B) List of the 9 validated compounds tested with their EC₅₀ and the corresponding duration of osmotic shock required to reach 50% or 100% mortality. (C-D) Dose-response experiments. Measure of time required to reach 50% mortality following hypo-osmotic shock on *DYSF*^{L1341P} myoblasts pre-treated for 24 hours with increasing concentrations of saracatinib (C) or bazedoxifene (D). (E-G) Measure of cell mortality following hypo-osmotic shock on control (E), null-dysferlin (F) or L1341P (G) immortalized myoblasts treated for 24 hours with 0.1% DMSO (red curve), 2 μ M saracatinib (blue curve) or 1 μ M bazedoxifene (green curve). Each point represents the mean \pm SD of four replicates.

Figure S1

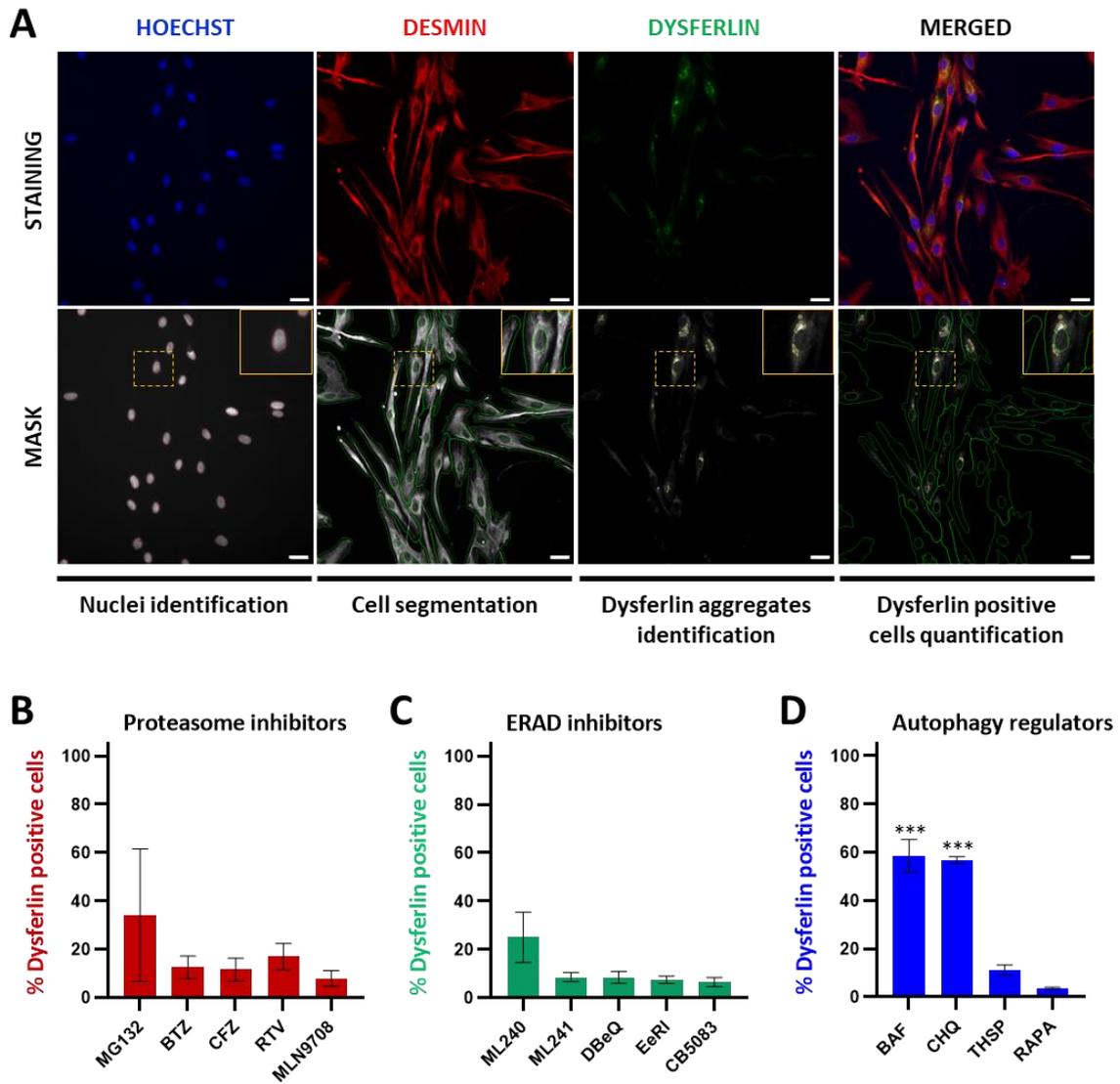


Figure S1. Pilot screen for L1341P dysferlin assay. (A) Hoechst, desmin and dysferlin staining in *DYSF*^{L1341P} myoblasts (top panels) and the corresponding mask images (bottom panels), allowing automated identification of L1341P dysferlin aggregates and quantification of dysferlin-positive cells (>1 aggregate). Yellow outlets represent higher magnification images. Scale bar = 30µm. (B-D) Quantification of dysferlin-positive myoblasts following treatment with the most effective concentration of proteasome inhibitors (B), ERAD inhibitors (C) or autophagy regulators (D). Abbreviations: BTZ, bortezomib; CFZ, carfilzomib; RTV, ritonavir; MLN9708, ixazomib; EeRI, eeyarestatin; BAF, bafilomycin; CHQ, chloroquine; THSP, thiostrepton; RAPA, rapamycin.

Figure S2

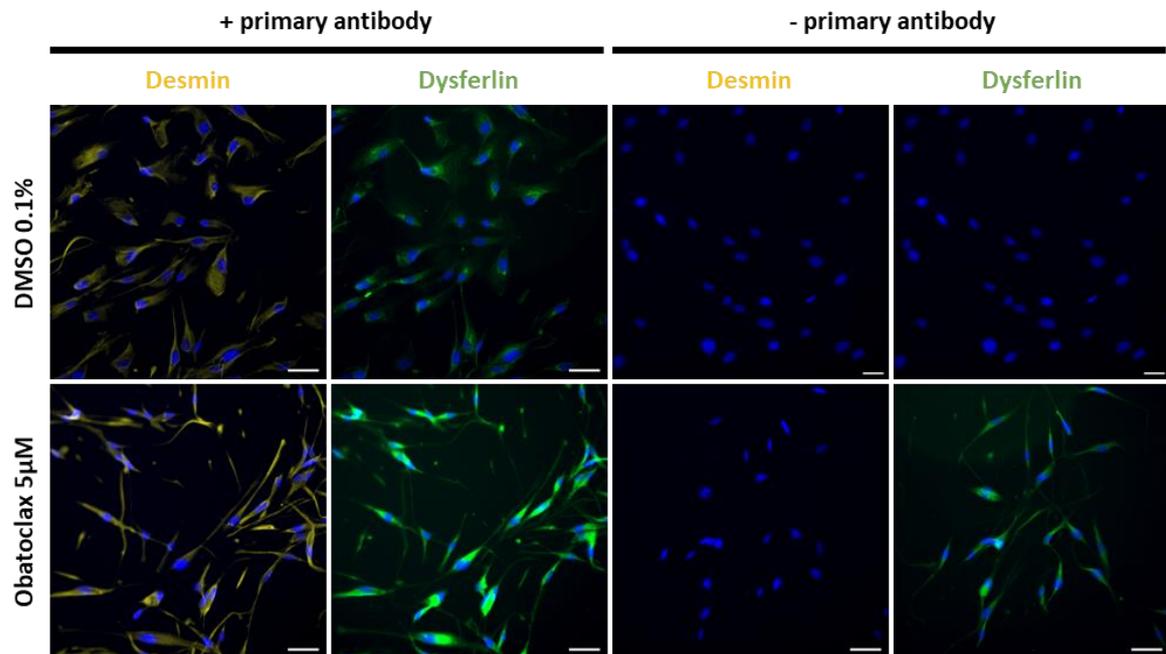


Figure S2. Fluorescence interferences after obatoclox mesylate treatment. Desmin and dysferlin staining in the presence (left panels) or in absence (right panels) of primary antibodies in DYSFL1341P myoblasts treated for 24 hours with 0.1% DMSO or 5 μ M obatoclox mesylate. Scale bar = 25 μ m.

Figure S3

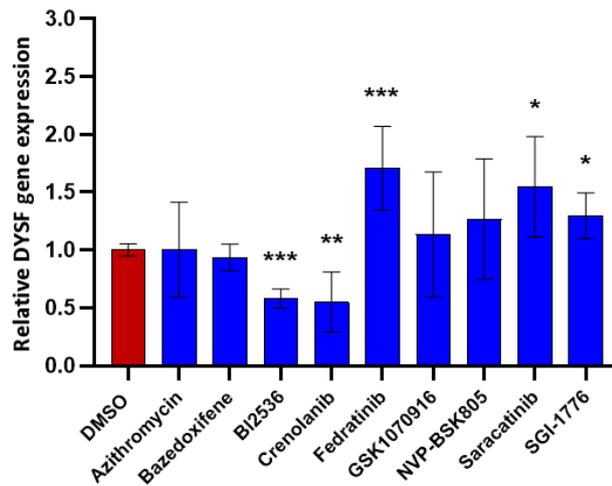


Figure S3. Effect of the nine validated hits on dysferlin gene modulation. Measure of dysferlin gene expression by qPCR in *DYSF*^{L1341P} myoblasts treated for 24 hours with 0.1% DMSO or the 9 validated hits at their maximum effective dose (10 μ M: azithromycin; 5 μ M: bazedoxifene, crenolanib, GSK1070916, saracatinib; 2 μ M: BI2536, fedratinib, NVP-BSK805, SGI-1776). Gene expression is normalized to DMSO-treated cells. Data are shown as the mean of three independent experiments +/- SD. 0.01 < p \le 0.05 or **0.005 < p \le 0.01 or ***p < 0.005 (Student's t-test).

Figure S4

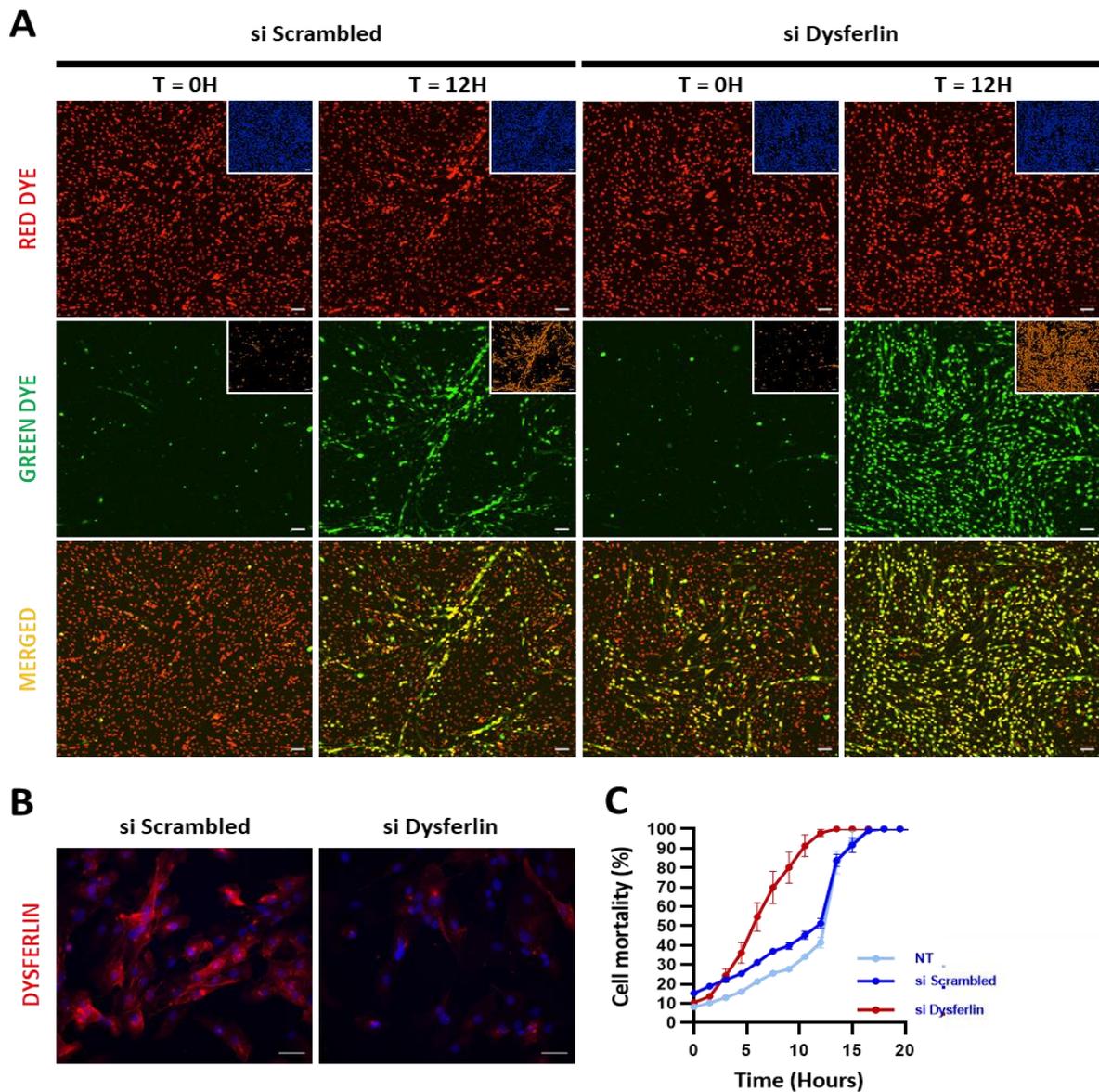


Figure S4. Dysferlin-null myoblasts are more susceptible to membrane damage following hypo-osmotic shock. (A) Live labeling with red dye, for nuclear staining, and green dye, for caspase3/7 apoptosis, of healthy immortalized myoblasts subjected to hypo-osmotic shock after 48 hours of transfection with siScrambled (left panels) or siDysferlin (right panels). Representative images of labeling and corresponding mask pictures on the top right of each image for automated quantification of cell mortality (green/red ratio) at the beginning of osmotic shock (T=0H) or when 50% mortality is achieved with siScrambled treatment (T=12H). Scale bar = 100 μ m. (B) Dysferlin immunostaining of healthy immortalized myoblasts treated for 48 hours with siScrambled or siDysferlin. Scale bar = 50 μ m. (C) Quantification of cell mortality after induction of osmotic shock in control myoblasts treated for 48 hours with siScrambled (blue) or siDysferlin (red). Each point represents the mean \pm SD of three replicates on a representative control cell line.

References

- Anderson, L.V., Davison, K., Moss, J.A., Young, C., Cullen, M.J., Walsh, J., Johnson, M.A., Bashir, R., Britton, S., Keers, S., et al. (1999). Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 8, 855–861. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.855>.
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S.S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., McNeil, P.L., and Campbell, K.P. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423, 168–172. <https://doi.org/10.1038/nature01573>.
- Barthélémy, F., Blouin, C., Wein, N., Mouly, V., Courrier, S., Dionnet, E., Kergourlay, V., Mathieu, Y., Garcia, L., Butler-Browne, G., et al. (2015). Exon 32 Skipping of Dysferlin Rescues Membrane Repair in Patients' Cells. *J Neuromuscul Dis* 2, 281–290. <https://doi.org/10.3233/JND-150109>.
- Barthélémy, F., Courrier, S., Lévy, N., Krahn, M., and Bartoli, M. (2018). Dysferlin Exon 32 Skipping in Patient Cells. *Methods Mol Biol* 1828, 489–496. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8651-4_31.
- Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., et al. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 20, 37–42. <https://doi.org/10.1038/1689>.
- Blazek, A.D., Paleo, B.J., and Weisleder, N. (2015). Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 30, 438–448. <https://doi.org/10.1152/physiol.00019.2015>.
- Cacciottolo, M., Numitone, G., Aurino, S., Caserta, I.R., Fanin, M., Politano, L., Minetti, C., Ricci, E., Piluso, G., Angelini, C., et al. (2011). Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. *Eur J Hum Genet* 19, 974–980. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.70>.
- Cea, L.A., Bevilacqua, J.A., Arriagada, C., Cárdenas, A.M., Bigot, A., Mouly, V., Sáez, J.C., and Caviedes, P. (2016). The absence of dysferlin induces the expression of functional connexin-based hemichannels in human myotubes. *BMC Cell Biol* 17 Suppl 1, 15. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0096-6>.
- Cenacchi, G., Fanin, M., De Giorgi, L.B., and Angelini, C. (2005). Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *J Clin Pathol* 58, 190–195. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.018978>.
- Choi, Y.R., Kim, J.-B., Kang, S.-J., Noh, H.R., Jou, I., Joe, E.-H., and Park, S.M. (2020). The dual role of c-src in cell-to-cell transmission of α -synuclein. *EMBO Rep* 21, e48950. <https://doi.org/10.15252/embr.201948950>.
- Collins, B.C., Arpke, R.W., Larson, A.A., Baumann, C.W., Xie, N., Cabelka, C.A., Nash, N.L., Juppi, H.-K., Laakkonen, E.K., Sipilä, S., et al. (2019). Estrogen Regulates the Satellite Cell Compartment in Females. *Cell Rep* 28, 368–381.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.025>.
- Demonbreun, A.R., Rossi, A.E., Alvarez, M.G., Swanson, K.E., Deveaux, H.K., Earley, J.U., Hadhazy, M., Vohra, R., Walter, G.A., Pytel, P., et al. (2014). Dysferlin and myoferlin regulate transverse tubule formation and glycerol sensitivity. *Am J Pathol* 184, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.009>.

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. *Am J Pathol* 182, 485–504. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.018>.

Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y.K., and Momoi, T. (2007). Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet* 16, 618–629. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm002>.

García-Campos, P., Báez-Matus, X., Jara-Gutiérrez, C., Paz-Araos, M., Astorga, C., Cea, L.A., Rodríguez, V., Bevilacqua, J.A., Caviedes, P., and Cárdenas, A.M. (2020). N-Acetylcysteine Reduces Skeletal Muscles Oxidative Stress and Improves Grip Strength in Dysferlin-Deficient Bla/J Mice. *IJMS* 21, 4293. <https://doi.org/10.3390/ijms21124293>.

Gayi, E., Neff, L.A., Ismail, H.M., Ruegg, U.T., Scapozza, L., and Dorchies, O.M. (2018). Repurposing the Selective Oestrogen Receptor Modulator Tamoxifen for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Chimia (Aarau)* 72, 238–240. <https://doi.org/10.2533/chimia.2018.238>.

Grounds, M.D., Terrill, J.R., Radley-Crabb, H.G., Robertson, T., Papadimitriou, J., Spuler, S., and Shavlakadze, T. (2014). Lipid accumulation in dysferlin-deficient muscles. *Am J Pathol* 184, 1668–1676. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.005>.

Han, R. (2011). Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skelet Muscle* 1, 10. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-10>.

Haynes, V.R., Keenan, S.N., Bayliss, J., Lloyd, E.M., Meikle, P.J., Grounds, M.D., and Watt, M.J. (2019). Dysferlin deficiency alters lipid metabolism and remodels the skeletal muscle lipidome in mice. *J Lipid Res* 60, 1350–1364. <https://doi.org/10.1194/jlr.M090845>.

Hoch, L., Bourg, N., Degrugillier, F., Bruge, C., Benabides, M., Pellier, E., Tournois, J., Mahé, G., Maignan, N., Dawe, J., et al. (2022). Dual Blockade of Misfolded Alpha-Sarcoglycan Degradation by Bortezomib and Givinostat Combination. *Front Pharmacol* 13, 856804. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.856804>.

Jin, S.-Q., Yu, M., Zhang, W., Lyu, H., Yuan, Y., and Wang, Z.-X. (2016). Dysferlin Gene Mutation Spectrum in a Large Cohort of Chinese Patients with Dysferlinopathy. *Chin Med J (Engl)* 129, 2287–2293. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190671>.

Jokl, E.J., and Blanco, G. (2016). Disrupted autophagy undermines skeletal muscle adaptation and integrity. *Mamm Genome* 27, 525–537. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9659-2>.

Kerr, J.P., Ziman, A.P., Mueller, A.L., Muriel, J.M., Kleinhans-Welte, E., Gumerson, J.D., Vogel, S.S., Ward, C.W., Roche, J.A., and Bloch, R.J. (2013). Dysferlin stabilizes stress-induced Ca²⁺ signaling in the transverse tubule membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20831–20836. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307960110>.

Kerr, J.P., Ward, C.W., and Bloch, R.J. (2014). Dysferlin at transverse tubules regulates Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle. *Front Physiol* 5, 89. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00089>.

Klinge, L., Laval, S., Keers, S., Haldane, F., Straub, V., Barresi, R., and Bushby, K. (2007). From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB j.* 21, 1768–1776. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7659com>.

Klinge, L., Harris, J., Sewry, C., Charlton, R., Anderson, L., Laval, S., Chiu, Y.-H., Hornsey, M., Straub, V., Barresi, R., et al. (2010). Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 41, 166–173. <https://doi.org/10.1002/mus.21166>.

Krahn, M., Bérout, C., Labelle, V., Nguyen, K., Bernard, R., Bassez, G., Figarella-Branger, D., Fernandez, C., Bouvenot, J., Richard, I., et al. (2009). Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients. *Hum Mutat* 30, E345-375. <https://doi.org/10.1002/humu.20910>.

Kuşçu, G.C., Gürel, Ç., Buhur, A., Oltulu, F., Akman, L., Köse, T., Yavaşoğlu, N.Ü.K., and Yavaşoğlu, A. (2022). The regulatory effects of clomiphene and tamoxifen on mTOR and LC3-II expressions in relation to autophagy in experimental polycystic ovary syndrome (PCOS). *Mol Biol Rep* 49, 1721–1729. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06981-y>.

Lee, J.J.A., Maruyama, R., Duddy, W., Sakurai, H., and Yokota, T. (2018). Identification of Novel Antisense-Mediated Exon Skipping Targets in DYSF for Therapeutic Treatment of Dysferlinopathy. *Mol Ther Nucleic Acids* 13, 596–604. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.10.004>.

Lek, A., Evesson, F.J., Sutton, R.B., North, K.N., and Cooper, S.T. (2012). Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair: Ferlins. *Traffic* 13, 185–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x>.

Lira, V.A., Okutsu, M., Zhang, M., Greene, N.P., Laker, R.C., Breen, D.S., Hoehn, K.L., and Yan, Z. (2013). Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J* 27, 4184–4193. <https://doi.org/10.1096/fj.13-228486>.

Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizberea, J.A., Hentati, F., Hamida, M.B., et al. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20, 31–36. <https://doi.org/10.1038/1682>.

LoMauro, A., Gandossini, S., Russo, A., Diella, E., Pistininzi, C., Marchi, E., Pascuzzo, R., Vantini, S., Aliverti, A., and D'Angelo, M.G. (2021). Over three decades of natural history of limb girdle muscular dystrophy type R1/2A and R2/2B: Mathematical modelling of a multifactorial study. *Neuromuscul Disord* 31, 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.02.018>.

Lostal, W., Bartoli, M., Bourg, N., Roudaut, C., Bentaïb, A., Miyake, K., Guerchet, N., Fougerousse, F., McNeil, P., and Richard, I. (2010). Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet* 19, 1897–1907. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq065>.

Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., and Sandri, M. (2009). Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10, 507–515. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.008>.

McNally, E.M., Ly, C.T., Rosenmann, H., Mitrani Rosenbaum, S., Jiang, W., Anderson, L.V., Soffer, D., and Argov, Z. (2000). Splicing mutation in dysferlin produces limb-girdle muscular dystrophy with inflammation. *Am J Med Genet* 91, 305–312. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(20000410\)91:4<305::aid-ajmg12>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(20000410)91:4<305::aid-ajmg12>3.0.co;2-s).

de Morrée, A., Flix, B., Bagaric, I., Wang, J., van den Boogaard, M., Grand Moursel, L., Frants, R.R., Illa, I., Gallardo, E., Toes, R., et al. (2013). Dysferlin regulates cell adhesion in human monocytes. *J Biol Chem* 288, 14147–14157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448589>.

Nguyen, K., Bassez, G., Krahn, M., Bernard, R., Laforêt, P., Labelle, V., Urtizberea, J.A., Figarella-Branger, D., Romero, N., Attarian, S., et al. (2007). Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 64, 1176–1182. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.8.1176>.

Nixon, R.A., and Yang, D.-S. (2011). Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis* 43, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.021>.

Nygaard, H.B., Wagner, A.F., Bowen, G.S., Good, S.P., MacAvoy, M.G., Strittmatter, K.A., Kaufman, A.C., Rosenberg, B.J., Sekine-Konno, T., Varma, P., et al. (2015). A phase Ib multiple ascending dose study of the safety, tolerability, and central nervous system availability of AZD0530 (saracatinib) in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 7, 35. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0119-0>.

Ouyang, Q., Zhang, K., Lin, D., Feng, C.G., Cai, Y., and Chen, X. (2020). Bazedoxifene Suppresses Intracellular Mycobacterium tuberculosis Growth by Enhancing Autophagy. *MSphere* 5, e00124-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00124-20>.

Philippi, S., Bigot, A., Marg, A., Mouly, V., Spuler, S., and Zacharias, U. (2012). Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy. *PLoS Curr* 4, RRN1298. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1298>.

Potter, R.A., Griffin, D.A., Sondergaard, P.C., Johnson, R.W., Pozsgai, E.R., Heller, K.N., Peterson, E.L., Lehtimäki, K.K., Windish, H.P., Mittal, P.J., et al. (2018). Systemic Delivery of Dysferlin Overlap Vectors Provides Long-Term Gene Expression and Functional Improvement for Dysferlinopathy. *Hum Gene Ther* 29, 749–762. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.062>.

Pryadkina, M., Lostal, W., Bourg, N., Charton, K., Roudaut, C., Hirsch, M.L., and Richard, I. (2015). A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2, 15009. <https://doi.org/10.1038/mtm.2015.9>.

Schoewel, V., Marg, A., Kunz, S., Overkamp, T., Carrazedo, R.S., Zacharias, U., Daniel, P.T., and Spuler, S. (2012). Dysferlin-peptides reallocate mutated dysferlin thereby restoring function. *PLoS One* 7, e49603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049603>.

Selcen, D., Stilling, G., and Engel, A.G. (2001). The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* 56, 1472–1481. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.11.1472>.

Song, W., Gao, K., Huang, P., Tang, Z., Nie, F., Jia, S., and Guo, R. (2020). Bazedoxifene inhibits PDGF-BB induced VSMC phenotypic switch via regulating the autophagy level. *Life Sci* 259, 118397. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118397>.

Tang, S.J., Fesharaki-Zadeh, A., Takahashi, H., Nies, S.H., Smith, L.M., Luo, A., Chyung, A., Chiasseu, M., and Strittmatter, S.M. (2020). Fyn kinase inhibition reduces protein aggregation, increases synapse density and improves memory in transgenic and traumatic Tauopathy. *Acta Neuropathol Commun* 8, 96. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00976-9>.

Tominaga, K., Tominaga, N., Williams, E.O., Rufibach, L., Schöwel, V., Spuler, S., Viswanathan, M., and Guarente, L.P. (2022). 4-Phenylbutyrate restores localization and membrane repair to human dysferlin mutations. *IScience* 25, 103667. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103667>.

Vallecillo-Zúniga, M.L., Rathgeber, M.F., Poulson, P.D., Hayes, S., Luddington, J.S., Gill, H.N., Teynor, M., Kartchner, B.C., Valdoz, J., Stowell, C., et al. (2020). Treatment with galectin-1 improves myogenic

potential and membrane repair in dysferlin-deficient models. *PLoS One* 15, e0238441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238441>.

Verwey, N., Gazzoli, I., Krause, S., Mamchaoui, K., Mouly, V., and Aartsma-Rus, A. (2020). Antisense-Mediated Skipping of Dysferlin Exons in Control and Dysferlinopathy Patient-Derived Cells. *Nucleic Acid Ther* 30, 71–79. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0788>.

de Villiers, T.J., Chines, A.A., Palacios, S., Lips, P., Sawicki, A.Z., Levine, A.B., Codreanu, C., Kelepouris, N., and Brown, J.P. (2011). Safety and tolerability of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis: results of a 5-year, randomized, placebo-controlled phase 3 trial. *Osteoporos Int* 22, 567–576. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1302-6>.

Walton, J.N., and Nattrass, F.J. (1954). On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain* 77, 169–231. <https://doi.org/10.1093/brain/77.2.169>.

Wenzel, K., Carl, M., Perrot, A., Zabojszcza, J., Assadi, M., Ebeling, M., Geier, C., Robinson, P.N., Kress, W., Osterziel, K.-J., et al. (2006). Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding. *Hum. Mutat.* 27, 599–600. <https://doi.org/10.1002/humu.9424>.

Wu, Z., Chang, P.-C., Yang, J.C., Chu, C.-Y., Wang, L.-Y., Chen, N.-T., Ma, A.-H., Desai, S.J., Lo, S.H., Evans, C.P., et al. (2010). Autophagy Blockade Sensitizes Prostate Cancer Cells towards Src Family Kinase Inhibitors. *Genes Cancer* 1, 40–49. <https://doi.org/10.1177/1947601909358324>.

DISCUSSION & CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE

Au cours de ces trois années de thèse, j'ai participé au développement d'un modèle *in vitro* de skMC dérivées à partir de CSP humaines, permettant de modéliser les processus physiopathologiques associés aux LGMD. En particulier, ce modèle cellulaire m'a permis d'étudier les mécanismes moléculaires engendrés par une déficience en dysferline grâce à une approche transcriptomique comparative de skMt différenciés à partir de hiPSC de patients LGMD R2 ou sains. Cela m'a permis de mettre en évidence une dérégulation de l'expression de *dab2* dans les cellules musculaires pathologiques et de suggérer un rôle potentiel de ce biomarqueur dans la physiopathologie des LGMD R2. En parallèle de ces travaux, j'ai pu mettre en place un modèle pharmacologique qui permet d'identifier un traitement pour les LGMD R2 causées par la production d'une protéine mal conformée. Le développement de cette plateforme m'a permis d'identifier le saracatinib et le bazédoxifène, deux inducteurs d'autophagie, comme des candidats médicaments à explorer pour le traitement des patients LGMD R2 porteurs de la mutation *DYSF*^{L1341P}.

Ainsi, durant ce projet de thèse, j'ai eu l'opportunité de développer deux stratégies différentes dont l'objectif commun était l'identification d'un traitement pharmacologique pour les patients atteints de LGMD R2. D'une part, l'approche phénotypique consistait à identifier un nouveau phénotype pathologique, ou biomarqueur, résultant d'une déficience en dysferline, dans le but de développer une thérapie qui cible ce défaut. D'autre part, l'approche mécanistique consistait à cibler un mécanisme cellulaire indépendant de la dysferline, en particulier les voies de dégradation des protéines mal conformées. Dans la discussion qui va suivre, je vais donc aborder les avantages et inconvénients de chacune de ces deux stratégies pour l'identification d'un traitement pharmacologique pour les dysferlinopathies.

1. La pharmacologie et la découverte de nouveaux médicaments

1.1. Etat de la recherche pharmacologique

Malgré l'émergence sur le marché de produits thérapeutiques biologiques innovants ces dernières années (protéines, anticorps, oligonucléotides, thérapie génique...), les petites molécules issues de la chimie fine conservent leur place de favorite dans le développement de médicaments. En 2021, parmi les 50 nouveaux médicaments approuvés par la FDA (pour US Food and Drug Administration) plus de la moitié (28) sont des petites molécules (Mullard, 2022), laissant présager encore de belles perspectives d'avenir pour la chimie thérapeutique. En effet, on observe depuis 2017 un accroissement du marché des petites molécules, notamment avec l'émergence de molécules thérapeutiques pour des maladies rares et des inhibiteurs de kinase dans le domaine de la cancérologie (Mullard, 2021).

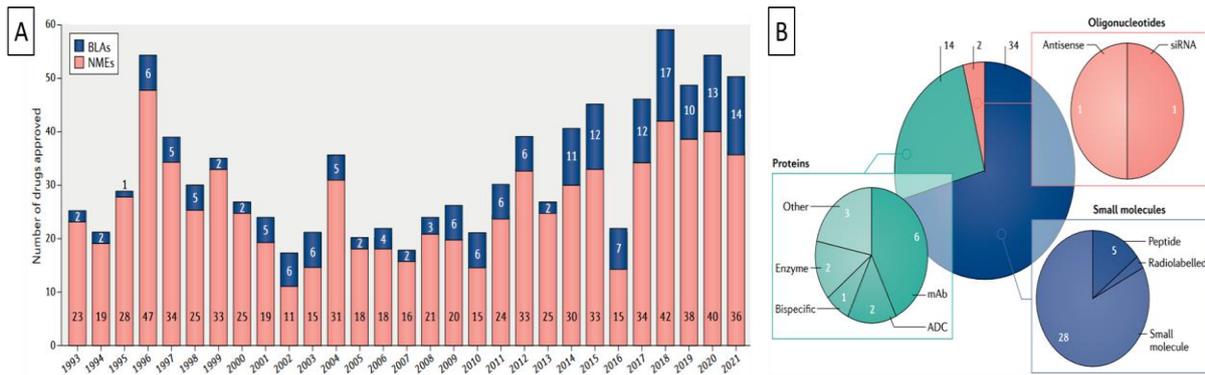


Figure 51. Le marché du médicament.

(A) Approbations de la FDA depuis 1993 : nombre annuel de nouvelles entités moléculaires (NME) et de demandes de licence de produits biologiques (BLA) approuvées par le Center for Drug Evaluation and Research (CDER) de la FDA. Les approbations du Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), pour des produits tels que les vaccins et les thérapies génétiques, ne sont pas incluses dans ce décompte des médicaments. (B) Approbations du CDER par modalité : Les petites molécules, y compris les peptides d'une longueur maximale de 40 acides aminés, et les oligonucléotides sont approuvés en tant que nouvelles entités moléculaires (NEM). Les candidats à base de protéines sont approuvés par le biais de demandes de licence de produits biologiques (BLA). ADC, conjugué anticorps-médicament ; mAb, anticorps monoclonal. Adapté de (Mullard, 2022).

Néanmoins, l'industrie pharmaceutique présente encore aujourd'hui un taux d'attrition qui reste très élevé. Une récente estimation suggère que le développement de nouveaux candidats médicaments échoue aujourd'hui dans 90% des cas (Sun et al., 2022) au cours des phases I, II et III des essais cliniques. Si les médicaments candidats au stade préclinique sont également pris en compte, le taux d'échec du développement de médicaments dépasse les 90 %. L'analyse des données des essais cliniques réalisés de 2010 à 2017 (Dowden and Munro, 2019; Harrison, 2016) montre par ailleurs que ces échecs sont majoritairement attribués à un manque d'efficacité des molécules (40-50%), en raison de modèles précliniques pas assez prédictifs et d'une cible thérapeutique non pertinente. Le développement de modèles cellulaires alternatifs plus prédictifs et plus fiables apparaît donc nécessaire pour optimiser le développement de nouveaux traitements plus efficaces. Au même titre qu'un certain nombre d'outils cellulaire ou moléculaire récents (modèles de surexpression, protéine tagguée, ...), les CSP représentent une source cellulaire intéressante pour la découverte de candidats médicaments, notamment lorsque les symptômes affectent des types cellulaires peu ou pas accessibles mais pour lesquels il existe un protocole de différenciation. C'est le cas notamment des cellules musculaires primaires qui sont difficiles à obtenir chez les patients atteints de LGMD qui présentent une atrophie et un remplacement des muscles par des tissus fibrotiques ou gras.

1.2. Le repositionnement de candidats médicaments

La recherche classique de molécules soutenue par les grands industriels n'est pas applicable aux maladies rares comme les dysferlinopathies. D'une part, il est difficile d'obtenir des financements nécessaires au développement de nouvelles molécules quand une pathologie ne touche que quelques milliers de personnes et, d'autre part, le temps de développement vers la clinique est trop long pour répondre aux besoins des patients. En effet, la découverte et le développement de médicaments est un processus long, coûteux et risqué qui dure en

moyenne 10 à 15 ans, avec un coût moyen de 1 à 2 milliards de dollars pour chaque nouveau médicament dont l'utilisation clinique est approuvée (Hinkson et al., 2020).

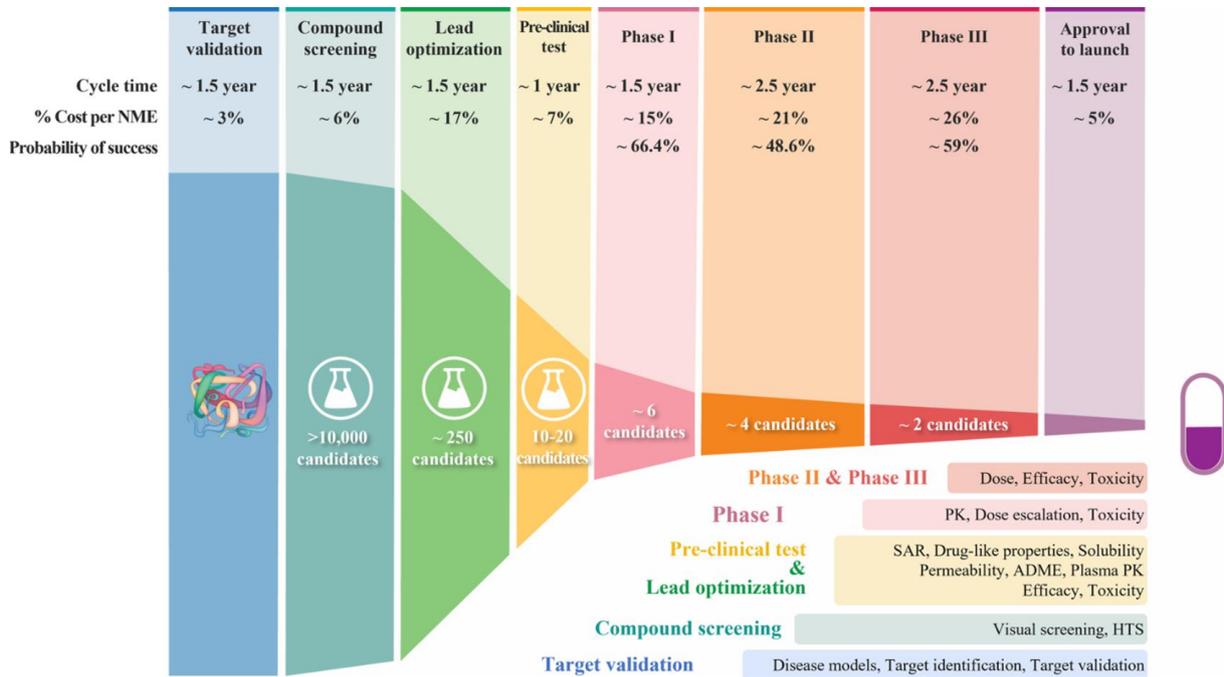


Figure 52. Le processus de découverte et de développement des médicaments.

Source (Sun et al., 2022)

Ainsi, au cours de ma thèse j'ai utilisé une stratégie alternative, le repositionnement de molécules, qui consiste à tester des médicaments pour une indication thérapeutique différente de celle pour laquelle il a été développé initialement. Cette stratégie s'applique à des médicaments déjà disponibles sur le marché mais aussi à ceux en cours de développement dont l'innocuité a été démontrée pendant la phase I d'essais cliniques. Le repositionnement de médicaments présente des avantages majeurs en termes de coût et de délai puisqu'il permettrait de réduire à un tiers le prix de développement et de moitié le délai de mise sur le marché d'un traitement par rapport à sa découverte (6 ans – 300 millions dollars) (Nosengo, 2016). En constante augmentation ces dix dernières années, le repositionnement apparaît aujourd'hui comme une nécessité pour la recherche de traitements des maladies rares. Le premier médicament repositionné pour une maladie rare à avoir atteint les phases cliniques est l'ezogabine, un médicament efficace contre les crises d'épilepsie partielles. Des études utilisant des hiPSC générées à partir de patients atteints de sclérose latérale amyotrophique ont montré que l'ezogabine pouvait avoir un effet positif sur les motoneurones grâce à un mécanisme moléculaire similaire, c'est-à-dire une réduction de l'excitabilité des motoneurones par la modulation des canaux potassiques (Wainger et al., 2021). Le repositionnement de médicament est également une stratégie d'intérêt pour les maladies fréquentes. Par exemple, il a été montré que sur 105 traitements en cours d'essais cliniques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer en 2017, 27 s'appuient sur du repositionnement (Cummings et al., 2017).

1.3. Les stratégies de repositionnement d'un médicament

Les premières études de repositionnement de médicaments ont d'abord cherché à évaluer l'efficacité d'un groupe restreint et défini de molécules sélectionnées sur la base d'un mécanisme d'action connu. Cette approche est adaptée lorsque la voie de signalisation responsable du phénotype pathologique est déjà connue ou lorsque des maladies similaires ont déjà été modélisées et traitées avec succès *in vitro* à l'aide de ces médicaments. L'efficacité d'une telle approche a été démontrée au sein d'I-Stem avec la mise en évidence de l'effet de la metformine, un antidiabétique couramment utilisé par des millions de personnes, pour le traitement du syndrome de Hutchinson-Gilford (Egesipe et al., 2016). Ce fut également le cas avec la découverte du MG132 (Harhour et al., 2017) ou du batimastat par nos collaborateurs (Pitrez et al., 2020).

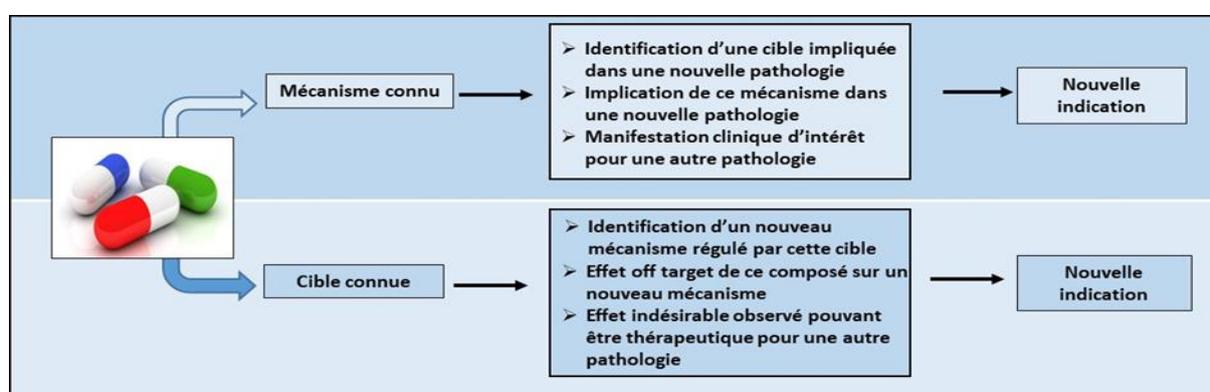


Figure 53. Les principales stratégies de repositionnement d'un médicament.

A l'inverse, le criblage à haut débit (ou HTS pour high-throughput screening) ne nécessite pas de connaissances préalables pour amorcer la découverte de médicaments, car il permet de tester l'activité thérapeutique de plusieurs milliers de composés issus de chimiothèques sur le biomarqueur ou le phénotype pathologique. Cette méthode nécessite cependant l'identification d'un paramètre capable de mesurer le phénotype (communément appelé « *readout* ») et quantifiable de façon automatisée et miniaturisée. Un grand nombre de cellules est également nécessaire pour tester tous les composés. Dans ce contexte, les CSP, grâce à leurs propriétés d'auto-renouveau, démontrent pleinement leur potentiel puisqu'elles permettent de produire la biomasse suffisante pour tester plusieurs milliers de candidats médicaments.

Par ailleurs, une approche hybride permet de combiner le criblage à haut débit au repositionnement de médicaments. A l'image du modèle pharmacologique que j'ai développé pour la dysferline mal conformée mutée L1341P, plusieurs études ont démontré la pertinence de ce type d'approche en identifiant plusieurs candidats médicaments pour des pathologies affectant des types cellulaires divers. Cette méthode a par exemple permis d'identifier l'effet potentiellement thérapeutique de l'acide rétinoïque (Lo Cicero et al., 2016) ou du thioestrepton (Hoch et al., 2019) pour le syndrome de Hutchinson-Gilford ou la LGMD R3, respectivement.

2. Approche phénotypique : sauvetage des phénotypes pathologiques liés à la dysferline

Le processus classique de découverte de médicament dans l'industrie pharmaceutique consiste à identifier une cible thérapeutique, le plus souvent une protéine ou un récepteur, qui est impliquée dans la pathologie visée. De grandes bibliothèques de molécules sont ensuite testées sur cette cible afin de déterminer des classes de composés actifs, appelés « hits ». Par ailleurs, afin d'accélérer le processus de découverte de ces hits, le criblage moléculaire peut être remplacé par des tests *in silico* où la cible et les molécules actives sont modélisées informatiquement.

Etant donné qu'aucune cible moléculaire n'a été identifiée pour les dysferlinopathies, une des approches pharmacologiques que nous avons envisagées consiste à faire du repositionnement de médicaments sur un phénotype représentatif de la maladie, afin d'obtenir un bénéfice thérapeutique. C'est en effet une stratégie d'intérêt qui a déjà montré son efficacité, aussi bien pour les maladies fréquentes que rares, avec la découverte par exemple de l'ivacaftor pour la fibrose kystique (Van Goor et al., 2009) ou du risdiplam pour la SMA (Ratni et al., 2018). Dans le cadre des dysferlinopathies, le fait de cibler les conséquences phénotypiques de la perte d'expression de la dysferline a pour avantage majeur de pouvoir traiter l'ensemble des patients, sans distinction des mutations génétiques causales. Cependant, au travers de la littérature, nous nous sommes rapidement rendu compte que les phénotypes décrits comme étant associés aux dysferlinopathies étaient soit peu caractérisés, soit non applicables aux contraintes de miniaturisation et d'automatisation imposées par le criblage de composés. Partant de ce constat, le premier objectif de ma thèse a consisté à identifier de nouveaux mécanismes moléculaires associés aux LGMD R2.

2.1. Développer un modèle cellulaire pertinent

La première étape de l'approche phénotypique consiste à développer un modèle cellulaire capable de récapituler les mécanismes pathologiques de la maladie. A ce titre, les CSP nous sont apparues comme un outil biologique pertinent. D'une part, la facilité relative d'obtention des hiPSC à partir de prélèvements sanguins et les récents progrès réalisés dans le développement de protocoles de différenciation myogénique permettaient de générer des modèles d'intérêt pour l'étude des maladies musculaires (Avior et al., 2016; Merkle and Egan, 2013; Rüegg and Glass, 2011). D'autre part, grâce à leur propriété unique d'auto-renouvellement, les hiPSC représentaient une source standardisée et illimitée de cellules, permettant la production automatisée de grandes quantités de skMC pour le criblage de médicaments. Par ailleurs, le développement d'un modèle de skMC dérivées de hiPSC nous permettait d'innover dans les stratégies thérapeutiques associées aux dysferlinopathies, puisqu'aucune approche de repositionnement de médicaments à large échelle n'avait été rapportée pour restaurer un défaut phénotypique. Ce qui est toujours le cas aujourd'hui.

Ainsi, la première partie de mon travail de thèse a été de mettre en place les conditions

expérimentales permettant la production de skMC à partir de hiPSC. Au début du projet, deux équipes avaient publié des protocoles de différenciation myogénique répondant à nos besoins d'homogénéité et de fonctionnalité nécessaires aux applications de modélisation pathologique et de criblage à haut débit (Caron et al., 2016; Chal et al., 2018). Un effort important et du temps ont donc été fournis au début de ma thèse pour comparer ces protocoles et choisir celui qui serait le plus adapté pour nos applications. Nous avons décidé d'utiliser le second protocole de différenciation puisqu'il permettait d'obtenir des populations pures et homogènes de skMC en qualité et en quantité suffisante pour le projet. Il présentait également l'avantage d'être commercialisé par la société GeneabioCell, nous assurant théoriquement un approvisionnement important et régulier. Ensuite, la deuxième partie de ce projet consistait à vérifier si notre modèle de skMC était adapté à la modélisation des LGMD. Ainsi, nous avons pu démontrer qu'il était suffisamment mature pour exprimer la majorité des gènes impliqués dans les LGMD ainsi que les protéines résultantes, de manière comparable à des myotubes immortalisés obtenus à partir de biopsies musculaires. De plus, nous avons mis en évidence la pertinence biologique de notre modèle par sa capacité à récapituler un défaut moléculaire identifié dans les LGMD R9 à partir de skMt dérivés de hiPSC de patients.

Globalement, nous avons pu démontrer que les CSP constituent un modèle pertinent pour modéliser les LGMD. Néanmoins, comme tout modèle, il présente certaines limites. La première d'entre elles est le temps nécessaire à la production de ces cellules. D'une part, la culture des CSP est très chronophage. La multiplication du nombre de lignées et le temps pour les produire, les amplifier et les caractériser est nécessaire mais rend ce processus encore plus long. D'autre part, le protocole de différenciation musculaire nécessite un mois de culture supplémentaire. Néanmoins, au laboratoire nous avons réussi à contourner certains obstacles, en particulier en robotisant une partie de la différenciation myogénique et en réalisant des banques importantes de skMb. Une autre limitation des CSP est que, dans certains cas, la mutation que l'on cherche à modéliser impacte elle-même le processus de différenciation cellulaire, rendant plus complexes encore nos interprétations. C'est notamment ce que l'on aurait pu craindre pour la modélisation des dysferlinopathies puisque certaines études plaident pour un rôle de la dysferline dans le processus de différenciation musculaire (Cohen et al., 2012; De Luna et al., 2006). Il est également important de tenir compte de la variabilité des lignées de hiPSC qui résulte des fonds génétiques différents entre les patients. Pour cela, il est important de multiplier le nombre de lignées en culture. Par ailleurs, il est maintenant possible de générer des lignées qui partagent le même patrimoine génétique à l'aide de la technologie Crispr-Cas9. On pourrait donc envisager, pour nos prochains programmes de modélisation, de générer des lignées isogéniques. Enfin, bien que l'on puisse observer la présence de sarcomères très organisés, un enjeu majeur concernant notre modèle cellulaire est son niveau de maturité qui est assimilé à un modèle embryo-foetal. L'apparition limitée de certains phénotypes tardifs est donc à envisager (Baxter et al., 2015; Bursac et al., 2015), en particulier lorsque l'on souhaite modéliser des pathologies qui apparaissent à l'âge adulte. C'est peut-être d'ailleurs à cause de ce point que nous n'avons pas été en mesure d'observer d'alpha sarcoglycane dans notre modèle. Face à ce constat, nous avons essayé de mimer une

maturation de nos skMt en rallongeant leur temps de culture mais ce ne fut pas concluant puisque les tapis cellulaires se sont détachés. Dans l'objectif de garder nos cultures plus longtemps, l'utilisation de nouveaux hydrogels développés récemment et plus innovants pourrait être une alternative (Iberite et al., 2022). Nous pourrions également envisager de complexifier notre modèle en développant des co-cultures comprenant des skMt et des motoneurons dérivés de hiPSC d'un même patient. En effet, cette technique permet d'améliorer la maturité des myotubes, ainsi que leurs propriétés contractiles (Smith et al., 2016). Malgré ces alternatives, il semblerait néanmoins que les modèles conventionnels en deux dimensions (2D) présentent des limitations en raison du manque de complexité dans la structure, les interactions intercellulaires et le microenvironnement des tissus. Face à ce constat, nous pourrions développer des modèles cellulaires tridimensionnels (3D) tels que les organoïdes ou les organes sur puce (*organ-on-chip*), qui ont émergé au cours des dernières années. Le principal avantage d'un organoïde est sa sophistication structurelle qui reproduit plus fidèlement le développement et le microenvironnement de l'organisme humain. Par contre, l'hétérogénéité présente au sein d'un même lot de production (C. Liu et al., 2018) peut limiter son utilisation pour des études à haut débit. Enfin, la technologie d'organes sur puce permet l'association d'un modèle cellulaire microfluidique 2D ou 3D et de biomatériaux reproduisant la MEC naturellement présente au sein d'un tissu (Agrawal et al., 2017; Osaki et al., 2020). Ce modèle s'impose aujourd'hui dans divers domaines, en plus de la modélisation pathologique, tels que la validation de candidats médicaments et les tests de pharmacocinétique. Cependant, en termes d'hétérogénéité cellulaire, de fidélité phénotypique et de complexité physiologique, les organoïdes restent plus adaptés que les modèles d'organes sur puce. Ainsi, la convergence de ces deux approches pourrait être le prochain challenge pour modéliser les dysferlinopathies.

Comme tous les modèles cellulaires, il est important de tenir compte de l'ensemble de ces paramètres et de les anticiper avant de lancer de tels programmes de modélisation. Aucun de ces critères ne doit cependant être considéré comme un élément bloquant puisque l'identification d'un phénotype pathologique ne nécessite pas obligatoirement l'utilisation d'un système complexe. Le facteur le plus important à prendre en compte est la capacité de notre modèle à reproduire des mécanismes moléculaires observés chez le patient. En effet, malgré ces points d'amélioration à prendre en compte, notre modèle cellulaire a démontré sa capacité à récapituler un défaut de PMR dans les skMt dérivés de hiPSC LGMD R2, validant ainsi sa pertinence biologique pour modéliser les dysferlinopathies. Néanmoins, il me semble important de noter que certains autres défauts pathologiques, identifiés dans des myoblastes immortalisés, non pas été reproduits tels que la dérégulation du trafic de la transferrine ou de l'expression des connexines. Même si la maturité de notre modèle peut encore une fois être remise en cause, cette différence pourrait également s'expliquer soit par l'utilisation d'outils non adaptés pour reproduire les phénotypes (anticorps, protocole d'endocytose), soit par le processus d'immortalisation des myoblastes qui peut engendrer des anomalies génétiques et métaboliques et donc limiter la capacité de ce modèle à reproduire fidèlement les maladies humaines.

2.2. Identifier un phénotype pathologique

Une fois le modèle cellulaire d'étude identifié et caractérisé, la deuxième étape de l'approche phénotypique consiste à identifier un défaut moléculaire représentatif de la pathologie. Pour cela, une analyse transcriptomique a été réalisée sur des skMt dérivés de hiPSC de patients LGMD R2, en comparaison avec des contrôles sains. Cette étude nous a permis d'identifier des dérégulations géniques associées à différentes voies biologiques déjà identifiées dans les dysferlinopathies, telles que la voie du TGF β , des acides gras ou de la MEC, nous confirmant ainsi la pertinence biologique de notre modèle d'étude. En effet, plusieurs membres de la famille du TGF β , impliqués dans la régulation de la réparation musculaire, ont déjà été identifiés comme étant des cytokines pro fibrotiques et pro inflammatoires majeures impliquées dans la progression des MD (Burks and Cohn, 2011; Ceco and McNally, 2013). Des thérapies ciblant l'activité de cette voie ont par ailleurs été développées pour la DMD afin de réduire la fibrose musculaire (Mázala et al., 2020). D'autre part, comme expliqué dans l'introduction de ce manuscrit, des études récentes suggèrent une dérégulation du métabolisme lipidique dans les dysferlinopathies (Srivastava et al., 2018) qui entraînerait un remodelage du muscle squelettique (Agarwal et al., 2019; Grounds et al., 2014; Haynes et al., 2019). Enfin, la dysferline a déjà été impliquée dans des mécanismes d'adhésion cellulaire à la MEC de par la formation de complexes protéiques avec des protéines de l'adhésion focale ((de Morrée et al., 2013) ou son interaction avec la protéine AHNAK (Huang et al., 2007). Cette analyse transcriptomique nous a également permis d'identifier une dérégulation de l'expression de *dab2*, inversement corrélée à celle de la dysferline. En complétant ces résultats par des études chez le modèle Bla/J et dans des biopsies musculaires de patients nous avons ensuite suggéré un rôle potentiel de *dab2* dans la physiopathologie des LGMD R2. Cependant, un désavantage majeur à cette approche phénotypique est qu'il nous est difficile de relier *dab2* à la maladie. En général, pour répondre à cette interrogation, on peut étudier les conséquences physiopathologiques d'une perte et d'un gain de fonction *in vitro* du biomarqueur en utilisant des tests phénotypiques secondaires. Or, dans notre cas, on ne saura pas sur quel critère mesurer le bénéfice. En effet, comme évoqué précédemment, il n'existe pas de phénotype pathologique caractérisé dans les dysferlinopathies, excepté la PMR qui n'est cependant pas suffisante pour refléter un effet bénéfique sur le caractère dystrophique du muscle. Dans notre situation, une alternative plus longue et fastidieuse consisterait à utiliser les modèles *in vivo* pour évaluer le rôle de notre biomarqueur dans l'apparition de la maladie.

2.3. Etude du mécanisme d'action

Une fois le phénotype pathologique identifié et validé, l'étape finale de l'approche phénotypique consiste à évaluer la capacité de petites molécules à corriger ce défaut. L'avantage du criblage phénotypique est qu'il ouvre la possibilité d'identifier des molécules potentiellement thérapeutiques sans aucun a priori sur la cible pharmacologique et donc de valider plusieurs molécules. A l'inverse, l'inconvénient est qu'il identifie également des composés qui pourraient agir sur le phénotype complètement indépendamment de la

pathologie étudiée. C'est pour cela qu'il est nécessaire d'avoir accès à un certain nombre de tests secondaires pour pouvoir distinguer ces deux situations, soulignant encore une fois la nécessité d'identifier de nouveaux phénotypes pathologiques dans les dysferlinopathies. Un autre obstacle limitant des criblages phénotypiques réside dans la difficulté à identifier le mécanisme d'action du candidat médicament. Les cibles protéiques des molécules issues du criblage peuvent être nombreuses. Néanmoins, plus le test rend compte d'un phénotype précis, plus les molécules actives sélectionnées seront pertinentes, et plus l'analyse de leur mécanisme d'action sera facilitée. Par exemple, un simple test de viabilité est généralement insuffisant car de nombreux facteurs peuvent affecter la croissance et la mort cellulaire.

3. Approche mécanistique : des premiers succès des inhibiteurs des voies de dégradation protéique aux molécules repositionnées pour le sauvetage de la dysferline

Une autre stratégie pharmacologique pour les dysferlinopathies est l'approche mécanistique qui consiste à cibler un mécanisme de la machinerie cellulaire. De façon similaire à la stratégie phénotypique, cette approche a déjà démontré son intérêt dans l'identification de candidats médicaments pour des maladies fréquentes (Berndt et al., 2011) et plus rares avec, par exemple, l'identification d'inhibiteurs du processus de farnésylation pour améliorer certains symptômes de la progéria (Capell et al., 2008; Gordon et al., 2012; Yang et al., 2008). En ce qui concerne les MD, cette stratégie mécanistique est transposable pour restaurer l'expression à la membrane plasmique de protéines mal conformées en modulant, soit la voie de repliement/maturation des protéines, soit celle des voies de dégradation des protéines. Des preuves en faveur de cette stratégie ont notamment été décrites par notre groupe, et d'autres, pour la LGMD R3. Dans cette pathologie, les mutations faux-sens entraînent la production de protéines mal repliées, reconnues par le système de contrôle qualité du réticulum endoplasmique, puis dégradées par le système ubiquitine-protéasome (Bartoli et al., 2008; Gastaldello et al., 2008). Le groupe d'Isabelle Richard, avec qui nous collaborons, a mis en évidence qu'une inhibition de ce processus permettait de restaurer la présence à la membrane de certaines formes mutantes mal conformées de l' α -sarcoglycane (α -SG) (Bartoli et al., 2008; Soheili et al., 2012). La confirmation de ce lien a ensuite été apportée par une autre équipe (Bianchini et al., 2014). Bien que mal conformés, ces études ont par ailleurs montré que certains mutants de l' α -SG conservaient leurs fonctionnalités, ouvrant ainsi la voie aux approches pharmacologiques ciblant les voies de contrôle qualité ou de dégradation de la cellule. C'est dans ce contexte que j'ai participé, dès 2017, au développement d'un modèle pharmacologique de la LGMD R3 visant à identifier, par criblage à haut débit, des candidats médicaments capables de restaurer l'expression à la membrane du mutant R77C, le plus fréquent de l' α -SG. Nous avons ainsi rapporté dans une première étude que, parmi 2000 molécules repositionnables testées, seul un médicament, le thiostrepton, était capable de sauver la localisation membranaire de l' α -SG R77C via une inhibition du protéasome (Hoch et al., 2019)(annexe 1). Ensuite, dans une seconde étude à laquelle j'ai également contribué, nous avons pu démontrer l'impact positif de l'association du givinostat et du bortézomib sur la

relocalisation de ce même mutant à la membrane plasmique (Hoch et al., 2022)(annexe 2) en perturbant les systèmes de dégradation du protéasome et de l'autophagie, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles stratégies de traitements combinés pour la LGMD R3.

3.1. Intérêt et faisabilité de l'approche pour les dysferlinopathies

Dans le cadre des dysferlinopathies, le fait de cibler directement la perte d'expression de la dysferline a pour avantage majeur de pouvoir empêcher l'apparition de tous les phénotypes pathologiques. Ainsi, nous nous sommes demandé si l'approche mécanistique exposée précédemment pouvait être applicable à cette pathologie, dont un tiers des mutations sont des variants faux-sens (Cacciottolo et al., 2011; Jin et al., 2016; Schoewel et al., 2012). Une série d'expériences *in vitro* a montré que les mutations L1341P, W999C et G1628R entraînaient la production de protéines mal conformées qui se retrouvaient agrégées et dégradées (Fernández-Simón et al., 2020; Matsuda et al., 2015; Wenzel et al., 2006). Ces études, complétées par d'autres, ont par ailleurs démontré que la dégradation de ces variants n'impliquait pas forcément le système ubiquitine protéasome puisque l'utilisation d'inhibiteurs de cette voie n'était pas suffisante pour sauver les protéines mutantes L1341P et G1628R (Fernández-Simón et al., 2020; Kokubu et al., 2019). De ce fait, plusieurs études ont suggéré un rôle de l'autophagie dans la dégradation de certaines formes mutées de dysferline, en particulier le mutant L1341P (Fujita et al., 2007; Kokubu et al., 2019).

3.2. Développement du modèle pharmacologique

Sur la base de l'analyse de ces différents articles, le second objectif de mon projet de thèse a consisté à développer un modèle pharmacologique de la LGMD R2 permettant d'identifier des molécules capables d'empêcher la dégradation des formes mal conformées de la dysferline. Parmi le large panel de mutations faux-sens impliquées dans cette pathologie, je me suis intéressée au variant L1341P qui, bien que mal conformé et agrégé dans le réticulum endoplasmique, conserve sa fonctionnalité s'il est relocalisé au sarcolemme (Schoewel et al., 2012).

Contrairement à l'approche phénotypique, la mise en place du modèle d'étude de l'approche mécanistique s'est faite beaucoup plus rapidement. J'ai tiré parti du modèle cellulaire de myoblastes immortalisés *DYSF*^{L1341P} qui était déjà caractérisé. Ce modèle récapitule l'agrégation de la dysferline mutante dans le réticulum endoplasmique et le phénotype pathologique de défaut de PMR (Philippi et al., 2012). De façon plus général, la simplicité du modèle cellulaire est un des avantages de l'approche mécanistique. Dans mon projet, j'ai eu l'opportunité de travailler sur un type cellulaire relevant pour les dysferlinopathies mais un modèle de surexpression de la dysferline L1341P ou de dysferline tagguée, permettant d'identifier des molécules thérapeutiques en suivant la localisation de la protéine, aurait été suffisant. Un autre avantage à cette stratégie de criblage mécanistique repose sur notre *readout*, qui consiste à mesurer une augmentation de l'expression de la dysferline dans les cellules. En effet, intuitivement, plus le *readout* est proche de la biomolécule à l'origine de la maladie, plus

grandes sont nos chances de trouver une petite molécule spécifique.

3.3. Identification de candidats médicaments

Une fois notre modèle pharmacologique développé et caractérisé, une campagne de criblage de 2200 médicaments repositionnables nous a permis d'identifier 9 composés qui présentaient une efficacité dose dépendante sur l'expression de la dysferline et permettaient de relocaliser la protéine en dehors du réticulum endoplasmique. Cependant, de façon comparable à l'approche phénotypique, il nous était difficile d'évaluer l'effet thérapeutique de ces molécules. D'une part, notre *readout* ne permettait pas de certifier que la dysferline était relocalisée à la membrane plasmique et, d'autre part, nous n'avions pas de test secondaire à notre disposition. Partant de ce constat, nous avons émis l'hypothèse que si la dysferline mutante relocalisée était fonctionnelle alors elle serait en mesure d'assurer sa fonction dans la PMR après une lésion. En effet, même si un test de PMR ne nous assurait pas un effet thérapeutique, il nous permettait au moins de confirmer un effet fonctionnel des molécules sur la dysferline mutante L1341P. De ce fait, l'évaluation de la capacité des cellules à résister à un choc osmotique après avoir été traitées avec chacun des 9 composés nous a permis d'identifier le saracatinib et le bazédoxifène comme étant des candidats médicaments pour les patients LGMD R2 porteurs de la mutation L1341P. Pour démontrer l'effet thérapeutique de ces 2 molécules, les modèles animaux sont indispensables. Ainsi, on pourrait envisager d'utiliser le modèle murin MMex 38 développé par le Dr Simone Spuler ou de générer des souris *knock-in* L1341P.

Enfin, il convient de comprendre les mécanismes par lesquels chacun des 2 composés identifiés régule l'expression de la dysferline. A l'inverse de l'approche phénotypique, cette étape est moins complexe. En effet, quand on s'intéresse aux voies de dégradation des protéines il y a en réalité peu de candidats cibles. Dans notre étude, nous constatons que le mécanisme d'action semble différent pour chaque molécule. En effet, l'effet du saracatinib sur le choc osmotique est uniquement observé dans les myoblastes exprimant la dysferline L1341P alors que celui du bazédoxifène a été mesuré dans toutes les lignes cellulaires, peu importe la mutation, y compris dans des cellules saines. Ainsi, contrairement au bazédoxifène, l'effet du saracatinib serait lié au sauvetage de la dysferline mutante L1341P.

De prime abord, le mécanisme d'action du saracatinib semble plus facile à élucider que celui du bazédoxifène. Le saracatinib est un médicament développé par AstraZeneca (AZD-0530) pour traiter le mélanome métastatique. C'est un inhibiteur de Src qui semble promouvoir l'autophagie par la voie de signalisation Akt/mTOR (Wu et al., 2010). Le saracatinib a été reporté comme une molécule efficace pour éliminer les agrégats de protéines Tau phosphorylées mal conformées dans la maladie d'Alzheimer (Nygaard et al., 2015; Tang et al., 2020). Plus récemment, il a également été montré que le saracatinib réduit la propagation des agrégats d'alpha synucléine dans la maladie de Parkinson via l'activation de l'autophagie (Choi et al., 2020). Par conséquent, on peut supposer que l'effet bénéfique du saracatinib sur les cellules musculaires exprimant la dysferline mutante L1341P passerait par l'activation de la voie de

l'autophagie. Cette hypothèse est d'ailleurs en accord avec une précédente étude qui montre l'impact positif de la rapamycine, un puissant inducteur d'autophagie, sur cette même mutation (Fujita et al., 2007). Afin de valider si l'effet du saracatinib sur le mutant L1341P passe par la voie de l'autophagie, il faudrait donc envisager de mesurer l'expression de marqueurs spécifiques de cette voie comme LC3B et P62 et d'utiliser des inhibiteurs de ce mécanisme.

Par ailleurs, ces données permettent également d'envisager un rôle de l'autophagie dans la pathogenèse des dysferlinopathies, de façon similaire aux maladies neurodégénératives. Dans le cas de mutations faux-sens de *DYSF*, des agrégats de dysferline vont se former, ce qui va entraîner une augmentation de l'autophagie qui, dans les premiers stades de la maladie, serait assez efficace pour assurer leur élimination. A un stade plus avancé de la pathologie, on peut par contre envisager que l'autophagie ne serait plus suffisante pour assurer la dégradation des protéines. De ce fait l'accumulation de protéines et d'organelles cellulaires endommagées activerait des cascades de signalisation conduisant à l'atrophie et à l'apoptose des fibres et, dans certains cas, à une réduction de la force mécanique générée lors de la contraction musculaire et à un échec de la régénération musculaire. Si cette hypothèse est confirmée, des inducteurs de l'autophagie pourraient alors être utilisés pour détoxifier les cellules musculaires et améliorer leur phénotype dystrophique. Plusieurs traitements stimulant l'autophagie (tels que la privation de nourriture, ou l'inhibition pharmacologique de la kinase mTOR) ont d'ailleurs eu un impact positif sur des modèles animaux de myopathies multiples, confirmant que la déficience en autophagie joue un rôle important dans la pathogenèse des troubles musculaires squelettiques. Récemment, des résultats prometteurs ont été obtenus avec le ptérostilbène, une molécule non toxique similaire au resvératrol, sur des souris *Col6a1^{-/-}* (Metti et al., 2020). En réactivant l'autophagie, ce composé a permis d'améliorer les lésions musculaires avec une diminution de la taille anormale des fibres musculaires et une augmentation du nombre de fibres nouvellement formées. Par ailleurs, une étude clinique pilote de phase II évaluant les effets d'un régime pauvre en protéines pendant un an et menée chez sept adultes atteints de MDC liée au collagène VI a montré des signes de réactivation de l'autophagie au niveau du tissu musculaire squelettique (Castagnaro et al., 2016). Ce régime a non seulement permis de contrecarrer l'aggravation de la fonction motrice, mais aussi entraîné une amélioration de certains paramètres moteurs et respiratoires.

Le bazédoxifène est un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (SERM) de troisième génération (De Villiers et al., 2011), développé par Pfizer. De façon intéressante, deux études suggèrent également un rôle d'inducteur d'autophagie au bazédoxifène, d'une part, par la régulation du PDGF-BB dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Song et al., 2020) et, d'autre part, en induisant la formation d'autophagosomes et l'expression de la protéine LC3B-II par la signalisation Akt/mTOR dans les macrophages infectés par *M. tuberculosis* (Ouyang et al., 2020). De plus, le bazédoxifène appartient à la même classe de médicaments que le tamoxifène, un autre SERM associé à l'induction de l'autophagie, et certaines preuves récentes recueillies sur l'effet de ce médicament sur les MD (Kuşçu et al., 2022) soutiennent le bénéfice potentiel du bazédoxifène sur la LGMD R2. Par ailleurs, le bazédoxifène améliore la résistance membranaire des cellules musculaires pour un large spectre de conditions

(mutations L1341P, G299R, S1173X et cellules contrôles), suggérant un mécanisme plus général de protection des fibres musculaires qu'avec le saracatinib. Afin de protéger ces résultats, un brevet concernant l'utilisation du bazédoxifène pour augmenter la survie musculaire a d'ailleurs été déposé (annexe 3). On peut supposer que ce mécanisme de protection des cellules musculaires LGMD R2 et saines est une conséquence directe de l'induction de l'autophagie. En effet, une autophagie active permet de renouveler rapidement la population de lysosomes intracellulaires (McGrath et al., 2021). Or comme nous l'avons évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, les lysosomes sont essentiels au processus de PMR. Une hypothèse serait qu'une autophagie active, via le bazédoxifène, permettrait de compenser l'absence de dysferline pour le recrutement des lysosomes à la membrane lésée ou exacerberait la PMR en présence de dysferline. Dans ce sens, nos résultats montrent que l'effet protecteur du bazédoxifène sur le sarcolemme est plus important dans des myoblastes contrôles que pathologiques.

Pour conclure, l'avantage principal de l'approche mécanistique repose sur la rapidité à identifier deux médicaments candidats, le saracatinib et le bazédoxifène, comme options thérapeutiques potentielles pour le traitement des patients LGMD R2 porteurs de la mutation *DYSF*^{L1341P}. A l'inverse, comme nous l'avons vu avec le saracatinib, l'inconvénient principal de cette stratégie est son spectre thérapeutique. En effet, celui-ci est réduit à la mutation testée, ainsi qu'au nombre restreints de patients touchés par ce variant puisqu'aucune mutation faux-sens de *DYSF* n'a été répertoriée comme étant plus fréquente qu'une autre. Bien qu'il soit théoriquement possible de repositionner l'effet du saracatinib à d'autres mutations faux-sens de la dysferline, il faudrait néanmoins que ces variants soient agrégés ou dégradés de la même façon que le mutant L1341P. Or, cette information n'est pas connue pour les dysferlinopathies. Il faudrait donc faire cette analyse pour chaque variant en clonant toutes les mutations faux-sens afin d'identifier leur voie de dégradation, ce qui représente des années de recherche.

4. Approche basée sur une cible moléculaire pour la découverte de médicaments

Une stratégie alternative que l'on aurait pu envisager pour identifier un traitement pharmacologique aux dysferlinopathies est l'approche « *target-based* », qui est le chemin du médicament classique de l'industrie pharmaceutique. Cette stratégie consiste à modéliser, à l'aide de méthodes informatiques, des inhibiteurs sélectifs d'une cible moléculaire. L'étape la plus critique dans ce processus est le choix de la cible, car elle détermine le succès potentiel du programme de recherche. Plusieurs approches peuvent être utilisées. La plus courante est celle basée sur la littérature scientifique puisque la connaissance de l'étiopathogénie de la maladie est une source importante de nouvelles cibles moléculaires. Par exemple, les études génétiques concernant les formes familiales précoces de la maladie d'Alzheimer ont permis d'identifier des mutations portant sur les gènes codant pour le précurseur de la protéine β -amyloïde et conduisant à la formation de plaques séniles (Hardy and Selkoe, 2002; Morrissette et al., 2009). Ces données ont permis de développer des stratégies thérapeutiques visant à réduire la formation de la protéine β -amyloïde (Pangalos et al., 2007). Une autre approche est basée sur une recherche prospective utilisant la génomique, la transcriptomique ou la protéomique différentielle. Dans certains cas, des gènes peuvent être sélectionnés comme

cible de façon pragmatique, en fonction de leur expression différentielle dans un tissu d'intérêt. Mais le plus souvent la validation de la cible biologique est réalisée par génomique fonctionnelle à l'aide de souris transgéniques dont le gène d'intérêt est invalidé ou surexprimé et par l'analyse du phénotype correspondant.

Dans le cadre des dysferlinopathies l'unique cible moléculaire identifiée est la dysferline. On pourrait donc envisager d'utiliser les techniques informatiques de type prédiction *in silico* pour concevoir des chaperons pharmacologiques permettant de restaurer la structure de la dysferline lorsqu'elle est se retrouve mal conformée et dégradée à cause de mutations faux-sens. Dans ce sens, une étude très récente montre que le 4-PBA, un chaperon chimique, permet à la dysferline mutante de retrouver *in vitro* une localisation membranaire partielle pour 25 des 64 mutations faux-sens qui avaient une forte probabilité de provoquer des défauts de repliement de la dysferline et de mener à sa dégradation (Tominaga et al., 2022). De plus, les tests *in vivo* sur le modèle MMex38 montrent que l'administration orale du 4-PBA pendant deux jours permet de restaurer complètement la fonction de PMR des cellules musculaires, démontrant un potentiel thérapeutique important des chaperons pharmacologiques et ouvrant la voie à leur identification pour traiter certaines mutations faux-sens des dysferlinopathies.

Les chaperons pharmacologiques ont l'avantage d'être plus spécifiques que des modulateurs du protéasome ou de l'autophagie. En effet, ils se lient spécifiquement aux protéines mutantes repliées (ou partiellement repliées) instables. Par contre, l'utilisation de cette stratégie implique de connaître les mutations faux-sens de la dysferline qui entraînent des défauts de repliement et une agrégation de la protéine dans le réticulum endoplasmique. En effet, dans l'étude précédente, seulement 64 mutations faux-sens sur 113 analysées étaient susceptibles d'engendrer un mauvais repliement de la dysferline mutante. De façon similaire à l'approche mécanistique, l'analyse de tous les variants faux-sens pathogènes de *DYSF* nécessiterait de cloner chaque mutation et engendrerait des années de recherche.

5. Vers une stratégie « à la carte »

Ces trois années de thèse m'ont permis d'évaluer la pertinence de différentes approches pharmacologiques pour l'identification de candidats médicaments. Pour résumer, une des promesses de l'approche phénotypique est son spectre thérapeutique. En plus de pouvoir théoriquement traiter tous les patients atteints d'une même maladie, sans distinction du variant génétique, la molécule thérapeutique identifiée peut potentiellement être repositionnée pour d'autres pathologies, à partir du moment où celles-ci partagent le même mécanisme pathologique. Cependant, connaître l'identité d'une partie d'un défaut peut ne pas être suffisant pour traiter la maladie. A l'inverse, le spectre thérapeutique de l'approche mécanistique est généralement limité puisqu'il est réduit aux patients atteints de la mutation testée. Le modèle d'étude est également un point de divergence. Alors que l'accès à un type cellulaire relevant n'est pas nécessaire à l'approche mécanistique, ce point est déterminant pour la stratégie phénotypique qui nécessite d'utiliser un modèle capable de récapituler une maladie. De ce fait, le modèle mécanistique a été plus rapidement mis en place. Mais, à

contrario, la plateforme de skMC dérivés de hiPSC, associée à la technologie CRISPR, constitue un modèle cellulaire unique pour modéliser l'ensemble des LGMD et permet d'envisager l'identification de mécanismes pathologiques partagés par ces pathologies. Elle permet également de suivre les conséquences d'une invalidation/surexpression d'un gène au cours de la différenciation musculaire. Malgré ces différences entre les approches, une problématique commune a néanmoins été identifiée. Que ce soit pour valider l'effet pathologique d'un biomarqueur ou thérapeutique d'un candidat médicament, nos programmes ont été ralentis par le manque de tests secondaires disponibles, soulignant la nécessité d'identifier de nouveaux mécanismes pathologiques associés aux dysferlinopathies ou de mieux caractériser ceux déjà connus. L'accès à un modèle animal pertinent pour valider les résultats obtenus *in vitro* est également un point important dont il faut tenir compte à la fois pour les programmes de modélisation et de pharmacologie puisqu'il peut nécessiter de développer des collaborations.

De ces expériences que j'ai pu acquérir en développant ces deux approches pharmacologiques, je me questionne donc sur le choix de la stratégie que j'utiliserai pour optimiser le développement d'un nouveau programme de recherche. Il me semble tout d'abord important de tenir compte de nos connaissances sur les mécanismes physiopathologiques. La stratégie doit par exemple être adaptée au spectre mutationnel du gène et à son impact clinique, aux modifications structurelles de la protéine, aux mécanismes pathologiques identifiés et aux stratégies thérapeutiques déjà développées. Il me semble également important de tenir compte du contexte socio-économique. En effet, la grande majorité des maladies génétiques sur lesquelles nous travaillons sont des maladies rares voir ultra rares. Il apparaît donc nécessaire de privilégier des stratégies de repositionnement de médicaments déjà existants pour éviter le processus long et très coûteux de développement de nouvelles entités chimiques. Le choix entre ces approches dépend également des ressources dont on dispose. Une approche phénotypique est par exemple chronophage si nous n'avons pas accès au matériel robotique permettant de faire du high-content ou du high-throughput screening. Ainsi, il me semble que le choix de la stratégie doit se faire « à la carte ».

Par ailleurs, il me semble pertinent de ne pas considérer les approches phénotypiques et mécanistiques comme des alternatives opposées dans la découverte de nouveaux médicaments, mais plutôt comme des méthodes complémentaires qui peuvent augmenter les chances d'identifier et de développer des médicaments efficaces.

6. Comment améliorer notre compréhension des dysferlinopathies ?

L'identification d'un point bloquant à nos deux approches, qui est le manque de compréhension sur les mécanismes impliqués dans les dysferlinopathies, m'a amenée à me poser une autre question qui est la suivante: *quelles autres stratégies auraient pu être développées pour identifier des défauts pathologiques pertinents pour cette maladie ?*

6.1. Etude de la sensibilité différentielle des muscles squelettiques dans les dysferlinopathies

A ce jour, les skMC représentent le seul type cellulaire identifié comme étant impacté dans les dysferlinopathies. Toutefois, comme nous l'avons vu dans la partie introductive du manuscrit, les skMC présentent une vulnérabilité différentielle dans cette pathologie. En effet, les dysferlinopathies se caractérisent, chez le patient, par une atteinte spécifique de certains groupes musculaires consécutivement à une déficience en dysferline. Ainsi, mieux comprendre les mécanismes régissant cette vulnérabilité sélective des skMC, dépendante de la dysferline ou non, offrirait le potentiel de révéler de nouvelles cibles thérapeutiques, avec une pertinence potentielle pour les autres LGMD ou MD. Une hypothèse serait qu'un sous-ensemble de skMC possèderaient des caractéristiques intrinsèques uniques qui les protègent, par des mécanismes de compensation ou par leur composition (fibres lentes vs rapides) par exemple, ou au contraire les fragilisent. Dans le but d'identifier ces voies moléculaires pouvant expliquer la dégénérescence sélective de certains groupes musculaires dans les dysferlinopathies, nous pourrions envisager de modéliser différents types de cellules musculaires dérivées de hiPSC. Cependant, notre faible connaissance des programmes géniques activés lors du développement de ces sous-types de progéniteurs myogéniques limite leur transposition en protocole de différenciation *in vitro* à partir de CSP.

6.2. Etude des mécanismes de compensation

Les dysferlinopathies sont des maladies génétiques qui se déclarent tardivement et progressent lentement, laissant penser que certains mécanismes moléculaires pourraient être exprimés au début de la pathologie afin de compenser l'absence de dysferline. Un des enjeux pour le traitement des dysferlinopathies serait donc d'identifier ces mécanismes compensatoires. Dans ce but, l'objectif d'une étudiante en thèse dans l'équipe est d'établir les signatures génétiques de sous-ensembles de skMC dérivées de hiPSC grâce à la technique du *single cell RNASeq*. Plusieurs approches sont possibles dans cette analyse telles que : (i) identifier les gènes dérégulés entre des cellules LGMD R2 et des cellules saines ou (ii) identifier les gènes différemment exprimés entre des sous-ensembles de skMC LGMD R2 qui sont composés de cellules que l'on considère comme atteintes ou non atteintes. Ces populations pourraient par exemple se distinguer par leur niveau d'expression pour certains biomarqueurs de la pathologie comme *dab2* ou la connexine 43.

Par ailleurs, une étude récente montre que les patients qui déclenchent tardivement la maladie sont moins gravement atteints et présentent des changements dystrophiques plus légers dans leur biopsie musculaire. Ainsi, une alternative à la stratégie précédente pour étudier les mécanismes compensatoires mis en place dans les dysferlinopathies serait d'étudier les profils d'expression génique de biopsies musculaires de patients qui déclarent tardivement la maladie (Late Onset) afin de les comparer avec des patients atteints précocement (Early Onset).

Le développement d'un modèle *in vitro* de skMC dérivées à partir de CSP humaines nous a permis d'identifier une dérégulation de l'expression de dab2 dans les cellules musculaires pathologiques. Cette dérégulation a ensuite été confirmée *in vivo* en analysant son augmentation dans les muscles les plus atteints de souris Bla/J et son sauvetage lorsque la dysferline pleine longueur a été restaurée dans ce modèle à l'aide d'AAV. Dans l'ensemble, nos résultats révèlent que dab2 est inversement régulé par la teneur en dysferline et suggèrent son implication dans la physiopathologie de la LGMD R2. Par ailleurs, cette corrélation entre l'augmentation de dab2 et la déficience en dysferline a été renforcée par l'analyse de l'expression de dab2 dans des biopsies musculaires prélevées chez des patients LGMD R2 à différents stades de la maladie (classés selon l'échelle de Walton). Comme dans le modèle murin, nos résultats ont démontré que dab2 était surexprimé dans les muscles des patients présentant les stades les plus avancés de la pathologie.

Au-delà du fait que dab2 pourrait être utilisé comme un marqueur de la progression des dysferlinopathies, l'ensemble de nos résultats souligne que l'augmentation de dab2 pourrait jouer un rôle actif dans le développement de la maladie. Il convient donc d'essayer de déchiffrer les mécanismes par lesquels dab2 pourrait être impliqué dans la pathogenèse des dysferlinopathies.

1. Rôle de dab2 dans l'endocytose du récepteur au LDL

Dab2 a principalement été décrit comme une molécule adaptatrice de la clathrine qui permet l'internalisation de récepteurs cellulaires par le mécanisme d'endocytose médiée par la clathrine (CME) (Lampe et al., 2016). La CME est un processus cellulaire complexe qui génère de petites vésicules membranaires (60-120 nm) et permet de transporter diverses molécules cargo de la membrane plasmique aux endosomes. En particulier, dab2 a été impliquée dans la régulation de l'internalisation du récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDLR) et de l'absorption des LDL riches en cholestérol (Mettlen et al., 2010; Tao et al., 2016).

Dans les années 1950 et 1960, les physiologistes ont défini les deux principales lipoprotéines sanguines transportant du cholestérol : les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Les épidémiologistes ont observé que des concentrations élevées de LDL prédisposent aux crises cardiaques, alors que des quantités élevées de HDL sont protectrices ; l'excès de cholestérol circulant chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale est contenu dans les LDL, et non dans les HDL. Quelques années plus tard, Goldstein et Brown ont découvert que le LDLR, un récepteur de surface cellulaire pour les LDL, transporte les particules de LDL dans les cellules par le biais de fosses et de vésicules recouvertes de clathrine (Brown and Goldstein, 1979) et que des mutations du LDLR entraînant une endocytose défectueuse étaient responsables de l'hypercholestérolémie familiale (Anderson et al., 1977). Après la liaison du LDL à son récepteur, le complexe est internalisé par la CME et pénètre dans les endosomes précoces. Alors que le LDLR est recyclé

vers la surface cellulaire, le LDL est hydrolysé dans les lysosomes. L'absorption des LDL est très sensible aux changements, même minimes, des concentrations de cholestérol et la privation de cholestérol induit l'activation des facteurs de transcription SREBP, qui à leur tour régulent la transcription du LDLR (Yokoyama et al., 1993).

Bien que plusieurs protéines adaptatrices ont été décrites pour recruter la clathrine à la membrane plasmique, il a été démontré que dab2 agit comme adaptateur de la clathrine pour l'internalisation d'un sous-ensemble spécifique de récepteurs (Anderson et al., 1977). En effet, dab2 semble être spécifiquement impliqué dans l'internalisation du LDLR pour l'absorption des LDL, alors qu'il n'est pas nécessaire pour l'absorption du récepteur de la transferrine (TfnR) (Mettlen et al., 2010; Tao et al., 2016; Yokoyama et al., 1993). Les récepteurs de la Tfn et du LDL sont concentrés dans des puits recouverts de clathrine (CCP pour clathrin coated pits) et sont constitutivement endocytés (Brodsky, 1988). Le regroupement de ces cargos dépend des signaux de tri trouvés dans leur queue cytoplasmique (Trowbridge et al., 1993). Alors que le signal de tri YXX Φ du TfnR est reconnu par la protéine adaptatrice tétramérique AP2, le recrutement du LDLR repose sur un motif FXNPXY (Davis et al., 1986) reconnu par les adaptateurs dab2 et son partenaire ARH (pour autosomal recessive hypercholesterolemia) (Garcia et al., 2001). Il a été démontré que la combinaison des fonctions de dab2 et d'ARH contrôle l'homéostasie circulatoire du cholestérol et le *knock-out* des gènes ARH et dab2 chez la souris a entraîné une hypercholestérolémie similaire à celle résultant de la délétion homozygote du LDLR (Tao et al., 2016). Ainsi, les adaptateurs dab2 et ARH se lient tous les deux aux mêmes molécules cargo, sont recrutés dans les mêmes structures de clathrine, et la taille des CCP peut être contrôlée par le ratio dab2/ARH. Par exemple, la surexpression de dab2 conduit à la formation de plaques géantes de clathrine (Mettlen et al., 2010).

Sur la base de nos résultats montrant une surexpression de dab2 dans les myotubes LGMD R2, combinée à la littérature révélant un rôle de dab2 dans l'endocytose du LDLR, on peut donc supposer que l'expression accrue de dab2 pourrait augmenter ou altérer l'endocytose du LDL et engendrer des conséquences sur l'homéostasie du cholestérol chez les patients LGMD R2.

2. Rôle du métabolisme lipidique dans les dysferlinopathies

Cette hypothèse est soutenue par des études récentes soulignant un rôle majeur de la dérégulation du métabolisme des lipides dans la phase la plus précoce de la LGMD R2 (Srivastava et al., 2018). D'un point de vue clinique, cette modification contribue au remodelage du muscle squelettique (Haynes et al., 2019) comme le révèle le dépôt anormalement élevé de lipides dans les myofibres de patients (Diaz-Manera et al., 2018) ou de souris modèles (Agarwal et al., 2019; Grounds et al., 2014; Haynes et al., 2019) et l'infiltration d'adipocytes entre les fibres à un stade plus tardif (Agarwal et al., 2019; Grounds et al., 2014; Haynes et al., 2019). Par ailleurs, des études lipidomiques des muscles déficients en dysferline révèlent des augmentations significatives d'un large éventail de lipides – incluant les sphingolipides, phospholipides, lysophospholipides, le cholestérol et les esters de cholestérol – avant l'apparition de complications histologiques perceptibles (Haynes et al., 2019). En accord avec ces observations,

notre hypothèse a également été soutenue par la découverte que les skMt LGMD R2 accumulaient des gouttelettes lipidiques *in vitro*. Bien que la cause de ces dérégulations soit encore inconnue, une composition lipidique altérée des myofibres pourrait contribuer à un déclin progressif de la fonction musculaire dans le LGMD R2. Dans ce sens, une récente étude démontre l'effet délétère du cholestérol dans les muscles déficients en dysferline (Sellers et al., 2018).

Ainsi, l'ensemble de ces données questionnent sur le rôle de la CME dans les mécanismes pathologiques associés à la dysferline ainsi que son lien avec l'homéostasie lipidique des fibres musculaires. *Est-ce que l'expression accrue de dab2 pourrait jouer un rôle clé dans l'homéostasie défectueuse du cholestérol chez les patients LGMD R2 en augmentant l'absorption du cholestérol par le LDLR ? Au contraire, est-ce que l'augmentation de dab2 pourrait être un mécanisme compensatoire visant à réguler ce défaut d'homéostasie ? Est-ce que dab2 pourrait aggraver la maladie en dérégulant l'endocytose du LDL ?* Ces résultats questionnent également sur l'existence et le rôle d'une balance entre un mécanisme d'exocytose (dysferline) et d'endocytose (dab2) dans les dysferlinopathies. *Est-ce que l'absence de la dysferline est compensée par une augmentation de dab2 ? Ou au contraire, est-ce un déséquilibre de cette balance exocytose/endocytose, et du trafic vésiculaire associé, qui est impliqué dans la pathologie ?*

3. Caractériser le rôle de dab2 dans la physiopathologie de la LGMD R2

Dans ce contexte il semblerait intéressant d'aller étudier les conséquences des mutations de la dysferline sur la CME et, plus particulièrement, le rôle de dab2 dans la régulation de l'endocytose du LDLR et de l'homéostasie du cholestérol. Le but serait d'identifier les mécanismes physiopathologiques responsables de la dérégulation de l'homéostasie du cholestérol dans la LGMD R2 afin d'apporter de nouvelles opportunités thérapeutiques pour le traitement de cette maladie. Néanmoins la dissection des mécanismes par lesquels dab2 régule l'endocytose et l'absorption des lipides par les cellules musculaires, ainsi que l'étude des conséquences physiopathologiques de l'accumulation des lipides dans le LGMD R2 nécessitent une approche multidisciplinaire.

Pour répondre à ces questions, nous pourrions envisager d'analyser le rôle de dab2 *in vitro* par des expérimentations de gain et de perte de fonction qui permettront de relier cette protéine à la CME ou à tout autres phénotypes et mécanismes impliqués dans la LGMD R2. Pour cela, nous pourrions utiliser notre modèle de skMt dérivés de hiPSC LGMD R2 et contrôles afin de mesurer les conséquences d'une modulation de l'expression de dab2 sur (i) les phénotypes pathologiques déjà identifiés comme la PMR, l'organisation des tubules-t, les connexines, l'accumulation de gouttelettes lipidiques ; (ii) l'organisation des clathrines et la localisation du LDLR ; (iii) l'endocytose du LDL.

En parallèle, la transduction *in vivo* de muscles de souris Bla/J et saines à l'aide d'AAV exprimant un shRNA ou la séquence codante de dab2 permettrait d'établir le rôle fonctionnel de dab2 dans la physiopathologie de la LGMD R2. Les conséquences de la surexpression de dab2 dans

des souris contrôles pourraient être suivies par le nombre de fibres centronucléées, la quantification de la fibrose, de l'inflammation et de l'accumulation de lipides. Les expérimentations miroirs nous permettraient, quant à elles, d'évaluer si une diminution de *dab2* chez des souris Bla/J pré- et post- symptomatiques peut corriger les caractéristiques pathologiques de la LGMD R2. Par ailleurs, la surexpression de *dab2* dans des souris Bla/J démontreraient la capacité de *dab2* à exacerber la progression de la maladie. Les expérimentations *in vivo* permettraient également d'explorer les mécanismes moléculaires par lesquels l'absence de dysferline peut mener à une augmentation de *dab2*. En effet, nos résultats préliminaires ont montré que *dab2* est surexprimé au niveau transcriptionnel dans les skMt, les souris et les patients déficients en dysferline, ce qui suggère que la déficience en dysferline déclenche directement ou indirectement une cascade de régulation conduisant à la modulation de l'expression du gène. Nous pourrions donc envisager d'investiguer les facteurs susceptibles de jouer un rôle dans le contrôle transcriptionnel de *dab2*. Des études ont par exemple montré que, dans des contextes de cancer, la régulation transcriptionnelle de *dab2* est déterminée par la méthylation de son promoteur, l'acétylation des histones et par l'activité du facteur de transcription GATA6 (Zhou et al., 2005). De plus, des microARN spécifiques sont connus pour réguler l'expression de *dab2*, dont certains sont exprimés dans le muscle squelettique (Du et al., 2014; Lu et al., 2018; Mayorga and Penn, 2012).

CONCLUSION

Pour conclure, ces trois dernières années m'ont offert l'opportunité d'explorer le potentiel des CSP, notamment en appréhendant les aspects technologiques liés à leur production, en mettant en place des protocoles de différenciation et en évaluant la pertinence de ce modèle pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. En parallèle, à travers le développement d'un modèle pharmacologique, j'ai pu apercevoir le potentiel du repositionnement de médicaments pour les maladies rares avec l'identification du saracatinib et du bazédoxifène comme candidats médicament pour la LGMD R2. Plus généralement, grâce à l'ensemble de ces travaux, j'ai pu suivre un projet de recherche dans son ensemble : du développement d'un modèle d'étude et sa caractérisation, à l'identification d'une cible thérapeutique, jusqu'à la mise en place d'un test pharmacologique et l'identification de composés ayant un potentiel thérapeutique.

ANNEXES

Article 1

Publié en 2019, Scientific Reports

Identification of thiostrepton as a pharmacological approach to rescue misfolded alpha-sarcoglycan mutant proteins from degradation.

Hoch L^{1,2,3*}, Henriques SF^{4*}, Bruge C^{1,2,3}, Marsolier J⁴, Benabides M^{1,2,3}, Bourg N⁴, Tournois J^{1,2,3}, Mahé G^{1,2,3}, Morizur L^{1,2,3}, Jarrige M^{1,2,3}, Bigot A⁵, Richard I^{4*} and Nissan X^{1,2,3,*}

¹ CECS, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

² INSERM U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

³ UEVE U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

⁴ INTEGRARE, Genethon, Inserm, Université Evry, Université Paris-Saclay, 91002 Evry, France

⁵ Centre de Recherche en Myologie, Institut de Myologie, Inserm, Sorbonne Université, 75013 Paris, France

* These authors have contributed equally to this work.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of thiostrepton as a pharmacological approach to rescue misfolded alpha-sarcoglycan mutant proteins from degradation

Received: 19 October 2018
Accepted: 18 April 2019
Published online: 06 May 2019

Lucile Hoch^{1,2,3}, Sara F. Henriques⁴, Celine Bruge^{1,2,3}, Justine Marsolier⁴, Manon Benabides^{1,2,3}, Nathalie Bourg⁴, Johana Tournois^{1,2,3}, Gurvan Mahé^{1,2,3}, Lise Morizur^{1,2,3}, Margot Jarrige^{1,2,3}, Anne Bigot⁵, Isabelle Richard⁴ & Xavier Nissan^{1,2,3}

Limb-girdle muscular dystrophy type 2D (LGMD2D) is characterized by a progressive proximal muscle weakness. LGMD2D is caused by mutations in the gene encoding α -sarcoglycan (α -SG), a dystrophin-associated glycoprotein that plays a key role in the maintenance of sarcolemma integrity in striated muscles. We report here on the development of a new *in vitro* high-throughput screening assay that allows the monitoring of the proper localization of the most prevalent mutant form of α -SG (R77C substitution). Using this assay, we screened a library of 2560 FDA-approved drugs and bioactive compounds and identified thiostrepton, a cyclic antibiotic, as a potential drug to repurpose for LGMD2D treatment. Characterization of the thiostrepton effect revealed a positive impact on R77C- α -SG and other missense mutant protein localization (R34H, I124T, V247M) in fibroblasts overexpressing these proteins. Finally, further investigations of the molecular mechanisms of action of the compound revealed an inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome 24 h after thiostrepton treatment and a synergistic effect with bortezomib, an FDA-approved proteasome inhibitor. This study reports on the first *in vitro* model for LGMD2D that is compatible with high-throughput screening and proposes a new therapeutic option for LGMD2D caused by missense mutations of α -SG.

Limb Girdle Muscular Dystrophies (LGMD) are a heterogeneous group of muscular dystrophies sharing common clinical presentation of weakness affecting the shoulder and pelvic girdles¹. Within this group, sarcoglycanopathies are a subgroup caused by mutations in genes encoding the transmembrane protein sarcoglycan (SG) complex, located in the sarcolemma of striated muscles². Because the SG complex plays a key role in the maintenance of sarcolemma integrity during muscle contraction, mutations in these genes lead to muscular dysfunction³. Four SGs, namely, α -, β -, γ -, δ -SG, have been described to cause different subtypes of LGMD, LGMD2D⁴, LGMD2E^{5,6}, LGMD2C⁷, LGMD2F⁸, respectively. While the clinical features of these LGMDs are well described, the molecular mechanisms associated with sarcoglycanopathies remain poorly understood^{9,10}. Analyses of large cohorts of patients have revealed that hundreds of different missense or null mutations of these genes can lead to sarcoglycanopathies¹¹, with the most frequent type being the arginine-to-cysteine substitution at the 77th amino acid (R77C) in α -SG¹². This mutation leads to the production of a misfolded but still functional protein, recognized by the endoplasmic reticulum quality control (ERQC) system and degraded by the endoplasmic-reticulum-associated protein degradation (ERAD) pathway through the ubiquitin-proteasome system^{13,14}.

Although no treatment is currently available for LGMD2D, recent studies suggest that inhibition of the different steps in the endoplasmic reticulum (ER) degradation system could be effective in restoring mutated α -SG expression in the plasma membrane^{13–15}. Evidence in support of this strategy has been described by our group and others, as revealed by the positive impact of kifunensine when targeting mannosidase I activity^{13,15} or the use of

¹CECS, I-Stem, 91100, Corbeil-Essonnes, France. ²INSERM U861, I-Stem, 91100, Corbeil-Essonnes, France. ³UEF U861, I-Stem, 91100, Corbeil-Essonnes, France. ⁴INTEGRARE, Genethon, Inserm, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France. ⁵Institut de Myologie, INSERM U974, Sorbonne Université, Paris, France. Lucile Hoch, Sara F. Henriques, Xavier Nissan and Isabelle Richard contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.R. (email: richard@genethon.fr) or X.N. (email: xnissan@istem.fr)

the proteasome inhibitor MG132¹⁴. More recent studies on correctors of the misfolded $\Delta F508$ mutant protein in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have described their positive impact on α -SG missense mutant protein localization in the plasma membrane in primary muscle cells from patients¹⁶. Together, these studies provide strong evidence that targeting cellular quality control or degradation pathways are of interest to rescue missense mutations that cause LGMD2D and encourage further investigations in the search for new pharmacological molecules.

High-throughput screening (HTS) has been commonly used for decades to repurpose drugs with good safety profiles for new therapeutic applications¹⁷. Conversely, there are no reported cellular models for LGMD that are compatible with the robustness and reproducibility constraints imposed on this technique. In the current study, we generated and validated an R77C- α -SG mCherry fusion protein, leading to the development of a new *in vitro* cellular model for LGMD2D. Taking advantage of this model, we screened 2560 compounds, including 1280 off-patent small molecules, of which 95% are approved drugs, and 1280 annotated bio-active molecules, for their capacity to restore the expression of this α -SG mutant form in the plasma membrane. One of the compounds was validated on secondary tests on the R77C substitution as well as on additional SG mutations opening a new avenue toward treatment of LGMD2D patients.

Results

Validation of the α -SGmCh fusion construct and characterization of the R77C mutant cellular model.

In order to easily evaluate the membrane localization of the wildtype (WT) and R77C mutant α -SG in the heterologous condition, a system was generated that allowed the simultaneous identification of the positive cells for the exogenous protein and the quantification of the protein localization in the cell membrane compartment. A fusion protein was created, consisting of the coding sequence for human WT or R77C- α -SG fused with a mCherry (mCh) fluorescent reporter at the C-terminus. A flexible linker was inserted between the two coding sequences to avoid protein interference in protein maturation and folding. The constructs, hereafter termed WT- α -SGmCh and R77C- α -SGmCh, were placed under the transcriptional control of the cytomegalovirus (CMV) promoter and inserted into a lentivirus backbone (Supplementary Fig. 1A). Immortalized fibroblasts from a LGMD2D patient homozygous for R77C were used as cellular model for screening because of their absence of endogenous α -SG. WT- α -SGmCh lentivirus was transduced with a multiplicity of infection (MOI) of 20 in these cells and monitored by evaluating the mCh fluorescence signal (Fig. 1A,B, top panels). The integrity of the fused protein was confirmed by showing co-localization of the mCh signal (red) and α -SG, as detected with an α -SG antibody (NCL-L-a-SARC) directed against the extracellular domain of α -SG (green) in a permeabilized condition (Fig. 1B, top panels). Immunofluorescence (IF) staining was then performed with the same α -SG antibody in a non-permeabilized condition, indicating that the fused protein was properly located at the cell membrane even in the absence of the other sarcoglycans as it was previously observed on other cell types^{14,16}. A presence positive staining of α -SG was only detected in with mCh signal (Fig. 1B, bottom panels), confirming that the membrane protein revealed by IF was produced by the exogenous SGCA sequence.

The R77C- α -SGmCh fusion protein was characterized after validation of the WT- α -SGmCh construct. The choice of this particular mutation was based on the number of occurrences of patients affected with this mutation that were reported in the Leiden Muscular Dystrophy database (<http://www.dmd.nl>) and on previous studies demonstrating the rescue of the R77C protein using pharmacological treatments^{13-16,18}. Confocal analysis of α -SG IF revealed intracellular staining in the permeabilized condition (Fig. 1C, top panels) and no detectable membrane localization of the R77C mutant protein in the non-permeabilized condition (Fig. 1C, middle panels), indicating retention of the protein. Further investigations of α -SG subcellular localization, with staining of the ER based on the recognition of the KDEL signal sequence, confirmed the ER retention of the R77C mutant protein (Supplementary Fig. 1B). Finally, the relevance of the screening model was validated by showing the rescue of R77C α -SG localization in the plasma membrane, following a pharmacological proteasome inhibition with bortezomib (BTZ) at 30 nM (Fig. 1C, bottom panels).

High-content screening assay development and optimization. In order to quantify the level of α -SG in the plasma membrane through high-content imaging, a working cell bank of LGMD2D patient fibroblasts that had been previously stably transduced with the R77C- α -SGmCh lentivirus was prepared and the process for HTS was set up as outlined in Fig. 2A. All experiments were carried out in 384-well plates. Immunostaining was conducted under the non-permeabilized condition using the α -SG antibody, 24 h after treatment with either 0.1% DMSO as the negative control or 30 nM bortezomib as the positive control. Images were acquired using the automated imaging CellInsight CX7 HCS Platform. Masks and algorithms were developed with the HCS Reader software to define the nuclear (Hoechst), membrane α -SG and mCherry fluorescent signals (Supplementary Fig. 2A). Quantification of cells positive for α -SG membrane staining and the mCherry signal was then carried out for the negative and positive controls. Robustness of the assay was validated through calculation of a Z' factor of 0.78 in 5 independent plates, with 32 replicates of negative and positive controls in each plate (Supplementary Fig. 2B). Finally, dose response experiment using three known proteasome inhibitors, bortezomib, carfilzomib (CFZ) and MG132 was performed (Fig. 2B,C), confirming a dose dependent effect of these drugs on R77C α -SG rescue. Quantification of α -SG staining indicated that among these three drugs, the most efficient treatment was bortezomib, inducing a rescue of the membrane staining with an EC_{50} of 15 nM and reaching maximum efficacy at 30 nM. Carfilzomib and MG132 were also potent drugs for R77C- α -SG mutant rescue, with an EC_{50} of 21 nM and 222 nM, respectively (Fig. 2C). The effect of these drugs on cell viability was then measured by counting the number of cells 24 h after treatment, showing a decrease of 30% to 40% of cells as detected by Hoechst at doses corresponding to the EC_{50} for the three inhibitors (Fig. 2D).

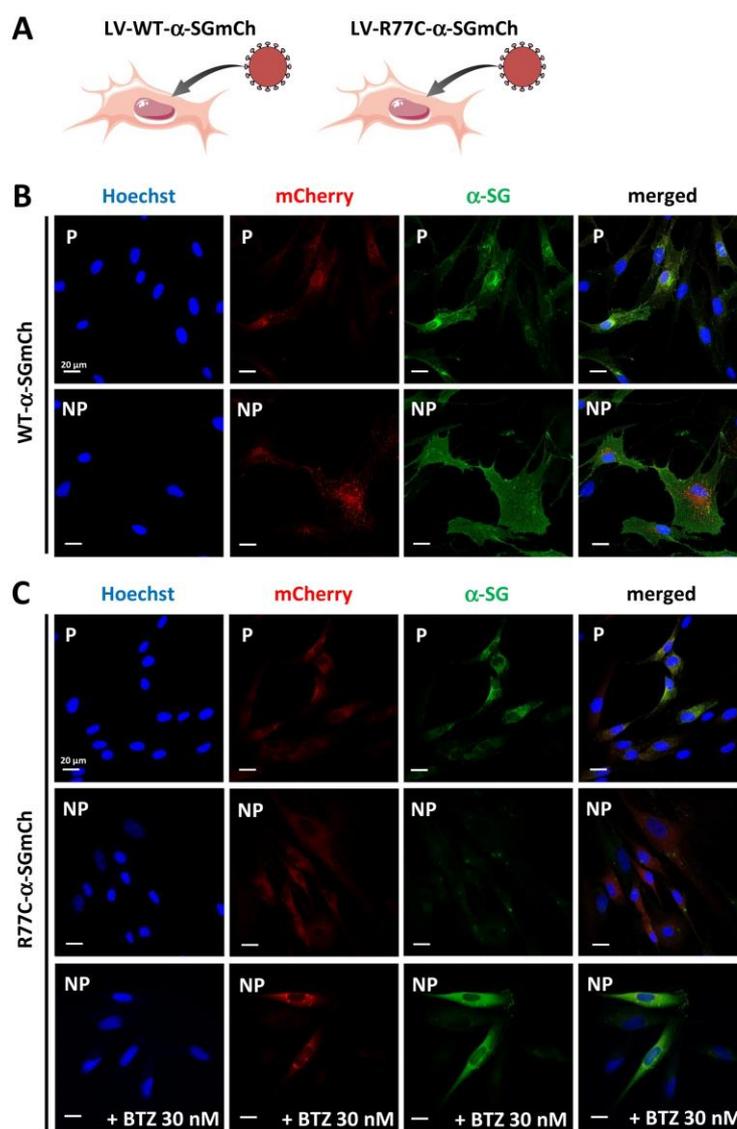


Figure 1. Characterization of α -sarcoglycan WT and R77C fusion constructs and effect of bortezomib treatment. (A) Schematic representation of the cellular models showing that immortalized fibroblasts from a LGMD2D patient carrying the R77C homozygous mutation were transduced with lentivirus expressing WT- α -SGmCh or R77C- α -SGmCh constructs. (B) Confocal images of mCherry signal (red) and α -SG (green) detected by immunofluorescence in fibroblasts transduced with the lentivirus expressing WT- α -SGmCh under permeabilized (P) and non-permeabilized condition (NP). (C) Confocal images of mCherry signal (red) and α -SG (green) detected by immunofluorescence in fibroblasts transduced with the lentivirus expressing R77C- α -SGmCh under permeabilized (P) and non-permeabilized condition (NP) and following bortezomib (BTZ) treatment at 30 nM. Nuclei are labelled by Hoechst staining (blue). Scale bar = 20 μ m.

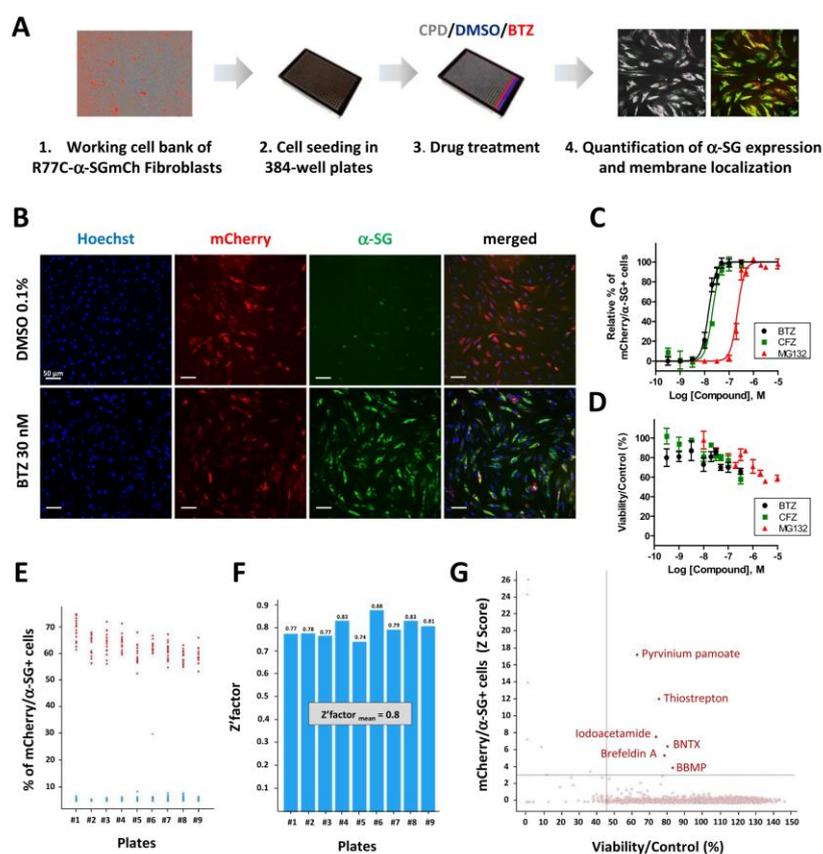


Figure 2. High-content screening for R77C- α -SGmCh membrane rescue expression in 384 well plates. (A) Workflow for the high-content screening of R77C- α -SGmCh membrane rescue expression in 384 well plates. CPD = tested compounds. (B) mCherry fluorescent signal (red) and α -SG staining (green) in non permeabilized condition in fibroblasts overexpressing R77C- α -SGmCh treated with 0.1% DMSO and 30 nM bortezomib. Nuclei are labelled by Hoechst staining (blue). Scale bar = 50 μ m. (C,D) Quantification of mCherry and membrane α -SG positive fibroblasts (C) and cell viability (D) following treatment with increasing concentrations of three proteasome inhibitors; bortezomib (black), carfilzomib (green) and MG132 (red). Values are expressed as percentage of the maximal response induced by bortezomib (C) or as percentage of the response induced by 0.1% DMSO (D) and each point represents the mean \pm SD of four replicates. (E) High-throughput screening validation for the R77C- α -SGmCh membrane rescue in fibroblasts treated with the negative control, 0.1% DMSO, and the positive control, 30 nM bortezomib, in each of the 384-well plates of the screening. (F) Determination of the Z' factor for each in each of the 384-well plates of the screening. (G) Primary screen cell-based assay for R77C- α -SGmCh membrane rescue. Dot plot representation of the effects of the 2560 drugs on R77C- α -SGmCh membrane expression (Z score $>$ 3) and cell viability (Viability $>$ 45%); thiostrepton = THSP; bortezomib = BTZ, carfilzomib = CFZ.

Identification of a new inhibitor of misfolded R77C- α -SG protein degradation using high-throughput screening. HTS was then performed with the aim of finding new compounds capable of the membrane localization of R77C- α -SGmCh, with potentially lower toxicity than the 3 proteasome inhibitors that had been tested. A total of 2560 compounds, comprising 1280 bio-active compounds from the Library of Pharmacologically Active Compounds (LOPAC) and 1280 approved drugs from Prestwick Chemical library, were tested at 5 μ M. Screening quality was ensured by a statistically relevant difference between the negative and positive controls, giving a mean Z' factor of 0.8 (Fig. 2E,F). Compounds were considered as potential candidates when their effect was superior to three standard deviations from the mean for all the tested compounds, without affecting cell viability by more than 55%. This led to an initial list of six hits, thiostrepton (THSP), idoacetamide, 7-benzylidenaltraxone

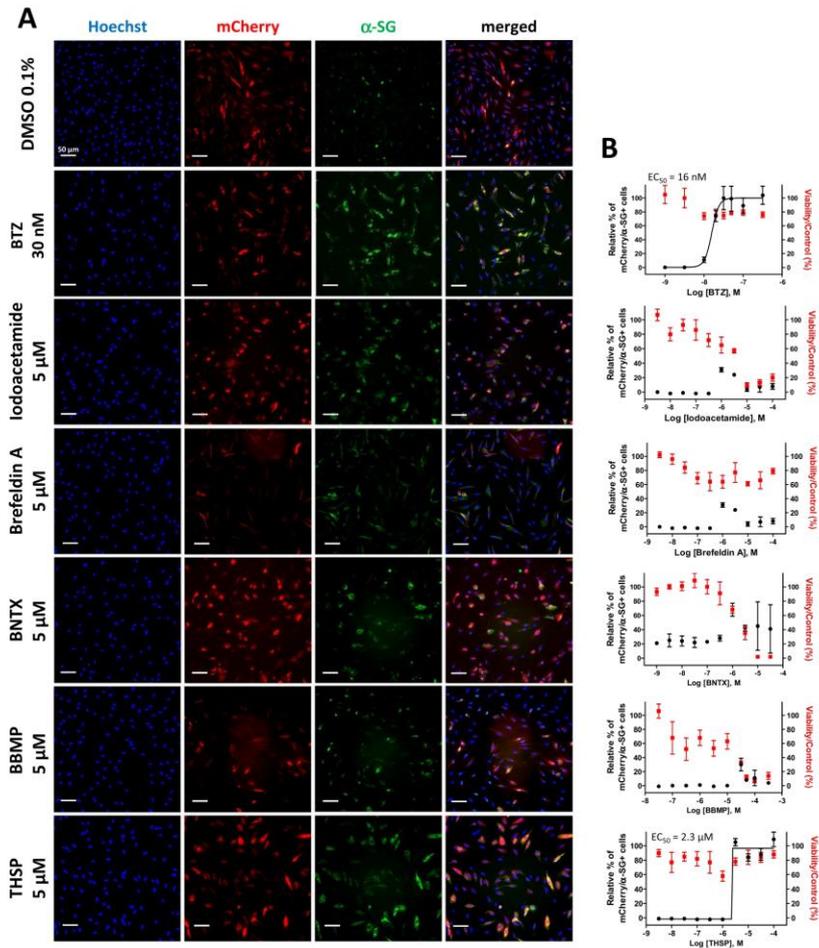


Figure 3. Effect of the five identified compounds on membrane localization of R77C α -SG protein. (A) mCherry fluorescent signal (in red) and α -SG staining (in green) in non permeabilized condition in fibroblasts overexpressing R77C- α -SGmCh treated with 0.1% DMSO, bortezomib 30 nM and the five drugs identified at the dose of 5 μ M (iodoacetamide, brefeldin A, BNTX, BBMP and thiostrepton). Nuclei are labelled by Hoechst staining (blue). Scale bar = 50 μ m. (B) Quantification of mCherry and membrane α -SG positive cells and cell viability following treatment with increasing concentrations of bortezomib, iodoacetamide, brefeldin A, BNTX, BBMP and thiostrepton. Values are expressed as the percentage of the maximal response induced by bortezomib and each point represents the mean \pm SD of four replicates; thiostrepton = THSP; bortezomib = BTZ.

(BNTX), brefeldin A, 5-benzylsulfonyl-4-bromo-2-methylpyridazin-3-one (BBMP) (Fig. 2G and Supplementary Table 1) and pyrvinium pamoate, the latter being discarded because of artefactual fluorescence (Supplementary Fig. 3). Retest experiments were conducted with increasing concentrations from the nanomolar to micromolar range for the five primary hits (Fig. 3). Of these, only THSP, a natural cyclic oligopeptide antibiotic approved in veterinary medicine for the topical treatment of dermatologic infections, was validated as an hit of interest, with an EC₅₀ of 2.3 μ M and a toxicity of only 20%. Of note, THSP induced a steep dose-response curve, with a threshold dose of 1 μ M and maximum effect at 3 μ M.

Characterization of thiostrepton's mode of action. In order to determine whether the effect of THSP on R77C- α -SG mutant protein is transcriptional or post-transcriptional in origin, the *SGCA* gene expression was evaluated after THSP (3 μ M) treatment, using bortezomib (30 nM) and MG132 (1 μ M) (Fig. 4A). No significant

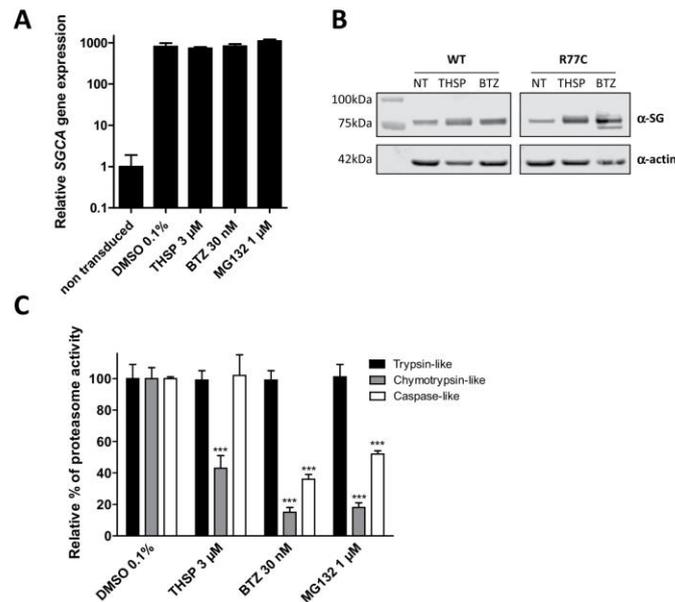


Figure 4. Mechanism of action of Thiostrepton. (A) Measure of *SGCA* gene expression by qPCR in fibroblasts overexpressing R77C- α -SGmCh and treated with 0.1% DMSO, 3 μ M thiostrepton, 30 nM bortezomib or 1 μ M MG132 for 24 hours. Data are normalized to non-transduced fibroblasts. (B) Grouping of western blots analysis of α -SG and α -actin expression in non-treated (NT) fibroblasts overexpressing WT- and R77C- α -SGmCh or treated with thiostrepton (THSP, 3 μ M) or bortezomib (BTZ, 30 nM) for 24 hours. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. 4. (C) Quantification of trypsin-like, chymotrypsin-like and caspase-like activities of the proteasome in fibroblasts overexpressing R77C- α -SGmCh treated for 24 h with 0.1% DMSO, 3 μ M thiostrepton, 30 nM bortezomib or 1 μ M MG132. Values are expressed as the percentage of the response relative to 0.1% DMSO and each point represents the mean \pm SD of four replicates.

difference was observed following these treatments in comparison to 0.1% DMSO, indicating no transcriptional change in the *SGCA* gene after treatment. α -SG protein levels were then investigated after THSP (3 μ M) or bortezomib (30 nM) treatment by immunoblot analysis (Fig. 4B and Supplementary Fig. 4). Increased α -SG protein levels were detected in fibroblasts overexpressing WT- and R77C- α -SGmCh after THSP and bortezomib treatment. This analysis showed also the presence of an additional and lower band in cells treated with BTZ. An enzymatic treatment removing N-linked oligosaccharides indicated that this additional band corresponds to a non-glycosylated form of α -SG, indicating that the BTZ treatment leads to a certain level of immature α -SG, an event which is not seen with THSP (Supplementary Fig. 5). Interestingly, THSP has been previously identified as an inhibitor of FOXM1 protein expression through a proteasome-dependent mechanism¹⁹ and has been reported to interact covalently with the regulatory particle of triple-ATPase (Rpt) subunits in the 19S proteasome²⁰. We therefore evaluated the different proteasomal activities after treatment with THSP. At the 3 μ M concentration, THSP partially inhibited the chymotrypsin-like activity of the proteasome, while bortezomib (30 nM) and MG132 (1 μ M) blocked both the chymotrypsin-like and caspase-like activities, suggesting a different mode of action for these compounds on the proteasome (Fig. 4C).

We then conducted an RNA-seq analysis using the Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression core panel to characterize the transcriptomic changes that occur after treatment with 3 μ M THSP, 30 nM bortezomib and 1 μ M MG132, when compared with 0.1% DMSO. We generated an average of 11 million pairs of reads per sample. RNA-seq-based gene expression levels were calculated from reads per million (RPM) values. The principal component analysis (PCA) revealed a clear separation between untreated and treated samples. In addition, treatments with 30 nM bortezomib and 1 μ M MG132 were grouped in the same cluster, suggesting a common transcriptome signature for these two drugs (Fig. 5A). An unsupervised hierarchical clustering was performed to assess similarities and changes in global gene expression profiles between the different treatments, again indicating the similarity between 30 nM bortezomib and 1 μ M MG132 (Fig. 5B) and showing that THSP is closer to these treatments than to the DMSO condition. Statistical differential expression analysis comparing 0.1% DMSO and 3 μ M THSP (false discovery rate (FDR) < 0.01) revealed that 3159 genes were significantly differentially expressed, with 1577 genes being up-regulated and 1582 genes down-regulated. Among these 3159 genes, 2228 were modulated by all the treatments, suggesting common consequences of these drugs (Fig. 5C).

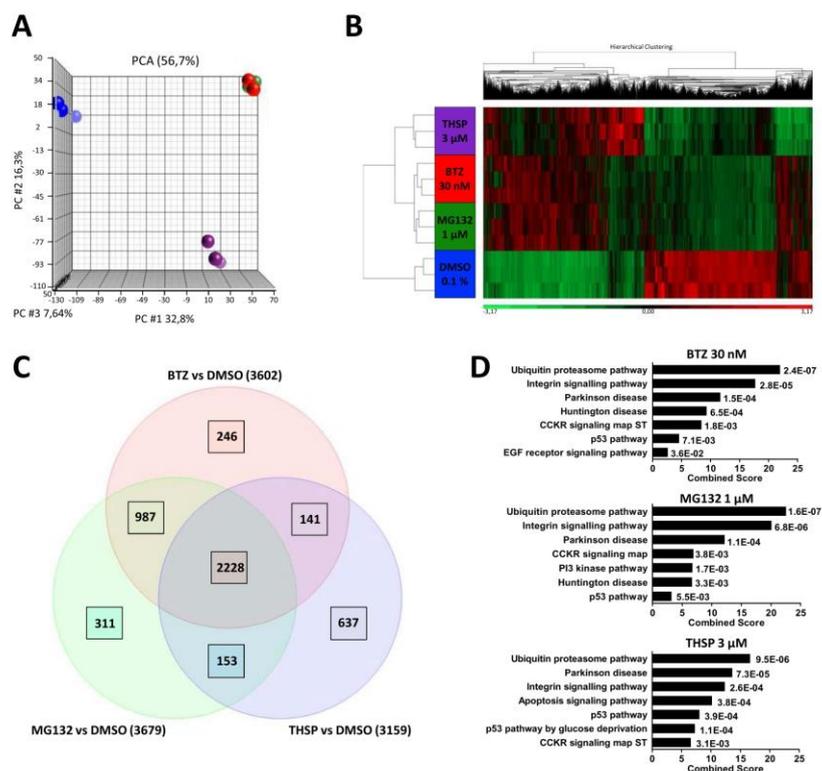


Figure 5. Transcriptomic analysis. (A) The PCA graph of global gene expression data computed using Partek Genomic Suite and Partek Flow. 0.1% DMSO samples are shown as blue spheres; 3 μM thiostrepton samples in purple; 30 nM bortezomib samples in red and 1 μM MG132 samples in green. (B) Hierarchical clustering and heat map of significantly expressed genes in thiostrepton 3 μM vs 0.1% DMSO using RNA sequencing in fibroblasts overexpressing R77C-α-SGmCh. Color coding from green to red depicts gene expression differences between treatments from low to high expression, respectively. (C) Venn diagram illustrating the number of shared genes modulated in fibroblasts overexpressing R77C-α-SGmCh after 24 h of treatment with 0.1% DMSO, 3 μM thiostrepton, 30 nM bortezomib or 1 μM MG132. (D) Functional enrichment analysis of up-regulated genes in fibroblasts overexpressing R77C-α-SGmCh after 24 h of treatment with 30 nM bortezomib, 3 μM thiostrepton or 1 μM MG132 vs 0.1% DMSO. Analysis has been performed with the Panther pathway database. Values are expressed as combined scores and p-values are indicated; thiostrepton = THSP; bortezomib = BTZ.

Moreover, Panther pathway analysis using the Enrichr web interface suggested that these three different treatments were commonly enriched for major signaling pathways, the main one being the ubiquitin-proteasome pathway (Fig. 5D) as expected. Nevertheless, this analysis revealed that 637 genes were specifically modulated by 3 μM THSP for which Panther analysis revealed an enrichment of angiogenesis and p53 pathways in accordance with previous reports^{21,22} (Fig. 5C,D).

Combinatorial effect of thiostrepton and bortezomib on R77C-α-SGmCh membrane rescue.

Since THSP and bortezomib had different effects on both proteasome activities and cell transcriptome, there was a potential interest in combining them for potentiation. We measured the chymotrypsin-like activity of the proteasome with increasing concentrations of THSP in the presence of 3 nM, 5 nM or 15 nM bortezomib in one hand and with increasing concentrations of bortezomib in the presence of 300 nM, 1 μM or 1.5 μM THSP in the other hand. Analysis of the dose-response curves revealed a higher inhibition of the chymotrypsin-like activity induced by THSP when combined with bortezomib than with the two drugs used alone (Fig. 6A,B). Quantification of the number of cells with membrane localization of this protein was carried out in the presence of increasing doses of these two drugs, either alone or in combination, to determine whether or not THSP and bortezomib might act synergistically on R77C-α-SG mutant rescue. Analysis of the dose-response curves revealed a shift to the left when the drugs are combined, in comparison to the individual drugs alone (Fig. 6C,D). Analysis of this set of

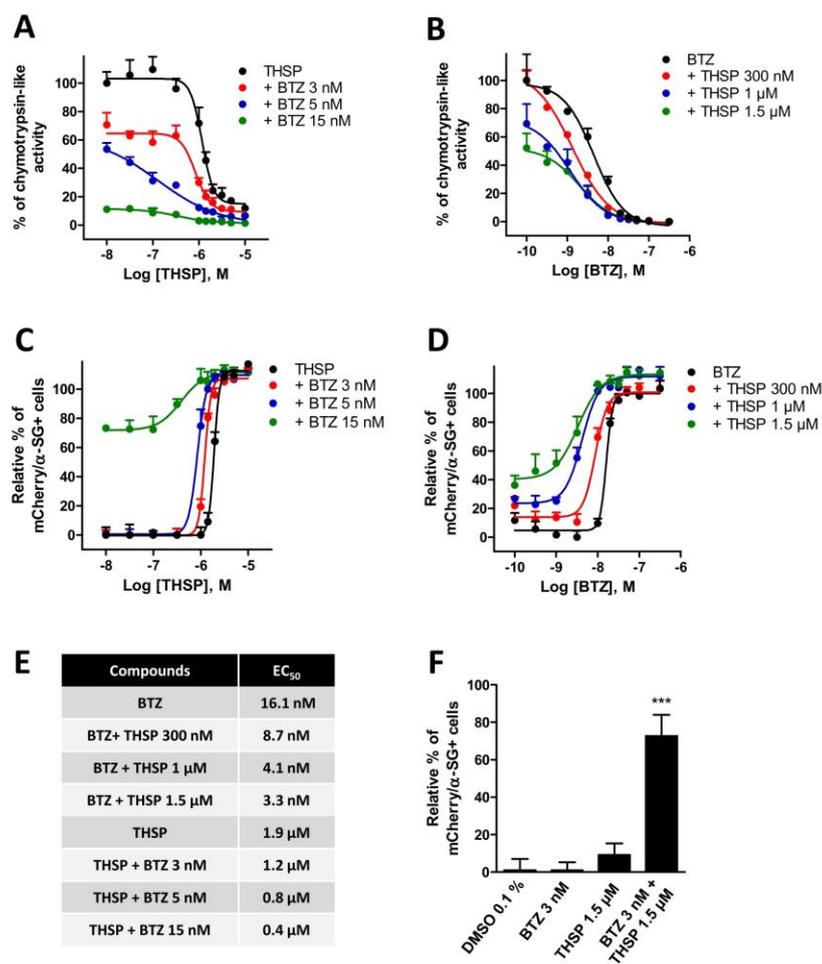


Figure 6. Synergistic effects of thiostrepton and bortezomib. Quantification of chymotrypsin-like activity of the proteasome (A,B) or mCherry and membrane α -SG expression (C,D) in fibroblasts overexpressing R77C- α -SGmCh. Cells were treated for 24 h with increasing concentration of thiostrepton in the presence of 3 nM, 5 nM or 15 nM bortezomib (A,C) or with increasing concentrations of bortezomib in the presence of 300 nM, 1 μ M or 1.5 μ M thiostrepton (B,D). Values are expressed as percentage of the response induced by 0.1% DMSO (A,B) or as percentage of the maximal response induced by bortezomib (C,D) and each point represents the mean \pm SD of four replicates. (E) EC₅₀ of thiostrepton, bortezomib and combination treatments on membrane α -SGmCh membrane rescue. (F) Quantification of mCherry and membrane α -SG positive cells after 0.1% DMSO, 1.5 μ M thiostrepton, 3 nM bortezomib and combination treatments. *** $p \leq 0.001$; thiostrepton = THSP; bortezomib = BTZ.

experiments revealed a decrease in the EC₅₀ obtained following drug combination treatments (3.3 nM and 0.4 μ M, respectively), as compared to the individual drugs alone, i.e., 16.1 nM bortezomib and 1.9 μ M THSP (Fig. 6E). Finally, this synergistic effect on R77C- α -SGmCh mutant protein rescue was confirmed by combining low doses of bortezomib (3 nM) and THSP (1.5 μ M), showing a significantly higher effect of this combination than with the two drugs alone (Fig. 6F). Overall, these results provide evidence of a synergistic effect of THSP and bortezomib on R77C- α -SGmCh mutant protein rescue from proteasomal degradation.

Rescue of the R77C- α -SG mutant in iPSC-derived myoblasts following thiostrepton treatment. The efficacy of THSP in rescuing the R77C- α -SGmCh mutant protein was assessed on muscular cells to confirm

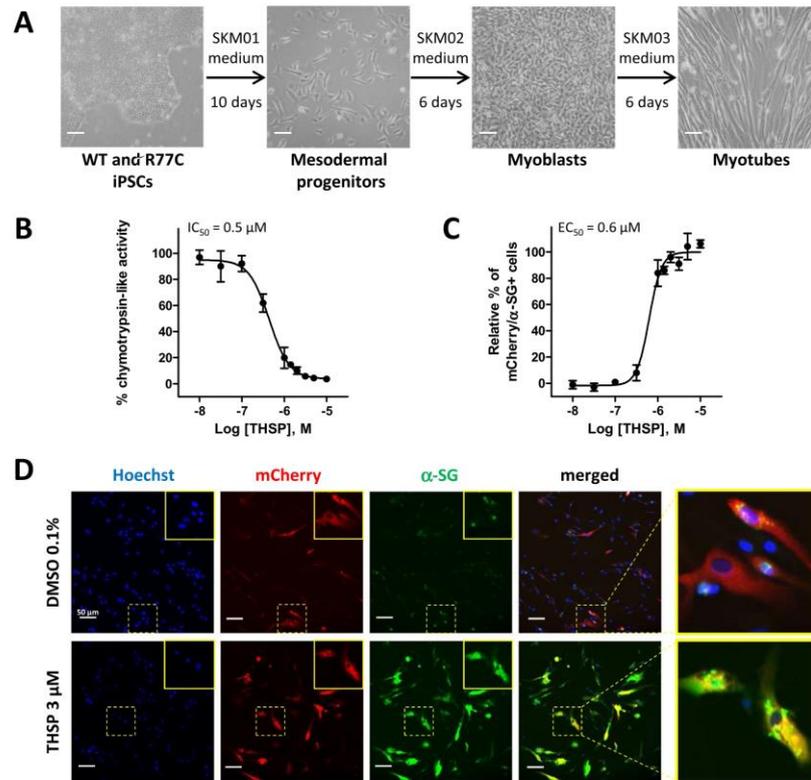


Figure 7. Thiostrepton effect on the rescue of R77C- α -SGmCh protein in iPSC-derived myoblasts. (A) Differentiation of iPSCs into myoblasts following a 3-step protocol of differentiation. iPSC-derived myoblasts were transduced with the lentivirus overexpressing R77C- α -SGmCh and treated for 24 h with increasing concentrations of thiostrepton or negative and positive controls (0.1% DMSO and 30 nM bortezomib, respectively). (B) Quantification of the chymotrypsin-like activity of the proteasome following thiostrepton 3 μ M treatment. Values are expressed as the percentage of the response induced by DMSO (0.1%) (C) Quantification of mCherry and membrane α -SG positive cells after thiostrepton 3 μ M treatment. Values are expressed as percentage of the maximal response induced by bortezomib. (D) Images of mCherry fluorescent signal (red), membrane α -SG (green) and Hoechst staining (blue) in iPSC-derived myoblasts treated with 0.1% DMSO or thiostrepton 3 μ M in non-permeabilized condition. Outsets represent higher magnification images. Scale bar = 50 μ m; thiostrepton = THSP; bortezomib = BTZ.

the data collected on the fibroblast cellular model. To do so, WT and LGMD2D patient fibroblasts were reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) as no primary myoblasts carrying the homozygous R77C mutation were available. Following a full quality control of their pluripotency capacities, as revealed by the expression of OCT4, NANOG, SSEA4, TRA160 by IF or SSEA3, TRA181, based on flow cytometry and a high activity of alkaline phosphatase (Supplementary Fig. 6A–C), iPSCs were then differentiated into myoblasts and myotubes using a 3-step protocol of differentiation (Fig. 7A). Myoblasts and myotubes obtained using this protocol were characterized by monitoring the expression of the two myogenic markers, MyoD and MF20 (Supplementary Fig. 6D,E). While qPCR revealed high expression of *SGCA* mRNA (Supplementary Fig. 6F), the endogenous protein was not detected by IF, preventing its use for investigating the effect of THSP (Supplementary Fig. 6D,E). Myoblasts derived from LGMD2D patient iPSCs were therefore transduced with the lentivirus overexpressing R77C- α -SGmCh to evaluate the effect of THSP on muscular cells. Quantification of chymotrypsin-like activity in these cells revealed a dose-dependent effect of THSP, with an IC_{50} of 0.5 μ M (Fig. 7B). Similarly, analysis of R77C- α -SGmCh protein localization revealed a rescue of this protein in the plasma membrane, with an EC_{50} of 0.6 μ M (Fig. 7C,D).

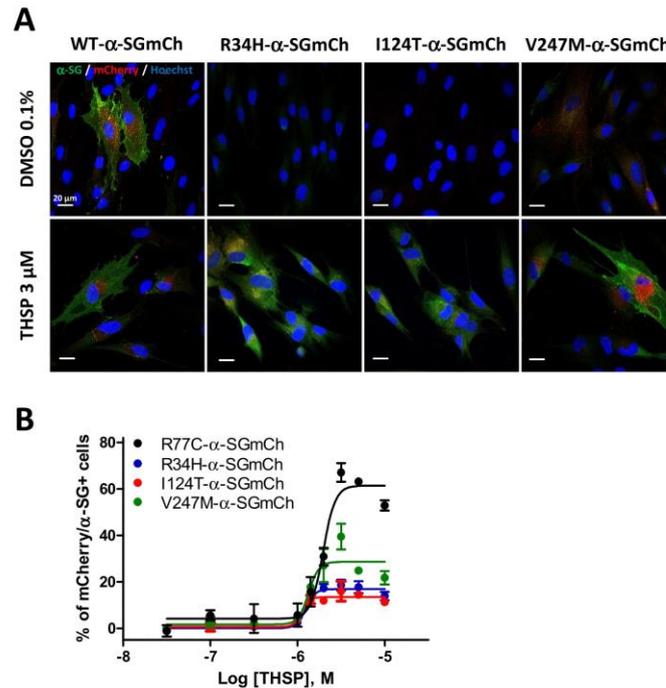


Figure 8. Evaluation of thiostrepton treatment on other missense α -SG mutants. Immortalized fibroblasts were transduced with lentivirus expressing WT-, R34H-, I124T- or V247M- α -SGmCh constructs and treated for 24 h with 0.1% DMSO or increasing concentrations of thiostrepton. The membrane α -SG expression was monitored by IF under non-permeabilized condition. (A) Confocal images of mCherry fluorescent signal (red), membrane α -SG (green) and Hoechst staining (blue) after 0.1% DMSO or THSP 3 μ M treatments. Scale bar is 20 μ m. (B) Quantification of mCherry and membrane α -SG positive cells following treatment with increasing concentrations of Thiostrepton. Values are expressed as percentage of mCherry and α -SG positive cells; thiostrepton = THSP; bortezomib = BTZ.

Rescue of different α -SG mutants through thiostrepton treatment. We then evaluated the effect of THSP on the rescue of other missense α -SG mutants. We selected three mutations with severe phenotypes (R34H, I124T and V247M) that are among the most frequent mutations in *SGCA* encoding for misfolded proteins that are not rescuable by kifunensine¹⁵. Lentiviruses expressing the R34H, I124T and V247M α -SGmCh mutants were generated following the same experimental strategy employed for the R77C mutant and were used to transduce the immortalized R77C patient fibroblasts. Confocal immunofluorescence analysis in non-permeabilized condition revealed the absence of detectable α -SG staining in the membrane compartment in all the mutant transduced cells (Fig. 8A, top panels). Analysis of R34H, I124T and V247M- α -SGmCh protein localization was then evaluated following treatment with 3 μ M THSP and showed the rescued localization of the three mutant proteins at the membrane level (Fig. 8A, bottom panels). Finally, analysis of the dose-response curves revealed a similar effect of THSP, with an EC_{50} of 1.4 μ M, on R77C, I124T, R34H and V247M α -SGmCh mutant proteins, but different maximum efficacies ranging between 15% and 60% of rescued cells (Fig. 8B).

Discussion

In the current study, we established a HTS method that can be used to identify candidate molecules able to rescue α -SG mutant proteins from ER-retention and early degradation. Thanks to this platform, we identified THSP as a candidate compound to be explored as a new therapeutic molecule for the treatment of LGMD2D patients affected by missense mutations. Beyond the effect on proteasomal degradation of this specific compound, our results shed a new light on an experimental paradigm suitable for the treatment of other genetic conditions associated to missense mutations.

The rescue of ER-retained and prematurely degraded sarcoglycan mutant proteins has been previously demonstrated using pharmacological compounds^{13–16,18}. Most of the compounds used on these studies were specifically chosen for their ability to target key players of the ERQC and ERAD pathways, the mechanisms involved in the active degradation of mutant proteins, or to rescue other misfolded proteins such as in the case of CFTR

correctors¹⁶. Even though specific mechanisms can be involved in the recognition of the misfolding structure of each disease-causing protein, the above mentioned studies demonstrates that some common features make possible to repurpose drugs from one to the other disease²³. Here, we performed a drug screening on the most frequent LGMD2D causing mutation (p.R77C) as a platform to identify drugs that would also benefit other misfolding diseases. As designed, our screening procedure allowed simultaneous testing for hundreds of possible repurposable drugs and bioactive compounds able to rescue the R77C α -SG mutant protein to the cell membrane compartment. α -SG is expressed in mature skeletal muscle fibers. To overcome the current inability to attain suitable muscle cellular models has hindered the use of endogenous mutant expression for drug identification, we have introduced a heterologous stable overexpression system in skin cells. Using this cellular model, as a proof of concept, we identified a promising new lead compound, THSP, for the rescue of ER-retained α -SG R77C mutant protein that was later confirmed to rescue other patient-derived mutant proteins, reinforcing the rationale to use the R77C mutation as point of entry.

THSP is a natural antibiotic produced by microorganisms in the genus *Streptomyces* discovered in 1955^{24–26}. It is mainly used as an anti-parasitic veterinary product. Over the past decade, several studies have highlighted a new potential use in humans, based on its apoptotic effect on cancer cells^{27,28}, alone or in combination with bortezomib²⁹. Interestingly, normal cells were shown to be resistant to THSP-induced apoptosis through expression of WT p53 protein^{21,27}, suggesting that its application in healthy tissues might be a safe strategy. Furthermore, THSP was recently proposed as a less toxic alternative to bortezomib for topical treatment for Psoriasis-like inflammation caused by TLR9 through, in particular, the attenuation of proteasomal degradation³⁰. More recently, cell-based HTS has identified THSP as a regulator of Drosophila inhibitor of apoptosis protein 1 (DIAP1) degradation through direct and irreversible inhibition of the 19S proteasome subunit²⁰. Interestingly, our study is in line with these results as we demonstrated a robust effect of THSP on α -SG mutant degradation and proteasome activity, with an EC₅₀ of 2.3 μ M and 1.9 μ M, respectively, both in the same range as in the DIAP1 study (EC₅₀ of 4.9 μ M). Our results also highlight the value of pharmacological action on proteasome activity to rescue misfolded α -SG proteins from degradation, as originally described for MG132^{13,14}. Within the class of proteasome inhibitors, bortezomib has been described as one the most potent treatment, leading to its approval by the US FDA for the treatment of patients with relapsed refractory multiple myeloma³¹. Even though our study demonstrates that bortezomib treatment can efficiently rescue R77C- α -SGmCh protein degradation, overall, it reports that the combination of bortezomib and THSP significantly increases the effect of the treatment on the proteasome activity and the α -SG rescue.

While our overall results describe a potential new class of drug for the treatment of LGMD2D, further preclinical and clinical investigations are required before evaluating its efficacy in patients. Firstly, this is because THSP is a veterinarian drug with no human toxicology reports, requiring several complementary investigations in animal models in order to safeguard human administration. Secondly, THSP is mainly used through topical administration, requiring optimization of its administration route by, for example, using nanoparticles to target muscles and limit potential off-target side effects³². Even though clinical treatment may be some way off, our results describe a method for the identification of new treatments for hundreds of diseases involving misfolded proteins and hope for LGMD2D patients who remain without curative treatment.

Materials and Methods

Plasmid cloning and mutagenesis. The sarcoglycan fusion protein was designed based on the human *SGCA* consensus coding sequence (CCDS) found in the NCBI portal (Gene ID: 6442, CCDS number 45729.1) and the mCherry sequence: The linker, in the amino-acid form of -GGGGS-, was chosen as a flexible type linker that also increased stability/folding of the fusion proteins³³. The fusion protein nucleotide sequence was synthesized by Genecust and cloned in a vector plasmid prepared for lentivirus production. The final construct, termed α -SGmCh, was driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter. The R34H, R77C, I124T and V247M mutations were generated based on the 100GT > AC, 229C > T, 371T > C and 739G > A nucleotide changes of *SGCA* gene, respectively. Mutagenesis was performed using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (200516, Agilent) according to manufacturer's instructions. The primers used to introduce the R34H, R77C, I124T and V247M mutations are listed in Supplementary Table 2.

Cell Culture, transduction and pharmacological treatments. The R77C fibroblasts used in this study were isolated from a patient biopsy obtained by the Genethon's Cell Bank. Informed consents were obtained from the parents of the patient included in this study, complying with the ethical guidelines of the institutions involved and with the legislation requirements of the country of origin. Fibroblasts were transduced with a pBabe-puro-based retroviral vector containing sequence encoding the catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and then selected in the presence of puromycin (1 mg/ml) for 10 days, as previously described³⁴. Experimental protocols were approved by the french minister of research: AC-2013-1868. Fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium + GlutaMAX (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (research grade, Sigma-Aldrich) and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen). For over-expression of the WT or mutated α -SG, immortalized fibroblasts were transduced with a lentiviral vector expressing human WT-, R77C-, R34H-, I124T- or V247M- α -SGmCh with a multiplicity of infection (MOI) of 20 in the presence of 4 μ g/ml of polybrene (Sigma-Aldrich). Cells were seeded on plates coated with 50 μ g/ml of collagen I and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Twenty-four hours after seeding, cells were treated with 30 nM of bortezomib (Selleckchem) or the carrier 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO, VWR). Cells were analyzed after 24 hours of treatment.

Pluripotent stem cell culture and differentiation. The R77C fibroblasts were reprogrammed to iPSCs using Yamanaka's original method with OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc, transferred using retroviral vectors³⁵.

WT and R77C iPSCs were grown in colonies on matrigel (Corning), seeded at 5000 cells/cm² and cultured in iPS-Brew XF medium (Macs, Milteny Biotech). iPSCs were differentiated into myoblasts following a protocol developed by GeneabioCell® (Caron *et al.*, 2016). Briefly, iPSCs were seeded at 3,500 cell/cm² in 6-well plates coated with collagen I and maintained in SKM01 medium (AMSBIO) for 10 days with a passage at day 7. Medium was then switched to SKM02 medium (AMSBIO) until freezing of the myoblasts at day 16. For overexpression of the WT or mutated α -SG, iPSC-derived myoblasts were transduced with a lentiviral vector expressing human WT or R77C- α -SGmCh with a multiplicity of infection (MOI) of 43 in the presence of 4 μ g/ml of polybrene (Sigma-Aldrich).

High throughput screening. The high-throughput screening was conducted on Biocell 1800 (Agilent). For this, 1600 R77C- α -SGmCh fibroblasts were seeded in 38 μ l of culture medium into black 384-well clear bottom plates. Twenty-four hours after seeding, 2 μ l of compounds from the chemical libraries were transferred in monoplicate into cell assay plates. In each plate, negative control (0.1% DMSO) and positive control (30 nM bortezomib) were added in columns 1–23 and 2–24, respectively. Plates were then incubated for 24 hours and processed for α -SG detection assay. Each of the 9 plates of the screening were fixed and stained with the specific anti- α -SG antibody using the optimized protocol under non-permeabilized condition. To prevent the discovery of toxic molecules, the number of cells was monitored in parallel by counting Hoechst stained cells per field and candidates showing mortality superior to 55% were excluded.

α -SG localization cell-based assay. After 24 hours of drug treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (10 min, room temperature). Immunocytochemistry was performed in a phosphate-buffered saline (PBS) solution supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma) for blocking (1 hour, room temperature) and with a mouse anti- α -SG (NCL-L-a-SARC, Novocastra, Leica) for primary hybridization step (overnight, 4 °C). Cells were stained with a fluorophore-conjugated secondary anti-mouse antibody (Invitrogen; 1 hour, room temperature) and nuclei were visualized with Hoechst 33342 (Invitrogen). α -SG localization was analyzed with a CellInsight CX7 HCS Platform (Cellomics Inc). The first channel was used for nuclei identification, the second one for membrane α -SG staining identification and the third one for mCherry tag identification. Pictures were acquired with a 10x objective in high-resolution camera mode and were analyzed using the colocalization bioapplication quantifying positive cells for membrane α -SG staining and mCherry tag expression.

Chemical library. The chemical libraries were obtained from Prestwick Chemical and Sigma-Aldrich for the LOPAC and distributed in 384 well plate format. The Prestwick Chemical library contains 1280 FDA approved drugs and the LOPAC library contains a collection of 1280 pharmacologically active compounds. Both libraries were tested at 5 μ M.

Data analysis. Data analysis of the screening was performed using a customized Hiscreen application (Discngine) connected to Spotfire software (Tibco Software Inc.). The robustness of the assay was evaluated by calculating for each plate the Z' factor on the percentage of mCherry/ α -SG positive cells parameter as follows $Z' = 1 - [3(SDP + SDN)/(MP - MN)]$ where MP and MN correspond to the means of the positive (30 nM bortezomib) and negative (0.1% DMSO) controls, respectively, and SDP and SDN correspond to their S.D. Raw data related to the percentage of mCherry/ α -SG positive cells were normalized to the mean of positive and negative controls, which are defined as 100% and 0%, respectively. Raw data related to cell number per field were normalized to the mean of negative controls. Hit selection was performed using in parallel the number of standard deviations from the mean for each readout value (Z-score) calculated per plate individually or per run where all plate data were pooled. Only hits whose Z-score plate and/or Z-score run was ≥ 3 and that did not decrease cell number by more than 55% compared to 0.1% DMSO condition were selected for subsequent validation step. Hits were then tested at gradual concentrations (1 nM–100 μ M) for parallel exploration of their efficacy and toxicity.

Quantitative PCR. Total RNAs were isolated using the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. A DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA levels and quality were checked using the NanoDrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the SuperScript III reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis was performed using a QuantStudio 12 K Flex real-time PCR system (Applied biosystem) and Luminaris Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific), following the manufacturers' instructions. α -SG expression analysis was performed using the TaqMan gene expression Master Mix (Roche), following the manufacturer's protocol. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt method and normalized on 18S expression (Assay HS_099999). Primer sequences for SGCA were: 5'-TGCTGGCCTATGTCATGTGC-3' and 5'-TCTGGATGTCGGAGGTAGCC-3'. Taqman MGB probe sequence for SGCA was 5'-CGGGAGGGAAGGCTGAAGAGAGACC-3'.

Western immunoblotting. Whole-cell lysates of fibroblasts treated or not with 3 μ M of thiostrepton or 30 nM of bortezomib were collected. Same cells extracts were treated with PNGase F (Biolabs) for 1 hour at 37 °C to remove N-linked oligosaccharides from glycoproteins. Proteins were extracted with RIPA lysis buffer (Thermo Scientific) supplemented with 1X Protease Inhibitor-Complete ULTRA tablets mini (Roche) and 1X Benzamide nuclease HC (Millipore) for 1 h at 4 °C. Protein concentration was measured using the Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific) and the absorbance at 562 nm was evaluated using a Clariostar (BMG Labtech). A total of 50 μ g of protein was loaded and run on NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris Protein Gels (Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. Membranes were then blocked in Odyssey blocking buffer (Li-Cor) for 1 hour at room temperature. Incubation with primary antibodies diluted in Odyssey blocking buffer was carried out at 4 °C overnight for the mouse anti- α -SG 1:200

(NCL-L-a-SARC, Novocastra, Leica) and for the rabbit anti- α -actin 1:200 (A2066, Sigma). Washing was carried out 4 times for 8 minutes at room temperature with TBS + 0.1% Tween20 and the membranes were incubated with a donkey anti-mouse antibody IRDye-680 (926–32222, Li-Cor) or a donkey anti-rabbit antibody IRDye-800 (926–32213, Li-Cor) at 1:10,000 in blocking buffer. Washing was carried out 4 times for 8 minutes at room temperature with TBS + 0.1% Tween20. Proteins were detected by fluorescence (Odyssey, Li-Cor) following the manufacturer's instructions.

Proteasomal activity assay. Fibroblasts and myoblasts were seeded in 384 well plates and treated with MG132 (1 μ M) or various concentrations of bortezomib (100 pM–300 nM) and thiothrepton (10 nM–10 μ M) for 12 hours. Proteasome-Glo™ chymotrypsin-like, trypsin-like or caspase-like cell-based assay reagents were added according to manufacturer instructions (Promega). Luminescence was read using a CLARIOstar® microplate reader (BMG Labtech).

RNA sequencing and transcriptomic analysis. Total RNAs were isolated using the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen) and quality of the RNAs was checked using a RNAnano chip (Agilent technologies) according to the manufacturer protocol. For each of the 12 samples, 50 ng of total RNA was reverse transcribed using the Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression kit following the protocol of the manufacturer (ThermoFisher Scientific). The cDNA libraries were amplified and barcoded using Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression core panel and Ion Xpress Barcode Adapter (ThermoFisher Scientific). The amplicons were quantified using Agilent High Sensitivity DNA kit before the samples were pooled in sets of eight. Emulsion PCR and Enrichment was performed on the Ion OT2 system Instrument using the Ion PI Hi-Q OT2 200 kit (ThermoFisher Scientific). Samples were loaded on an Ion PI v3 Chip and sequenced on the Ion Proton System using Ion PI Hi-Q sequencing 200 kit chemistry (200bp read length; ThermoFisher Scientific). The sequencing reads (FASTQ files) were imported into the RNA-seq pipeline of Partek Flow software (v6 Partek Inc). Briefly, the pipeline consists of trimming of adapters and bases followed by a two-step alignment method. The sequencing reads were mapped on the Homo sapiens reference genome (hg19) with Tophat2 (v2.0.8). Then, the unaligned reads were realigned using Bowtie2 (v2.1.0). The resulting aligned reads from both the Tophat and the Bowtie2 steps were combined into one data node and annotated on RefSeq Release 84 using the Partek E/M algorithm. Gene abundances were quantified and expression levels were normalized on reads per million values (RPM). Differentially expressed genes were identified using Partek Gene Specific Analysis (GSA) when their FDR (False discovery rate) are lower than 0.01, the fold change are superior to 1.5 or inferior to -1.5 and the expression value in all sample are superior to 100 RPM. Biological interpretations of the filtered list of differentially expressed genes were performed using Enrichr software <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>^{36,37}. The heat map was generated by average linkage hierarchical clustering of the differentially expressed genes between THSP 3 μ M and DMSO 0.1% (cutoff FDR \leq 0.01 RPM \geq 100), using Euclidean distance as the distance metric. Scaled expression values are color-coded according to the legend.

Statistical analysis. Data are presented as means \pm SD. Statistical analysis was performed using the Student's t test. Statistical significance was considered for $^{***}P \leq 0.001$. Curve-fitting, IC₅₀ and EC₅₀ determinations were performed using GraphPad Prism (v5.0.3).

Data Availability

The datasets produced in this study are available in the following database: RNA-Seq data: Gene Expression Omnibus GSE11984.

References

- Liewluck, T. & Milone, M. Untangling the complexity of limb-girdle muscular dystrophies. *Muscle & nerve*, <https://doi.org/10.1002/mus.26077> (2018).
- Taraki, H. & Berger, J. The sarcoglycan complex in skeletal muscle. *Frontiers in bioscience* **21**, 744–756 (2016).
- Sandona, D. & Betto, R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert reviews in molecular medicine* **11**, e28, <https://doi.org/10.1017/S1462399409001203> (2009).
- Roberds, S. L. *et al.* Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* **78**, 625–633 (1994).
- Lim, L. E. *et al.* Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nature genetics* **11**, 257–265, <https://doi.org/10.1038/ng1195-257> (1995).
- Bonnemann, C. G. *et al.* Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nature genetics* **11**, 266–273, <https://doi.org/10.1038/ng1195-266> (1995).
- Noguchi, S. *et al.* Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* **270**, 819–822 (1995).
- Nigro, V. *et al.* Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nature genetics* **14**, 195–198, <https://doi.org/10.1038/ng1096-195> (1996).
- Thompson, R. & Straub, V. Limb-girdle muscular dystrophies - international collaborations for translational research. *Nature reviews. Neurology* **12**, 294–309, <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2016.35> (2016).
- Tasca, G. *et al.* MRI in sarcoglycanopathies: a large international cohort study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **89**, 72–77, <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316736> (2018).
- Trabelsi, M. *et al.* Revised spectrum of mutations in sarcoglycanopathies. *European journal of human genetics: EJHG* **16**, 793–803, <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.9> (2008).
- Carrie, A. *et al.* Mutational diversity and hot spots in the alpha-sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D). *Journal of medical genetics* **34**, 470–475 (1997).
- Bartoli, M. *et al.* Mannosidase I inhibition rescues the human alpha-sarcoglycan R77C recurrent mutation. *Human molecular genetics* **17**, 1214–1221, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn029> (2008).
- Gastaldello, S. *et al.* Inhibition of proteasome activity promotes the correct localization of disease-causing alpha-sarcoglycan mutants in HEK-293 cells constitutively expressing beta-, gamma-, and delta-sarcoglycan. *The American journal of pathology* **173**, 170–181, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071146> (2008).

15. Soheili, T. *et al.* Rescue of sarcoglycan mutations by inhibition of endoplasmic reticulum quality control is associated with minimal structural modifications. *Human mutation* **33**, 429–439, <https://doi.org/10.1002/humu.21659> (2012).
16. Carotti, M. *et al.* Repairing folding-defective alpha-sarcoglycan mutants by CFTR correctors, a potential therapy for limb-girdle muscular dystrophy 2D. *Human molecular genetics* **27**, 969–984, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu013> (2018).
17. Sun, W., Zheng, W. & Simeonov, A. Drug discovery and development for rare genetic disorders. *American journal of medical genetics. Part A* **173**, 2307–2322, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38326> (2017).
18. Bianchini, E., Fanin, M., Mamchaoui, K., Betto, R. & Sandona, D. Unveiling the degradative route of the V247M alpha-sarcoglycan mutant responsible for LGMD-2D. *Human molecular genetics* **23**, 3746–3758, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu088> (2014).
19. Newick, K. *et al.* Peroxiredoxin 3 is a redox-dependent target of thiostrepton in malignant mesothelioma cells. *PLoS one* **7**, e39404, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039404> (2012).
20. Sandu, C. *et al.* Thiostrepton interacts covalently with Rpt subunits of the 19S proteasome and proteasome substrates. *Journal of cellular and molecular medicine* **19**, 2181–2192, <https://doi.org/10.1111/jcmm.12602> (2015).
21. Bhat, U. G., Halasi, M. & Gartel, A. L. Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PLoS one* **4**, e5592, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005592> (2009).
22. Jiang, L., Wang, P., Chen, L. & Chen, H. Down-regulation of FoxM1 by thiostrepton or small interfering RNA inhibits proliferation, transformation ability and angiogenesis, and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells. *International journal of clinical and experimental pathology* **7**, 5450–5460 (2014).
23. Yella, J. K., Yaddanapudi, S., Wang, Y. & Jegga, A. G. Changing Trends in Computational Drug Repositioning. *Pharmaceuticals* **11**, <https://doi.org/10.3390/ph11020057> (2018).
24. Donovick, R., Pagano, J. F., Stout, H. A. & Weinstein, M. J. Thiostrepton, a new antibiotic. I. *In vitro* studies. *Antibiotics annual* **3**, 554–559 (1955).
25. Dutcher, J. D. & Vandeputte, J. Thiostrepton, a new antibiotic. II. Isolation and chemical characterization. *Antibiotics annual* **3**, 560–561 (1955).
26. Jambor, W. P., Steinberg, B. A. & Suydam, L. O. Thiostrepton, a new antibiotic. III. *In vivo* studies. *Antibiotics annual* **3**, 562–565 (1955).
27. Bhat, U. G., Halasi, M. & Gartel, A. L. FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors. *PLoS one* **4**, e6593, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006593> (2009).
28. Bhat, U. G., Zipfel, P. A., Tyler, D. S. & Gartel, A. L. Novel anticancer compounds induce apoptosis in melanoma cells. *Cell cycle* **7**, 1851–1855, <https://doi.org/10.4161/cc.7.12.6032> (2008).
29. Pandit, B. & Gartel, A. L. Thiazole antibiotic thiostrepton synergize with bortezomib to induce apoptosis in cancer cells. *PLoS one* **6**, e17110, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017110> (2011).
30. Lai, C. Y. *et al.* Identification of Thiostrepton as a Novel Inhibitor for Psoriasis-like Inflammation Induced by TLR7-9. *Journal of immunology* **195**, 3912–3921, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500194> (2015).
31. Kane, R. C., Bross, P. F., Farrell, A. T. & Pazdur, R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *The oncologist* **8**, 508–513 (2003).
32. Sutariya, V. *et al.* Nanodrug delivery platform for glucocorticoid use in skeletal muscle injury. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **96**, 681–689, <https://doi.org/10.1139/cjpp-2017-0795> (2018).
33. Chen, X., Zaro, J. L. & Shen, W. C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews* **65**, 1357–1369, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.039> (2013).
34. Chaouch, S. *et al.* Immortalized skin fibroblasts expressing conditional MyoD as a renewable and reliable source of converted human muscle cells to assess therapeutic strategies for muscular dystrophies: validation of an exon-skipping approach to restore dystrophin in Duchenne muscular dystrophy cells. *Human gene therapy* **20**, 784–790, <https://doi.org/10.1089/hum.2008.163> (2009).
35. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024> (2006).
36. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC bioinformatics* **14**, 128, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-128> (2013).
37. Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research* **44**, W90–97, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377> (2016).

Acknowledgements

I-Stem and Genethon are part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD). Both institutes are funded with the continuous support of Association Française contre les Myopathies (AFM-Telethon), INSERM and Genopole. This work was supported by grants from the National Infrastructure Engineering for Pluripotent and differentiated Stem cells INGESTEM (Investissement d’Avenir - ANR-11-INBS-0009), the Strategic Research Initiatives (IRS) of Université Paris-Saclay BioTherAlliance, the laboratoire d’Excellence Revive (Investissement d’Avenir; ANR-10-LABX-73), the domaine d’intérêt majeur (DIM) Biothérapies and the Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences NeurATRIS (Investissement d’Avenir - ANR-11-INBS-0011). SH was supported by a PhD fellowship from the University of Paris-Saclay. The authors thank Cécile Martinat, Christian Pinset and Marc Peschanski for helpful discussions, the “Imaging and Cytometry Core Facility” of Genethon for technical support and Genopole for the purchase of the equipment. Finally, we thank the Platform for Immortalization of Human Cells from the Centre of Research in Myology, Institute of Myology, Paris, for providing immortalized MyoD-inducible human fibroblasts.

Author Contributions

I.R. and X.N. were responsible for the experimental design and project management. L.H. and S.H. performed the cell culture experiments. L.H. developed the screening assay and carried out screening analysis. S.H., J.M. and N.B. developed the cellular model. G.M. and J.T. did the screening. L.M. generated the cell banks for screening. M.J. performed the gene expression analysis. A.B. carried out optimization of the cellular model. L.H., C.B. and M.B. provided technical assistance for iPS cell culture and pharmacological studies. L.H., S.H., X.N. and I.R. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43399-w>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

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



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

© The Author(s) 2019

Article 2

Publié en 2022, *Frontiers in Pharmacology*

Dual blockade of misfolded alpha-sarcoglycan degradation by bortezomib and givinostat combination.

Lucile Hoch ^{1,2,3}, Nathalie Bourg ⁴, Fanny Degrugillier ⁵, Céline Bruge ^{1,2,3}, Manon Benabides ^{1,2,3}, Emilie Pellier ^{1,2,3}, Johana Tournois ^{1,2,3}, Gurvan Mahé ^{1,2,3}, Nicolas Maignan ⁶, Jack Dawe ⁶, Maxime Georges ⁶, David Papazian ⁶, Nik Subramanian ⁶, Stéphanie Simon ⁵, Pascale Fanen ^{5,7}, Cédric Delevoye ^{8,9}, Isabelle Richard ^{4,†} and Xavier Nissan ^{1,2,3,†,*}

¹ CECS, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

² INSERM U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

³ UEVE U861, I-Stem, 91100 Corbeil-Essonnes, France

⁴ INTEGRARE, Genethon, Inserm, Université Evry, Université Paris-Saclay, 91002 Evry, France

⁵ Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, 94010 Créteil, France

⁶ KANTIFY, Bruxelles, Belgique

⁷ AP-HP, GH Mondor-A. Chenevier, DMU Biologie-Pathologie, Département de Génétique, 94010 Créteil, France

⁸ Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 144, Structure and Membrane Compartments, 75005 Paris, France

⁹ Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR 144, Cell and Tissue Imaging Facility (PICT-IBiSA), 75005 Paris, France

† These authors have contributed equally to this work.



Dual Blockade of Misfolded Alpha-Sarcoglycan Degradation by Bortezomib and Givinostat Combination

Lucile Hoch^{1,2,3}, Nathalie Bourg⁴, Fanny Degrugillier⁵, Céline Bruge^{1,2,3}, Manon Benabides^{1,2,3}, Emilie Pellier^{1,2,3}, Johana Tournois^{1,2,3}, Gurvan Mahé^{1,2,3}, Nicolas Maignan⁶, Jack Dawe⁶, Maxime Georges⁶, David Papazian⁶, Nik Subramanian⁶, Stéphanie Simon⁵, Pascale Fanen^{5,7}, Cédric Delevoye^{8,9}, Isabelle Richard^{4†} and Xavier Nissan^{1,2,3*†}

¹CECS, I-Stem, Corbeil-Essonnes, France, ²INSERM U861, I-Stem, Corbeil-Essonnes, France, ³UEVE U861, I-Stem, Corbeil-Essonnes, France, ⁴INTEGRARE, Genethon, Inserm, Univ Evry, Université Paris-Saclay, Evry, France, ⁵Université Paris Est Créteil, INSERM, IMRB, Créteil, France, ⁶KANTIFY, Bruxelles, Belgium, ⁷Département de Génétique, DMU Biologie-Pathologie, GH Mondor-A. Chenevier, AP-HP, Créteil, France, ⁸Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Structure and Membrane Compartments, Paris, France, ⁹Institut Curie, PSL Research University, CNRS, UMR144, Cell and Tissue Imaging Facility (PICT-IBISA), Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Corrado Italo Angelini,
University of Padua, Italy

Reviewed by:

Giulio Piluso,
University of Campania Luigi Vanvitelli,
Italy
Giulia Maria Camerino,
University of Bari Aldo Moro, Italy

*Correspondence:

Xavier Nissan
xnissan@istern.fr

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Translational Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 17 January 2022

Accepted: 04 April 2022

Published: 27 April 2022

Citation:

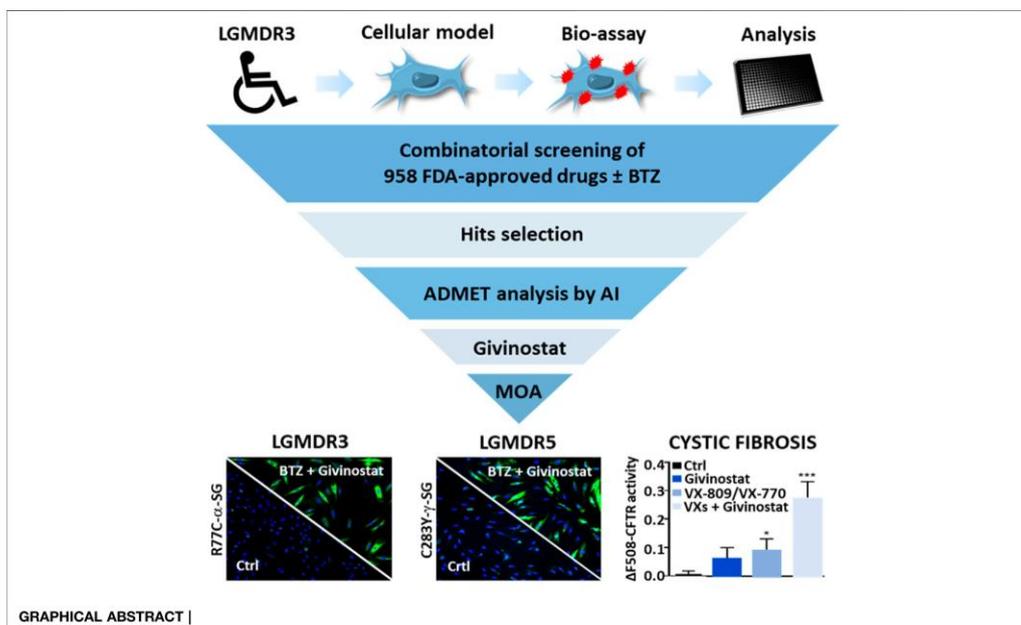
Hoch L, Bourg N, Degrugillier F, Bruge C, Benabides M, Pellier E, Tournois J, Mahé G, Maignan N, Dawe J, Georges M, Papazian D, Subramanian N, Simon S, Fanen P, Delevoye C, Richard I and Nissan X (2022) Dual Blockade of Misfolded Alpha-Sarcoglycan Degradation by Bortezomib and Givinostat Combination. *Front. Pharmacol.* 13:856804. doi: 10.3389/fphar.2022.856804

Limb-girdle muscular dystrophy type R3 (LGMD R3) is a rare genetic disorder characterized by a progressive proximal muscle weakness and caused by mutations in the SGCA gene encoding alpha-sarcoglycan (α -SG). Here, we report the results of a mechanistic screening ascertaining the molecular mechanisms involved in the degradation of the most prevalent misfolded R77C- α -SG protein. We performed a combinatorial study to identify drugs potentializing the effect of a low dose of the proteasome inhibitor bortezomib on the R77C- α -SG degradation inhibition. Analysis of the screening associated to artificial intelligence-based predictive ADMET characterization of the hits led to identification of the HDAC inhibitor givinostat as potential therapeutical candidate. Functional characterization revealed that givinostat effect was related to autophagic pathway inhibition, unveiling new theories concerning degradation pathways of misfolded SG proteins. Beyond the identification of a new therapeutic option for LGMD R3 patients, our results shed light on the potential repurposing of givinostat for the treatment of other genetic diseases sharing similar protein degradation defects such as LGMD R5 and cystic fibrosis.

Keywords: misfolded protein, drug repurposing, givinostat, HDAC inhibitor, autophagy

INTRODUCTION

Limb girdle muscular dystrophies (LGMDs) are a diverse group of genetic muscular dystrophies sharing common features of weakness and wasting of the shoulder and pelvic girdle muscles (Taghizadeh et al., 2019). More than 30 different subtypes of LGMDs have been described with diverse severities depending on the affected gene (Straub et al., 2018). Sarcoglycanopathies are a subgroup of LGMDs caused by autosomal recessive mutations in genes encoding the four sarcoglycan (SG) proteins, α -, β -, δ -, and γ -SG, leading to LGMD R3 (Roberds et al., 1994),



LGMD R4 (Bönnemann et al., 1995; Lim et al., 1995), LGMD R5 (Noguchi et al., 1995) and LGMD R6 (Nigro et al., 1996), respectively. SGs form a transmembrane complex playing a key role to protect striated muscles membrane against contraction-induced damages.

In the past two decades, more than 170 different mutations were described (Sandona and Betto, 2009) to cause sarcoglycanopathies, including 70 *SGCA* gene mutations leading to LGMD R3. The most frequent, the substitution R77C (Carrié et al., 1997), leads to the expression of a misfolded α -SG protein which is recognized by the endoplasmic reticulum quality control (ERQC) system and subsequently degraded by the endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) system involving the proteasome (Bartoli et al., 2008; Gastaldello et al., 2008). Even if there is still no treatment available for LGMDs, preclinical investigations have recently described the positive impact of gene therapy approaches using AAV-mediated *SGCA* or *SGCG* gene transfer to rescue α -SG or γ -SG deficiencies (Mendell et al., 2009, 2010; Israeli et al., 2019). Recently, the results of a phase 1/2 clinical trial enrolling six LGMD R3 patients were reported showing a good tolerance and delivery efficacy of AAVrh74 in muscles but limited functional outcome improvements in patients (Mendell et al., 2019). Several pharmacological approaches were also investigated to restore α -SG expression and function at the plasma membrane (Bartoli et al., 2008; Gastaldello et al., 2008; Soheili et al., 2012; Carotti et al., 2018). Most of these approaches were based on mechanistic

hypothesis focused on missense mutations, especially on the two most frequently reported missense α -SG mutations R77C and V247M (Bartoli et al., 2008; Gastaldello et al., 2008). Even if mutated, the corresponding proteins were shown to be functional at the membrane level, opening the possibility of recovery strategies. To date, the main therapeutic avenues for these mutations are to target either the degradative proteins pathway comprising ERQC system and proteasome or the protein folding/maturation pathway with small molecules as revealed by the use of MG132 (Gastaldello et al., 2008), kifunensine (Soheili et al., 2012) or cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) correctors (Carotti et al., 2018). Targeting the proteasomal pathway has pioneered been developed for the treatment of multiple myeloma and lymphoma to induce cancer cells death and has led to the development of the FDA-approved proteasome inhibitors, carfilzomib (CFZ) or bortezomib (BTZ). However, while being potent proteasome inhibitors, these treatments are associated to side effect as peripheral neuropathy, thrombocytopenia, leukopenia, gastrointestinal dysfunction and hematological toxicity precluding their long-term use for muscular dystrophies (Kaplan et al., 2017; Mohan et al., 2017).

Recent developments in rare diseases highlighted the interest to perform drug screening to repurpose new drugs as revealed with the discovery of small molecules modulators of SMN expression for spinal muscular atrophy (SMA) (Jarecki et al., 2005), cardiac glycosides as modulators of myotonic dystrophy 1 (DM1) (Maury et al., 2019) or metformin as a modulator of

progerin expression for Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS) (Egesipe et al., 2016). Recently, our group developed a pharmacological model of LGMD R3 to identify drugs rescuing the proteasomal degradation of R77C- α -SG. We previously reported that among 2,000 tested drugs only one drug, thiostrepton, was capable to rescue R77C- α -SG membrane localization *via* a direct inhibition of the proteasome (Hoch et al., 2019). Here we have extended the library to 958 other drugs and performed the screening of these drugs alone or in combination with a low dose of BTZ. Our results demonstrate that the combination of BTZ with several heat shock protein 90 (HSP90) and histone deacetylase (HDAC) inhibitors exhibited potent capacity to restore the expression of the α -SG mutant form in the plasma membrane. The functional characterization of the HDAC inhibitor givinostat, revealed the inhibition of the autophagic degradation opening new strategies of combined treatments for LGMD R3.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The R77C fibroblasts used in this study were isolated from a patient biopsy obtained by the Genethon's Cell Bank. Informed consents were obtained from the parents of the patient included in this study, complying with the ethical guidelines of the institutions involved and with the legislation requirements of the country of origin. The R77C fibroblasts were transduced with a pBABE-puro-based retroviral vector containing sequence encoding the catalytic subunit of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and then selected in the presence of puromycin (1 mg/ml) for 10 days, as previously described (Hoch et al., 2019). Experimental protocols were approved by the french minister of research: AC-2013-1868. The SGCG KO fibroblasts used in this study were isolated from a biopsy obtained by the Genethon's Cell Bank from a patient carrying the mutation c.525del at the homozygous state. Both fibroblast lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium + GlutaMAX (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (research grade, Sigma-Aldrich) and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen). For overexpression of the mutated α -SG or mutated γ -SG, fibroblasts were transduced with a lentiviral vector expressing human R77C-, R34H-, I124T-, V247M- α -SGmCh or C283Y-, E263K- γ -SGmCh with a multiplicity of infection (MOI) of 20 in the presence of 4 μ g/ml of polybrene (Sigma-Aldrich). Cells were seeded on plates coated with 50 μ g/ml of collagen I and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Human embryonic kidney (HEK293 MSR Grip Tite) cells stably coexpressing eYFP (H148Q/I152L) and F508del-CFTR-3HA (HEK-F508del/YFP) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 50 μ g/ml zeocin, 0.6 mg/ml G418, 10 μ g/ml blasticidin. Human bronchial epithelial cell line CFBE41o-derived from a CF patient were modified to stably expressing F508del CFTR (F508del-CFTR) (Kunzelmann et al., 1993; Gruenert et al., 2004; Illek et al., 2008). CFBE cells were grown in MEM (Life Technologies) supplemented with 10% FBS (Sigma Aldrich), 1% penicillin/streptomycin (P/S) (Invitrogen) and 1% L-glutamine (Invitrogen).

Plasmid Cloning and Mutagenesis

The sarcoglycan fusion protein was designed based on the human SGCA and SGCG consensus coding sequence (CCDS) found in the NCBI portal (Gene ID: 6442, CCDS number 45729.1 and Gene ID: 6445, CCDS number 9299.1) and the mCherry sequence. The linker, in the amino-acid form of -GGGGG-, was chosen as a flexible type linker that also increased stability/folding of the fusion proteins (Hoch et al., 2019). The fusion protein nucleotide sequence was synthesized by Genecust and cloned in a vector plasmid prepared for lentivirus production. The final construct, termed α -SGmCh or γ -SGmCh, were driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter. The R34H, R77C, I124T, and V247M mutations were generated based on the 100GT > AC, 229C > T, 371T > C, and 739G > A nucleotide changes of SGCA gene, respectively. The E263K and C283Y mutations were generated based on the 788G > A and 847C > A nucleotide changes of SGCG gene, respectively. Mutagenesis was performed using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (200516, Agilent) according to manufacturer's instructions. The primers used to introduce the R34H, R77C, I124T, V247M, E263K, and C283Y mutations are listed in **Supplementary Table S1**.

Pharmacological Treatments

Twenty-four hours after seeding, cells were treated with BTZ (Selleckchem), CFZ (Selleckchem), MG132 (Selleckchem), givinostat (Selleckchem), belinostat (Selleckchem), tubacin (Selleckchem), Lumacaftor (VX-809; Selleckchem), Ivacaftor (VX-770; Selleckchem) or the carrier 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO, VWR). Cells were analyzed after 24 h of treatment.

High Throughput Screening

The high-throughput screening was conducted on Biocell 1800 (Agilent). For this, 1600 R77C- α -SGmCh fibroblasts were seeded in 36 μ l of culture medium into black 384-well clear bottom plates. Twenty-four hours after seeding, 2 μ l of compounds from the chemical library were transferred in monoplicate into cell assay plates added with 2 μ l of culture medium for non-combined treatments or 5 nM BTZ for combined treatments. In each plate, negative control (0.1% DMSO) and positive control (30 nM BTZ) were added in columns 1–23 and upper half columns 2–24, respectively. 5 nM BTZ was also added in the lower half columns 2–24 to control the low effect of this concentration during the drug screening. Plates were then incubated for 24 h and processed for α -SG detection assay. Each of the six plates of the screening were fixed and stained with the specific anti- α -SG antibody using the optimized protocol under non-permeabilized condition. To prevent the discovery of toxic molecules, the number of cells was monitored in parallel by counting Hoechst stained cells per field and candidates showing mortality superior to 55% were excluded.

SG Localization Cell-Based Assay

After 24 h of drug treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (10 min, room temperature). Immunocytochemistry was performed in a phosphate-buffered saline (PBS) solution supplemented with 1% bovine serum

albumin (BSA; Sigma) for blocking (1 h, room temperature) and with a mouse anti- α -SG 1:100 (NCL-L-a-SARC, Novocastra, Leica) or a mouse anti- γ -SG 1:100 (NCL-L-g-SARC, Novocastra, Leica) for primary hybridization step (overnight, 4°C). Cells were stained with a fluorophore-conjugated secondary anti-mouse antibody (Invitrogen; 1 h, room temperature) and nuclei were visualized with Hoechst 33342 (Invitrogen). SG localization was analyzed with a CellInsight CX7 HCS Platform (Cellomics Inc.). The first channel was used for nuclei identification, the second one for membrane α -SG or γ -SG staining identification and the third one for mCherry tag identification. Pictures were acquired with a 10x objective in high-resolution camera mode and were analyzed using the colocalization bioapplication quantifying positive cells for membrane α -SG or γ -SG staining and mCherry tag expression.

Chemical Library

The chemical library was obtained from Selleckchem, distributed in 384 well plate format and tested at 5 μ m. The Selleckchem Chemical library contains 958 FDA approved drugs and pharmacologically active compounds.

Data Analysis

Data analysis of the screening was performed using a customized Hiscreen application (Discngine) connected to Spotfire software (Tibco Software Inc.). The robustness of the assay was evaluated by calculating for each plate the Z' factor on the percentage of mCherry/ α -SG positive cells parameter as follows $Z' = 1 - [3(SDP + SDN)/(MP - MN)]$ where MP and MN correspond to the means of the positive (30 nM BTZ) and negative (0.1% DMSO) controls, respectively, and SDP and SDN correspond to their S.D. Raw data related to the percentage of mCherry/ α -SG positive cells were normalized to the mean of positive and negative controls, which are defined as 100% and 0%, respectively. Raw data related to cell number per field were normalized to the mean of negative controls. Hit selection was performed using in parallel the number of standard deviations from the mean for each readout value (Z-score) calculated per plate individually or per run where all plate data were pooled. Only hits whose Z-score plate and/or Z-score run was ≥ 2 and that did not decrease cell number by more than 55% compared to 0.1% DMSO condition were selected for subsequent validation step. Hits were then tested at gradual concentrations (10 nM–10 μ m) for parallel exploration of their efficacy and toxicity.

ADMET Analysis

Seventy six ADMET endpoints were evaluated for all the compounds found to be active on the assay. These 76 properties represent a set of drug-likeness parameters that are used to compare compounds. Among these parameters, 27 can be directly determined from the sole structure of the considered molecules. The remaining 49 parameters are normally evaluated through assays. Therefore, assay data was collected for approximately 150k compounds and Machine Learning models were trained to predict assay results using molecules features and descriptors and were evaluated through K-Fold train-test-splits. The predictions were then passed through so-

called drug-likeness decision rules, all determined from literature and the analysis of the properties of authorized drugs. Finally, a metric was created to establish which compounds maximize the number of passing ADMET endpoints, the viability of the cellular culture during the assay and the activity observed on the biomarker of the assay. The final ranking established from this metric is to be considered as a risk-benefit indicator highlighting the compounds being the most likely to both show efficacy and minimize adverse effects.

Quantitative PCR

Total RNAs were isolated using the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. A DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA levels and quality were checked using the NanoDrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the SuperScript III reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis was performed using a QuantStudio 12 K Flex real-time PCR system (Applied biosystem) and Luminaris Probe qPCR Master Mix (Thermo Scientific), following the manufacturers' instructions. α -SG expression analysis were performed using the TaqMan gene expression Master Mix (Roche), following the manufacturer's protocol. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt method and normalized on 18S expression (Assay HS_099999). Primer sequences for endogenous SGCA were: 5'-TAAACAAGCAGG GAGAGGGG-3' and 5'-CAATTGGTGAGCAGAGCAGC-3'. Primer sequences for exogenous SGCA were: 5'-TGCTGGCCT ATGTCATGTGC-3' and 5'-TCTGGATGTCGGAGGTAGCC-3'. Taqman MGB probe sequence for exogenous SGCA was 5'-CGGGAGGGAAGGCTGAAGAGAGACC-3'.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitations were performed using Dynabeads Protein A (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Briefly, the HSP90 antibody (4877S, Cell Signaling) was preincubated with the beads for 30 min. The bead/antibody mix was then added to 100 μ g of whole-cell lysate and incubated for additional 30 min. Samples were washed three times with PBS containing 0.1% Tween-20 and subjected to Western immunoblotting analysis.

Western Immunoblotting

Twenty-four hours after treatments with the tested compounds or the carrier, the immortalized fibroblasts expressing R77C- α -SGmCh or the CFBE-F508del-CFTR were collected. Proteins were extracted by cell lysis buffer (np40 or ripa buffer, respectively, thermo scientific) and completed with proteases inhibitors (complete pic, roche). Protein concentration was measured using the Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific) and the absorbance at 562 nm was evaluated using a CLARIOstar[®] microplate reader (BMG Labtech) or a TriStar plate reader (Berthold). For the fibroblasts extracts, a total of 20 μ g of protein was separated using a 3–8% Criterion[™] XT tris-acetate or a 4–15% Criterion[™] XT tris-glycine protein gels and then transferred to PVDF membrane with a Trans-Blot Turbo Transfert system (Biorad)

following the manufacturer's instructions. For the CFBE extracts, a total of 50 µg of protein was separated on 7% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and then transferred onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare) with a Novex Gel Transfert Device (ThermoScientific) following the manufacturer's instructions. Membranes were then blocked in Odyssey blocking buffer (Li-Cor) or Tris-Buffer-Saline 1X (TBS) containing 0.05% Tween-20 and 5% milk for 1 h at room temperature. Incubation with primary antibodies diluted in blocking buffer was carried out at 4°C from 2 h to overnight for the mouse anti-α-SG 1:100 (NCL-L-a-SARC, Novocastra, Leica), the rabbit anti-HSP90 1:1,000 (4877S, Cell Signaling), the rabbit anti-acetylated-lysine 1:1,000 (9441S, Cell Signaling), the mouse anti-ubiquitinated proteins 1:1,000 (04-263, Merck), the rabbit anti-LC3B 1:1,000 (NB600-1384, Novus), the mouse anti-P62 1:1,000 (ab56416, Abcam), the mouse anti-acetylated-α-tubulin 1:1,000 (T6793, Sigma), the rabbit anti-V-ATPase0a1 (V0a1) 1:500 (NBP1-89342, Novus), the mouse anti-CFTR 1:5,000 and 1:1,000 (596 and 570, Cystic Fibrosis Foundation distribution program), the rabbit anti-LaminB1 1:15,000 (ab16048, abcam) and for the rabbit anti-β-actin 1:1,000 (926-42210, Li-Cor). Washing was carried out 4 times for 8 min at room temperature with TBS + 0.1% Tween 20 and the membranes were incubated with a donkey anti-mouse antibody IRDye-680 1:10,000 (926-32222, Li-Cor) or a donkey anti-rabbit antibody IRDye-800 1:5,000 (926-32213, Li-Cor) in blocking buffer. Washing was carried out 4 times for 8 min at room temperature with TBS + 0.1% Tween 20. Proteins were detected by fluorescence (Odyssey, Li-Cor) or revealed using the ECL Prime Western Blotting Detection Reagent kit (GE Healthcare) and images were acquired in a dark room using a G:Box (Syngene) equipped with GeneSys software following the manufacturer's instructions.

Proteasomal Activity Assay

Fibroblasts were seeded in 384 well plates and treated with various concentrations of BTZ (100 pM–300 nM), givinostat (10 nM–10 µM), belinostat (10 nM–10 µM), MG132 (30 nM–10 µM) or CFZ (100 pM–1 µM) for 24 h. Proteasome-Glo™ chymotrypsin-like cell-based assay reagents were added according to manufacturer instructions (Promega). Luminescence was read using a CLARIOstar® microplate reader (BMG Labtech).

Immunostaining Assay

R77C-α-SGmCh fibroblasts were seeded on coverslips coated with 50 µg/ml of collagen I. After 24 h, cells were treated with compounds during 24 h and fixed in 4% formaldehyde. Permeabilization was performed with 0.5% Triton X-100 (ThermoScientific) for 5 min. Then, PBS containing 1% BSA was used for blocking. Incubation with primary antibodies diluted in blocking buffer was carried out at 4°C overnight for the mouse anti-KDEL 1:100 (ADI-SPA-827, EnzoLife) and the mouse anti-LAMP2 1:500 (ab25631, Abcam). Washing was carried out 3 times for 5 min at room temperature with PBS and then secondary antibodies alexa fluor 488 goat anti-mouse 1:1,000 (A-11029, ThermoScientific), alexa fluor 555 goat anti-rabbit 1:1,000 (A-21429, ThermoScientific) and Hoechst solution

1:3,000 were applied at room temperature for 1 h. Washing was carried out 3 times for 5 min at room temperature with PBS and stained coverslips were mounted in fluoromont solution (ThermoScientific) and imaged using a LSM-800 confocal microscope (Zeiss) with Zen software. Images were exported, analyzed and processed with Fiji software.

RFP-GFP-LC3B Tandem Sensor Assay

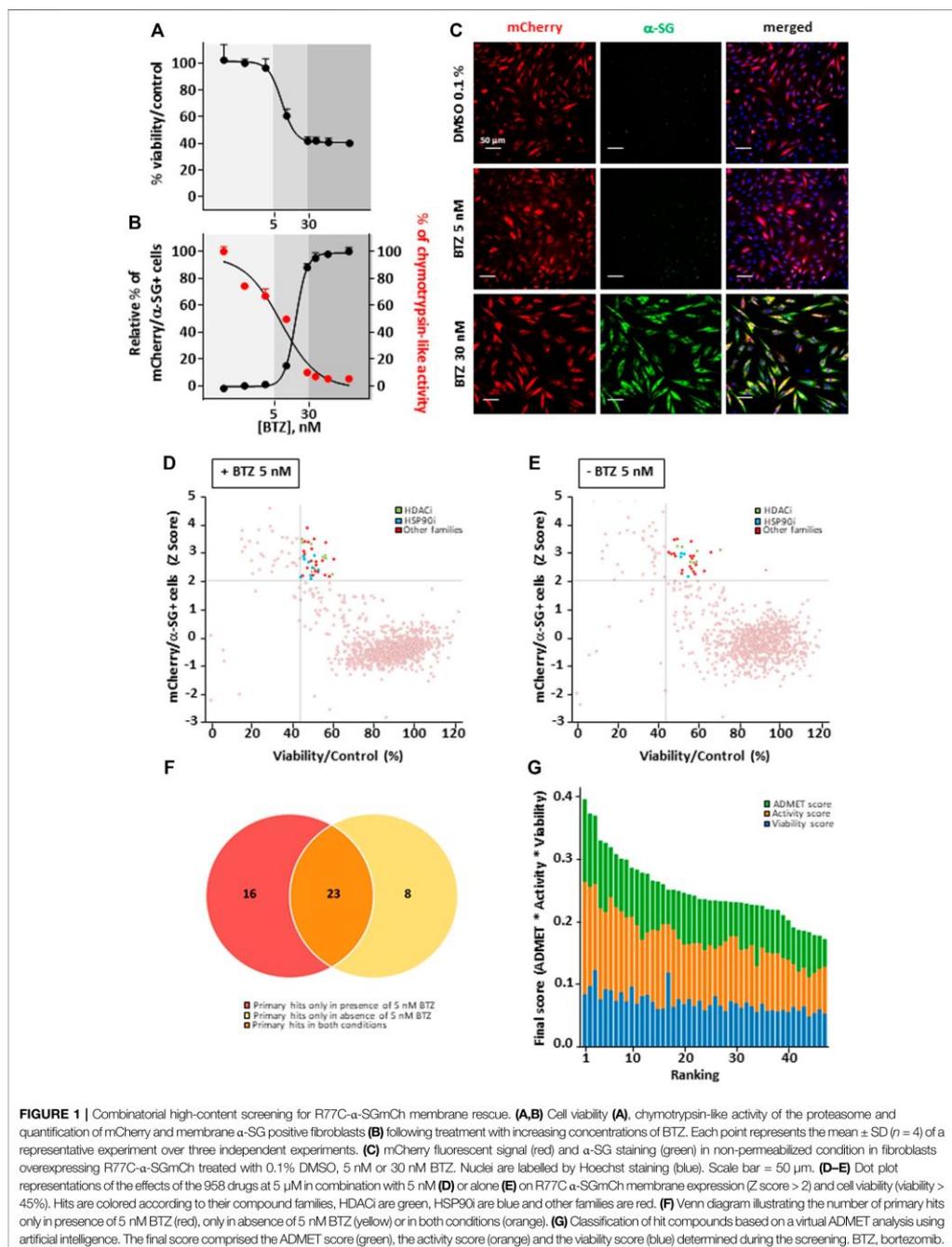
Patient's fibroblasts were seeded on coverslips coated with 50 µg/ml of collagen I. After 24 h, cells were transfected with Premo™ autophagy tandem sensor RFP-GFP-LC3B kit (ThermoScientific) according to the manufacturer's protocol. After 24 h, cells were treated with 10 µM givinostat or 0.1% DMSO. After 24 h of treatment, cells were fixed with 4% formaldehyde and counterstained with Hoechst 33342 solution (Invitrogen). Stained coverslips were mounted in fluoromont solution and imaged using a LSM-800 confocal microscope.

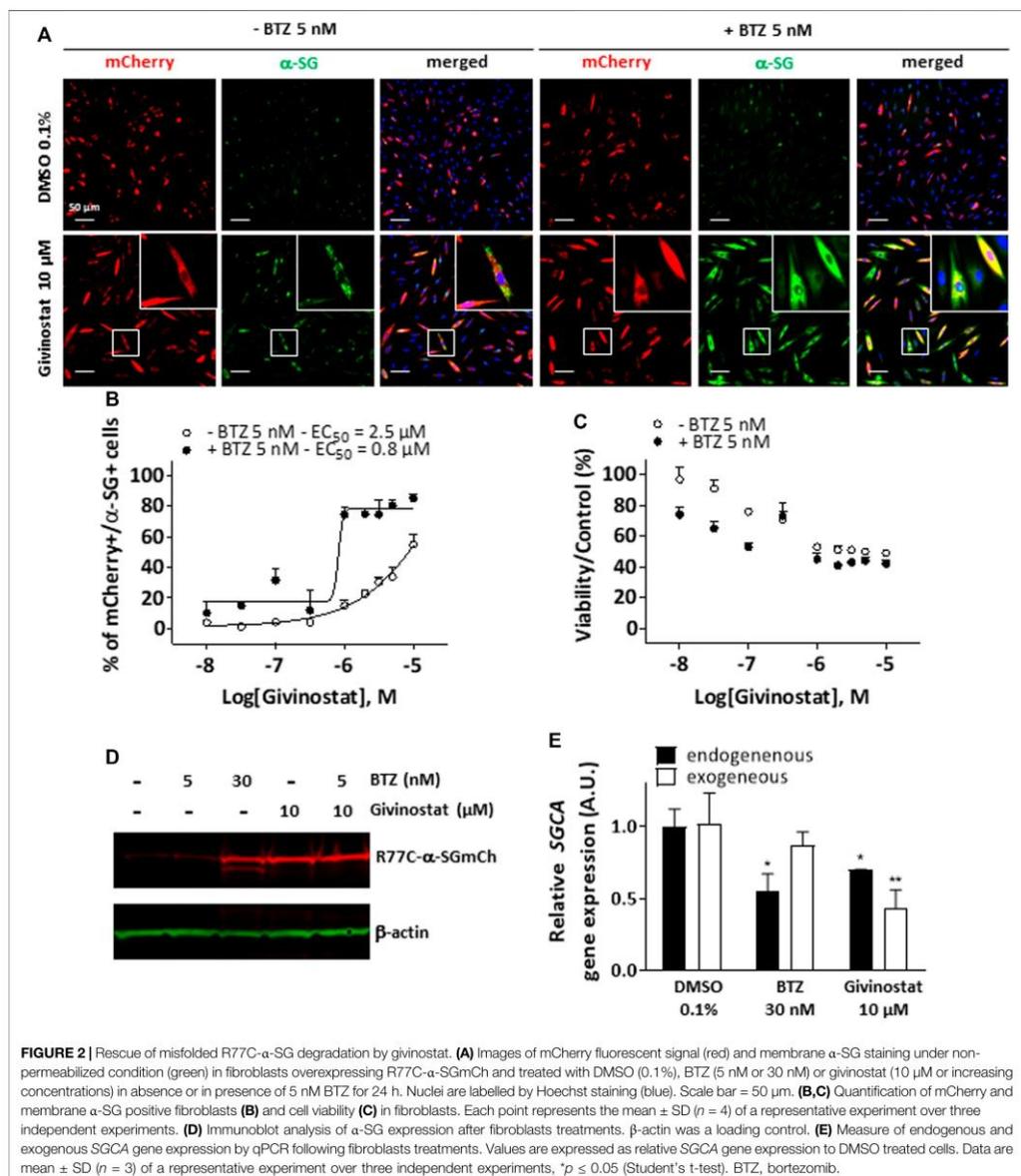
Transmission Electron Microscopy

R77C-α-SGmCh fibroblasts seeded on coverslips coated with 50 µg/ml of collagen were chemically fixed in 2.5% (v/v) glutaraldehyde, 2% (v/v) paraformaldehyde in 0.1 M cacodylate (pH 7.2) buffer for 2 h at room temperature, washed in cacodylate (0.1 M), post-fixed with 2% (w/v) osmium tetroxide supplemented with 1.5% (w/v) potassium ferrocyanide (45 min, 4°C), washed in water, dehydrated in ethanol (increasing concentration from 30% to 100%) and embedded in Epon as described in (Hurbain et al., 2017). Ultrathin sections of cell monolayers were prepared with a Reichert Ultracut S ultramicrotome (Leica Microsystems) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Electron micrographs were acquired on a Tecnai Spirit Electron Microscope (ThermoFischer Scientific) equipped with a 4k CCD camera (Quemesa, EMSIS GmbH, Muenster, Germany) using iTEM software (EMSIS).

YFP-Based CFTR Functional Assay

The assay was performed according to (Galiotta et al., 2001). Briefly, CFTR activity was measured in stably transfected HEK cells coexpressing the halide-sensitive yellow fluorescent protein YFP-H148Q/I152L and F508del CFTR mutant. Cells were seeded in poly-L-lysine coated 96-well black/clear bottom microplates. The CFTR functional assay was carried out 24 h after individual compound treatments with 3 µM VX-809, 10 µM givinostat, 5 nM BTZ or combined treatments. Cells were incubated for 30 min with 50 µl of PBS containing CPT-AMPc (100 µM) before to be transferred to a TrisStar plate reader (Berthold). When indicated, before being treated with of PBS containing CPT-AMPc, cells were incubated with 10 µM VX-770 for 30 min. Each condition was tested in triplicate. Cell fluorescence (excitation: 485 nm; emission: 535 nm) was continuously measured before and after addition of 100 µl of PBS-NaI. Cell fluorescence recordings were normalized to the initial average value measured and signal decay was fitted to an exponential function to derive the maximal slope. Maximal slopes were converted to rates of change in intracellular I-concentration (in mM/sec). The experiments were repeated three times.





Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SD. Statistical analysis was performed using the Student's t test. Statistical significance was

considered for *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$. Curve-fitting, histograms, IC₅₀ and EC₅₀ determinations were performed using GraphPad Prism (v8.4.3).

RESULTS

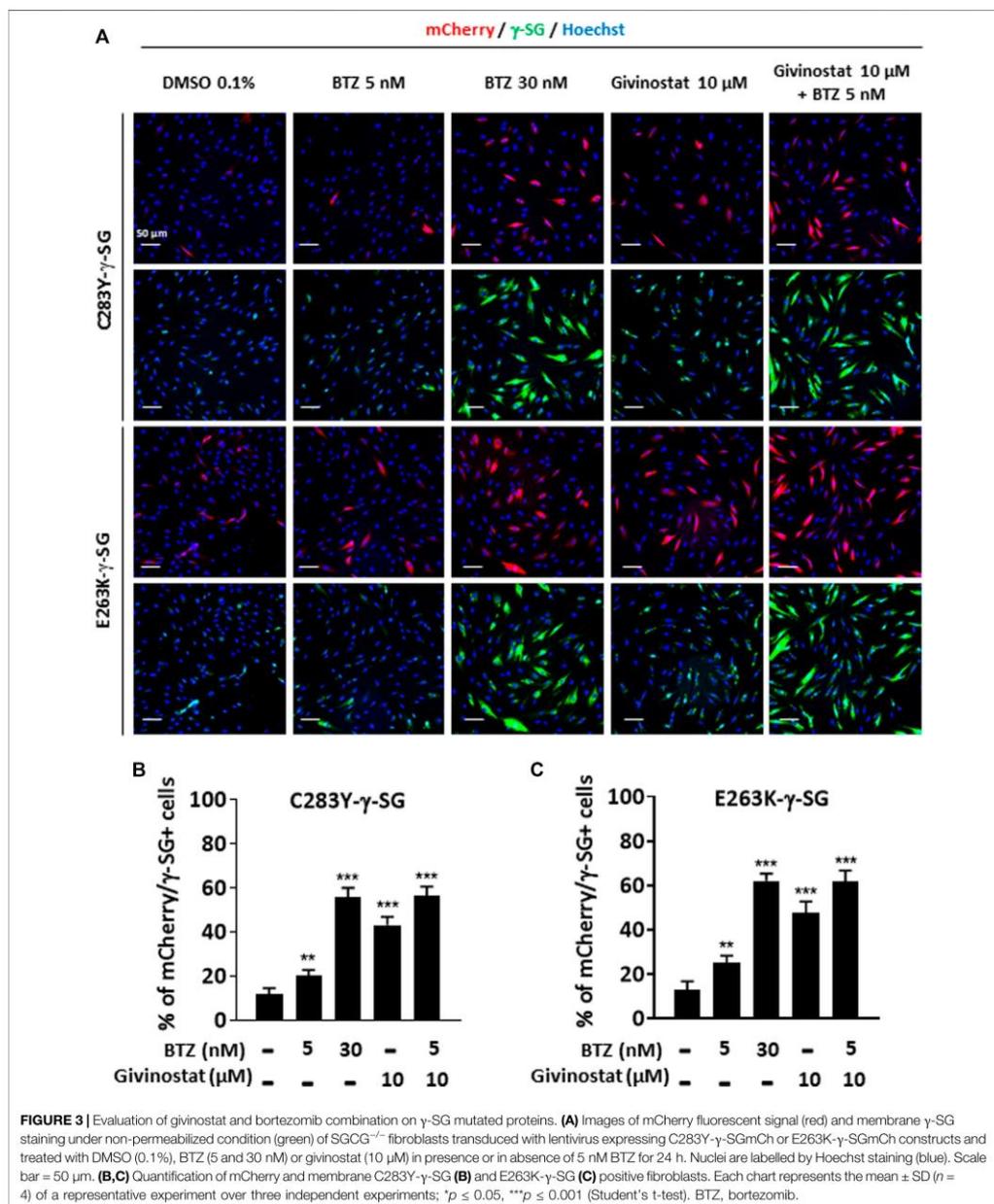
Identification of HSP90 and HDAC Families as New Inhibitors of Misfolded R77C- α -SG Protein Degradation Using Combinatorial High-Content Screening

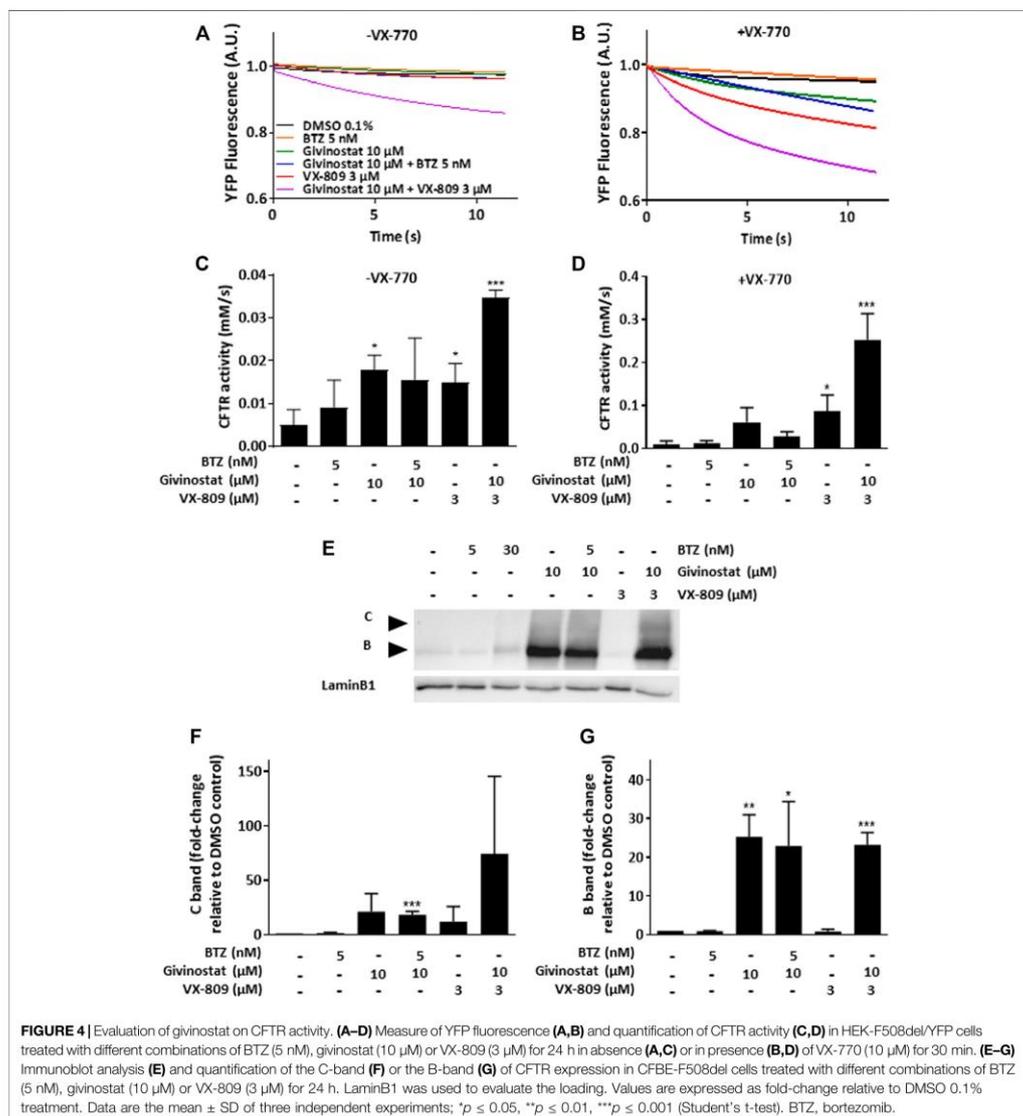
This study was performed on immortalized fibroblasts from a LGMD R3 patient homozygous for R77C- α -SG mutation and stably transduced with a R77C- α -SGmCh reporter lentivirus. This model was previously described as a relevant cellular model to concomitantly investigate the R77C- α -SG expression and localization after compound treatments (Hoch et al., 2019). The drug screening strategy is based on simultaneous identification of positive cells for heterologous R77C- α -SGmCh protein by immunostaining and for presence of the R77C- α -SGmCh protein at the cell membrane compartment using a high-content imaging automate in 384 well plates on non-permeabilized cells (Supplementary Figure S1A). Masks and algorithms were used to define the nuclear (Hoechst), membrane α -SG staining and mCherry fluorescent signal (Supplementary Figure S1B). First, dose response experiments were carried out with BTZ to identify the toxicological profile (Figure 1A) as well as IC₅₀ on proteasome activity and EC₅₀ on R77C- α -SG membrane rescue (Figure 1B). Analysis of these data allowed us to identify a non-toxic dose of BTZ (5 nM) having limited effect on R77C- α -SG membrane rescue and partial inhibition of the proteasome activity. In comparison, 30 nM BTZ was identified as a dose highly rescuing the R77C- α -SG membrane expression with a complete inhibition of the proteasome activity (Figures 1B,C). Accordingly, a combinatorial screening of a chemical library of 958 FDA-approved drugs at 5 μ M was performed in the presence of 5 nM BTZ (Figure 1D), hypothesizing that the partial proteasome inhibition would permit to identify drugs acting in synergy. A simultaneous screening of the chemical library alone at 5 μ M was performed as a control (Figure 1E). Quantification of double positive cells for the negative and positive controls (0.1% DMSO and 30 nM BTZ, respectively) of each plate of the screening was carried out (Supplementary Figure S1C), confirming a statistical relevant difference between controls with a mean Z' factor of 0.5 (Supplementary Figure S1D). Compounds were considered as potential candidates when their effect of directing the mutated protein at the membrane was superior to two standard deviations from the mean of all the tested compounds, and their cell viability was superior to 45%. This led to an initial list of 31 hits when the library was tested alone and 39 hits when tested in combination with 5 nM BTZ with an overlap of 23 hits between the two conditions and 16 unique to the combination (Figure 1F; Supplementary Table S2). Interestingly, among the list of 39 hits, nine HSP90 and eight histone deacetylase HDAC inhibitors were identified as significantly efficient on R77C- α -SG membrane expression (Figures 1D,E; Supplementary Table S2). The identification of these two families of compounds highlights new potential pathways implicated in the degradation of the R77C- α -SG protein. Interestingly, previous studies described a link between HDACs and HSP90 signaling pathways as HDAC6 regulates HSP90

deacetylation, an event critical for maintaining its normal chaperone activity (Bali et al., 2005; Kovacs et al., 2005).

Investigation of Givinostat for R77C- α -SG Membrane Rescue

We then performed a virtual Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination and Toxicity (ADMET) analysis of the hit compounds using artificial intelligence, evaluating 76 properties. The compound ranking metric used is an equally balanced weight of the percentage of ADMET endpoints passing, among which 49 machine learning predictions, the cell viability and the compound activity on the bioassay. While in this classification, givinostat was ranked in the top 10 compounds (Figure 1G; Supplementary Table S3), the review of various factors of the top compounds such as their clinical approval stage, their indications, and their targets, highlighted givinostat as one of the most promising orphan drugs to be investigated for its effect on α -SG. Besides its good safety profile, givinostat, retained our attention because of its anti-fibrotic effect in Duchenne muscular dystrophy (DMD) animal models (Consalvi et al., 2013) and its current evaluation in a phase III clinical trial in DMD patients. Dose-response experiments for membrane rescue of R77C- α -SGmCh were conducted with increasing concentrations from nanomolar to micromolar range of givinostat alone or in combination with 5 nM BTZ. Analysis of α -SG staining following givinostat treatment alone revealed a punctiform α -SG signal suggesting a partial rescue of the protein degradation (Figure 2A, left panels). However, similar experiment conducted in presence of the combined treatment of givinostat with 5 nM BTZ revealed a continuous α -SG signal at the membrane compartment (Figure 2A, right panels). These observations were confirmed by performing a dose-response experiment quantifying the presence of R77C- α -SGmCh at the membrane that revealed a significantly higher efficacy of the combined treatments (EC₅₀ of 0.8 μ M) as compared to givinostat treatment alone (EC₅₀ of 2.5 μ M) (Figure 2B) without additional toxicity (Figure 2C). α -SG protein level was then investigated by immunoblot analysis in presence of the different treatments (Figure 2D), revealing an increased α -SG protein level after treatment with 10 μ M givinostat in both presence and absence of 5 nM BTZ. This result suggested that givinostat treatment alone could induce the inhibition of the R77C- α -SG protein degradation but probably not its full trafficking to the membrane as indicated by the imperfect immunostaining at the membrane (Figure 2A). Of note, as previously reported by our group, treatment with 30 nM BTZ leads to the appearance of an extra band corresponding to an immature form of α -SG (Hoch et al., 2019). This additional band was not observed in presence of 10 μ M givinostat alone, suggesting a distinct mechanism of action of both compounds. Interestingly, similar results were obtained with parallel experiments following belinostat treatment, another pan-HDACi identified in the screening, alone or in combination with 5 nM BTZ, suggesting a common mode of action of these two HDACi for the R77C- α -SG membrane expression rescue (Supplementary Figure S2). To explore givinostat mode of action on α -SG, we next evaluated the endogenous and exogenous SGCA gene expression after treatments with 10 μ M

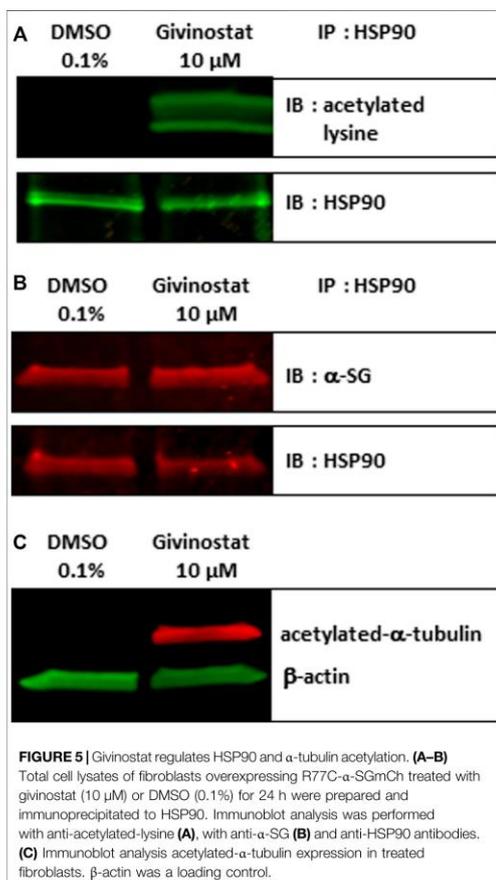




givinostat or 30 nM BTZ (Figure 2E). Analysis of qPCR revealed that gene expression was not increased by any treatment suggesting that R77C- α -SG protein rescue was not due to *SGCA* transcriptional increase. Inversely, we observed a significant transcriptional decrease that did not reflect the increase of R77C- α -SG protein level, suggesting a post-transcriptional effect of givinostat on R77C- α -SG protein.

Rescue of Different Missense Mutations of SG Proteins Through Combination of Givinostat and Bortezomib Treatments

To further validate the interest of givinostat, we evaluated the effect of this compound alone or combined with BTZ on other missense mutations leading to misfolded α -SG and γ -SG and



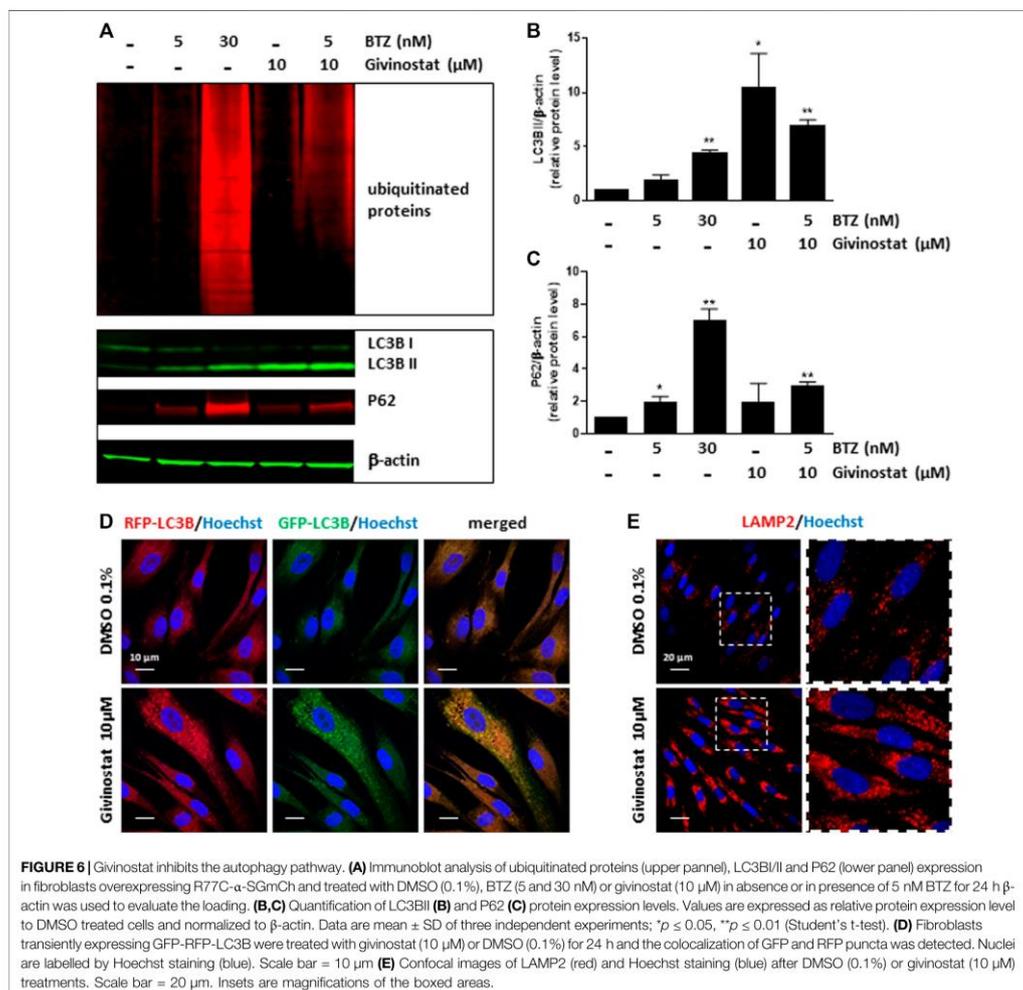
frequently reported in LGMD R3 and LGMD R5 patients. Lentiviruses expressing the V247M, R34H or I124T α-SGmCh or the C283Y or E263K γ-SGmCh mutants were transduced in immortalized R77C patient fibroblasts or SGCG^{-/-} fibroblasts, respectively. Immunofluorescence images analysis in non-permeabilized condition revealed the absence of detectable α-SG or γ-SG staining at the membrane level in all mutant transduced cells (Figure 3A; Supplementary Figure S3A). Analysis of α-SG and γ-SG mutant proteins localization was then evaluated following treatment with BTZ (5 and 30 nM) or givinostat (10 μM alone or combined with 5 nM BTZ). All mutant proteins were rescued with 30 nM BTZ, confirming that these misfolded proteins are rescuable from proteasomal degradation. Combination of givinostat and BTZ treatments leads to the rescue of all mutated protein, except the I124T-α-SGmCh, with different efficacies ranging between 40 % and 60% of rescued cells (Figures 3B,C, Supplementary Figures S3C,D).

Givinostat Treatment Corrects F508del CFTR Trafficking

Recent evidences have reported the role of HDAC inhibition in the transport at the plasma membrane of the misfolded F508del-CFTR protein, the most frequent mutant causing cystic fibrosis (CF) (Anglès et al., 2019). CF is an inherited disorder that causes severe damage to the lungs, digestive system and other organs in the body. It is now well established that restoring the expression of the F508del-CFTR mutant on the surface of epithelial cells by inhibiting its degradation allows the correction of CF patients phenotype since the F508del-CFTR protein is partially functional when it is correctly positioned at the apical pole of the cells. To open up the possibility of using givinostat for other misfolded protein rescue, we investigated the impact of givinostat alone or in combination with the FDA-approved CF treatments Lumacaftor (VX-809) or Orkambi (VX-770 + VX-809) on CFTR (Van Goor et al., 2006, 2009). To do so, we used embryonic kidney (HEK293 MSR Grip Tite) cells stably coexpressing a yellow fluorescent protein (eYFP) variant and F508del-CFTR-3HA (Trzcińska-Daneluti et al., 2015). Because the fluorescence of eYFP variant can be quenched in response to iodide influx entering the cell through a functional CFTR channel, this strategy is used to indirectly measure CFTR activity. Results of this experiment revealed that treatment with 10 μM givinostat induced a similar level of eYFP quenching to the one observed with 3 μM Lumacaftor (Figures 4A,C). Importantly, an additive effect on the CFTR channel activity was observed using the combination of givinostat with Lumacaftor treatment (Figures 4A,C) and synergistic effects were observed with Orkambi treatment (Figures 4B,D). Results were confirmed by measuring CFTR protein levels (B- and C- band) following treatments with 10 μM givinostat, 3 μM Lumacaftor or combinational treatments by immunoblot analysis showing that givinostat induces a synergistic improvement in the trafficking efficiency of the F508del CFTR mutant (Figures 4E–G).

Givinostat Treatment Induces Acetylation of HSP90 and α-Tubulin

Following these demonstrations of the interest of givinostat in various pathological conditions, we explored its mechanism of action. First and because we identified several HSP90i in the combinatorial screening hits list suggesting the involvement of HSP90 chaperone activity in the degradation of the R77C-α-SG protein and considering previous studies already connecting HDACs and HSP90 signaling pathways (Rao et al., 2012), we investigated the effect of givinostat on HSP90. HDACs function through the removal of acetyl groups attached to lysine residues in histones and non-histone proteins. Interestingly, it has been previously demonstrated that at least one HDAC, HDAC6, functions as an HSP90 deacetylase (Kovacs et al., 2005) with the inactivation of HDAC6 leading to HSP90 hyperacetylation and resulting in a reduced interaction with client proteins (Bali et al., 2005). After treatment of fibroblasts with 10 μM givinostat, immunoprecipitation of HSP90 followed by immunoblotting with antibodies recognizing acetylated lysine residues and α-SG proteins were performed. An important acetylation of



HSP90 but no effect on the levels of the protein was observed after treatment (Figure 5A). Interestingly, α-SG was identified to interact with HSP90 but the givinostat treatment did not alter this interaction (Figure 5B), suggesting that the rescuing effect of givinostat on α-SG does not implicate a reduction of α-SG as a client protein of HSP90.

After confirmation that givinostat modulates the acetylation of HSP90, the hypothesis of the implication of HDAC6 was then investigated. To validate the modulation of HDAC6 activity following givinostat treatment, we analyzed by immunoblot the acetylation of α-tubulin, an event mostly dependent on HDAC6 activity. As hypothesized, givinostat treatment

induced the acetylation of α-tubulin (Figure 5C). We then examined the effect of tubacin, a selective HDAC6 inhibitor, on R77C-α-SGmCh mutant rescue. Our results demonstrated that tubacin induced a dose-reponse curve for membrane R77C-α-SGmCh expression and a synergistic effect with 5 nM BTZ (Supplementary Figures S4A,B) with cell toxicity in the same range than givinostat (Supplementary Figure S4C). Immunoblot analysis confirmed the increase of α-SG protein levels and the acetylation of α-tubulin (Supplementary Figure S4D) following combined tubacin and BTZ treatment. These data suggest that the inhibitory effect of givinostat leading to the R77C-α-SG protein rescue could implicate the HDAC6 activity.

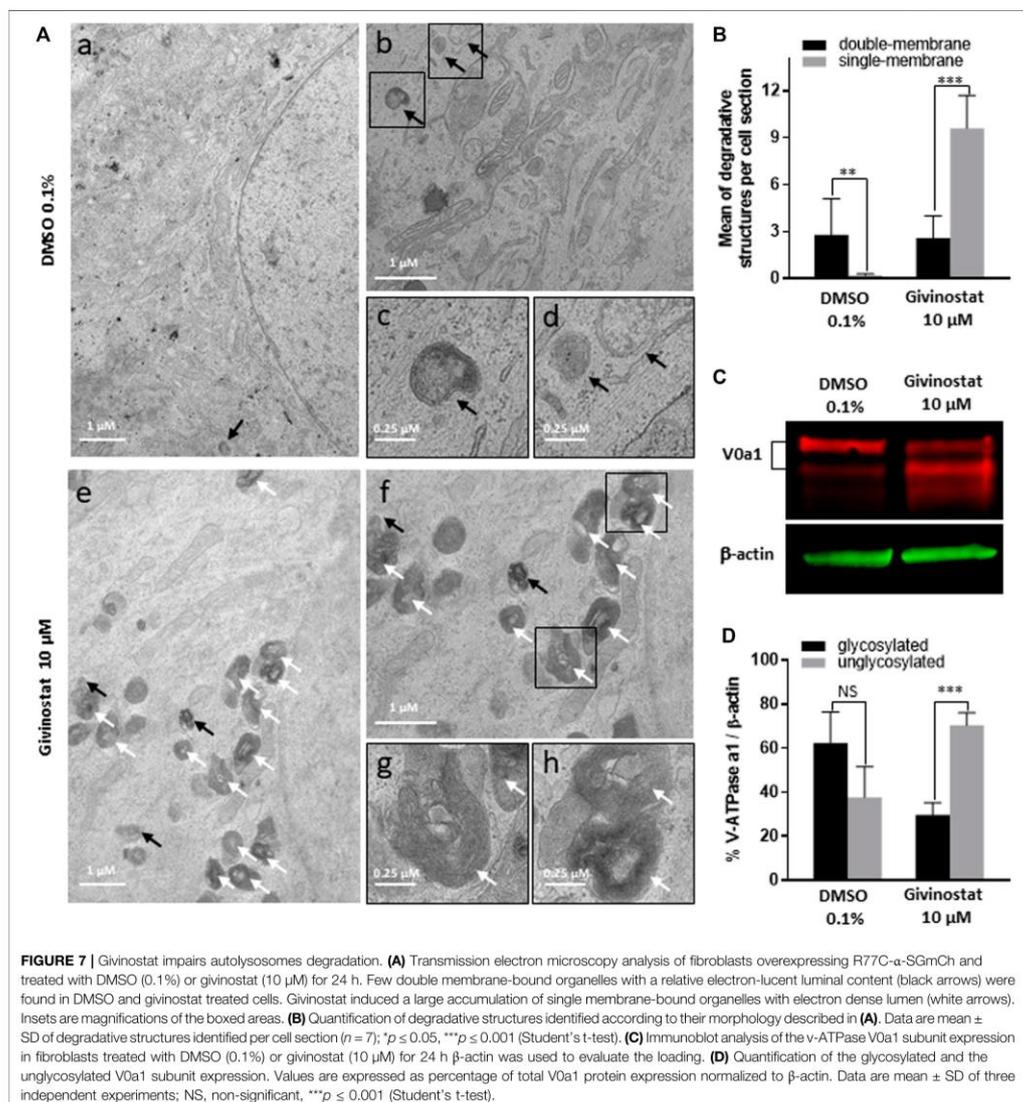
Givinostat Mode of Action Is Not Occurring at the Proteasome Level

As a second step, we analysed givinostat effect on degradative systems, starting by the proteasome activity considering the synergistic effect of the BTZ and givinostat combination. To do so, we first measured the chymotrypsin-like activity of the proteasome after treatment with increasing concentrations of givinostat (**Supplementary Figure S5A**). Results revealed no significant decrease of the chymotrypsin-like activity following givinostat treatment, suggesting a distinct mechanism of action than BTZ. The same conclusion was obtained with parallel experiments following belinostat treatment (**Supplementary Figure S2E**). We then evaluated the effect of givinostat on the BTZ-mediated proteasome inhibition by measuring the chymotrypsin-like activity after treatments with increasing concentrations of BTZ in the presence of 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M, 3 μ M, or 10 μ M of givinostat (**Supplementary Figure S5B**). Analysis of the dose-response curves revealed no significant IC_{50} changes of the chymotrypsin-like activity induced by the different combinations of BTZ and givinostat, while significant EC_{50} changes of the membrane R77C- α -SGmCh mutant protein rescue were observed (**Supplementary Figures S5C–E**), providing evidences that givinostat had no effect on BTZ-mediated proteasome inhibition, although toxicity is observed at high dose combinations. Similar results were obtained by testing the combination of givinostat with two other proteasome inhibitors respectively, Carfilzomib (CFZ) and MG132 (**Supplementary Figure S6**). As previously done with BTZ, quantification of the percentage of cells with membrane localization of R77C- α -SGmCh after treatment with increasing concentrations of givinostat combined to low doses of CFZ (10 nM) or MG132 (100 nM) indicated their synergistic effect on R77C- α -SGmCh mutant protein rescue (**Supplementary Figure S6G**).

Givinostat Treatment Inhibits Autophagy at the Late Stage

To deeper investigate the mechanism of givinostat on membrane SG rescue, we analyzed the ubiquitination of proteins. Immunoblot analysis revealed similar increased expression levels of ubiquitinated proteins after 10 μ M givinostat or 5 nM BTZ treatment and additive effects were observed with combination of both treatments (**Figure 6A**, upper panel). These results, together with the fact that givinostat did not inhibit the proteasome activity nor act through increasing the effect of BTZ on proteasome inhibition, suggested that another mechanism of protein degradation should be prevented by the effect of givinostat. Beside the ERAD pathway, another important degradation pathway for proteins present in the ER is ER-phagy, a selective form of autophagy which enables the formation of autophagosomes from the ER membranes and mediates their fusion with lysosomes for proteins degradation (Song et al., 2018). Interestingly, it was previously described that R77C- α -SG proteins can form aggregates in the ER, an element compatible

with the possibility of activation of ER-phagy with mutated sarcoglycans (Draviam et al., 2006). In line with these results, mCherry aggregates were observed by confocal immunofluorescence analysis in the ER after 30 nM BTZ treatment (**Supplementary Figure S7**) revealing R77C- α -SG proteins aggregation when the proteasome activity is inhibited. In comparison, no aggregates were observed after 10 μ M givinostat treatment (**Supplementary Figure S7**). Since recent studies have demonstrated that proteasome inhibitors could induce autophagy as a compensatory response (Kocaturk and Gozuacik, 2018), we hypothesized that BTZ treatment, in addition to its inhibitory effect on proteasome, would orient R77C- α -SG proteins towards the autophagic route. Our observation of the synergistic effects of givinostat when associated to BTZ led to the hypothesis that givinostat effect on R77C- α -SG proteins was relied on the regulation of this alternative autophagic route. We investigated the autophagy process by monitoring the conversion of LC3B from the cytosolic form, LC3B-I, to the membrane-associated form, LC3B-II (Kabeya et al., 2000) using immunoblot analysis. Conversion to LC3B-II was induced in dose-dependent manner in cells upon BTZ treatment confirming that autophagy was activated in a compensatory response to proteasome inhibition (**Figures 6A,B** lower panel). Then, we assessed the expression of P62, another marker of autophagy selectively incorporated into autophagosomes through direct binding with LC3B. It has also been reported that P62 is degraded at the late stage of autophagy process, and that accumulation of P62 could be the consequence of an autophagic flux inhibition meaning that autophagy is activated but not completed (Mizushima et al., 2010). Upon 10 μ M givinostat treatment, accumulation of P62 and LC3B-II were observed suggesting an inhibition of the autophagic flux (**Figures 6A–C** lower panel). Interestingly, P62 accumulation was also observed upon BTZ treatment (**Figures 6A,C** lower panel). In line with these results, many studies have reported that P62 transcription was rapidly upregulated upon proteasome inhibition (Sha et al., 2018). To further understand the mechanism of autophagy inhibition induced by givinostat, we next explored the process of autophagy by immunofluorescence imaging using a RFP-GFP-LC3B tandem sensor allowing the dissection of the maturation of autophagosomes to functional autolysosomes. By combining an acid-sensitive GFP-LC3B sensor with an acid-insensitive RFP-LC3B sensor, the transition from neutral autophagosomes to acidic autolysosomes can be visualized by imaging the specific loss of the GFP fluorescence in cells. Patient's fibroblasts were transiently transduced with a RFP-GFP-LC3B tandem sensor and treated with 10 μ M givinostat or 0.1% DMSO. Givinostat treatment dramatically increased the number of RFP-LC3B structures positive for GFP signal (**Figure 6D**) indicating an accumulation of non-acid autophagic structures. Also, LAMP2 staining was largely increased after givinostat treatment (**Figure 6E**) suggesting that the generated autophagic structures were positive for lysosomal components. To decipher whether givinostat affects autophagosome-lysosome fusion or lysosomal pH



increase, we examined the ultrastructure of the degradative organelles by using transmission electron microscopy (TEM). Accordingly, and as compared to controls, givinostat-treated cells showed a dramatic accumulation of large and irregular electron-dense single membrane-bound organelles containing a large amount of luminal proteinaceous and lipid materials (Figures 7A,B, white arrows). Those organelles were not autophagosomes, which were equally identified in DMSO-

and givinostat-treated cells as electron-lucent organelles delimited by a double membrane (Figures 7A,B black arrows) suggesting similar autophagy induction with both treatments. While those organelles shared ultrastructural features of autolysosomes and would evidence that autophagosomes fused with lysosomes, the non-degraded luminal content was suggestive of a lower degradative capacity of these structures upon givinostat treatment.

Givinostat Treatment Inhibits the N-Glycosylation of the V-ATPase V0 Subunit a1

The degradative function of lysosomes is carried out by hydrolytic enzymes within their lumen that require acidic pH for optimal activity (Mellman et al., 1986). Acidification of lysosomes is mainly controlled by the vacuolar-type ATPase (V-ATPase), a multimeric protein composed of two sub-complexes, the cytosolic V1, and the membrane-bound V0, allowing transport of protons across the lysosomal membrane. Reversible assembly of V1/V0 sub-complexes on lysosomal membrane regulates the proton pump activity of the V-ATPase. To probe for abnormal lysosomal acidification, we investigated the N-glycosylation of the V-ATPase subunit V0a1, which has been demonstrated to regulate the proton pump assembly in lysosomes (Lee JH. et al., 2010). Immunoblot analysis of fibroblasts treated with 10 μ M givinostat or 0.1% DMSO using an anti-V-ATPase V0a1 antibody revealed two bands corresponding to the non-glycosylated (100 kDa) and the mature N-glycosylated (120 kDa) subunit V0a1. Fibroblasts treated with 10 μ M givinostat highly expressed non-glycosylated V0a1 in comparison to 0.1% DMSO treated cells which expressed mainly mature N-glycosylated V0a1 (Figures 7C,D). These data strongly support the conclusion that, under 10 μ M givinostat treatment, the V-ATPase V0a1 subunit is not N-glycosylated, preventing acidification of lysosomes and therefore degradation of autolysosome content.

DISCUSSION

The main result of this study is the identification of the synergistic effect of givinostat with a low dose of BTZ on misfolded protein degradation through the dual blockade of autophagy and proteasome pathways. Overall our results describe a new therapeutic avenue for the treatment of LGMD R3 patients carrying missense mutations of *SGCA* but also other genetic diseases sharing similar protein degradation defects as LGMD R5 and CF.

Proteasome inhibitors are mainly used for the treatment of multiple myeloma and lymphoma mostly because of their effects on cell cycle and apoptosis (Fricker, 2019). To date, BTZ is the most used FDA-approved proteasome inhibitor. While efficient on tumors growth, BTZ treatment is used for short term therapy because of its well reported side effects (Kaplan et al., 2017; Mohan et al., 2017) that preclude its use for long term administration in patients. Here, we report that α -SG membrane rescue induced by BTZ arise only at toxic doses inhibiting proteasome up to 95% whereas conversely, proteasome inhibition inferior or equal to 50% does not lead to any effect on α -SG. Based on these observations, we used HTS to evaluate the effect of 958 FDA-approved drugs and identify those capable to increase R77C- α -SG rescue without increasing BTZ-induced proteasome inhibition and its associated cell toxicity. In the past decade, similar strategies have already

been reported to identify drugs increasing effects (Chumakov et al., 2014; Yu et al., 2019) or alleviating side effects (Hajj et al., 2015; Zhou et al., 2019) of other therapeutic agents. In this study, we identified 47 compounds all capable to increase R77C- α -SG rescue and belonging mostly to HSP90i, HDACi, aurora kinase inhibitors (AKi) and cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi) families. Among this hits list, although having an effect on R77C- α -SG rescue, 16 compounds were too toxic or their effects were not sufficient when tested alone to be selected in both conditions. Combination with 5 nM BTZ has decreased the cell toxicity of seven compounds and increased the effect on R77C- α -SG rescue of nine compounds above the threshold of 2 standard deviations allowing their selection in the hits list. The virtual ADMET analysis was used to classify the hit compounds according to parameters predicting the potential success of their clinical development. CDKi and HDACi compounds were in the top 10 of this ranking. Among these drugs identified, we report the particular effect of HDACi with eight HDACi out of 20 tested as able to rescue α -SG at the membrane level. HDACs are zinc-dependent hydrolases removing acetyl groups from the lysine residues of both histone and non-histone proteins (Allfrey et al., 1964). HDACs are well known as epigenetic modulators regulating chromatin condensation and gene transcription (Verdin and Ott, 2015). In the past decade, their enzymatic effects on non-histones protein has been associated with diverse cellular processes such as gene transcription, DNA damage repair, cell division, signal transduction, protein folding, autophagy and metabolism (Narita et al., 2019). Therapeutically, HDACi represent drug candidates with broad therapeutic spectrum and are currently predominantly investigated for the treatment of cancer (Mohammad et al., 2019). In this study, we demonstrated the therapeutical interest of HDACi for misfolded protein diseases.

One of the identified HDACi, givinostat, was described in 2005 as a potent pan-HDACi that exerts activity against all types of HDACs and has been mainly investigated in cancer because of its anti-inflammatory effects (Leoni et al., 2005). Here we report that givinostat effect on α -SG membrane expression was not mediated by *SGCA* gene expression regulation nor by proteasome inhibition suggesting an alternative mechanism. Recent studies have demonstrated that autophagy could be an alternative mechanism of ubiquitinated proteins clearance in a compensatory manner of proteasome inhibition (Kocaturk and Gozuacik, 2018). Because we identified synergistic effect on R77C- α -SG membrane rescue and ubiquitin proteins expression after combination of givinostat and BTZ treatments, suggesting the inhibition of two different signaling pathways, we investigated the effect of givinostat on the autophagy. Here, we demonstrated that givinostat induced the accumulation of autophagic components like LC3B and P62 likely associated to autolysosomes containing undegraded materials. Those abnormal autolysosomes reflected a poorly degradative capacity which was supported by the defective maturation of the V-ATPase V0a1 subunit, subsequently required for proper lysosomes acidification. Together, the data propose an inhibition of the autophagic degradative system at a late stage. Among the HDAC proteins, HDAC6 has been related in many studies to the

autophagic pathway. In 2002, HDAC6 was firstly described as a microtubule-associated deacetylase (Hubbert et al., 2002) containing an ubiquitin binding zinc finger (Hook et al., 2002). These properties highlighted the capacity of HDAC6 to bind both polyubiquitinated proteins and dynein motors to transport ubiquitinated proteins through microtubules to aggresomes via tubulin deacetylation (Kawaguchi et al., 2003). HDAC6 was then described to facilitate the autophagosome-lysosome fusion during substrate degradation through the recruitment of a F-actin network (Lee et al., 2010). Here we demonstrated that givinostat induced HSP90 and tubulin acetylation highlighting its inhibitory effect on HDAC6 and suggesting that the inhibitory effect of givinostat on autophagy leading to the R77C- α -SG protein rescue could implicate the HDAC6 activity. We also demonstrated for the first time an interaction between HSP90 and R77C- α -SG by co-immunoprecipitation. Even if we did not observe a reduced interaction between these two proteins after givinostat treatment, excluding a direct effect of givinostat on the HSP90 chaperone activity, this interaction could explain the identification of 9 HSP90i in the primary hits list of the screening. Here, we demonstrated the effect of givinostat on the autophagic pathway through the maturation of the V-ATPase V0a1 subunit required for lysosomes acidification highlighting a potential new implication of HDAC6 for autophagy.

Clinically, givinostat is currently investigated in a phase III clinical trial for Duchenne's muscular dystrophy (DMD). The beneficial effects of givinostat on DMD were demonstrated by preclinical studies on DMD mice model (mdx mice) treated with escalating doses of givinostat (ranging from 1 to 10 mg/kg/day) for 3.5 months (Consalvi et al., 2013). This study identified an optimal range of doses between 5 and 10 mg/kg/day for givinostat to induce muscle formation, muscle performance restoration and fibrosis prevention, providing the preclinical basis for a translation of givinostat into clinical studies with DMD patients. Recent preliminary clinical data on twenty ambulant young DMD boys revealed that givinostat treatment leads to a significant increase of muscle tissue in the biopsies correlated with a decrease of fibrotic tissue as well as substantial reduction of tissue necrosis and fatty replacement (Bettica et al., 2016). Because similar features are also observed in LGMD, we believe that these clinical observations strengthen the use of this treatment to patients with LGMD. Our results describe here an additional effect of givinostat that would have an interest for patients with missense mutations leading to muscular dystrophies in combination with low doses of BTZ. Further preclinical and toxicological *in vivo* studies are required to evaluate positive or negative impact of these combined treatments. Beyond the identification of this potential treatment for LGMD R3 patients, our study pioneerly explore the concept of shared molecular etiology for rare diseases. While 10% of the world population is affected by one or the other of the 7,000 rare diseases, the number of underlying etiologies is much smaller. The emerging strategy consisting to target shared molecular mechanisms is currently revolutionizing drug discovery in rare diseases, making possible to target groups of

pathologies in the same time (Brooks et al., 2014; Roessler et al., 2021). Here we describe a complete demonstration of this new paradigm by performing a phenotypical combinatorial drug screening on LGMD R3 disease identifying givinostat as potential treatment and we demonstrate the positive effect of this drug on LGMD R5 and CF.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IR and XN were responsible for the experimental design and project management. LH performed the cell culture experiments. LH developed the screening assay, carried out screening analysis and realized mechanism of action experiments. NB developed the lentivirus and provided the LGMD cell models. GM and JT did the screening. NM, JD, MG, DP, and NS. performed and analyzed the ADMET analysis. FD, SS, and PF. provided the CFTR cell models and performed the CFTR analysis. CD designed and performed the EM experiments and contributed to edit the manuscript. LH, CB, MB, and EP. provided technical assistance for cell culture and pharmacological studies. LH, XN, and IR. wrote the manuscript.

FUNDING

I-Stem and Genethon are part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD), supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This research was funded by grants from INSERM, the domaine d'intérêt majeur (DIM) Biothérapies, Genopole and the European Commission: the laboratoire d'Excellence Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73), NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences (Investissement d'Avenir—ANR-11-INBS-0011), INGESTEM: the National Infrastructure Engineering for Pluripotent and differentiated Stem cells (Investissement d'Avenir—ANR-11-INBS-0009) and the University of Paris-Saclay (BiotherAlliance). FD is a recipient of an IMRB fellowship for "Translational Research." This work was supported by the French National Research Agency through the "Investments for the Future" program (France-BioImaging, ANR-10-INBS-04). We acknowledge the PICT-IBiSA, member of the France-BioImaging national research infrastructure, supported by the Cell(n)Scale Labex (ANR-10-LBX-0038) part of the IDEX PSL (ANR-10-IDEX-0001-02 PSL).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Marc Peschanski (I-Stem, Corbeil-Essonnes) and Carole Kretz (Institut NeuroMyoGène, Lyon) for helpful

discussions, the “Imaging and Cytometry Core Facility” of Genethon for technical support and to Genopole Research, Evry, for the purchase of the equipment and the Platform for Immortalization of Human Cells from the Centre of Research in Myology, Institute of Myology, Paris, for providing immortalized MyoD-inducible human fibroblasts. The French CF association Vaincre la Mucoviscidose is thanked for its financial support. We thank John Riordan (University of North Carolina) and Cystic Fibrosis Foundation for antibodies against CFTR from Antibody Distribution Program. The authors thank Daniela Rotin (University of Toronto) for the gift of HEK293 MSR Grip Tite

stably coexpressing eYFP (H148Q/I152L) and F508del-CFTR-3HA and UCSF for the gift of CFBE stably expressing F508del-CFTR. In memory of our friend and colleague Jackie Gide.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.856804/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 51, 786–794. doi:10.1073/pnas.51.5.786
- Anglès, F., Hutt, D. M., and Balch, W. E. (2019). HDAC Inhibitors rescue Multiple Disease-Causing CFTR Variants. *Hum. Mol. Genet.* 28, 1982–2000. doi:10.1093/hmg/ddz026
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., et al. (2005). Inhibition of Histone Deacetylase 6 Acetylates and Disrupts the Chaperone Function of Heat Shock Protein 90: a Novel Basis for Antileukemia Activity of Histone Deacetylase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 280, 26729–26734. doi:10.1074/jbc.C500186200
- Bartoli, M., Gicquel, E., Barrault, L., Soheili, T., Malissen, M., Malissen, B., et al. (2008). Mannosidase I Inhibition Rescues the Human Alpha-Sarcoglycan R77C Recurrent Mutation. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1214–1221. doi:10.1093/hmg/ddn029
- Bettica, P., Petrini, S., D’Oria, V., D’Amico, A., Catteruccia, M., Pane, M., et al. (2016). Histological Effects of Givinostat in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 26, 643–649. doi:10.1016/j.nmd.2016.07.002
- Bönnemann, C. G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., et al. (1995). Beta-sarcoglycan (A3b) Mutations Cause Autosomal Recessive Muscular Dystrophy with Loss of the Sarcoglycan Complex. *Nat. Genet.* 11, 266–273. doi:10.1038/ng1195-266
- Brooks, P. J., Tagle, D. A., and Groft, S. (2014). Expanding Rare Disease Drug Trials Based on Shared Molecular Etiology. *Nat. Biotechnol.* 32, 515–518. doi:10.1038/nbt.2924
- Carotti, M., Marsolier, J., Soardi, M., Bianchini, E., Gomiero, C., Fecchio, C., et al. (2018). Repairing Folding-Defective α -sarcoglycan Mutants by CFTR Correctors, a Potential Therapy for Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2D. *Hum. Mol. Genet.* 27, 969–984. doi:10.1093/hmg/ddy013
- Carrié, A., Piccolo, F., Leturcq, F., de Toma, C., Azibi, K., Beldjord, C., et al. (1997). Mutational Diversity and Hot Spots in the Alpha-Sarcoglycan Gene in Autosomal Recessive Muscular Dystrophy (LGMD2D). *J. Med. Genet.* 34, 470–475. doi:10.1136/jmg.34.6.470
- Chumakov, I., Milet, A., Cholet, N., Primas, G., Boucard, A., Pereira, Y., et al. (2014). Polytherapy with a Combination of Three Repurposed Drugs (PXT3003) Down-Regulates Pmp22 Over-Expression and Improves Myelination, Axonal and Functional Parameters in Models of CMT1A Neuropathy. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 201. doi:10.1186/s13023-014-0201-x
- Consalvi, S., Mozzetta, C., Bettica, P., Germani, M., Fiorentini, F., Del Bene, F., 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. doi:10.2119/molmed.2013.00011
- Draviam, R. A., Wang, B., Shand, S. H., Xiao, X., and Watkins, S. C. (2006). Alpha-Sarcoglycan Is Recycled from the Plasma Membrane in the Absence of Sarcoglycan Complex Assembly. *Traffic* 7, 793–810. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00433.x
- Egesipe, A. L., Blondel, S., Lo Cicero, A., Jaskowiak, A. L., Navarro, C., Sandre-Giovannoli, A., et al. (2016). Metformin Decreases Progerin Expression and Alleviates Pathological Defects of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells. *NPJ Aging Mech. Dis.* 2, 16026. doi:10.1038/npiamd.2016.26
- Fricker, L. D. (2019). Proteasome Inhibitor Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 60, 457–476. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010919-023603
- Galletta, L. J., Haggie, P. M., and Verkman, A. S. (2001). Green Fluorescent Protein-Based Halide Indicators with Improved Chloride and Iodide Affinities. *FEBS Lett.* 499, 220–224. doi:10.1016/s0014-5793(01)02561-3
- Gastaldello, S., D’Angelo, S., Franzoso, S., Fanin, M., Angelini, C., Betto, R., et al. (2008). Inhibition of Proteasome Activity Promotes the Correct Localization of Disease-Causing Alpha-Sarcoglycan Mutants in HEK-293 Cells Constitutively Expressing Beta-, Gamma-, and Delta-Sarcoglycan. *Am. J. Pathol.* 173, 170–181. doi:10.2353/ajpath.2008.071146
- Gruenert, D. C., Willems, M., Cassiman, J. J., and Frizzell, R. A. (2004). Established Cell Lines Used in Cystic Fibrosis Research. *J. Cyst. Fibros.* 3 Suppl 2 (Suppl. 2), 191–196. doi:10.1016/j.jcf.2004.05.040
- Haji, R., Milet, A., Toulorge, D., Cholet, N., Laffaire, J., Fouquier, J., et al. (2015). Combination of Acamprosate and Baclofen as a Promising Therapeutic Approach for Parkinson’s Disease. *Sci. Rep.* 5, 16084. doi:10.1038/srep16084
- Hoch, L., Henriques, S. F., Bruge, C., Marsolier, J., Benabides, M., Bourg, N., et al. (2019). Identification of Thiostrepton as a Pharmacological Approach to rescue Misfolded Alpha-Sarcoglycan Mutant Proteins from Degradation. *Sci. Rep.* 9, 6915. doi:10.1038/s41598-019-43399-w
- Hook, S. S., Orian, A., Cowley, S. M., and Eisenman, R. N. (2002). Histone Deacetylase 6 Binds Polyubiquitin Through its Zinc Finger (PAZ Domain) and Copurifies With Deubiquitinating Enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99, 13425–13430. doi:10.1073/pnas.172511699
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., et al. (2002). HDAC6 Is a Microtubule-Associated Deacetylase. *Nature* 417, 455–458. doi:10.1038/417455a
- Hurbain, I., Romao, M., Bergam, P., Heiligenstein, X., and Raposo, G. (2017). Analyzing Lysosome-Related Organelles by Electron Microscopy. *Methods Mol. Biol.* 1594, 43–71. doi:10.1007/978-1-4939-6934-0_4
- Illek, B., Maurisse, R., Wahler, L., Kunzelmann, K., Fischer, H., and Gruenert, D. C. (2008). Cl Transport in Complemented CF Bronchial Epithelial Cells Correlates with CFTR mRNA Expression Levels. *Cell. Physiol. Biochem.* 22, 57–68. doi:10.1159/000149783
- Israeli, D., Cosette, J., Corre, G., Amor, F., Poupiot, J., Stockholm, D., et al. (2019). An AAV-SGCG Dose-Response Study in a γ -Sarcoglycanopathy Mouse Model in the Context of Mechanical Stress. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 13, 494–502. doi:10.1016/j.omtm.2019.04.007
- Jarecki, J., Chen, X., Bernardino, A., Coover, D. D., Whitney, M., Burghes, A., et al. (2005). Diverse Small-Molecule Modulators of SMN Expression Found by High-Throughput Compound Screening: Early Leads Towards a Therapeutic for Spinal Muscular Atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2003–2018. doi:10.1093/hmg/ddi205
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., et al. (2000). LC3, a Mammalian Homologue of Yeast Apg8p, Is Localized in Autophagosome Membranes After Processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- Kaplan, G. S., Torcun, C. C., Grune, T., Ozer, N. K., and Karademir, B. (2017). Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy: Treatment Regimen and Peripheral Neuropathy as a Side Effect. *Free Radic. Biol. Med.* 103, 1–13. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.007
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., and Yao, T. P. (2003). The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell* 115, 727–738. doi:10.1016/s0092-8674(03)00939-5

- Kocaturk, N. M., and Gozuacik, D. (2018). Crosstalk between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Front Cell Dev Biol* 6, 128. doi:10.3389/fcell.2018.00128
- Kovacs, J. J., Murphy, P. J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J. T., Nicchitta, C. V., et al. (2005). HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Mol. Cell* 18, 601–607. doi:10.1016/j.molcel.2005.04.021
- Kunzelmann, K., Schwiebert, E. M., Zeitlin, P. L., Kuo, W. L., Stanton, B. A., and Gruenert, D. C. (1993). An Immortalized Cystic Fibrosis Tracheal Epithelial Cell Line Homozygous for the Delta F508 CFTR Mutation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8, 522–529. doi:10.1165/ajrcmb/8.5.522
- Lee, J. H., Yu, W. H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P. S., Peterhoff, C. M., et al. (2010a). Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations. *Cell* 141, 1146–1158. doi:10.1016/j.cell.2010.05.008
- Lee, J. Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y. S., et al. (2010b). HDAC6 Controls Autophagosome Maturation Essential for Ubiquitin-Selective Quality-Control Autophagy. *EMBO J.* 29, 969–980. doi:10.1038/emboj.2009.405
- Leoni, F., Fossati, G., Lewis, E. C., Lee, J. K., Porro, G., Pagani, P., et al. (2005). The Histone Deacetylase Inhibitor ITF2357 Reduces Production of Pro-Inflammatory Cytokines In Vitro and Systemic Inflammation In Vivo. *Mol. Med.* 11, 1–15. doi:10.2119/2006-00005.Dinarello
- Lim, L. E., Ducloux, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., et al. (1995). Beta-Sarcoglycan: Characterization and Role in Limb-Girdle Muscular Dystrophy Linked to 4q12. *Nat. Genet.* 11, 257–265. doi:10.1038/ng1195-257
- Maury, Y., Poydenot, P., Brinon, B., Lesueur, L., Gide, J., Roquevière, S., et al. (2019). Pluripotent Stem Cell-Based Drug Screening Reveals Cardiac Glycosides as Modulators of Myotonic Dystrophy Type 1. *iScience* 11, 258–271. doi:10.1016/j.isci.2018.12.019
- Mellman, L., Fuchs, R., and Helenius, A. (1986). Acidification of the Endocytic and Exocytic Pathways. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 663–700. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.003311
- Mendell, J. R., Chicoine, L. G., Al-Zaidy, S. A., Sahenk, Z., Lehman, K., Lowes, L., et al. (2019). Gene Delivery for Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2D by Isolated Limb Infusion. *Hum. Gene Ther.* 30, 794–801. doi:10.1089/hum.2019.006
- Mendell, J. R., Rodino-Klapac, L. R., Rosales, X. Q., Coley, B. D., Galloway, G., Lewis, S., et al. (2010). Sustained Alpha-Sarcoglycan Gene Expression after Gene Transfer in Limb-Girdle Muscular Dystrophy, Type 2D. *Ann. Neurol.* 68, 629–638. doi:10.1002/ana.22251
- Mendell, J. R., Rodino-Klapac, L. R., Rosales-Quintero, X., Kota, J., Coley, B. D., Galloway, G., et al. (2009). Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2D Gene Therapy Restores Alpha-Sarcoglycan and Associated Proteins. *Ann. Neurol.* 66, 290–297. doi:10.1002/ana.21732
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell* 140, 313–326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028
- Mohammad, H. P., Barbash, O., and Creasy, C. L. (2019). Targeting Epigenetic Modifications in Cancer Therapy: Erasing the Roadmap to Cancer. *Nat. Med.* 25, 403–418. doi:10.1038/s41591-019-0376-8
- Mohan, M., Matin, A., and Davies, F. E. (2017). Update on the Optimal Use of Bortezomib in the Treatment of Multiple Myeloma. *Cancer Manag. Res.* 9, 51–63. doi:10.2147/CMAR.S105163
- Narita, T., Weinert, B. T., and Choudhary, C. (2019). Functions and Mechanisms of Non-Histone Protein Acetylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 156–174. doi:10.1038/s41580-018-0081-3
- Nigro, V., de Sá Moreira, E., Piluso, G., Vainzof, M., Belsito, A., Politano, L., et al. (1996). Autosomal Recessive Limb-Girdle Muscular Dystrophy, LGMD2F, Is Caused by a Mutation in the Delta-Sarcoglycan Gene. *Nat. Genet.* 14, 195–198. doi:10.1038/ng1096-195
- Noguchi, S., McNally, E. M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., et al. (1995). Mutations in the Dystrophin-Associated Protein Gamma-Sarcoglycan in Chromosome 13 Muscular Dystrophy. *Science* 270, 819–822. doi:10.1126/science.270.5237.819
- Rao, R., Fiskus, W., Ganguly, S., Kambhampati, S., and Bhalla, K. N. (2012). HDAC Inhibitors and Chaperone Function. *Adv. Cancer Res.* 116, 239–262. doi:10.1016/B978-0-12-394387-3.00007-0
- Roberds, S. L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R. D., et al. (1994). Missense Mutations in the Adhulin Gene Linked to Autosomal Recessive Muscular Dystrophy. *Cell* 78, 625–633. doi:10.1016/0092-8674(94)90527-4
- Roessler, H. I., Knoers, N. V. A. M., van Haelst, M. M., and van Haften, G. (2021). Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 42, 255–267. doi:10.1016/j.tips.2021.01.003
- Sandonà, D., and Betto, R. (2009). Sarcoglycanopathies: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Prospects. *Expert Rev. Mol. Med.* 11, e28. doi:10.1017/S1462399409001203
- Sha, Z., Schnell, H. M., Ruoff, K., and Goldberg, A. (2018). Rapid Induction of P62 and GABARAPL1 Upon Proteasome Inhibition Promotes Survival Before Autophagy Activation. *J. Cell Biol.* 217, 1757–1776. doi:10.1083/jcb.201708168
- Soheil, T., Gicquel, E., Poupiot, J., N'Guyen, L., Le Roy, F., Bartoli, M., et al. (2012). Rescue of Sarcoglycan Mutations by Inhibition of Endoplasmic Reticulum Quality Control Is Associated with Minimal Structural Modifications. *Hum. Mutat.* 33, 429–439. doi:10.1002/humu.21659
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., and Zhang, Q. (2018). Crosstalk of ER Stress-Mediated Autophagy and ER-Phagy: Involvement of UPR and the Core Autophagy Machinery. *J. Cell. Physiol.* 233, 3867–3874. doi:10.1002/jcp.26137
- Straub, V., Murphy, A., Udd, B., Corrado, A., Aymé, S., Bönneman, C., et al. (2018). 229th ENMC International Workshop: Limb Girdle Muscular Dystrophies - Nomenclature and Reformed Classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscul. Disord.* 28, 702–710. doi:10.1016/j.nmd.2018.05.007
- Taghizadeh, E., Rezaee, M., Barreto, G. E., and Sahebkar, A. (2019). Prevalence, Pathological Mechanisms, and Genetic Basis of Limb-Girdle Muscular Dystrophies: A Review. *J. Cell Physiol.* 234, 7874–7884. doi:10.1002/jcp.27907
- Trzcińska-Daneluti, A. M., Chen, A., Nguyen, L., Murchie, R., Jiang, C., Moffat, J., et al. (2015). RNA Interference Screen to Identify Kinases that Suppress Rescue of ΔF508-CFTR. *Mol. Cell Proteomics* 14, 1569–1583. doi:10.1074/mcp.M114.046375
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P. D., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., et al. (2009). Rescue of CF Airway Epithelial Cell Function In Vitro by a CFTR Potentiator, VX-770. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 18825–18830. doi:10.1073/pnas.0904709106
- Van Goor, F., Straley, K. S., Cao, D., González, J., Hadida, S., Hazlewood, A., et al. (2006). Rescue of DeltaF508-CFTR Trafficking and Gating in Human Cystic Fibrosis Airway Primary Cultures by Small Molecules. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol Physiol* 290, L1117–L1130. doi:10.1152/ajplung.00169.2005
- Verdin, E., and Ott, M. (2015). 50 Years of Protein Acetylation: from Gene Regulation to Epigenetics, Metabolism and Beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 258–264. doi:10.1038/nrm3931
- Yu, X. W., Wei, D., Gao, Y. S., Du, H. Z., Yu, B. Y., Li, R. M., et al. (2019). Synergistic Combination of DT-13 and Topotecan Inhibits Aerobic Glycolysis in Human Gastric Carcinoma BGC-823 Cells via NM IIA/EGFR/HK II axis. *J. Cell. Mol. Med.* 23 (10), 6622–6634. doi:10.1111/jcmm.14523
- Zhou, J., Huang, N., Guo, Y., Cui, S., Ge, C., He, Q., et al. (2019). Combined Obeticholic Acid and Apoptosis Inhibitor Treatment Alleviates Liver Fibrosis. *Acta Pharm. Sin B* 9, 526–536. doi:10.1016/j.apsb.2018.11.004

Conflict of Interest: Authors NM, JD, MG, DP, and NS were employed by the company KANTIFY.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Hoch, Bourg, Degrugillier, Bruge, Benabides, Pellier, Tournois, Mahé, Maignan, Dawe, Georges, Papazian, Subramanian, Simon, Fanen, Delevoeye, Richard and Nissan. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Brevet d'invention
N/REF. A293-B-63377 FR
Dépôt 15 mars 2022

Utilisation du bazedoxifène pour augmenter la survie musculaire.

Description

Titre de l'invention : UTILISATION DU BAZEDOXIFÈNE POUR AUGMENTER LA SURVIE MUSCULAIRE

Domaine technique

- [0001] La présente invention vise à améliorer la fonction musculaire chez l'homme ou l'animal, en préservant l'intégrité et la survie des cellules musculaires, y compris en conditions défavorables.
- [0002] Plus précisément, elle préconise l'utilisation de bazedoxifène, un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (ou SERM pour « Selective Estrogen Receptor Modulator »), pour assurer la protection de la fonction musculaire, notamment dans des conditions pathologiques telles que des dystrophies musculaires.
- Etat antérieur de la technique**
- [0003] Les maladies neuromusculaires regroupent des pathologies diverses qui sont généralement associées à une perte de force musculaire transitoire ou permanente. Cette perte de force s'accompagne le plus souvent d'une fonte musculaire, également appelée amyotrophie.
- [0004] Parmi ces maladies musculaires, les myopathies constituent un groupe important correspondant à des atteintes de la fibre musculaire à proprement parler. Parmi elles, les dystrophies musculaires progressives se caractérisent par une diminution de la force musculaire avec généralement une atrophie des muscles, ainsi que par des anomalies à la biopsie musculaire révélant une modification du tissu. Appartiennent notamment à ce groupe la dystrophie musculaire de Duchenne (ou DMD), la dystrophie musculaire de Becker (ou DMB), ainsi que les myopathies des ceintures.
- [0005] Pour certaines de ces pathologies, les anomalies génétiques associées ont pu être identifiées. Ainsi, les dystrophies musculaires de Duchenne ou de Becker sont liées à des altérations dans le gène codant la dystrophine, la dystrophie des ceintures de type 2A (LGMD 2A ou R1 ou calpainopathie) à des altérations dans le gène de la calpaïne 3, la dysferlinopathie (LGMD 2B ou R2) à des altérations dans le gène de la dysferline, les sarcoglycanopathies ou myopathies des ceintures de type LGMD 2C (ou R5), LGMD 2D (ou R3), LGMD 2E (ou R4), LGMD 2F (ou R6), à des défauts dans les gènes des γ , α , β et δ -sarcoglycanes, respectivement (McNally EM, Pytel P, Annu Rev Pathol. 2007 ; Vol 2 :87-109).
- [0006] En lien avec la dysferlinopathie, il a été montré que la mutation L1341P dans le gène de la dysferline se traduisait par une mauvaise configuration de la protéine résultante, associée à son agrégation au niveau du réticulum endoplasmique. L'absence de dysferline au sarcolemme entraîne alors une fragilité membranaire qui entraîne in fine

la mort des cellules musculaires et participe donc à la dystrophie musculaire.

- [0007] Pour ces pathologies, différentes stratégies de thérapie génique sont en cours de développement mais restent délicates à mettre en œuvre.
- [0008] Toutefois et plus généralement dans tous les cas de faiblesse musculaire, il existe un besoin évident de développer des solutions techniques permettant de préserver la fonction musculaire, notamment à l'aide de composés chimiques plus facilement maîtrisés que la thérapie génique.
- [0009] Ainsi, la présente invention repose sur la mise en évidence, par les inventeurs, de cette propriété du bazedoxifène.

Description détaillée de l'invention

- [0010] Les inventeurs ont montré que le bazedoxifène, un composé pharmacologique principalement connu dans la prévention et le traitement de l'ostéoporose postménopausée en raison de son action en tant que modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (ou SERM), est un candidat prometteur pour traiter les dysferlinopathies. La présente application révèle qu'il est efficace pour un large spectre de conditions associées à une fragilité des cellules musculaires, en particulier liée à l'intégrité de leurs membranes.
- Définitions**
- [0011] Les définitions ci-dessous donnent le sens généralement utilisé dans le cadre de l'invention et doivent être prises en compte sauf si une autre définition est explicitement indiquée.
- [0012] Dans le cadre de l'invention, les articles « un » et « une » sont utilisés pour désigner un ou plusieurs (c'est-à-dire au moins un) des objets grammaticaux de l'article. A titre d'exemple, « un élément » désigne au moins un élément, c'est-à-dire un ou plusieurs éléments.
- [0013] Les termes « environ », « à peu près », « de l'ordre de » ou « approximativement » utilisés dans le présent document pour désigner une valeur mesurable telle qu'une quantité, une durée et autres, doivent être compris comme englobant des variations de $\pm 20\%$ ou $\pm 10\%$, de préférence $\pm 5\%$, plus préférentiellement $\pm 1\%$, et encore plus avantageusement $\pm 0,1\%$ par rapport à la valeur spécifiée.
- [0014] Intervalles/plages : tout au long de cette divulgation, divers aspects de l'invention peuvent être présentés sous la forme d'un intervalle de valeurs (format de plage). Il faut comprendre que la description des valeurs sous la forme d'un intervalle n'est faite que par commodité et brièveté et ne doit pas être interprétée comme une limitation de la portée de l'invention. En conséquence, la description d'une gamme doit être considérée comme ayant spécifiquement divulgué toutes les sous-gammes possibles ainsi que les valeurs numériques individuelles dans cette gamme. Par exemple, la description d'une gamme telle que « de 1 à 6 » doit être considérée comme ayant spécifiquement

divulgué des sous-gammes telles que de 1 à 3, de 1 à 4, de 1 à 5, de 2 à 4, de 2 à 6, de 3 à 6, etc. ainsi que les nombres individuels à l'intérieur de cette gamme, par exemple 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 et 6. Ceci s'applique quelle que soit l'étendue de la plage.

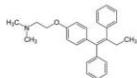
- [0015] « Isolé » signifie extrait ou retiré de son environnement ou état naturel. Par exemple, un acide nucléique ou un peptide isolé est un acide nucléique ou un peptide qui a été extrait de l'environnement naturel dans lequel il se trouve habituellement, que ce soit dans une plante ou un animal vivant par exemple. Un acide nucléique ou un peptide par exemple qui est naturellement présent dans un animal vivant n'est pas un acide nucléique ou un peptide isolé au sens de l'invention, alors que le même acide nucléique ou peptide partiellement ou complètement séparé des autres composants présents dans son environnement naturel est lui-même « isolé » au sens de l'invention. Un acide nucléique ou une protéine isolé peut exister sous une forme sensiblement purifiée, ou peut exister dans un environnement non natif tel que, par exemple, une cellule hôte.
- [0016] Le terme « anormal », lorsqu'il est utilisé dans le contexte d'organismes, de tissus, de cellules ou de composants de ceux-ci, désigne les organismes, tissus, cellules ou composants de ceux-ci qui diffèrent par au moins une caractéristique observable ou détectable (par exemple, l'âge, le traitement, l'heure de la journée, etc.) des organismes, tissus, cellules ou composants de ceux-ci qui présentent la caractéristique respective « normale » (attendue). Les caractéristiques, qui sont normales ou attendues pour un type de cellule ou de tissu, peuvent être anormales pour un autre type de cellule ou de tissu.
- [0017] Les termes « patient », « sujet », « individu » et autres sont utilisés de manière interchangeable dans le présent document et désignent tout animal ou cellule de celui-ci, in vitro ou in situ, pouvant être soumis aux méthodes décrites dans le présent document. Dans certains modes de réalisation non limitatifs, le patient, le sujet ou l'individu est un animal, de préférence un mammifère, plus avantageusement un humain, aussi bien de sexe féminin que masculin. Il peut également s'agir d'une souris, d'un rat, d'un porc, d'un chien ou d'un primate non humain (PNH), tel que le singe macaque.
- [0018] Au sens de l'invention, une « maladie » ou « pathologie » est un état de santé d'un animal dans lequel son homéostasie est affectée négativement et qui, si la maladie n'est pas traitée, continue à se détériorer. À l'inverse, au sens de l'invention, un « trouble » ou « dysfonctionnement » est un état de santé dans lequel l'animal est capable de maintenir son homéostasie mais dans lequel l'état de santé de l'animal est moins favorable qu'il ne le serait en l'absence du trouble. En l'absence de traitement, un trouble n'entraîne pas nécessairement une détérioration de l'état de santé de l'animal dans le temps.
- [0019] Une maladie ou un trouble est « atténué » (« réduit ») ou « amélioré » si la gravité d'un symptôme de la maladie ou du trouble, la fréquence à laquelle ce symptôme est
- ressenti par le sujet, ou les deux, sont réduits. Cela inclut également la disparition de la progression de la maladie, c'est-à-dire l'arrêt de la progression de la maladie ou du trouble. Une maladie ou un trouble est « guéri » (« rétabli ») si la gravité d'un symptôme de la maladie ou du trouble, la fréquence à laquelle un tel symptôme est ressenti par le patient, ou les deux, sont éliminés.
- [0020] Dans le contexte de l'invention, un traitement « thérapeutique » est un traitement administré à un sujet qui présente les symptômes (signes) d'une pathologie, dans le but de réduire ou de supprimer ces symptômes. Dans le cadre de l'invention, le « traitement d'une maladie ou d'un trouble » signifie la réduction de la fréquence ou de la gravité d'au moins un signe ou symptôme d'une maladie ou d'un trouble ressenti par le sujet. Un traitement est dit prophylactique lorsqu'il est administré pour prévenir le développement, la propagation ou l'aggravation d'une maladie, notamment si le sujet ne présente pas ou pas encore les symptômes de la maladie et/ou pour laquelle la maladie n'a pas été diagnostiquée.
- [0021] Tel qu'utilisé ici, « traiter une maladie ou un trouble » signifie réduire la fréquence ou la gravité d'au moins un signe ou symptôme d'une maladie ou d'un trouble ressenti par un sujet. Maladie et trouble sont utilisés de manière interchangeable dans le contexte du traitement selon l'invention.
- [0022] Au sens de l'invention, une « quantité efficace » ou une « quantité effective » d'un composé est la quantité de composé qui est suffisante pour fournir un effet bénéfique au sujet auquel le composé est administré. L'expression « quantité thérapeutiquement efficace » se réfère à une quantité qui est suffisante ou efficace pour prévenir ou traiter (en d'autres termes retarder ou empêcher le développement, empêcher la progression, inhiber, réduire, diminuer ou inverser) une maladie ou un trouble, y compris le soulagement des symptômes de cette maladie ou de ce trouble.
- [0023] La présente invention concerne donc l'utilisation d'un modulateur spécifique des récepteurs aux œstrogènes, avantageusement de troisième génération c'est-à-dire comprenant un groupement 2-phénylindole, encore plus avantageusement le bazedoxifène ou ses dérivés, pour lutter contre la fragilité voire la mort des cellules musculaires, et donc pour augmenter la survie musculaire.
- [0024] Les modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes (ou SERM) sont des molécules non stéroïdiennes capables de se fixer sur les récepteurs des œstrogènes. Ils possèdent des propriétés à la fois agonistes et antagonistes des œstrogènes. De telles molécules peuvent être identifiées grâce à des tests bien connus tels que le test « estrogen response element (ERE) transactivation assay » ou comme décrit par Nelson (2016, Methods Mol Biol: 431-443).
- [0025] En pratique, différents composés présentant une telle activité sont disponibles :
- [0026] Les SERM dits de première génération sont des dérivés de triphényléthylène.

5

[0027] De tels composés peuvent par exemple être choisis parmi :

[0028] le tamoxifène de formule :

[0029] [Chem.1]



[0030] le citrate de tamoxifène

[0031] le clomifène ou l'enclomifène ou le citrate de clomifène (CLOMID)

[0032] le toremifène ou le citrate de toremifène

[0033] l'afimoxifène (4-hydroxytamoxifène)

[0034] le levormeloxifène ou l'ormeloxifène

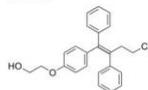
[0035] le droloxifène

[0036] l'idoxifène

[0037] le fispemifène

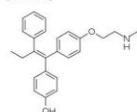
[0038] l'ospemifène ((deaminohydroxy)toremifène) de formule :

[0039] [Chem.2]



[0040] l'endoxifène de formule :

[0041] [Chem.3]

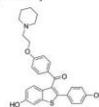


[0042] Les SERM dits de deuxième génération sont des dérivés de benzothiophène par exemple :

[0043] le raloxifène de formule :

6

[0044] [Chem.4]



[0045] l'arzoifène

[0046] Les SERM dits de troisième génération sont des dérivés de 2-phénylindole de

formule :

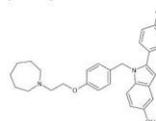
[0047] [Chem.5]



[0048] De tels composés peuvent par exemple être choisis parmi :

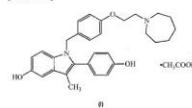
[0049] le bazédoxifène (numéro CAS : 198481-32-2) de formule :

[0050] [Chem.6]



[0051] l'acétate de bazédoxifène de formule :

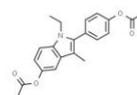
[0052] [Chem.7]



[0053] le zindoxifène de formule :

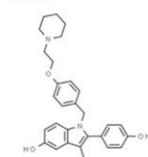
7

[0054] [Chem.8]



[0055] le pipendoxifène de formule :

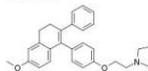
[0056] [Chem.9]



[0057] D'autres SERM potentiellement d'intérêt sont :

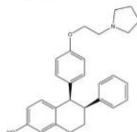
[0058] la nafoxidine de formule :

[0059] [Chem.10]



[0060] le lasofoxifène de formule :

[0061] [Chem.11]



[0062] De manière préférée, le composé mis en œuvre dans le cadre de la présente invention

8

est un SERM et/ou comprend un groupement 2-phénylindole de formule :

[0063] [Chem.5]



[0064] Avantagusement, il est choisi dans le groupe constitué de : le bazédoxifène, l'acétate de bazédoxifène, le zindoxifène, le pipendoxifène, leurs dérivés et/ou leurs combinaisons.

[0065] Alternativement, il peut s'agir de l'ospemifène, de l'endoxifène ou du raloxifène.

[0066] Selon un mode de réalisation particulier, il ne s'agit pas du tamoxifène, ni du fispemifène.

[0067] Encore plus avantagusement, il s'agit du bazédoxifène ou de l'acétate de bazédoxifène.

[0068] Le bazédoxifène a été approuvé par la FDA et l'ANSM pour la prévention de l'ostéoporose postménopausée. Ce médicament, commercialisé sous la dénomination Conbriza®, se présente sous la forme de comprimés contenant 20 mg d'acétate de bazédoxifène (avec un noyau du comprimé contenant : Lactose monohydraté (142,8 mg) + Cellulose microcristalline + Amidon pré-gélatinisé (maïs) + Glycolate sodique d'amidon + Laurylsulfate de sodium + Silice colloïdale anhydre + Stéarate de magnésium + Acide ascorbique et un pelliculage contenant : Hypromellose + Dioxyde de titane (E171) + Macrogol 400), avec une prise quotidienne par voie orale de 1 comprimé.

[0069] Sont également visés par la présente invention les dérivés de ces composés, notamment du bazédoxifène, ayant la même activité biologique, notamment celle de SERM ou celle rapportée dans les exemples, par exemple sur la survie des cellules musculaires en conditions de choc osmotique.

[0070] Le terme « dérivés » englobe les dérivés et les métabolites, ainsi que les sels pharmaceutiquement acceptables. Un dérivé est un composé provenant d'un autre (le précurseur, avec une structure chimique typiquement similaire) après transformation de ce dernier. Le dérivé peut différer par un ou plusieurs atomes ou groupes fonctionnels. Un métabolite est un composé intermédiaire stable ou un composé résultant de la transformation biochimique d'une molécule initiale par métabolisme.

[0071] Par « sels pharmaceutiquement acceptables », on entend les sels d'addition du composé, qui peuvent être obtenus par réaction de ce composé avec un acide minéral ou organique selon une méthode connue en soi. Parmi les acides qui peuvent être utilisés à cet effet, on peut citer les acides chlorhydrique (HCl), bromhydrique, sulfurique, phosphorique, 4-toluène sulfonique, méthane sulfonique, cyclohexyl

- sulfamique, oxalique, succinique, formique, fumarique, maléique, citrique, aspartique, cinnamique, lactique, glutamique. Les acides N-acétyl-aspartique, N-acétyl-glutamique, ascorbique, malique, benzoïque, nicotinique et acétique. A titre d'exemple, l'acétate de bazédoxifène est couramment utilisé dans le domaine pharmaceutique.
- [0072] Parmi les esters sur la fonction hydroxy, on peut citer les esters d'acide carboxylique ayant de 1 à 6 atomes de carbone.
- [0073] Lesdits composés, notamment le bazédoxifène, peuvent être modifiés pour augmenter leur stabilité, leur biodisponibilité et/ou leur capacité à atteindre les tissus cibles, notamment les tissus et les cellules musculaires.
- [0074] De manière connue par l'homme du métier, lesdits composés, notamment le bazédoxifène, peuvent être présents dans la composition sous une forme nue (libre) ou contenus dans des systèmes de délivrance qui augmentent la stabilité. Le ciblage et/ou la biodisponibilité, tels que des liposomes, ou incorporés dans des supports tels que des hydrogels, des cyclodextrines, des nanocapsules biodégradables, des microsphères bio-adhésives, des vecteurs ou en combinaison avec un peptide cationique.
- [0075] La présente invention concerne également les compositions pharmaceutiques contenant en tant que principe actif au moins un composé tel que défini ci-dessus, ainsi que l'utilisation de ce composé ou de cette composition en tant que médicament ou produit médicamenteux.
- [0076] Ainsi, la présente invention vise des compositions pharmaceutiques comprenant un composé selon l'invention. Avantagusement, ces compositions comprennent une quantité thérapeutiquement efficace dudit composé, et un support pharmaceutiquement acceptable. Dans un mode de réalisation particulier, le terme « pharmaceutiquement acceptable » signifie approuvé par un organisme de réglementation du gouvernement fédéral ou d'un État ou inscrit dans la pharmacopée américaine ou européenne ou dans une autre pharmacopée généralement reconnue pour une utilisation chez les animaux et les humains. Le terme « support » désigne un diluant, un adjuvant, un excipient ou un véhicule avec lequel le produit thérapeutique est administré. Ces supports pharmaceutiques peuvent être des liquides stériles, comme l'eau et les huiles, y compris celles d'origine pétrolière, animale, végétale ou synthétique, comme l'huile d'arachide, l'huile de soja, l'huile minérale, l'huile de sésame et autres. Les solutions salines et les solutions aqueuses de dextrose et de glycérol peuvent également être employées comme supports liquides, notamment pour les solutions injectables. Les excipients pharmaceutiques appropriés comprennent l'amidon, le glucose, le lactose, le saccharose, le stéarate de sodium, le monostéarate de glycérol, le talc, le chlorure de sodium, le lait écrémé en poudre, le glycérol, le propylène glycol, l'eau, l'éthanol et autres.

- µM, voire entre 300 nM et 2 µM.
- [0083] Une voie d'administration appropriée doit permettre la délivrance d'une quantité thérapeutiquement efficace du produit thérapeutique aux tissus cibles, en fonction de la maladie.
- [0084] Les voies d'administration disponibles sont les suivantes : topique (locale), entérale (action systémique, mais délivrée par le tractus gastro-intestinal (GI)), ou parentérale (action systémique, mais délivrée par des voies autres que le tractus GI). Dans le cas spécifique des maladies musculaires, la voie d'administration préférée des compositions divulguées ici est généralement entérale, ce qui inclut l'administration orale. Selon d'autres modes de réalisation, il peut s'agir d'une administration parentérale, notamment par voie intramusculaire (c'est-à-dire dans le muscle) ou systémique (c'est-à-dire dans le système circulant). Dans ce contexte, le terme « injection » (ou « perfusion » ou « infusion ») englobe l'administration intravasculaire, en particulier intraveineuse (IV), et intramusculaire (IM). Les injections sont généralement réalisées à l'aide de seringues ou de cathéters.
- [0085] Selon un mode de réalisation, la composition est administrée par voie orale, intramusculaire, intrapéritonéale, sous-cutanée, topique, locale ou intravasculaire, avantagusement par voie orale. Selon un mode de réalisation préféré, la composition est destinée à une administration orale.
- [0086] Comme déjà mentionné, une composition selon l'invention se présente de préférence sous une forme galénique solide adaptée à l'administration orale, avantagusement sous la forme d'une ou plusieurs capsules ou comprimés. Ainsi, ils peuvent être pris avec un peu d'eau avant ou pendant le repas principal. Selon un mode de réalisation préféré, la composition selon l'invention est administrée quotidiennement, par exemple une fois par jour. Le traitement peut durer plusieurs semaines, plusieurs mois, plusieurs années ou même toute la vie.
- [0087] Comme déjà indiqué, le patient est avantagusement un humain, notamment un nouveau-né, un jeune enfant, un adolescent ou un adulte, quel que soit son sexe. L'outil thérapeutique selon l'invention peut toutefois être adapté et utile pour le traitement d'autres animaux, notamment le porc, la souris, le chien ou le singe macaque.
- [0088] De manière générale, la présente invention a pour but de lutter contre (ou réduire ou atténuer ou préserver) la mortalité et/ou la fragilité des cellules, fibres ou tissus musculaires, en d'autres termes à améliorer (ou augmenter ou préserver) la survie et/ou la force et/ou la fonction musculaire. En effet et comme démontré dans la présente demande, les composés décrits ci-dessus améliorent la résistance membranaire notamment au stress, par exemple en conditions de choc osmotique ou après irradiation laser.

- [0077] La composition, le cas échéant, peut également contenir des quantités mineures d'agents mouillants ou émulsifiants, ou d'agents tampons du pH. Ces compositions peuvent prendre la forme de solutions, de suspensions, d'émulsions, de formulations à libération prolongée et autres. Des exemples de supports pharmaceutiques appropriés sont décrits dans « Remington's Pharmaceutical Sciences » de E. W. Martin. Ces compositions contiennent une quantité thérapeutiquement efficace de l'agent thérapeutique, de préférence sous forme purifiée, ainsi qu'une quantité appropriée de support de manière à fournir la forme permettant une administration adéquate au sujet.
- [0078] Dans un mode de réalisation préféré, la composition est formulée conformément aux procédures de routine comme une composition pharmaceutique adaptée, par exemple, à l'administration orale à des êtres humains. Typiquement, les compositions pour l'administration orale sont sous la forme de comprimés, éventuellement de comprimés sécables ou de comprimés effervescents, contenant en outre des excipients adaptés à la forme posologique solide et à l'administration chez l'homme. À titre d'exemple, les formes commerciales disponibles de bazédoxifène sont des comprimés qui contiennent en outre du lactose monohydraté, de la cellulose microcristalline, de l'amidon pré-gélatinisé (maïs), du glycolate sodique d'amidon, du laurylsulfate de sodium, de la silice colloïdale anhydre, du stéarate de magnésium et de l'acide ascorbique. Ces comprimés peuvent être écrasés et mélangés à des liquides.
- [0079] Alternativement, la composition peut être sous une forme liquide, avantagusement une composition aqueuse. Tout autre solvant approprié peut être utilisé.
- [0080] La quantité de l'agent thérapeutique de l'invention, c'est-à-dire un composé tel que décrit ci-dessus, qui sera efficace dans le traitement d'une maladie peut être déterminée par des techniques cliniques standard. En outre, des essais in vivo et/ou in vitro, tels que ceux décrits dans les exemples ci-dessous, peuvent éventuellement être utilisés pour aider à prédire les plages de dosage optimales. La dose précise à employer dans la formulation dépendra également de la voie d'administration, du poids et de la gravité de la maladie, et doit être décidée selon le jugement du praticien et les conditions de chaque patient.
- [0081] Selon un mode de réalisation particulier, la composition de l'invention se présente sous une forme solide, avantagusement un comprimé, comprenant 20 mg du composé actif, notamment du bazédoxifène ou de l'acétate de bazédoxifène, voire moins. De préférence, la composition comprend une quantité égale ou inférieure à 20 mg, 15 mg, 10 mg, voire égale ou inférieure à 5 mg.
- [0082] Selon un autre mode de réalisation, la composition de l'invention se présente sous une forme liquide et comprend avantagusement moins de 30 µM ou 10 µM du composé actif, notamment du bazédoxifène ou de l'acétate de bazédoxifène, plus avantagusement entre 30 nM et 10 µM, encore plus avantagusement entre 100 nM et 5

- [0089] Ainsi et comme déjà mentionné, la présente invention concerne le traitement des maladies associées à une fragilité musculaire, notamment une instabilité de la membrane des cellules musculaires. En d'autres termes, la présente invention peut contribuer à améliorer la survie musculaire, et par conséquent la fonction musculaire, en particulier la force musculaire.
- [0090] Comme illustré dans les exemples, la fragilité musculaire, notamment des membranes des cellules musculaires, peut être évaluée à l'aide de tests in vitro en conditions de choc osmotique.
- [0091] Ainsi et de manière plus précise, l'invention vise aussi bien :
- [0092] une composition comprenant un composé tel que décrit ci-dessus, en particulier du bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, pour traiter des pathologies associées à une fragilité musculaire ;
- [0093] l'utilisation d'un composé tel que décrit ci-dessus, en particulier du bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, pour la préparation d'un médicament destiné à traiter des pathologies associées à une fragilité musculaire ;
- [0094] une méthode de traitement de pathologies associées à une fragilité musculaire comprenant l'administration d'un composé tel que décrit ci-dessus, en particulier de bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole ;
- [0095] une composition comprenant un composé tel que décrit ci-dessus, en particulier du bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, pour augmenter la survie/ fonction/force musculaire ;
- [0096] l'utilisation d'un composé tel que décrit ci-dessus, en particulier du bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, pour augmenter la survie/fonction/force musculaire ;
- [0097] une méthode pour augmenter la survie/fonction/force musculaire comprenant l'administration d'un composé tel que décrit ci-dessus, en particulier de bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole.
- [0098] En effet, il existe un certain nombre de conditions dans lesquelles la fonction musculaire est affaiblie.
- [0099] Il peut tout d'abord s'agir de conditions pathologiques, en particulier dans le cas des maladies neuromusculaires.
- [0100] Ainsi, les dystrophies musculaires causées par des mutations dans le gène de la

13

- dysferline (DYSF) telles que la dysferlinopathie (LGMD 2B ou R2), la myopathie distale de type Miyoshi et la myopathie du compartiment distal antérieur sont des pathologies particulièrement visées mais toutes les formes de maladies neuromusculaires, en particulier les dystrophies musculaires, peuvent être traitées.
- [0101] Comme démontré dans les exemples, la dysferlinopathie (LGMD 2B ou R2) liée à la mutation L1341P, G299R ou S1173X peut ainsi être prise en charge.
- [0102] Dans certains modes de réalisation, un composé tel que décrit ou une composition pharmaceutique le comprenant est destiné à être utilisé pour traiter des maladies musculaires (c'est-à-dire, myopathies) ou des lésions musculaires, en particulier des troubles génétiques neuromusculaires, sans atteinte hépatique, comme par exemple : les dystrophies musculaires, les dystrophies musculaires congénitales, les myopathies congénitales, les myopathies distales, les autres myopathies, les syndromes myotoniques, les maladies musculaires à canal ionique, l'hyperthermie maligne, les myopathies métaboliques et les autres troubles neuromusculaires, avantageusement les dystrophies musculaires, les dystrophies musculaires congénitales, les myopathies congénitales, les myopathies distales et les autres myopathies.
- [0103] Les dystrophies musculaires qui peuvent ainsi être prises en charge comprennent notamment :
- [0104] - Les dystrophinopathies, un spectre de maladies musculaires liées au chromosome X, causées par des variants pathogènes du gène DMD, qui code pour la protéine dystrophine. Les dystrophinopathies comprennent la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), la dystrophie musculaire de Becker (BMD) et la cardiomyopathie dilatée associée à la DMD ;
- [0105] - Les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD), qui sont un groupe de troubles cliniquement similaires à la DMD, mais qui surviennent chez les deux sexes en raison d'une transmission autosomique récessive ou autosomique dominante. Les dystrophies des ceintures sont causées par la mutation de gènes qui codent pour les sarcoglycanes et d'autres protéines associées à la membrane des cellules musculaires, qui interagissent avec la dystrophine. Le terme LGMD1 désigne les types génétiques présentant une hérédité dominante (autosomique dominante), tandis que le terme LGMD2 désigne les types présentant une hérédité autosomique récessive. Des variants pathogènes ont été signalés sur plus de 50 loci (LGMD1A à LGMD1H ; LGMD2A à LGMD2Y) ;
- [0106] - La calpainopathie (LGMD2A/R1) est causée par une mutation du gène CAPN3, avec plus de 450 variantes pathogènes décrites.
- [0107] Une liste non limitative de ces maladies comprend : myopathie centronucléaire, avantageusement myopathie myotubulaire liée à l'X (XLMTM) et maladie de Charcot-Marie-Tooth, dystrophie musculaire des ceintures, avantageusement LGMD2A/R1, LGMD2B/R2, LGMD2D/R3 ou LGMD2I/R9, LGMD1D/D1, LGMD2L/R12.

15

- SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, à la greffe de cellules (myoblastes, cellules souches, ...). Cette administration peut se faire de manière simultanée ou décalée dans le temps.
- [0115] Il peut aussi être avantageux de combiner une thérapie génique, destinée au traitement d'une maladie neuromusculaire, avec l'administration d'un composé tel que décrit ci-dessus, en particulier de bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole. Ainsi et selon un mode de réalisation privilégié, un gène thérapeutique, tel que le gène natif de la dysferline, est associé au traitement par un composé tel que décrit ci-dessus, en particulier le bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole. L'administration des 2 traitements peut se faire de manière simultanée ou décalée dans le temps.
- [0116] Ce traitement peut également être combiné à des traitements permettant une augmentation de la survie des cellules musculaires tels que l'administration de décorine (WO2010/106295), de lumican ou de fibromoduline (WO2013/072587).
- [0117] Les effets avantageux du bazédoxifène comme représentant des composés tels que décrits ci-dessus, en particulier des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, se traduisent par une augmentation de la survie des cellules musculaires notamment en conditions de choc osmotique. Ces effets positifs peuvent être observés pour les différents muscles squelettiques, aussi bien chez un organisme atteint d'une pathologie associée à une fragilité musculaire que chez un individu sain. A priori, aucun effet secondaire, ni aucune réaction immunologique n'est à déplorer.
- [0118] Une autre application possible des composés tels que décrits ci-dessus, en particulier du bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, est la culture in vitro ou ex vivo des myoblastes, des myotubes ou des fibres musculaires (ou myofibrilles), par exemple comme décrit par Tominga et al. (iScience : 2021 Dec 20 ; 25(1) :103667). Ces cellules ou tissus peuvent aussi bien provenir d'organismes sains qu'atteints des pathologies susmentionnées.
- [0119] La mise en œuvre de la présente invention emploie, sauf indication contraire, des techniques conventionnelles de biologie moléculaire (y compris les techniques de recombinaison), de microbiologie, de biologie cellulaire, de biochimie et d'immunologie, connues de l'homme du métier. Ces techniques sont expliquées en détail dans la littérature, notamment dans « Molecular Cloning : A Laboratory Manual », quatrième édition (Sambrook, 2012) ; « Oligonucleotide Synthesis » (Gait, 1984) ; « Culture of Animal Cells » (Freshney, 2010) ; « Methods in Enzymology » « Handbook of Expe-

14

- dystrophie musculaire congénitale de type 1C (MDC1C), syndrome de Walker-Warburg (WWS), maladie muscle-œil-cerveau (MEB), dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou de Becker (BMD), dystrophie musculaire congénitale avec déficit en sélénoprotéine N, dystrophie musculaire congénitale avec déficience en sélénoprotéine N, dystrophie musculaire congénitale avec déficience en mérosine primaire, dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich, myopathie congénitale à noyau central, myopathie congénitale multi-minicore, myopathie autosomale centronucléaire, myopathie avec disproportion de fibres, myopathie némaline, syndromes myasthéniques congénitaux, myopathie distale de Miyoshi, dysferlinopathies, dystroglycanopathies et sarcoglycanopathies. Dans certains modes de réalisation, la composition pharmaceutique de l'invention est destinée à être utilisée pour traiter la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou de Becker (BMD), la dystrophie musculaire congénitale des ceintures, avantageusement LGMD2A/R1, LGMD2B/R2, LGMD2D/R3, LGMD2I/R9, LGMD1D/D1 ou LGMD2L/R12.
- [0108] En outre, la cachexie ou marasme est également un état pathologique visé par la présente invention. Cet état se caractérise par une maigreur extrême, en particulier au niveau musculaire, provoquée par une longue maladie ou un apport protéinique ou calorique insuffisant.
- [0109] Cet état pathologique est notamment observé dans les cas de maladies chroniques telles que le cancer ou le SIDA ou chez les personnes souffrant soit d'insuffisance cardiaque - il y a une atrophie des muscles squelettiques chez 68% des patients -, soit d'incontinence urinaire.
- [0110] Sans être considérées comme pathologiques à proprement parler, certaines situations sont associées à une perte ou détérioration de la fonction ou force musculaire : vieillissement, immobilisation prolongée... Il existe donc là encore un intérêt à améliorer la survie musculaire et ainsi à augmenter la fonction ou la force musculaire.
- [0111] Ainsi, la présente invention repose sur la mise en évidence de propriétés protectrices du bazédoxifène comme représentant des SERM en particulier de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, sur les membranes des cellules musculaires notamment.
- [0112] Comme déjà dit, une composition comprenant un composé selon l'invention, destinée au traitement des pathologies associées à une fragilité musculaire ou destinée à l'amélioration de la survie musculaire, peut en outre contenir tout composé ou excipient acceptable, notamment pharmaceutique.
- [0113] Ce traitement peut également être associé à d'autres traitements, destinés à traiter la même pathologie ou le même état.
- [0114] Pour favoriser la prise de greffe de cellules précurseurs ou cellules souches, il peut être avantageux d'associer l'administration de bazédoxifène comme représentant des

16

- rimental Immunology » (Weir, 1997) ; « Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells » (Miller and Calos, 1987) ; « Short Protocols in Molecular Biology » (Ausubel, 2002) ; « Polymerase Chain Reaction : Principles, Applications and Troubleshooting » (Babar, 2011) ; « Current Protocols in Immunology » (Coligan, 2002). Des techniques particulièrement utiles pour des modes de réalisation particuliers seront discutées dans les sections qui suivent.
- [0120] Les divulgations de chaque brevet, demande de brevet et publication cités dans la présente demande sont incorporées par référence dans leur intégralité.
- [0121] Sans autre description, il est considéré que l'homme du métier peut, en utilisant la description et les exemples illustratifs suivants, produire et utiliser les composés de la présente invention et mettre en œuvre les méthodes revendiquées.
- [0122] Exemples de réalisation
- [0123] L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples de réalisation suivants, à l'appui des figures annexées. Ceux-ci n'ont toutefois aucune portée limitative.
- [0124] L'invention est illustrée plus avant à l'aide de bazédoxifène, noté Bazedoxifène, ou d'acétate de bazédoxifène, noté Bazedoxifène acetate, testé sur des myoblastes immortalisés.
- Légendes des figures**
- [0125] Les Figures 1A et 1B illustrent l'effet du Bazedoxifène sur la quantité et la localisation de la dysferline L1341P.
- [0126] [Fig.1A] Quantification du nombre de cellules positives à la dysferline (●) et de la viabilité (■) après traitement des myoblastes immortalisés L1341P avec des concentrations croissantes de Bazedoxifène. Les valeurs sont normalisées par le traitement avec 0,1% DMSO et chaque point représente la moyenne ± déviation standard de quatre réplicats d'une expérience représentative (N=3).
- [0127] [Fig.1B] Analyse par immunofluorescence de la localisation de la dysferline après traitement avec 0,1% DMSO ou la dose maximale effective (5µM) de Bazedoxifène. Le réticulum endoplasmique, l'appareil de golgi, les lysosomes et les autophagosomes sont également identifiés avec les marquages KDEL, GM130, Lamp1 et LC3B. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Barre d'échelle = 10 µM.
- [0128] Les Figures 2A, 2B, et 2C illustrent la mesure de la protection du Bazedoxifène contre le choc osmotique.
- [0129] [Fig.2A] Visualisation et [Fig.2B] quantification de la mortalité induite par le choc osmotique des myoblastes immortalisés L1341P après traitement avec des concentrations croissantes de Bazedoxifène ou 0,03% DMSO.
- [0130] [Fig.2C] Détermination de la durée nécessaire (heures) de choc osmotique pour induire 50% de mortalité des cellules.

17

- [0131] Chaque point ou barre représente la moyenne \pm déviation standard de quatre répliqués d'une expérience représentative.
- [0132] BZA = Bazedoxifène.
- [0133] Les Figures 3A, 3B, 3C et 3D illustrent l'effet protecteur du Bazedoxifène indépendant de la mutation.
- [0134] Mesure de l'effet du Bazedoxifène et/ou du Bazedoxifène acétate à $2\mu\text{M}$ sur la viabilité cellulaire en réponse au choc osmotique dans différentes lignées de myoblastes immortalisés portant les mutations [Fig.3A] L1341P (missense 1), [Fig.3B] G299R (missense 2), [Fig.3C] S1173X (ko) ou [Fig.3D] aucune mutation de la dysferline. Chaque point représente la moyenne \pm déviation standard de quatre répliqués d'une expérience représentative.
- [0135] I) MATERIELS ET METHODES
- [0136] Culture cellulaire et traitement pharmacologique
- [0137] Les myoblastes immortalisés utilisés dans cette étude sont issus de patients atteint de la LGMDR2.
- [0138] La principale lignée cellulaire utilisée (814) provient d'une biopsie du muscle vaste latéral d'un patient masculin de 57 ans porteur de la mutation suivante : homozygote c.4022T>C ; p.L1341P. Les cellules ont été isolées par l'équipe du Dr Simone Spuler (Université de médecine – Charité, Berlin) puis immortalisées par l'équipe du Dr Vincent Mouly (Institut de Myologie, Paris). Pour les expériences de choc osmotique, les lignées de myoblastes immortalisés 107 et AB320 utilisées sont porteuses des mutations suivantes : hétérozygote c.855+1delG, c.895G>A ; mRNA decay. p.G299R et hétérozygote c.342-1G>A, c.3516_3517delTT ; / , p.Ser1173X.
- [0139] Les cellules ont été cultivées dans un milieu de prolifération de cellules musculaires : 1 volume de milieu 199 (Invitrogen, 41150020) pour 4 volumes de DMEM (Invitrogen, 61965-025), supplémentés par 20% de SVF, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fétaline (Life Technologies, 10344026), 5 ng/ml de hEGF (Life Technologies, PHG0311), 0.5 ng/ml bFGF (Life Technologies, PHG0026), 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Dexaméthasone (Sigma, D4902) et 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Insuline (Sigma, 91077). Les cellules ont été ensemencées sur plaques préalablement revêtues de 0.1% gélatine et maintenues sous atmosphère contrôlée à 37°C et 5% CO₂.
- [0140] Soixante-douze heures après l'ensemencement, les cellules ont été traitées avec le composé bazedoxifène HCl ou acétate de bazedoxifène (Selleckchem) ou le diméthylsulfoxyde (DMSO, VWR) comme contrôle négatif. Les cellules ont été analysées après 24 heures de traitement.
- [0141] Quantification de l'expression de la dysferline et test de viabilité
- [0142] Après 24 heures de traitement, les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde (10 minutes, température ambiante). L'immunofluorescence a été réalisée

19

- négatif (DMSO).
- [0147] II) RESULTATS
- [0148] 1/ Identification du Bazedoxifène comme un inhibiteur de la dégradation de la protéine dysferline mal conformée
- [0149] Comme démontré dans la [Fig.1A], l'utilisation de doses croissantes de Bazedoxifène entraîne une augmentation du nombre de myoblastes immortalisés mutés L1341P exprimant au moins un agrégat de dysferline, sans révéler de toxicité significative, hormis à très hautes doses. Cet effet est confirmé par l'analyse histologique présentée dans la [Fig.1B] : en présence de la dose maximale effective de Bazedoxifène (5 μM), la quantité de dysferline détectée dans les myoblastes immortalisés L1341P est augmentée en comparaison au traitement contrôle DMSO.
- [0150] Il a été démontré que la mutation L1341P entraîne la mauvaise conformation de la dysferline, son absence au sarcolemme et son agrégation au niveau du réticulum endoplasmique ; entraînant ainsi une fragilité membranaire et in fine la mort des cellules musculaires. L'analyse de la localisation de la dysferline L1341P, par le marquage de différents compartiments cellulaires en [Fig.1B], démontre la sortie de la protéine du réticulum endoplasmique après traitement au Bazedoxifène.
- [0151] Sur la base de ces expériences l'hypothèse formulée peut être que le Bazedoxifène empêche la dégradation par le système de l'ERAD de la protéine mal conformée, augmentant ainsi la quantité de dysferline fonctionnelle dans les cellules musculaires et potentiellement sa fonctionnalité à la membrane et la survie cellulaire.
- [0152] 2/ Le Bazedoxifène améliore la survie cellulaire
- [0153] Afin de démontrer une fonctionnalité du Bazedoxifène sur la fragilité des cellules musculaires, la survie des myoblastes immortalisés L1341P traités a été évaluée après un choc osmotique déstabilisateur des membranes cellulaires. La [Fig.2A] et la [Fig.2B] démontrent qu'à des doses adaptées de Bazedoxifène, le traitement des myoblastes immortalisés L1341P se traduit par une augmentation de la viabilité cellulaire en conditions de choc osmotique. De plus, d'après la [Fig.2C], la survie des cellules musculaires est fortement améliorée après traitement avec une dose équivalente à l'EC50 de Bazedoxifène qui entraîne notamment une augmentation de plus de 40% du nombre de myoblastes positifs à la dysferline ([Fig.1A] et [Fig.1B]).
- [0154] La [Fig.3A], la [Fig.3B], la [Fig.3C] et la [Fig.3D] confirment que l'effet protecteur du Bazedoxifène (HCl ou acétate) sur la survie cellulaire en conditions de choc osmotique, et donc sur la viabilité des cellules musculaires, résulte d'un effet plus général sur les cellules et non uniquement sur la dysferline agrégée. En effet, les myoblastes immortalisés résistent de façon similaire au choc osmotique après traitement au Bazedoxifène qu'ils soient porteurs des mutations L1341P (missense 1), G299R (missense 2), S1173X (ko) de la dysferline. De manière surprenante, ce même

18

dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) supplémentée avec 0.1% de Triton pour la perméabilisation (5min, température ambiante) puis 1% d'albumine de sérum bovin (BSA ; Sigma) pour le blocage (1 heure, température ambiante). Pour la première étape d'hybridation les cellules ont été incubées (sur la nuit, 4°C) avec les anticorps lapin anti-Dysferline (abcam, ab124684) et chèvre anti Desmine (R&D, AF3844). Les marquages ont ensuite été révélés pendant la deuxième étape d'hybridation par incubation (1 heure, température ambiante) avec des anticorps secondaires conjugués avec un fluorochrome (Invitrogen, anti lapin vert et anti chèvre rouge) et les noyaux ont été marqués au Hoechst (Invitrogen, 33342). L'expression de la dysferline a été analysée par l'imagerie CellInsight CX7 (Cellomics Inc). Le premier canal est utilisé pour l'identification des noyaux, le second pour la segmentation des cellules et le troisième pour l'identification et la quantification des agrégats de dysferline. Les images ont été acquises avec un objectif 20x à haute résolution et ont été analysées avec une bioapplication de colocalisation. A l'aide d'un seuillage sur le niveau d'intensité de la dysferline, le nombre de cellules positive à un marquage dysferline (minimum un agrégat de dysferline dans la cellule) a pu être calculé de sorte à ce qu'il soit inférieur à 10% avec le contrôle négatif. Le nombre de cellules total a été déterminé en comptant les cellules colorées par le Hoechst par puit, ce qui a permis de quantifier la viabilité cellulaire en normalisant avec le contrôle négatif.

- [0143] Localisation de la dysferline
- [0144] Après 24 heures de traitement au Bazedoxifène (EC50=5 μM) les cellules ont été fixées et marquées (sur la nuit, 4°C) avec les anticorps primaires suivants : anti Dysferline (Novocastra), Kdel (EnzoLife), GM130 (BD Biosciences), LAMP (Abcam) et LC3 A/B (ThermoScientific). Après lavages, les marquages ont ensuite été révélés à l'aide d'anticorps secondaires couplés à des fluorochromes (1 heure, température ambiante) et analysés à l'aide d'un microscope confocal (LSM 880, Carl Zeiss). Les images ont été acquises avec un objectif 63x à huile.
- [0145] Choc Osmotique
- [0146] Les cellules ont été ensemencées en plaques 96 puits et traitées avec différentes concentrations de Bazedoxifène, comme indiqué, pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 3 heures avec une sonde rouge de viabilité (1/3000, Incucyte® Nuclight Rapid Red Dye - Sartorius). Une fois la sonde incorporée par les noyaux des cellules vivantes (vérification incuCyte), un choc osmotique composé de 25% de PBS et 75% d'eau a été appliqué en présence d'une sonde verte de mortalité (1/3000, Incucyte® Caspase-3/7 Green Dye - Sartorius). Les marquages rouge et vert ont été acquis toutes les 90 minutes pendant 72 heures avec un IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis, permettant ainsi de mesurer la résistance des cellules au choc osmotique (ratio vert sur rouge) après traitement pharmacologique en comparaison au contrôle

20

effet est observé dans des cellules WT, c'est-à-dire des myoblastes immortalisés non mutés dans le gène de la dysferline.

- [0155] La présente application révèle ainsi que le Bazedoxifène est efficace pour un large spectre de conditions associées à une fragilité des cellules musculaires, en particulier liées à l'intégrité de leurs membranes.

Revendications

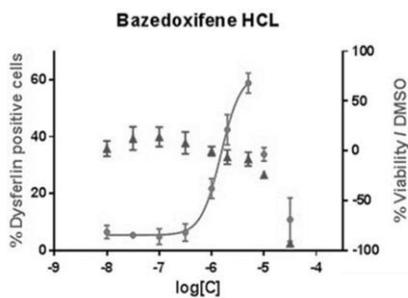
- [Revendication 1] Composé comprenant un groupement 2-phénylindole pour utilisation dans le traitement des pathologies associées à une fragilité musculaire.
- [Revendication 2] Composé pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce que les pathologies sont choisies dans le groupe comprenant : les maladies neuromusculaires, avantageusement les dystrophies musculaires telles que les dysferlinopathies, et les cachexies.
- [Revendication 3] Utilisation non thérapeutique d'un composé comprenant un groupement 2-phénylindole pour l'amélioration de la survie musculaire, en particulier la résistance au stress.
- [Revendication 4] Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'amélioration de la survie musculaire vise à compenser une détérioration résultant d'une immobilisation ou de la vieillesse.
- [Revendication 5] Composé pour son utilisation selon la revendication 1 ou 2 ou utilisation selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que le composé est un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes (SERM).
- [Revendication 6] Composé pour son utilisation selon l'une des revendications 1, 2 et 5 ou utilisation selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisé en ce que le composé est le bazédoxifène ou l'acétate de bazédoxifène.
- [Revendication 7] Composé pour son utilisation selon l'une des revendications 1, 2, 5 et 6 ou utilisation selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que le composé est formulé dans une composition sous une forme adaptée à une administration par voie orale.
- [Revendication 8] Composé pour son utilisation selon l'une des revendications 1, 2 et 5 à 7 ou utilisation selon l'une des revendications 3 à 7, caractérisé en ce que le composé est formulé dans une composition se présentant sous forme solide, avantageusement un comprimé.
- [Revendication 9] Composé pour son utilisation selon la revendication 8 ou utilisation selon la revendication 8, caractérisé en ce que la composition, avantageusement le comprimé, comprend 20 mg de bazédoxifène ou d'acétate de bazédoxifène.
- [Revendication 10] Composé pour son utilisation selon l'une des revendications 1, 2 et 5 à 9 ou utilisation selon l'une des revendications 3 à 9, caractérisée en ce que le composé est associé à d'autres traitements, notamment la thérapie génique et la greffe de cellules.

Abrégé

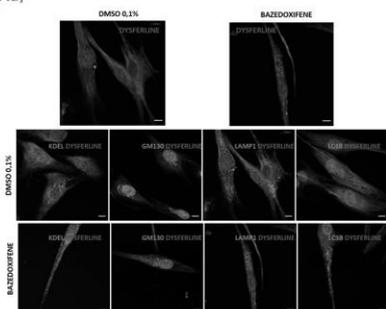
UTILISATION DU BAZEDOXIFENE POUR AUGMENTER LA SURVIE MUSCULAIRE
L'invention concerne l'utilisation du bazédoxifène comme représentant des SERM de troisième génération, à savoir des composés comprenant un groupement 2-phénylindole, pour augmenter la survie musculaire, notamment dans le traitement des dysferlinopathies.

1/4

[Fig. 1A]
A/

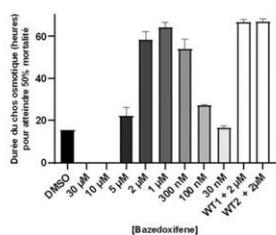


[Fig. 1B]
B/

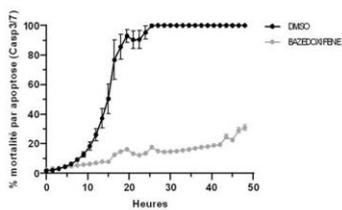


3/4

[Fig. 2C]
C/

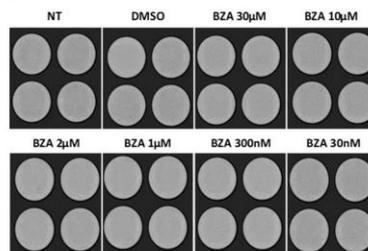


[Fig. 3A]
A/

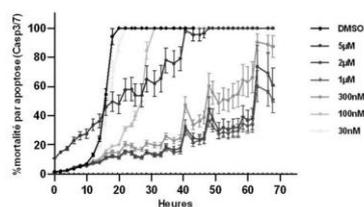


2/4

[Fig. 2A]
A/

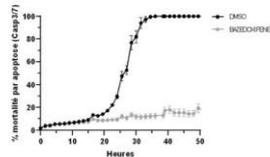


[Fig. 2B]
B/

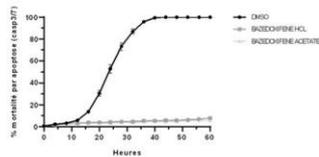


4/4

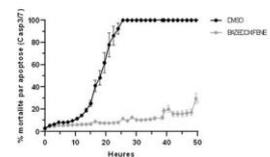
[Fig. 3B]
B/



[Fig. 3C]
C/



[Fig. 3D]
D/



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Aartsma-Rus, A., Janson, A.A.M., Kaman, W.E., Bremmer-Bout, M., van Ommen, G.-J.B., den Dunnen, J.T., van Deutekom, J.C.T., 2004. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *The American Journal of Human Genetics* 74, 83–92.

<https://doi.org/10.1086/381039>

Aartsma-Rus, A., Singh, K.H.K., Fokkema, I.F.A.C., Ginjaar, I.B., van Ommen, G.-J., Dunnen, J.T. den, van der Maarel, S.M., 2010. Therapeutic exon skipping for dysferlinopathies? *Eur J Hum Genet* 18, 889–894. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.4>

Aas, V., Bakke, S.S., Feng, Y.Z., Kase, E.T., Jensen, J., Bajpeyi, S., Thoresen, G.H., Rustan, A.C., 2013. Are cultured human myotubes far from home? *Cell Tissue Res* 354, 671–682.

<https://doi.org/10.1007/s00441-013-1655-1>

Abdullah, N., Padmanarayana, M., Marty, N.J., Johnson, C.P., 2014. Quantitation of the Calcium and Membrane Binding Properties of the C2 Domains of Dysferlin. *Biophysical Journal* 106, 382–389.

<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.11.4492>

Abmayr, S.M., Pavlath, G.K., 2012. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139, 641–656. <https://doi.org/10.1242/dev.068353>

Abreu-Blanco, M.T., Verboon, J.M., Parkhurst, S.M., 2014. Coordination of Rho family GTPase activities to orchestrate cytoskeleton responses during cell wound repair. *Curr Biol* 24, 144–155.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.048>

Abreu-Blanco, M.T., Watts, J.J., Verboon, J.M., Parkhurst, S.M., 2012. Cytoskeleton responses in wound repair. *Cell Mol Life Sci* 69, 2469–2483. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0928-2>

Ackroyd, M.R., Skordis, L., Kaluarachchi, M., Godwin, J., Prior, S., Fidanboyllu, M., Piercy, R.J., Muntoni, F., Brown, S.C., 2008. Reduced expression of fukutin related protein in mice results in a model for fukutin related protein associated muscular dystrophies. *Brain* 132, 439–451.

<https://doi.org/10.1093/brain/awn335>

Agarwal, A.K., Tunison, K., Mitsche, M.A., McDonald, J.G., Garg, A., 2019. Insights into lipid accumulation in skeletal muscle in dysferlin-deficient mice. *J Lipid Res* 60, 2057–2073.

<https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000399>

Agrawal, G., Aung, A., Varghese, S., 2017. Skeletal muscle-on-a-chip: an in vitro model to evaluate tissue formation and injury. *Lab Chip* 17, 3447–3461. <https://doi.org/10.1039/c7lc00512a>

Ahn, M.K., Lee, K.J., Cai, C., Huang, M., Cho, C.-H., Ma, J., Lee, E.H., 2016. Mitsugumin 53 regulates extracellular Ca²⁺ entry and intracellular Ca²⁺ release via Orai1 and RyR1 in skeletal muscle. *Sci Rep* 6, 36909. <https://doi.org/10.1038/srep36909>

Aiuti, A., Roncarolo, M.G., Naldini, L., 2017. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an *ex vivo* gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med* 9, 737–740. <https://doi.org/10.15252/emmm.201707573>

Alarcin, E., Bal-Öztürk, A., Avci, H., Ghorbanpoor, H., Dogan Guzel, F., Akpek, A., Yesiltas, G., Canak-Ipek, T., Avci-Adali, M., 2021. Current Strategies for the Regeneration of Skeletal Muscle Tissue. *Int J Mol Sci* 22, 5929. <https://doi.org/10.3390/ijms22115929>

- Albini, S., Coutinho, P., Malecova, B., Giordani, L., Savchenko, A., Forcales, S.V., Puri, P.L., 2013. Epigenetic reprogramming of human embryonic stem cells into skeletal muscle cells and generation of contractile myospheres. *Cell Reports* 3, 661–670. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.012>
- Alhamidi, M., Brox, V., Stensland, E., Liset, M., Lindal, S., Nilssen, Ø., 2017. Limb girdle muscular dystrophy type 2I: No correlation between clinical severity, histopathology and glycosylated α -dystroglycan levels in patients homozygous for common FKRP mutation. *Neuromuscular Disorders* 27, 619–626. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.02.015>
- Allamand, V., 2000. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Human Molecular Genetics* 9, 2459–2467. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2459>
- Allouche, J., Bellon, N., Saidani, M., Stanchina-Chatrousse, L., Masson, Y., Patwardhan, A., Gilles-Marsens, F., Delevoe, C., Domingues, S., Nissan, X., Martinat, C., Lemaitre, G., Peschanski, M., Baldeschi, C., 2015. In vitro modeling of hyperpigmentation associated to neurofibromatosis type 1 using melanocytes derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 9034–9039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501032112>
- Al-Qusairi, L., Laporte, J., 2011. T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skeletal Muscle* 1, 26. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-26>
- Amato, A.A., Brown, R.H., 2011. Dysferlinopathies. *Handb Clin Neurol* 101, 111–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045031-5.00007-4>
- Ampong, B.N., Imamura, M., Matsumiya, T., Yoshida, M., Takeda, S., 2005. Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myol* 24, 134–144.
- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Anderson, L.V., Davison, K., Moss, J.A., Young, C., Cullen, M.J., Walsh, J., Johnson, M.A., Bashir, R., Britton, S., Keers, S., Argov, Z., Mahjneh, I., Fougereuse, F., Beckmann, J.S., Bushby, K.M., 1999. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet* 8, 855–861. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.855>
- Anderson, R.G., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1977. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10, 351–364. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90022-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90022-8)
- Andrews, N.W., Corrotte, M., 2018. Plasma membrane repair. *Current Biology* 28, R392–R397. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.034>
- Antonio, J., Gonyea, W.J., 1993. Skeletal muscle fiber hyperplasia. *Med Sci Sports Exerc* 25, 1333–1345.
- Aoki, M., Liu, J., Richard, I., Bashir, R., Britton, S., Keers, S.M., Oeltjen, J., V. Brown, H.E., Marchand, S., Bourg, N., Beley, C., McKenna-Yasek, D., Arahata, K., Bohlega, S., Cupler, E., Illa, I., Majneh, I., Barohn, R.J., Urtizberea, J.A., Fardeau, M., Amato, A., Angelini, C., Bushby, K., Beckmann, J.S., Brown, R.H., 2001. Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology* 57, 271–278. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.2.271>
- Argov, Z., Sadeh, M., Mazor, K., Soffer, D., Kahana, E., Eisenberg, I., Mitrani-Rosenbaum, S., Richard, I., Beckmann, J., Keers, S., Bashir, R., Bushby, K., Rosenmann, H., 2000. Muscular dystrophy due to dysferlin deficiency in Libyan Jews. *Brain* 123, 1229–1237. <https://doi.org/10.1093/brain/123.6.1229>

- Armstrong, L., Hughes, O., Yung, S., Hyslop, L., Stewart, R., Wappler, I., Peters, H., Walter, T., Stojkovic, P., Evans, J., Stojkovic, M., Lako, M., 2006. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF κ B signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Human Molecular Genetics* 15, 1894–1913. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl112>
- Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Garrison, E.P., Kang, H.M., Korbel, J.O., Marchini, J.L., McCarthy, S., McVean, G.A., Abecasis, G.R., 2015. A global reference for human genetic variation; 1000 Genomes Project Consortium. *Nature* 526, 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Avior, Y., Sagi, I., Benvenisty, N., 2016. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 170–182. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.27>
- Awaya, T., Kato, T., Mizuno, Y., Chang, H., Niwa, A., Umeda, K., Nakahata, T., Heike, T., 2012. Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 7, e51638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051638>
- Azakir, B.A., Di Fulvio, S., Kinter, J., Sinnreich, M., 2012. Proteasomal inhibition restores biological function of mis-sense mutated dysferlin in patient-derived muscle cells. *J Biol Chem* 287, 10344–10354. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.329078>
- Azakir, B.A., Di Fulvio, S., Therrien, C., Sinnreich, M., 2010. Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One* 5, e10122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010122>
- Azzag, K., Ortiz-Cordero, C., Oliveira, N.A.J., Magli, A., Selvaraj, S., Tungtur, S., Upchurch, W., Iazzo, P.A., Lu, Q.L., Perlingeiro, R.C.R., 2020. Efficient engraftment of pluripotent stem cell-derived myogenic progenitors in a novel immunodeficient mouse model of limb girdle muscular dystrophy 2I. *Skeletal Muscle* 10, 10. <https://doi.org/10.1186/s13395-020-00228-3>
- Baek, J.-H., Many, G.M., Evesson, F.J., Kelley, V.R., 2017. Dysferlinopathy Promotes an Intramuscle Expansion of Macrophages with a Cyto-Destructive Phenotype. *Am J Pathol* 187, 1245–1257. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.02.011>
- Baharvand, H., Hashemi, S.M., Shahsavani, M., 2008. Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 76, 465–477. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00252.x>
- Balasubramanian, A., Kawahara, G., Gupta, V.A., Rozkalne, A., Beauvais, A., Kunkel, L.M., Gussoni, E., 2014. Fam65b is important for formation of the HDAC6-dysferlin protein complex during myogenic cell differentiation. *FASEB j.* 28, 2955–2969. <https://doi.org/10.1096/fj.13-246470>
- Ballouhey, O., Bartoli, M., Levy, N., 2020. CRISP(R)ation musculaire. *Med Sci (Paris)* 36, 358–366. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020081>
- Ballouhey, O., Courrier, S., Kergourlay, V., Gorokhova, S., Cerino, M., Krahn, M., Lévy, N., Bartoli, M., 2021. The Dysferlin Transcript Containing the Alternative Exon 40a is Essential for Myocyte Functions. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 754555. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.754555>

- Bansal, D., Campbell, K.P., 2004. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends in Cell Biology* 14, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.03.001>
- Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S.S., Groh, S., Chen, C.-C., Williamson, R., McNeil, P.L., Campbell, K.P., 2003. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423, 168–172. <https://doi.org/10.1038/nature01573>
- Bar-Nur, O., Gerli, M.F.M., Di Stefano, B., Almada, A.E., Galvin, A., Coffey, A., Huebner, A.J., Feige, P., Verheul, C., Cheung, P., Payzin-Dogru, D., Paisant, S., Anselmo, A., Sadreyev, R.I., Ott, H.C., Tajbakhsh, S., Rudnicki, M.A., Wagers, A.J., Hochedlinger, K., 2018. Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Functional Skeletal Muscle Progenitors. *Stem Cell Reports* 10, 1505–1521. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.04.009>
- Barthélémy, F., Blouin, C., Wein, N., Mouly, V., Courrier, S., Dionnet, E., Kergourlay, V., Mathieu, Y., Garcia, L., Butler-Browne, G., Lamaze, C., Lévy, N., Krahn, M., Bartoli, M., 2015. Exon 32 Skipping of Dysferlin Rescues Membrane Repair in Patients' Cells. *JND* 2, 281–290. <https://doi.org/10.3233/JND-150109>
- Barthélémy, F., Courrier, S., Lévy, N., Krahn, M., Bartoli, M., 2018. Dysferlin Exon 32 Skipping in Patient Cells. *Methods Mol Biol* 1828, 489–496. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8651-4_31
- Bartoli, M., Gicquel, E., Barrault, L., Soheili, T., Malissen, M., Malissen, B., Vincent-Lacaze, N., Perez, N., Udd, B., Danos, O., Richard, I., 2008. Mannosidase I inhibition rescues the human α -sarcoglycan R77C recurrent mutation. *Human Molecular Genetics* 17, 1214–1221. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn029>
- Barton-Davis, E.R., Cordier, L., Shoturma, D.I., Leland, S.E., Sweeney, H.L., 1999. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* 104, 375–381. <https://doi.org/10.1172/JCI7866>
- Barzilai-Tutsch, H., Dewulf, M., Lamaze, C., Butler Browne, G., Pines, M., Halevy, O., 2018. A promotive effect for halofuginone on membrane repair and synaptotagmin-7 levels in muscle cells of dysferlin-null mice. *Human Molecular Genetics* 27, 2817–2829. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy185>
- Barzilai-Tutsch, H., Genin, O., Pines, M., Halevy, O., 2020. Early pathological signs in young dysf mice are improved by halofuginone. *Neuromuscular Disorders* 30, 472–482. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2020.04.001>
- Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., Sadeh, M., Mahjneh, I., Marconi, G., Passos-Bueno, M.R., Moreira, E. de S., Zatz, M., Beckmann, J.S., Bushby, K., 1998. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 20, 37–42. <https://doi.org/10.1038/1689>
- Bashir, R., Strachan, T., Keers, S., Stephenson, A., Mahjneh, I., Marconi, G., Nashef, L., Bushby, K.M., 1994. A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Hum Mol Genet* 3, 455–457. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.3.455>
- Baum, C., 2007. Insertional mutagenesis in gene therapy and stem cell biology: Current Opinion in Hematology 14, 337–342. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3281900f01>
- Baxter, M., Withey, S., Harrison, S., Segeritz, C.-P., Zhang, F., Atkinson-Dell, R., Rowe, C., Gerrard, D.T., Sison-Young, R., Jenkins, R., Henry, J., Berry, A.A., Mohamet, L., Best, M., Fenwick, S.W., Malik, H., Kitteringham, N.R., Goldring, C.E., Piper Hanley, K., Vallier, L., Hanley, N.A., 2015. Phenotypic and

functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol* 62, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.10.016>

Beattie, G.M., Lopez, A.D., Bucay, N., Hinton, A., Firpo, M.T., King, C.C., Hayek, A., 2005. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *STEM CELLS* 23, 489–495. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0279>

Bejaoui, K., Hirabayashi, K., Hentati, F., Haines, J.L., Ben Hamida, C., Belal, S., Miller, R.G., McKenna-Yasek, D., Weissenbach, J., Rowland, L.P., 1995. Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology* 45, 768–772. <https://doi.org/10.1212/wnl.45.4.768>

Ben M'Barek, K., Habeler, W., Plancheron, A., Jarraya, M., Regent, F., Terray, A., Yang, Y., Chatrousse, L., Domingues, S., Masson, Y., Sahel, J.-A., Peschanski, M., Goureau, O., Monville, C., 2017. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci Transl Med* 9, eaai7471. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai7471>

Berger, A., Maire, S., Gaillard, M.-C., Sahel, J.-A., Hantraye, P., Bemelmans, A.-P., 2016. mRNA trans-splicing in gene therapy for genetic diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 7, 487–498. <https://doi.org/10.1002/wrna.1347>

Berndt, N., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., 2011. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 775–791. <https://doi.org/10.1038/nrc3151>

Bertero, A., Madrigal, P., Galli, A., Hubner, N.C., Moreno, I., Burks, D., Brown, S., Pedersen, R.A., Gaffney, D., Mendjan, S., Pauklin, S., Vallier, L., 2015. Activin/Nodal signaling and NANOG orchestrate human embryonic stem cell fate decisions by controlling the H3K4me3 chromatin mark. *Genes Dev.* 29, 702–717. <https://doi.org/10.1101/gad.255984.114>

Bianchini, E., Testoni, S., Gentile, A., Cali, T., Ottolini, D., Villa, A., Brini, M., Betto, R., Mascarello, F., Nissen, P., Sandonà, D., Sacchetto, R., 2014. Inhibition of Ubiquitin Proteasome System Rescues the Defective Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA1) Protein Causing Chianina Cattle Pseudomyotonia. *Journal of Biological Chemistry* 289, 33073–33082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576157>

Bittel, D.C., Chandra, G., Tirunagri, L.M.S., Deora, A.B., Medikayala, S., Scheffer, L., Defour, A., Jaiswal, J.K., 2020. Annexin A2 Mediates Dysferlin Accumulation and Muscle Cell Membrane Repair. *Cells* 9, E1919. <https://doi.org/10.3390/cells9091919>

Bittel, D.C., Sreetama, S.C., Chandra, G., Ziegler, R., Nagaraju, K., Van der Meulen, J.H., Jaiswal, J.K., 2022. Secreted acid sphingomyelinase as a potential gene therapy for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Journal of Clinical Investigation* 132, e141295. <https://doi.org/10.1172/JCI141295>

Bittner, R.E., Anderson, L.V., Burkhardt, E., Bashir, R., Vafiadaki, E., Ivanova, S., Raffelsberger, T., Maerk, I., Höger, H., Jung, M., Karbasiyan, M., Storch, M., Lassmann, H., Moss, J.A., Davison, K., Harrison, R., Bushby, K.M., Reis, A., 1999a. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 23, 141–142. <https://doi.org/10.1038/13770>

Bittner, R.E., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Höger, H., Elbe-Bürger, A., Wachtler, F., 1999b. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anatomy and Embryology* 199, 391–396. <https://doi.org/10.1007/s004290050237>

- Blazek, A.D., Paleo, B.J., Weisleder, N., 2015. Plasma Membrane Repair: A Central Process for Maintaining Cellular Homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 30, 438–448. <https://doi.org/10.1152/physiol.00019.2015>
- Bodine, S.C., Baehr, L.M., 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307, E469–484. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2014>
- Bonaldo, P., Sandri, M., 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech* 6, 25–39. <https://doi.org/10.1242/dmm.010389>
- Bonuccelli, G., Sotgia, F., Schubert, W., Park, D.S., Frank, P.G., Woodman, S.E., Insabato, L., Cammer, M., Minetti, C., Lisanti, M.P., 2003. Proteasome Inhibitor (MG-132) Treatment of mdx Mice Rescues the Expression and Membrane Localization of Dystrophin and Dystrophin-Associated Proteins. *The American Journal of Pathology* 163, 1663–1675. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63523-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63523-7)
- Boonyarom, O., Inui, K., 2006. Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf)* 188, 77–89. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01613.x>
- Borchin, B., Chen, J., Barberi, T., 2013. Derivation and FACS-Mediated Purification of PAX3+/PAX7+ Skeletal Muscle Precursors from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 1, 620–631. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.10.007>
- Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M.K., Vriend, G., Schöler, H.R., 1998. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* 12, 2073–2090. <https://doi.org/10.1101/gad.12.13.2073>
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122, 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Bray, N.L., Pimentel, H., Melsted, P., Pachter, L., 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 34, 525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Brennand, K.J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D., McCarthy, S., Sebat, J., Gage, F.H., 2011. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473, 221–225. <https://doi.org/10.1038/nature09915>
- Briggs, R., King, T.J., 1952. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 38, 455–463. <https://doi.org/10.1073/pnas.38.5.455>
- Brockington, M., Blake, D.J., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., Ponting, C.P., Estournet, B., Romero, N.B., Mercuri, E., Voit, T., Sewry, C.A., Guicheney, P., Muntoni, F., 2001. Mutations in the Fukutin-Related Protein Gene (FKRP) Cause a Form of Congenital Muscular Dystrophy with Secondary Laminin α 2 Deficiency and Abnormal Glycosylation of α -Dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.* 12.
- Brodsky, F.M., 1988. Living with clathrin: its role in intracellular membrane traffic. *Science* 242, 1396–1402. <https://doi.org/10.1126/science.2904698>
- Brooke, M.H., Fenichel, G.M., Griggs, R.C., Mendell, J.R., Iii, R.T.M., Miller, J.P., Kaiser, K.K., Florence, J.M., Pandya, S., Signore, L., King, W., Robison, J., Head, R.A., Seyfried, W., 1987. Clinical Investigation of Duchenne Muscular Dystrophy. *Archives of neurology* 44, 812–817.

- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1979. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3330–3337. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.7.3330>
- Bruge, C., Geoffroy, M., Benabides, M., Pellier, E., Gicquel, E., Dhiab, J., Hoch, L., Richard, I., Nissan, X., 2022. Skeletal Muscle Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells: A Platform for Limb Girdle Muscular Dystrophies. *Biomedicines* 10, 1428. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061428>
- Brussee, V., Tardif, F., Roy, B., Goulet, M., Sebille, A., Tremblay, J.P., 1999. Successful myoblast transplantation in fibrotic muscles: no increased impairment by the connective tissue. *Transplantation* 67, 1618–1622. <https://doi.org/10.1097/00007890-199906270-00018>
- Bryson-Richardson, R.J., Currie, P.D., 2008. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet* 9, 632–646. <https://doi.org/10.1038/nrg2369>
- Buckingham, M., Relaix, F., 2015. PAX3 and PAX7 as upstream regulators of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 44, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.017>
- Burke, J.F., Mogg, A.E., 1985. Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin. *Nucleic Acids Res* 13, 6265–6272. <https://doi.org/10.1093/nar/13.17.6265>
- Burks, T.N., Cohn, R.D., 2011. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle* 1, 19. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-19>
- Bursac, N., Juhas, M., Rando, T.A., 2015. Synergizing Engineering and Biology to Treat and Model Skeletal Muscle Injury and Disease. *Annu Rev Biomed Eng* 17, 217–242. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040640>
- Bushby, K.M.D., 1999. Making sense of the limb-girdle muscular dystrophies. *Brain* 122, 1403–1420. <https://doi.org/10.1093/brain/122.8.1403>
- Byers, B., Cord, B., Nguyen, H.N., Schüle, B., Fenno, L., Lee, P.C., Deisseroth, K., Langston, J.W., Pera, R.R., Palmer, T.D., 2011. SNCA Triplication Parkinson's Patient's iPSC-derived DA Neurons Accumulate α -Synuclein and Are Susceptible to Oxidative Stress. *PLoS ONE* 6, e26159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026159>
- Cacciottolo, M., Numitone, G., Aurino, S., Caserta, I.R., Fanin, M., Politano, L., Minetti, C., Ricci, E., Piluso, G., Angelini, C., Nigro, V., 2011. Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. *Eur J Hum Genet* 19, 974–980. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.70>
- Cai, C., Masumiya, H., Weisleder, N., Matsuda, N., Nishi, M., Hwang, M., Ko, J.-K., Lin, P., Thornton, A., Zhao, X., Pan, Z., Komazaki, S., Brotto, M., Takeshima, H., Ma, J., 2009. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol* 11, 56–64. <https://doi.org/10.1038/ncb1812>
- Capell, B.C., Olive, M., Erdos, M.R., Cao, K., Faddah, D.A., Tavaréz, U.L., Conneely, K.N., Qu, X., San, H., Ganesh, S.K., Chen, X., Avallone, H., Kolodgie, F.D., Virmani, R., Nabel, E.G., Collins, F.S., 2008. A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15902–15907. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807840105>
- Cardamone, M., Darras, B., Ryan, M., 2008. Inherited Myopathies and Muscular Dystrophies. *Semin Neurol* 28, 250–259. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1062269>

- Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., Jaenisch, R., 2009. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 157–162. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811426106>
- Carmeille, R., Bouvet, F., Tan, S., Croissant, C., Gounou, C., Mamchaoui, K., Mouly, V., Brisson, A.R., Bouter, A., 2016. Membrane repair of human skeletal muscle cells requires Annexin-A5. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 2267–2279. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.06.003>
- Caron, L., Kher, D., Lee, K.L., McKernan, R., Dumevska, B., Hidalgo, A., Li, J., Yang, H., Main, H., Ferri, G., Petek, L.M., Poellinger, L., Miller, D.G., Gabellini, D., Schmidt, U., 2016. A Human Pluripotent Stem Cell Model of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Affected Skeletal Muscles. *Stem Cells Translational Medicine* 5, 1145–1161. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0224>
- Carotti, M., Marsolier, J., Soardi, M., Bianchini, E., Gomiero, C., Fecchio, C., Henriques, S.F., Betto, R., Sacchetto, R., Richard, I., Sandonà, D., 2018. Repairing folding-defective α -sarcoglycan mutants by CFTR correctors, a potential therapy for limb-girdle muscular dystrophy 2D. *Human Molecular Genetics* 27, 969–984. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy013>
- Castagnaro, S., Pellegrini, C., Pellegrini, M., Chrisam, M., Sabatelli, P., Toni, S., Grumati, P., Ripamonti, C., Pratelli, L., Maraldi, N.M., Cocchi, D., Righi, V., Faldini, C., Sandri, M., Bonaldo, P., Merlini, L., 2016. Autophagy activation in COL6 myopathic patients by a low-protein-diet pilot trial. *Autophagy* 12, 2484–2495. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1231279>
- Cataldi, M.P., Lu, P., Blaeser, A., Lu, Q.L., 2018. Ribitol restores functionally glycosylated α -dystroglycan and improves muscle function in dystrophic FKRP-mutant mice. *Nat Commun* 9, 3448. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05990-z>
- Cea, L.A., Bevilacqua, J.A., Arriagada, C., Cárdenas, A.M., Bigot, A., Mouly, V., Sáez, J.C., Caviedes, P., 2016. The absence of dysferlin induces the expression of functional connexin-based hemichannels in human myotubes. *BMC Cell Biol* 17 Suppl 1, 15. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0096-6>
- Cea, L.A., Fernández, G., Arias-Bravo, G., Castillo-Ruiz, M., Escamilla, R., Brañes, M.C., Sáez, J.C., 2020. Blockade of Hemichannels Normalizes the Differentiation Fate of Myoblasts and Features of Skeletal Muscles from Dysferlin-Deficient Mice. *IJMS* 21, 6025. <https://doi.org/10.3390/ijms21176025>
- Ceco, E., McNally, E.M., 2013. Modifying muscular dystrophy through transforming growth factor- β . *FEBS J* 280, 4198–4209. <https://doi.org/10.1111/febs.12266>
- Cenacchi, G., Fanin, M., De Giorgi, L.B., Angelini, C., 2005. Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *J Clin Pathol* 58, 190–195. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.018978>
- Ceyhan-Birsoy, O., Talim, B., Swanson, L.C., Karakaya, M., Graff, M.A., Beggs, A.H., Topaloglu, H., 2015. Whole Exome Sequencing Reveals DYSF, FKTN, and ISPD Mutations in Congenital Muscular Dystrophy Without Brain or Eye Involvement. *Journal of Neuromuscular Diseases* 2, 87–92. <https://doi.org/10.3233/JND-140038>
- Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., Bhatia, M., 2003. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 102, 906–915. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-03-0832>

- Chal, J., Al Tanoury, Z., Hestin, M., Gobert, B., Aivio, S., Hick, A., Cherrier, T., Nesmith, A.P., Parker, K.K., Pourquié, O., 2016. Generation of human muscle fibers and satellite-like cells from human pluripotent stem cells *in vitro*. *Nat Protoc* 11, 1833–1850. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.110>
- Chal, J., Al Tanoury, Z., Oginuma, M., Moncuquet, P., Gobert, B., Miyanari, A., Tassy, O., Guevara, G., Hubaud, A., Bera, A., Sumara, O., Garnier, J.-M., Kennedy, L., Knockaert, M., Gayraud-Morel, B., Tajbakhsh, S., Pourquié, O., 2018. Recapitulating early development of mouse musculoskeletal precursors of the paraxial mesoderm *in vitro*. *Development* 145, dev157339. <https://doi.org/10.1242/dev.157339>
- Chal, J., Oginuma, M., Al Tanoury, Z., Gobert, B., Sumara, O., Hick, A., Bousson, F., Zidouni, Y., Mursch, C., Moncuquet, P., Tassy, O., Vincent, S., Miyanari, A., Bera, A., Garnier, J.-M., Guevara, G., Hestin, M., Kennedy, L., Hayashi, S., Drayton, B., Cherrier, T., Gayraud-Morel, B., Gussoni, E., Relaix, F., Tajbakhsh, S., Pourquié, O., 2015. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol* 33, 962–969. <https://doi.org/10.1038/nbt.3297>
- Chal, J., Pourquié, O., 2017. Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development* 144, 2104–2122. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A., 2003. Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 113, 643–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., Smith, A., 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 450, 1230–1234. <https://doi.org/10.1038/nature06403>
- Chan, J., Waddington, S.N., O'Donoghue, K., Kurata, H., Guillot, P.V., Gotherstrom, C., Themis, M., Morgan, J.E., Fisk, N.M., 2007. Widespread Distribution and Muscle Differentiation of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells After Intrauterine Transplantation in Dystrophic *mdx* Mouse. *Stem Cells* 25, 875–884. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0694>
- Chanda, S., Ang, C.E., Davila, J., Pak, C., Mall, M., Lee, Q.Y., Ahlenius, H., Jung, S.W., Südhof, T.C., Wernig, M., 2014. Generation of Induced Neuronal Cells by the Single Reprogramming Factor ASCL1. *Stem Cell Reports* 3, 282–296. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.020>
- Chandra, G., Defour, A., Mamchoui, K., Pandey, K., Mishra, S., Mouly, V., Sreetama, S., Mahad Ahmad, M., Mahjneh, I., Morizono, H., Pattabiraman, N., Menon, A.K., Jaiswal, J.K., 2019. Dysregulated calcium homeostasis prevents plasma membrane repair in Anoctamin 5/TMEM16E-deficient patient muscle cells. *Cell Death Discov* 5, 118. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0197-z>
- Chang, H., Yoshimoto, M., Umeda, K., Iwasa, T., Mizuno, Y., Fukada, S., Yamamoto, H., Motohashi, N., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Heike, T., Nakahata, T., 2009. Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. *FASEB j.* 23, 1907–1919. <https://doi.org/10.1096/fj.08-123661>
- Charnay, T., Blanck, V., Cerino, M., Bartoli, M., Riccardi, F., Bonello-Palot, N., Pécheux, C., Nguyen, K., Lévy, N., Gorokhova, S., Krahn, M., 2021. Retrospective analysis and reclassification of DYSF variants in a large French series of dysferlinopathy patients. *Genet Med* 23, 1574–1577. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01164-3>
- Chen, B., You, W., Shan, T., 2019. Myomaker, and Myomixer-Myomerger-Minion modulate the efficiency of skeletal muscle development with melatonin supplementation through Wnt/ β -catenin pathway. *Exp Cell Res* 385, 111705. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111705>

- Chiodo, A., 2013. Acquired myopathy/dystrophies. *PM&R* 5, S74–S80.
<https://doi.org/10.1016/j.pmrj.2013.04.004>
- Chiu, Y.-H., Hornsey, M.A., Klinge, L., Jørgensen, L.H., Laval, S.H., Charlton, R., Barresi, R., Straub, V., Lochmüller, H., Bushby, K., 2009. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 18, 1976–1989.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp121>
- Choi, Y.R., Kim, J.-B., Kang, S.-J., Noh, H.R., Jou, I., Joe, E.-H., Park, S.M., 2020. The dual role of c-src in cell-to-cell transmission of α -synuclein. *EMBO Rep* 21, e48950.
<https://doi.org/10.15252/embr.201948950>
- Chrobáková, T., Hermanová, M., Kroupová, I., Vondráček, P., Maříková, T., Mazanec, R., Zámečník, J., Staněk, J., Havlová, M., Fajkusová, L., 2004. Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscular Disorders* 14, 659–665.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.05.005>
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.-J., Johnson, J., Meisner, L., Lanza, R., 2006. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439, 216–219. <https://doi.org/10.1038/nature04277>
- Ciciliot, S., Schiaffino, S., 2010. Regeneration of mammalian skeletal muscle. Basic mechanisms and clinical implications. *Curr Pharm Des* 16, 906–914. <https://doi.org/10.2174/138161210790883453>
- Cinnamon, Y., Kahane, N., Bachelet, I., Kalcheim, C., 2001. The sub-lip domain—a distinct pathway for myotome precursors that demonstrate rostral-caudal migration. *Development* 128, 341–351.
<https://doi.org/10.1242/dev.128.3.341>
- Coady, T.H., Lorson, C.L., 2010. Trans-Splicing-Mediated Improvement in a Severe Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy. *Journal of Neuroscience* 30, 126–130.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4489-09.2010>
- Codding, S.J., Marty, N., Abdullah, N., Johnson, C.P., 2016. Dysferlin Binds SNAREs (Soluble N-Ethylmaleimide-sensitive Factor (NSF) Attachment Protein Receptors) and Stimulates Membrane Fusion in a Calcium-sensitive Manner. *Journal of Biological Chemistry* 291, 14575–14584.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.727016>
- Cohen, T.V., Cohen, J.E., Partridge, T.A., 2012. Myogenesis in dysferlin-deficient myoblasts is inhibited by an intrinsic inflammatory response. *Neuromuscular Disorders* 22, 648–658.
<https://doi.org/10.1016/j.nmd.2012.03.002>
- Collier, A.F., Gumerson, J., Lehtimäki, K., Puoliväli, J., Jones, J.W., Kane, M.A., Manne, S., O’Neill, A., Windish, H.P., Anttoniemi, T., Williams, B.A., Albrecht, D.E., Bloch, R.J., 2018. Effect of Ibuprofen on Skeletal Muscle of Dysferlin-Null Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 364, 409–419.
<https://doi.org/10.1124/jpet.117.244244>
- Collins, B.C., Arpke, R.W., Larson, A.A., Baumann, C.W., Xie, N., Cabelka, C.A., Nash, N.L., Juppi, H.-K., Laakkonen, E.K., Sipilä, S., Kovanen, V., Spangenburg, E.E., Kyba, M., Lowe, D.A., 2019. Estrogen Regulates the Satellite Cell Compartment in Females. *Cell Rep* 28, 368–381.e6.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.025>
- Constantinides, P.G., Jones, P.A., Gevers, W., 1977. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* 267, 364–366.
<https://doi.org/10.1038/267364a0>

- Cooper, S.T., McNeil, P.L., 2015. Membrane Repair: Mechanisms and Pathophysiology. *Physiol Rev* 95, 1205–1240. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2014>
- Coppens, S., Barnard, A.M., Puusepp, S., Pajusalu, S., Ōunap, K., Vargas-Franco, D., Bruels, C.C., Donkervoort, S., Pais, L., Chao, K.R., Goodrich, J.K., England, E.M., Weisburd, B., Ganesh, V.S., Gudmundsson, S., O'Donnell-Luria, A., Nigul, M., Ilves, P., Mohassel, P., Siddique, T., Milone, M., Nicolau, S., Maroofian, R., Houlden, H., Hanna, M.G., Quinlivan, R., Beiraghi Toosi, M., Ghayoor Karimiani, E., Costagliola, S., Deconinck, N., Kadhim, H., Macke, E., Lanpher, B.C., Klee, E.W., Łusakowska, A., Kostera-Pruszczyk, A., Hahn, A., Schrank, B., Nishino, I., Ogasawara, M., El Sherif, R., Stojkovic, T., Nelson, I., Bonne, G., Cohen, E., Boland-Augé, A., Deleuze, J.-F., Meng, Y., Töpf, A., Vilain, C., Pacak, C.A., Rivera-Zengotita, M.L., Bönnemann, C.G., Straub, V., Handford, P.A., Draper, I., Walter, G.A., Kang, P.B., 2021. A form of muscular dystrophy associated with pathogenic variants in JAG2. *Am J Hum Genet* 108, 840–856. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.03.020>
- Corrotte, M., Almeida, P.E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M.C., Millis, B.A., Cortez, M., Miller, H., Song, W., Mangel, T.K., Andrews, N.W., 2013. Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *Elife* 2, e00926. <https://doi.org/10.7554/eLife.00926>
- Cummings, J., Lee, G., Mortsdorf, T., Ritter, A., Zhong, K., 2017. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 3, 367–384. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.05.002>
- Dadgar, S., Wang, Z., Johnston, H., Kesari, A., Nagaraju, K., Chen, Y.-W., Hill, D.A., Partridge, T.A., Giri, M., Freishtat, R.J., Nazarian, J., Xuan, J., Wang, Y., Hoffman, E.P., 2014. Asynchronous remodeling is a driver of failed regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Biol* 207, 139–158. <https://doi.org/10.1083/jcb.201402079>
- Dai, J., Sheetz, M.P., 1999. Membrane tether formation from blebbing cells. *Biophys J* 77, 3363–3370. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77168-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77168-7)
- Darabi, R., Arpke, R.W., Irion, S., Dimos, J.T., Grskovic, M., Kyba, M., Perlingeiro, R.C.R., 2012. Human ES- and iPS-Derived Myogenic Progenitors Restore DYSTROPHIN and Improve Contractility upon Transplantation in Dystrophic Mice. *Cell Stem Cell* 10, 610–619. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.015>
- Davies, K.E., 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>
- Davis, C.G., Lehrman, M.A., Russell, D.W., Anderson, R.G., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1986. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* 45, 15–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90533-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90533-7)
- Davis, D.B., Delmonte, A.J., Ly, C.T., McNally, E.M., 2000. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 9, 217–226. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.217>
- Davis, D.B., Doherty, K.R., Delmonte, A.J., McNally, E.M., 2002. Calcium-sensitive Phospholipid Binding Properties of Normal and Mutant Ferlin C2 Domains. *Journal of Biological Chemistry* 277, 22883–22888. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201858200>
- Davis, R.L., Weintraub, H., Lassar, A.B., 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-x)

De Bari, C., Dell'Accio, F., Vandenabeele, F., Vermeesch, J.R., Raymackers, J.-M., Luyten, F.P., 2003. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *Journal of Cell Biology* 160, 909–918. <https://doi.org/10.1083/jcb.200212064>

De Luna, N., Gallardo, E., Illa, I., 2004. In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 1104–1113. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.10.1104>

De Luna, N., Gallardo, E., Soriano, M., Dominguez-Perles, R., de la Torre, C., Rojas-García, R., García-Verdugo, J.M., Illa, I., 2006. Absence of Dysferlin Alters Myogenin Expression and Delays Human Muscle Differentiation “in Vitro.” *Journal of Biological Chemistry* 281, 17092–17098. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601885200>

de Morrée, A., Flix, B., Bagaric, I., Wang, J., van den Boogaard, M., Grand Moursel, L., Frants, R.R., Illa, I., Gallardo, E., Toes, R., van der Maarel, S.M., 2013. Dysferlin regulates cell adhesion in human monocytes. *J Biol Chem* 288, 14147–14157. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448589>

De Villiers, T.J., Chines, A.A., Palacios, S., Lips, P., Sawicki, A.Z., Levine, A.B., Codreanu, C., Kelepouris, N., Brown, J.P., 2011. Safety and tolerability of bazedoxifene in postmenopausal women with osteoporosis: results of a 5-year, randomized, placebo-controlled phase 3 trial. *Osteoporos Int* 22, 567–576. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1302-6>

Defour, A., Van der Meulen, J.H., Bhat, R., Bigot, A., Bashir, R., Nagaraju, K., Jaiswal, J.K., 2014. Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. *Cell Death Dis* 5, e1306–e1306. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.272>

Deinsberger, J., Reisinger, D., Weber, B., 2020. Global trends in clinical trials involving pluripotent stem cells: a systematic multi-database analysis. *NPJ Regen Med* 5, 15. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00100-4>

Demonbreun, A.R., Allen, M.V., Warner, J.L., Barefield, D.Y., Krishnan, S., Swanson, K.E., Earley, J.U., McNally, E.M., 2016. Enhanced Muscular Dystrophy from Loss of Dysferlin Is Accompanied by Impaired Annexin A6 Translocation after Sarcolemmal Disruption. *The American Journal of Pathology* 186, 1610–1622. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.02.005>

Demonbreun, A.R., Fahrenbach, J.P., Deveaux, K., Earley, J.U., Pytel, P., McNally, E.M., 2011. Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 20, 779–789. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq522>

Demonbreun, A.R., Rossi, A.E., Alvarez, M.G., Swanson, K.E., Deveaux, H.K., Earley, J.U., Hadhazy, M., Vohra, R., Walter, G.A., Pytel, P., McNally, E.M., 2014. Dysferlin and myoferlin regulate transverse tubule formation and glycerol sensitivity. *Am J Pathol* 184, 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.009>

Demonbreun, A.R., Wyatt, E.J., Fallon, K.S., Oosterbaan, C.C., Page, P., Hadhazy, M., Quattrocchi, M., Barefield, D.Y., McNally, E.M., 2019. A gene-edited mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2C for testing exon skipping. *Dis Model Mech* 13, dmm040832. <https://doi.org/10.1242/dmm.040832>

Denis, J.A., Gauthier, M., Rachdi, L., Aubert, S., Giraud-Triboulet, K., Poydenot, P., Benchoua, A., Champon, B., Maury, Y., Baldeschi, C., Scharfmann, R., Piétu, G., Peschanski, M., Martinat, C., 2013. mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. *J Cell Sci* 126, 1763–1772. <https://doi.org/10.1242/jcs.116285>

DeRosa, B.A., Van Baaren, J.M., Dubey, G.K., Lee, J.M., Cuccaro, M.L., Vance, J.M., Pericak-Vance, M.A., Dykxhoorn, D.M., 2012. Derivation of autism spectrum disorder-specific induced pluripotent

stem cells from peripheral blood mononuclear cells. *Neuroscience Letters* 516, 9–14.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.02.086>

Díaz, J., Woudt, L., Suazo, L., Garrido, C., Caviedes, P., Cárdenas, A.M., Castiglioni, C., Bevilacqua, J.A., 2016. Broadening the imaging phenotype of dysferlinopathy at different disease stages. *Muscle Nerve* 54, 203–210. <https://doi.org/10.1002/mus.25045>

Diaz-Manera, J., Fernandez-Torron, R., LLauger, J., James, M.K., Mayhew, A., Smith, F.E., Moore, U.R., Blamire, A.M., Carlier, P.G., Rufibach, L., Mittal, P., Eagle, M., Jacobs, M., Hodgson, T., Wallace, D., Ward, L., Smith, M., Stramare, R., Rampado, A., Sato, N., Tamaru, T., Harwick, B., Rico Gala, S., Turk, S., Coppentrath, E.M., Foster, G., Bendahan, D., Le Fur, Y., Fricke, S.T., Otero, H., Foster, S.L., Peduto, A., Sawyer, A.M., Hilsden, H., Lochmuller, H., Grieben, U., Spuler, S., Tesi Rocha, C., Day, J.W., Jones, K.J., Bharucha-Goebel, D.X., Salort-Campana, E., Harms, M., Pestronk, A., Krause, S., Schreiber-Katz, O., Walter, M.C., Paradas, C., Hogrel, J.-Y., Stojkovic, T., Takeda, S., Mori-Yoshimura, M., Bravver, E., Sparks, S., Bello, L., Semplicini, C., Pegoraro, E., Mendell, J.R., Bushby, K., Straub, V., 2018. Muscle MRI in patients with dysferlinopathy: pattern recognition and implications for clinical trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89, 1071–1081. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317488>

Díaz-Manera, J., Touvier, T., Dellavalle, A., Tonlorenzi, R., Tedesco, F.S., Messina, G., Meregalli, M., Navarro, C., Perani, L., Bonfanti, C., Illa, I., Torrente, Y., Cossu, G., 2010. Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy. *Cell Death Dis* 1, e61–e61. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.35>

Dillingham, B.C., Benny Klimek, M.E., Gernapudi, R., Rayavarapu, S., Gallardo, E., Van der Meulen, J.H., Jordan, S., Among, B., Gordish-Dressman, H., Spurney, C.F., Nagaraju, K., 2015. Inhibition of inflammation with celastrol fails to improve muscle function in dysferlin-deficient A/J mice. *Journal of the Neurological Sciences* 356, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.06.042>

Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Wichterle, H., Henderson, C.E., Eggan, K., 2008. Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science, New Series* 321, 1218–1221.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

Doetschman, T., 2009. Influence of genetic background on genetically engineered mouse phenotypes. *Methods Mol Biol, Methods in Molecular Biology* 530, 423–433. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-471-1_23

Doherty, K.R., Cave, A., Davis, D.B., Delmonte, A.J., Posey, A., Earley, J.U., Hadhazy, M., McNally, E.M., 2005. Normal myoblast fusion requires myoferlin. *Development* 132, 5565–5575. <https://doi.org/10.1242/dev.02155>

Domi, T., Porrello, E., Velardo, D., Capotondo, A., Biffi, A., Tonlorenzi, R., Amadio, S., Ambrosi, A., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Ruegg, M.A., Previtali, S.C., 2015. Mesoangioblast delivery of miniagrin ameliorates murine model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A. *Skeletal Muscle* 5, 30. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0055-5>

Dominguez, M.J., McCord, J.J., Sutton, R.B., 2022. Redefining the architecture of ferlin proteins: Insights into multi-domain protein structure and function. *PLoS One* 17, e0270188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270188>

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., Décosterd, L.A., Ruegg, U.T., 2013. The anticancer drug tamoxifen counteracts the pathology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol* 182, 485–504. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.018>

Doudna, J.A., 2020. The promise and challenge of therapeutic genome editing. *Nature* 578, 229–236. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>

Dowden, H., Munro, J., 2019. Trends in clinical success rates and therapeutic focus. *Nat Rev Drug Discov* 18, 495–496. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00074-z>

Du, L., Zhao, Z., Ma, X., Hsiao, T.-H., Chen, Y., Young, E., Suraokar, M., Wistuba, I., Minna, J.D., Pertsemlidis, A., 2014. miR-93-directed downregulation of DAB2 defines a novel oncogenic pathway in lung cancer. *Oncogene* 33, 4307–4315. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.381>

Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., Svendsen, C.N., 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277–280. <https://doi.org/10.1038/nature07677>

Egesipe, A.-L., Blondel, S., Lo Cicero, A., Jaskowiak, A.-L., Navarro, C., Sandre-Giovannoli, A.D., Levy, N., Peschanski, M., Nissan, X., 2016. Metformin decreases progerin expression and alleviates pathological defects of Hutchinson–Gilford progeria syndrome cells. *NPJ Aging Mech Dis* 2, 16026. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.26>

El-Battrawy, I., Zhao, Z., Lan, H., Li, X., Yücel, G., Lang, S., Sattler, K., Schünemann, J.-D., Zimmermann, W.-H., Cyganek, L., Utikal, J., Wieland, T., Bieback, K., Bauer, R., Ratte, A., Pribe-Wolferts, R., Rapti, K., Nowak, D., Wittig, J., Thomas, D., Most, P., Katus, H.A., Ravens, U., Schmidt, C., Borggreffe, M., Zhou, X.-B., Müller, O.J., Akin, I., 2018. Ion Channel Dysfunctions in Dilated Cardiomyopathy in Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Circ: Genomic and Precision Medicine* 11, e001893. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.117.001893>

Emery, A.E., 2002. The muscular dystrophies. *Lancet* 359, 687–695. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07815-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07815-7)

Emery, A.E., 1998. The muscular dystrophies. *BMJ* 317, 991–995. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7164.991>

Espinoza-Fonseca, L.M., 2016. Pathogenic mutation R959W alters recognition dynamics of dysferlin inner DysF domain. *Mol Biosyst* 12, 973–981. <https://doi.org/10.1039/c5mb00772k>

Estronca, L., Francisco, V., Pitrez, P., Honório, I., Carvalho, L., Vazão, H., Blerch, J., Rai, A., Nissan, X., Simon, U., Grãos, M., Saúde, L., Ferreira, L., 2021. Induced pluripotent stem cell-derived vascular networks to screen nano–bio interactions. *Nanoscale Horiz.* 6, 245–259. <https://doi.org/10.1039/D0NH00550A>

Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>

Evesson, F.J., Peat, R.A., Lek, A., Brilot, F., Lo, H.P., Dale, R.C., Parton, R.G., North, K.N., Cooper, S.T., 2010. Reduced Plasma Membrane Expression of Dysferlin Mutants Is Attributed to Accelerated Endocytosis via a Syntaxin-4-associated Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 285, 28529–28539. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111120>

Fang, D., Leishear, K., Nguyen, T.K., Finko, R., Cai, K., Fukunaga, M., Li, L., Brafford, P.A., Kulp, A.N., Xu, X., Smalley, K.S.M., Herlyn, M., 2006. Defining the Conditions for the Generation of Melanocytes from Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 24, 1668–1677. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0414>

Fanin, M., Angelini, C., 2016. Progress and challenges in diagnosis of dysferlinopathy: Dysferlinopathy Diagnosis. *Muscle Nerve* 54, 821–835. <https://doi.org/10.1002/mus.25367>

Fanin, M., Angelini, C., 2002. Muscle pathology in dysferlin deficiency. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28, 461–470. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2002.00417.x>

Feng, S.-W., Lu, X.-L., Liu, Z.-S., Zhang, Y.-N., Liu, T.-Y., Li, J.-L., Yu, M.-J., Zeng, Y., Zhang, C., 2008. Dynamic distribution of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and change of pathology after infusing into mdx mice. *Cytotherapy* 10, 254–264. <https://doi.org/10.1080/14653240802020381>

Fernández, G., Arias, G.B., Bevilacqua, J.A., Castillo-Ruiz, M., Caviedes, P., Sáez, J.C., Cea, L.A., 2020. Myofibers deficient in connexins 43 and 45 expression protect mice from skeletal muscle and systemic dysfunction promoted by a dysferlin mutation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866, 165800. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165800>

Fernández-Eulate, G., Querin, G., Moore, U., Behin, A., Masingue, M., Bassez, G., Leonard-Louis, S., Laforêt, P., Maisonobe, T., Merle, P., Spinazzi, M., Solé, G., Kuntzer, T., Bedat-Millet, A., Salort-Campana, E., Attarian, S., Péréon, Y., Feasson, L., Graveleau, J., Nadaj-Pakleza, A., Leturcq, F., Gorokhova, S., Krahn, M., Eymard, B., Straub, V., Jain COS Consortium, Evangelista, T., Stojkovic, T., 2021. Deep phenotyping of an international series of patients with late-onset dysferlinopathy. *Eur J Neurol* 28, 2092–2102. <https://doi.org/10.1111/ene.14821>

Fernández-Simón, E., Lleixà, C., Suarez-Calvet, X., Diaz-Manera, J., Illa, I., Gallardo, E., de Luna, N., 2020. Proteasome inhibitors reduce thrombospondin-1 release in human dysferlin-deficient myotubes. *BMC Musculoskelet Disord* 21, 784. <https://doi.org/10.1186/s12891-020-03756-7>

Ferrari, G., Cusella, G., Angelis, D., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., Mavilio, F., 1998. Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science* 279, 1528–1530. <https://doi.org/10.1126/science.279.5356.1528>

Feyoux, M., Bourgois-Rocha, F., Redfern, A., Giles, P., Lefort, N., Aubert, S., Bonnefond, C., Bugi, A., Ruiz, M., Deglon, N., Jones, L., Peschanski, M., Allen, N.D., Perrier, A.L., 2012. Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells. *Human Molecular Genetics* 21, 3883–3895. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds216>

Filareto, A., Rinaldi, F., Arpke, R.W., Darabi, R., Belanto, J.J., Toso, E.A., Miller, A.Z., Ervasti, J.M., McIvor, R.S., Kyba, M., Perlingeiro, R.C., 2015. Pax3-induced expansion enables the genetic correction of dystrophic satellite cells. *Skelet Muscle* 5, 36. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0061-7>

Flix, B., Suárez-Calvet, X., Díaz-Manera, J., Santos-Nogueira, E., Mancuso, R., Barquinero, J., Navas, M., Navarro, X., Illa, I., Gallardo, E., 2013. Bone Marrow Transplantation in Dysferlin-Deficient Mice Results in a Mild Functional Improvement. *Stem Cells and Development* 22, 2885–2894. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0049>

- Flucher, B.E., Andrews, S.B., Daniels, M.P., 1994. Molecular organization of transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junctions during development of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *MBoC* 5, 1105–1118. <https://doi.org/10.1091/mbc.5.10.1105>
- Fong, H., Hohenstein, K.A., Donovan, P.J., 2008. Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26, 1931–1938. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1002>
- Forcina, L., Cosentino, M., Musarò, A., 2020. Mechanisms Regulating Muscle Regeneration: Insights into the Interrelated and Time-Dependent Phases of Tissue Healing. *Cells* 9, 1297. <https://doi.org/10.3390/cells9051297>
- Franzini-Armstrong, C., 1991. Simultaneous maturation of transverse tubules and sarcoplasmic reticulum during muscle differentiation in the mouse. *Developmental Biology* 146, 353–363. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90237-W](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90237-W)
- Frontera, W.R., 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>
- Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y.K., Momoi, T., 2007. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet* 16, 618–629. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm002>
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M., 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 348–362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- Fuson, K., Rice, A., Mahling, R., Snow, A., Nayak, K., Shanbhogue, P., Meyer, A.G., Redpath, G.M.I., Hinderliter, A., Cooper, S.T., Sutton, R.B., 2014. Alternate splicing of dysferlin C2A confers Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent binding for membrane repair. *Structure* 22, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.10.001>
- Gaj, T., Gersbach, C.A., Barbas, C.F., 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* 31, 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004>
- Gallardo, E., Rojas-Garcia, R., de Luna, N., Pou, A., Brown, R.H., Illa, I., 2001. Inflammation in dysferlin myopathy: Immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 57, 2136–2138. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.11.2136>
- Galvez, B.G., Sampaolesi, M., Brunelli, S., Covarello, D., Gavina, M., Rossi, B., Constantin, G., Torrente, Y., Cossu, G., 2006. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *Journal of Cell Biology* 174, 231–243. <https://doi.org/10.1083/jcb.200512085>
- Gang, E.J., Darabi, R., Bosnakovski, D., Xu, Z., Kamm, K.E., Kyba, M., Perlingeiro, R.C.R., 2009. Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery. *Experimental Cell Research* 315, 2624–2636. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.05.009>
- Garcia, C.K., Wilund, K., Arca, M., Zuliani, G., Fellin, R., Maioli, M., Calandra, S., Bertolini, S., Cossu, F., Grishin, N., Barnes, R., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2001. Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein. *Science* 292, 1394–1398. <https://doi.org/10.1126/science.1060458>

- García-Campos, P., Báez-Matus, X., Jara-Gutiérrez, C., Paz-Araos, M., Astorga, C., Cea, L.A., Rodríguez, V., Bevilacqua, J.A., Caviedes, P., Cárdenas, A.M., 2020. N-Acetylcysteine Reduces Skeletal Muscles Oxidative Stress and Improves Grip Strength in Dysferlin-Deficient Bla/J Mice. *IJMS* 21, 4293. <https://doi.org/10.3390/ijms21124293>
- Gastaldello, S., D'Angelo, S., Franzoso, S., Fanin, M., Angelini, C., Betto, R., Sandonà, D., 2008. Inhibition of Proteasome Activity Promotes the Correct Localization of Disease-Causing α -Sarcoglycan Mutants in HEK-293 Cells Constitutively Expressing β -, γ -, and δ -Sarcoglycan. *The American Journal of Pathology* 173, 170–181. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071146>
- Gawlik, K., 2018. At the Crossroads of Clinical and Preclinical Research for Muscular Dystrophy—Are We Closer to Effective Treatment for Patients? *IJMS* 19, 1490. <https://doi.org/10.3390/ijms19051490>
- Gayi, E., Neff, L.A., Ismail, H.M., Ruegg, U.T., Scapozza, L., Dorchies, O.M., 2018. Repurposing the Selective Oestrogen Receptor Modulator Tamoxifen for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Chimia (Aarau)* 72, 238–240. <https://doi.org/10.2533/chimia.2018.238>
- Gerke, V., Moss, S.E., 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev* 82, 331–371. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2001>
- Ginn, S.L., Amaya, A.K., Alexander, I.E., Edelstein, M., Abedi, M.R., 2018. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* 20, e3015. <https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
- Girardi, F., Le Grand, F., 2018. Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration. *Prog Mol Biol Transl Sci* 153, 157–179. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.026>
- Glasberg, M.R., 1979. Myopathies. *Neurosurgery* 5, 747–758. <https://doi.org/10.1227/00006123-197912000-00017>
- Gois Beghini, D., Iwao Horita, S., Cascabulho, C.M., Anastácio Alves, L., Henriques-Pons, A., 2020. Induced Pluripotent Stem Cells: Hope in the Treatment of Diseases, including Muscular Dystrophies. *IJMS* 21, 5467. <https://doi.org/10.3390/ijms21155467>
- González-Jamett, A.M., Bevilacqua, J.A., Díaz, A.M.C., 2018. Hereditary Myopathies, in: Sakuma, K. (Ed.), *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76076>
- Gordon, L.B., Kleinman, M.E., Miller, D.T., Neubergh, D.S., Giobbie-Hurder, A., Gerhard-Herman, M., Smoot, L.B., Gordon, C.M., Cleveland, R., Snyder, B.D., Fligor, B., Bishop, W.R., Statkevich, P., Regen, A., Sonis, A., Riley, S., Ploski, C., Correia, A., Quinn, N., Ullrich, N.J., Nazarian, A., Liang, M.G., Huh, S.Y., Schwartzman, A., Kieran, M.W., 2012. Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16666–16671. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202529109>
- Goudenege, S., Lebel, C., Huot, N.B., Dufour, C., Fujii, I., Gekas, J., Rousseau, J., Tremblay, J.P., 2012. Myoblasts Derived From Normal hESCs and Dystrophic hiPSCs Efficiently Fuse With Existing Muscle Fibers Following Transplantation. *Molecular Therapy* 20, 2153–2167. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.188>
- Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., Danos, O., 2004. Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science* 306, 1796–1799. <https://doi.org/10.1126/science.1104297>

- Granzier, H.L., Labeit, S., 2004. The Giant Protein Titin: A Major Player in Myocardial Mechanics, Signaling, and Disease. *Circulation Research* 94, 284–295. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000117769.88862.F8>
- Grillo-Lopez, A., White, C., Dallaire, B., Varns, C., Shen, C., Wei, A., Leonard, J., McClure, A., Weaver, R., Cairelli, S., Rosenberg, J., 2000. Rituximab The First Monoclonal Antibody Approved for the Treatment of Lymphoma. *CPB* 1, 1–9. <https://doi.org/10.2174/1389201003379059>
- Grounds, M.D., Garrett, K.L., Lai, M.C., Wright, W.E., Beilharz, M.W., 1992. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. *Cell Tissue Res* 267, 99–104. <https://doi.org/10.1007/BF00318695>
- Grounds, M.D., Terrill, J.R., Radley-Crabb, H.G., Robertson, T., Papadimitriou, J., Spuler, S., Shavlakadze, T., 2014. Lipid accumulation in dysferlin-deficient muscles. *Am J Pathol* 184, 1668–1676. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.005>
- Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C.C., Bernard, F.-X., Peschanski, M., Baldeschi, C., Waksman, G., 2009. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745–1753. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61496-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61496-3)
- Guglieri, M., Straub, V., Bushby, K., Lochmüller, H., 2008. Limb-girdle muscular dystrophies. *Current Opinion in Neurology* 21, 576–584. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32830efdc2>
- Guo, Q.-F., Ye, Z.-X., Qiu, L.-L., Lin, X., Lai, J.-H., Lin, M.-T., Wang, Z.-Q., Wang, N., Lin, F., 2021. Dysferlinopathy in a cohort of Chinese patients: clinical features, mutation spectrum, and imaging findings. *Chinese Medical Journal* 134, 622–624. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001343>
- Gurdon, J.B., 1962. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology* 4, 256–273. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90043-X)
- Gushchina, L.V., Bhattacharya, S., McElhanon, K.E., Choi, J.H., Manring, H., Beck, E.X., Alloush, J., Weisleder, N., 2017. Treatment with Recombinant Human MG53 Protein Increases Membrane Integrity in a Mouse Model of Limb Girdle Muscular Dystrophy 2B. *Molecular Therapy* 25, 2360–2371. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.025>
- Gussoni, E., Blau, H.M., Kunkel, L.M., 1997. The fate of individual myoblasts after transplantation into muscles of DMD patients. *Nat Med* 3, 970–977. <https://doi.org/10.1038/nm0997-970>
- Guttinger, M., Tafi, E., Battaglia, M., Coletta, M., Cossu, G., 2006. Allogeneic mesoangioblasts give rise to alpha-sarcoglycan expressing fibers when transplanted into dystrophic mice. *Experimental Cell Research* 312, 3872–3879. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.08.012>
- Hall, T.E., Martel, N., Ariotti, N., Xiong, Z., Lo, H.P., Ferguson, C., Rae, J., Lim, Y.-W., Parton, R.G., 2020. In vivo cell biological screening identifies an endocytic capture mechanism for T-tubule formation. *Nat Commun* 11, 3711. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17486-w>
- Hammelman, J., Patel, T., Closser, M., Wichterle, H., Gifford, D., 2022. Ranking reprogramming factors for cell differentiation. *Nat Methods* 19, 812–822. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01522-2>
- Han, J.W., Yoon, Y.-S., 2011. Induced pluripotent stem cells: emerging techniques for nuclear reprogramming. *Antioxid Redox Signal* 15, 1799–1820. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3814>

Han, R., 2011. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. *Skelet Muscle* 1, 10. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-10>

Han, R., Frett, E.M., Levy, J.R., Rader, E.P., Lueck, J.D., Bansal, D., Moore, S.A., Ng, R., Beltrán-Valero de Bernabé, D., Faulkner, J.A., Campbell, K.P., 2010. Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice. *J Clin Invest* 120, 4366–4374. <https://doi.org/10.1172/JCI42390>

Han, W.-Q., Xia, M., Xu, M., Boini, K.M., Ritter, J.K., Li, N.-J., Li, P.-L., 2012. Lysosome fusion to the cell membrane is mediated by the dysferlin C2A domain in coronary arterial endothelial cells. *J Cell Sci* 125, 1225–1234. <https://doi.org/10.1242/jcs.094565>

Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>

Harhour, K., Navarro, C., Depetris, D., Mattei, M.-G., Nissan, X., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A., Lévy, N., 2017. MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Mol Med* 9, 1294–1313. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607315>

Harris, E., Bladen, C.L., Mayhew, A., James, M., Bettinson, K., Moore, U., Smith, F.E., Rufibach, L., Cnaan, A., Bharucha-Goebel, D.X., Blamire, A.M., Bravver, E., Carlier, P.G., Day, J.W., Díaz-Manera, J., Eagle, M., Grieben, U., Harms, M., Jones, K.J., Lochmüller, H., Mendell, J.R., Mori-Yoshimura, M., Paradas, C., Pegoraro, E., Pestronk, A., Salort-Campana, E., Schreiber-Katz, O., Semplicini, C., Spuler, S., Stojkovic, T., Straub, V., Takeda, S., Rocha, C.T., Walter, M.C., Bushby, K., 2016. The Clinical Outcome Study for dysferlinopathy: An international multicenter study. *Neurol Genet* 2, e89. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000089>

Harrison, R.K., 2016. Phase II and phase III failures: 2013–2015. *Nat Rev Drug Discov* 15, 817–818. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.184>

Haruta, M., Sasai, Y., Kawasaki, H., Amemiya, K., Ooto, S., Kitada, M., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ide, C., Honda, Y., Takahashi, M., 2004. In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 1020–1025. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1034>

Hattori, H., Nagata, E., Oya, Y., Takahashi, T., Aoki, M., Ito, D., Suzuki, N., 2007. A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. *Eur J Neurol* 14, 1288–1291. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2007.01958.x>

Haynes, V.R., Keenan, S.N., Bayliss, J., Lloyd, E.M., Meikle, P.J., Grounds, M.D., Watt, M.J., 2019. Dysferlin deficiency alters lipid metabolism and remodels the skeletal muscle lipidome in mice. *J Lipid Res* 60, 1350–1364. <https://doi.org/10.1194/jlr.M090845>

Heier, C.R., Damsker, J.M., Yu, Q., Dillingham, B.C., Huynh, T., Van der Meulen, J.H., Sali, A., Miller, B.K., Phadke, A., Scheffer, L., Quinn, J., Tatem, K., Jordan, S., Dadgar, S., Rodriguez, O.C., Albanese, C., Calhoun, M., Gordish-Dressman, H., Jaiswal, J.K., Connor, E.M., McCall, J.M., Hoffman, E.P., Reeves, E.K.M., Nagaraju, K., 2013. VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO Mol Med* 5, 1569–1585. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302621>

Hellbach, N., Peterson, S., Haehnke, D., Shankar, A., LaBarge, S., Pivaroff, C., Saenger, S., Thomas, C., McCarthy, K., Ebeling, M., Hayhurst Bennett, M., Schmidt, U., Metzger, F., 2018. Impaired myogenic development, differentiation and function in hESC-derived SMA myoblasts and myotubes. *PLoS One* 13, e0205589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205589>

- Henriques, S.F., Gicquel, E., Marsolier, J., Richard, I., 2019. Functional and cellular localization diversity associated with Fukutin-related protein patient genetic variants. *Human Mutation* 40, 1874–1885. <https://doi.org/10.1002/humu.23827>
- Henry, M.P., Hawkins, J.R., Boyle, J., Bridger, J.M., 2019. The Genomic Health of Human Pluripotent Stem Cells: Genomic Instability and the Consequences on Nuclear Organization. *Front Genet* 9, 623. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00623>
- Hernández-Deviez, D.J., Howes, M.T., Laval, S.H., Bushby, K., Hancock, J.F., Parton, R.G., 2008. Caveolin Regulates Endocytosis of the Muscle Repair Protein, Dysferlin. *Journal of Biological Chemistry* 283, 6476–6488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708776200>
- Hicks, M.R., Hiserodt, J., Paras, K., Fujiwara, W., Eskin, A., Jan, M., Xi, H., Young, C.S., Evseenko, D., Nelson, S.F., Spencer, M.J., Handel, B.V., Pyle, A.D., 2018. ERBB3 and NGFR mark a distinct skeletal muscle progenitor cell in human development and hPSCs. *Nat Cell Biol* 20, 46–57. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0010-2>
- Hinkson, I.V., Madej, B., Stahlberg, E.A., 2020. Accelerating Therapeutics for Opportunities in Medicine: A Paradigm Shift in Drug Discovery. *Front. Pharmacol.* 11, 770. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00770>
- Ho, M., Gallardo, E., McKenna-Yasek, D., De Luna, N., Illa, I., Brown Jr., R.H., 2002. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and miyoshi myopathy. *Ann Neurol.* 51, 129–133. <https://doi.org/10.1002/ana.10080>
- Ho, M., Post, C.M., Donahue, L.R., Lidov, H.G.W., Bronson, R.T., 2004. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet* 13, 1999–2010. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh212>
- Hoch, L., Bourg, N., Degrugillier, F., Bruge, C., Benabides, M., Pellier, E., Tournois, J., Mahé, G., Maignan, N., Dawe, J., Georges, M., Papazian, D., Subramanian, N., Simon, S., Fanen, P., Delevoeye, C., Richard, I., Nissan, X., 2022. Dual Blockade of Misfolded Alpha-Sarcoglycan Degradation by Bortezomib and Givinostat Combination. *Front Pharmacol* 13, 856804. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.856804>
- Hoch, L., Henriques, S.F., Bruge, C., Marsolier, J., Benabides, M., Bourg, N., Tournois, J., Mahé, G., Morizur, L., Jarrige, M., Bigot, A., Richard, I., Nissan, X., 2019. Identification of thiostrepton as a pharmacological approach to rescue misfolded alpha-sarcoglycan mutant proteins from degradation. *Sci Rep* 9, 6915. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43399-w>
- Hofhuis, J., Bersch, K., Büssenschütt, R., Drzymalski, M., Liebetanz, D., Nikolaev, V.O., Wagner, S., Maier, L.S., Gärtner, J., Klinge, L., Thoms, S., 2017. Dysferlin mediates membrane tubulation and links T-tubule biogenesis to muscular dystrophy. *J Cell Sci* 130, 841–852. <https://doi.org/10.1242/jcs.198861>
- Hong, S., Kang, U.J., Isacson, O., Kim, K.-S., 2008. Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. *J Neurochem* 104, 316–324. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04952.x>
- Hoppeler, H., Flück, M., 2002. Normal mammalian skeletal muscle and its phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology* 205, 2143–2152. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.15.2143>

- Hosoyama, T., McGivern, J.V., Van Dyke, J.M., Ebert, A.D., Suzuki, M., 2014. Derivation of Myogenic Progenitors Directly From Human Pluripotent Stem Cells Using a Sphere-Based Culture. *Stem Cells Translational Medicine* 3, 564–574. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0143>
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., Deng, H., 2013. Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* 341, 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1239278>
- Hrvatin, S., O'Donnell, C.W., Deng, F., Millman, J.R., Pagliuca, F.W., Dilorio, P., Reznia, A., Gifford, D.K., Melton, D.A., 2014. Differentiated human stem cells resemble fetal, not adult, β cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 3038–3043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400709111>
- Huang, T.-S., Li, L., Moalim-Nour, L., Jia, D., Bai, J., Yao, Z., Bennett, S.A.L., Figeys, D., Wang, L., 2015. A Regulatory Network Involving β -Catenin, e-Cadherin, PI3k/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells In Response to Wnt Signaling. *Stem Cells* 33, 1419–1433. <https://doi.org/10.1002/stem.1944>
- Huang, Y., Laval, S.H., Remoortere, A., Baudier, J., Benaud, C., Anderson, L.V.B., Straub, V., Deelder, A., Frants, R.R., Dunnen, J.T., Bushby, K., Maarel, S.M., 2007. AHNAK a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB j.* 21, 732–742. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6628com>
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., Melton, D.A., 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269–1275. <https://doi.org/10.1038/nbt.1502>
- Huard, J., Bouchard, J.P., Roy, R., Malouin, F., Dansereau, G., Labrecque, C., Albert, N., Richards, C.L., Lemieux, B., Tremblay, J.P., 1992. Human myoblast transplantation: Preliminary results of 4 cases. *Muscle Nerve* 15, 550–560. <https://doi.org/10.1002/mus.880150504>
- Humphrey, G.W., Mekhedov, E., Blank, P.S., de Morree, A., Pekkurnaz, G., Nagaraju, K., Zimmerberg, J., 2012. GREG cells, a dysferlin-deficient myogenic mouse cell line. *Experimental Cell Research* 318, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.10.004>
- Hwang, W.S., Ryu, Y.J., Park, J.H., Park, E.S., Lee, E.G., Koo, J.M., Jeon, H.Y., Lee, B.C., Kang, S.K., Kim, S.J., Ahn, C., Hwang, J.H., Park, K.Y., Cibelli, J.B., Moon, S.Y., 2004. Evidence of a Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Line Derived from a Cloned Blastocyst. *Science* 303, 1669–1674. <https://doi.org/10.1126/science.1094515>
- Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., Lako, M., 2005. Downregulation of NANOG Induces Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Extraembryonic Lineages. *STEM CELLS* 23, 1035–1043. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0080>
- Iberite, F., Gruppioni, E., Ricotti, L., 2022. Skeletal muscle differentiation of human iPSCs meets bioengineering strategies: perspectives and challenges. *NPJ Regen Med* 7, 23. <https://doi.org/10.1038/s41536-022-00216-9>
- Idone, V., Tam, C., Goss, J.W., Toomre, D., Pypaert, M., Andrews, N.W., 2008. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *Journal of Cell Biology* 180, 905–914. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708010>
- Ilic, D., Ogilvie, C., 2017. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells—What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells* 35, 17–25. <https://doi.org/10.1002/stem.2450>

Illa, I., Serrano-Munuera, C., Gallardo, E., Lasa, A., Rojas-Garcia, R., Palmer, J., Gallano, P., Baiget, M., Matsuda, C., Brown, R.H., 2001. Distal anterior compartment myopathy: A dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol.* 49, 130–134. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200101\)49:1<130::AID-ANA22>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200101)49:1<130::AID-ANA22>3.0.CO;2-0)

Illarioshkin, S.N., Ivanova-Smolenskaya, I.A., Greenberg, C.R., Nysten, E., Sukhorukov, V.S., Poleshchuk, V.V., Markova, E.D., Wrogemann, K., 2000. Identical dysferlin mutation in limb-girdle muscular dystrophy type 2B and distal myopathy. *Neurology* 55, 1931–1933. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.12.1931>

Illarioshkin, S.N., Ivanova-Smolenskaya, I.A., Tanaka, H., Vereshchagin, N.V., Markova, E.D., Poleshchuk, V.V., Lozhnikova, S.M., Sukhorukov, V.S., Limborska, S.A., Slominsky, P.A., Bulayeva, K.B., Tsuji, S., 1996. Clinical and molecular analysis of a large family with three distinct phenotypes of progressive muscular dystrophy. *Brain* 119, 1895–1909. <https://doi.org/10.1093/brain/119.6.1895>

Iovino, S., Burkart, A.M., Warren, L., Patti, M.E., Kahn, C.R., 2016. Myotubes derived from human-induced pluripotent stem cells mirror in vivo insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 1889–1894. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525665113>

Irion, S., Nostro, M.C., Kattman, S.J., Keller, G.M., 2008. Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells: From Developmental Biology to Therapeutic Applications. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 73, 101–110. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.065>

Ishiba, R., Santos, A.L.F., Almeida, C.F., Caires, L.C., Ribeiro, A.F., Ayub-Guerrieri, D., Fernandes, S.A., Souza, L.S., Vainzof, M., 2019. Faster regeneration associated to high expression of Fam65b and Hdac6 in dysferlin-deficient mouse. *J Mol Hist* 50, 375–387. <https://doi.org/10.1007/s10735-019-09834-y>

Ivanova, A., Smirnikhina, S., Lavrov, A., 2022. Dysferlinopathies: Clinical and genetic variability. *Clin Genet.* <https://doi.org/10.1111/cge.14216>

Izumi, R., Takahashi, T., Suzuki, N., Niihori, T., Ono, H., Nakamura, N., Katada, S., Kato, M., Warita, H., Tateyama, M., Aoki, Y., Aoki, M., 2020. The genetic profile of dysferlinopathy in a cohort of 209 cases: Genotype–phenotype relationship and a hotspot on the inner DysF domain. *Human Mutation* 41, 1540–1554. <https://doi.org/10.1002/humu.24036>

Jackman, R.W., Kandarian, S.C., 2004. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C834–843. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00579.2003>

Jacobs, M.B., James, M.K., Lowes, L.P., Alfano, L.N., Eagle, M., Muni Lofra, R., Moore, U., Feng, J., Rufibach, L.E., Rose, K., Duong, T., Bello, L., Pedrosa-Hernández, I., Holsten, S., Sakamoto, C., Canal, A., Sanchez-Aguilera Práxedes, N., Thiele, S., Siener, C., Vandeveld, B., DeWolf, B., Maron, E., Guglieri, M., Hogrel, J., Blamire, A.M., Carlier, P.G., Spuler, S., Day, J.W., Jones, K.J., Bharucha-Goebel, D.X., Salort-Campana, E., Pestronk, A., Walter, M.C., Paradas, C., Stojkovic, T., Mori-Yoshimura, M., Bravver, E., Díaz-Manera, J., Pegoraro, E., Mendell, J.R., The Jain COS Consortium, Mayhew, A.G., Straub, V., 2021. Assessing Dysferlinopathy Patients Over Three Years With a New Motor Scale. *Annals of Neurology* 89, 967–978. <https://doi.org/10.1002/ana.26044>

James, D., Levine, A.J., Besser, D., Hemmati-Brivanlou, A., 2005. TGFβ/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132, 1273–1282. <https://doi.org/10.1242/dev.01706>

- Jensen, T.L., Gøtzsche, C.R., Woldbye, D.P.D., 2021. Current and Future Prospects for Gene Therapy for Rare Genetic Diseases Affecting the Brain and Spinal Cord. *Front. Mol. Neurosci.* 14, 695937. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.695937>
- Jiang, F., Doudna, J.A., 2017. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* 46, 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jin, S.-Q., Yu, M., Zhang, W., Lyu, H., Yuan, Y., Wang, Z.-X., 2016. Dysferlin Gene Mutation Spectrum in a Large Cohort of Chinese Patients with Dysferlinopathy. *Chin Med J* 129, 2287–2293. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190671>
- Jokl, E.J., Blanco, G., 2016. Disrupted autophagy undermines skeletal muscle adaptation and integrity. *Mamm Genome* 27, 525–537. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9659-2>
- Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M., Belloch, R., 2009. Embryonic stem cell–specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 27, 459–461. <https://doi.org/10.1038/nbt.1535>
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., Woltjen, K., 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771–775. <https://doi.org/10.1038/nature07864>
- Kaplan, G.S., Torcun, C.C., Grune, T., Ozer, N.K., Karademir, B., 2017. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Treatment regimen and peripheral neuropathy as a side effect. *Free Radic Biol Med* 103, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.007>
- Kaplan, J.-C., Hamroun, D., 2015. The 2016 version of the gene table of monogenic neuromuscular disorders (nuclear genome). *Neuromuscular Disorders* 25, 991–1020. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.10.010>
- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J.K., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka, S., Osafune, K., 2019. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiological Reviews* 99, 79–114. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2017>
- Karpati, G., Ajdukovic, D., Arnold, D., Gledhill, R.B., Guttmann, R., Holland, P., Koch, P.A., Shoubridge, E., Spence, D., Vanasse, M., Watters, G.V., Abrahamowicz, M., Duff, C., Worton, R.G., 1993. Myoblast transfer in duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 34, 8–17. <https://doi.org/10.1002/ana.410340105>
- Kawahara, G., Serafini, P.R., Myers, J.A., Alexander, M.S., Kunkel, L.M., 2011. Characterization of zebrafish dysferlin by morpholino knockdown. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 413, 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.105>
- Keeler, A.M., Flotte, T.R., 2019. Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annu. Rev. Virol.* 6, 601–621. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015530>
- Kerr, J.P., Ward, C.W., Bloch, R.J., 2014. Dysferlin at transverse tubules regulates Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle. *Front Physiol* 5, 89. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00089>
- Kerr, J.P., Ziman, A.P., Mueller, A.L., Muriel, J.M., Kleinhans-Welte, E., Gumerson, J.D., Vogel, S.S., Ward, C.W., Roche, J.A., Bloch, R.J., 2013. Dysferlin stabilizes stress-induced Ca²⁺ signaling in the transverse tubule membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 20831–20836. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307960110>

- Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T., Mizuma, H., Takara, S., Takahashi, R., Inoue, H., Morita, S., Yamamoto, M., Okita, K., Nakagawa, M., Parmar, M., Takahashi, J., 2017. Human iPSC cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 548, 592–596. <https://doi.org/10.1038/nature23664>
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., Kim, K.-S., 2009. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>
- Kim, J., Lana, B., Torelli, S., Ryan, D., Catapano, F., Ala, P., Luft, C., Stevens, E., Konstantinidis, E., Louzada, S., Fu, B., Paredes-Redondo, A., Chan, A.E., Yang, F., Stemple, D.L., Liu, P., Ketteler, R., Selwood, D.L., Muntoni, F., Lin, Y., 2019. A new patient-derived iPSC model for dystroglycanopathies validates a compound that increases glycosylation of α -dystroglycan. *EMBO Rep* 20. <https://doi.org/10.15252/embr.201947967>
- Klinge, L., Harris, J., Sewry, C., Charlton, R., Anderson, L., Laval, S., Chiu, Y.-H., Hornsey, M., Straub, V., Barresi, R., Lochmüller, H., Bushby, K., 2010. Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 41, 166–173. <https://doi.org/10.1002/mus.21166>
- Klinge, L., Laval, S., Keers, S., Haldane, F., Straub, V., Barresi, R., Bushby, K., 2007. From T-tubule to sarcolemma: damage-induced dysferlin translocation in early myogenesis. *FASEB j.* 21, 1768–1776. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7659com>
- Kobayashi, K., Izawa, T., Kuwamura, M., Yamate, J., 2010. The distribution and characterization of skeletal muscle lesions in dysferlin-deficient SJL and A/J mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62, 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2009.06.009>
- Kojima, K., Miyoshi, H., Nagoshi, N., Kohyama, J., Itakura, G., Kawabata, S., Ozaki, M., Iida, T., Sugai, K., Ito, S., Fukuzawa, R., Yasutake, K., Renault-Mihara, F., Shibata, S., Matsumoto, M., Nakamura, M., Okano, H., 2019. Selective Ablation of Tumorigenic Cells Following Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cell Transplantation in Spinal Cord Injury. *Stem Cells Translational Medicine* 8, 260–270. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0096>
- Kokubu, Y., Nagino, T., Sasa, K., Oikawa, T., Miyake, K., Kume, A., Fukuda, M., Fuse, H., Tozawa, R., Sakurai, H., 2019. Phenotypic Drug Screening for Dysferlinopathy Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine* 8, 1017–1029. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0280>
- Kong, K.Y., Ren, J., Kraus, M., Finklestein, S.P., Brown, R.H., 2004. Human Umbilical Cord Blood Cells Differentiate into Muscle in *sjl* Muscular Dystrophy Mice. *STEM CELLS* 22, 981–993. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-6-981>
- Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., Rizzino, A., 2008. Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26, 903–911. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0951>
- Krahn, M., Bérout, C., Labelle, V., Nguyen, K., Bernard, R., Bassez, G., Figarella-Branger, D., Fernandez, C., Bouvenot, J., Richard, I., Ollagnon-Roman, E., Bevilacqua, J.A., Salvo, E., Attarian, S., Chapon, F., Pellissier, J.-F., Pouget, J., Hammouda, E.H., Laforêt, P., Urtizberea, J.A., Eymard, B., Leturcq, F., Lévy, N., 2009. Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients. *Hum Mutat* 30, E345–375. <https://doi.org/10.1002/humu.20910>

- Krahn, M., Wein, N., Bartoli, M., Lostal, W., Courrier, S., Bourg-Alibert, N., Nguyen, K., Vial, C., Streichenberger, N., Labelle, V., DePetris, D., Pécheux, C., Leturcq, F., Cau, P., Richard, I., Lévy, N., 2010. A Naturally Occurring Human Minidysferlin Protein Repairs Sarcolemmal Lesions in a Mouse Model of Dysferlinopathy. *Sci Transl Med* 2, 50ra69. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000951>
- Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., Agulnick, A.D., D'Amour, K.A., Carpenter, M.K., Baetge, E.E., 2008. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443–452. <https://doi.org/10.1038/nbt1393>
- Kuşçu, G.C., Gürel, Ç., Buhur, A., Oltulu, F., Akman, L., Köse, T., Yavaşoğlu, N.Ü.K., Yavaşoğlu, A., 2022. The regulatory effects of clomiphene and tamoxifen on mTOR and LC3-II expressions in relation to autophagy in experimental polycystic ovary syndrome (PCOS). *Mol Biol Rep* 49, 1721–1729. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06981-y>
- Ladewig, J., Koch, P., Brüstle, O., 2013. Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 225–236. <https://doi.org/10.1038/nrm3543>
- Lampe, M., Vassilopoulos, S., Merrifield, C., 2016. Clathrin coated pits, plaques and adhesion. *J Struct Biol* 196, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.07.009>
- Lanza, R., Russell, D.W., Nagy, A., 2019. Engineering universal cells that evade immune detection. *Nat Rev Immunol* 19, 723–733. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0200-1>
- Lasa-Elgarresta, J., Mosqueira-Martín, L., González-Imaz, K., Marco-Moreno, P., Gerenu, G., Mamchaoui, K., Mouly, V., López de Munain, A., Vallejo-Illarramendi, A., 2022. Targeting the Ubiquitin-Proteasome System in Limb-Girdle Muscular Dystrophy With CAPN3 Mutations. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 822563. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.822563>
- Lau, Y.H., Caswell, A.H., Brunschwig, J.P., 1977. Isolation of transverse tubules by fractionation of triad junctions of skeletal muscle. *J Biol Chem* 252, 5565–5574.
- Laustriat, D., Gide, J., Barrault, L., Chautard, E., Benoit, C., Auboeuf, D., Boland, A., Battail, C., Artiguenave, F., Deleuze, J.-F., Bénit, P., Rustin, P., Franc, S., Charpentier, G., Furling, D., Bassez, G., Nissan, X., Martinat, C., Peschanski, M., Baghdoyan, S., 2015. In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 4, e262. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.35>
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.-C., Farsad, K., Wenk, M.R., De Camilli, P., 2002. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-Tubule Biogenesis in Muscle. *Science* 297, 1193–1196. <https://doi.org/10.1126/science.1071362>
- Lee, E.-M., Kim, D.-Y., Kim, A.-Y., Lee, E.-J., Kim, S.-H., Lee, M.-M., Sung, S.-E., Park, J.-K., Jeong, K.-S., 2015. Chronic effects of losartan on the muscles and the serologic profiles of mdx mice. *Life Sciences* 143, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.023>
- Lee, J.J.A., Maruyama, R., Duddy, W., Sakurai, H., Yokota, T., 2018. Identification of Novel Antisense-Mediated Exon Skipping Targets in DYSF for Therapeutic Treatment of Dysferlinopathy. *Mol Ther Nucleic Acids* 13, 596–604. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.10.004>
- Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H.L., Zucker, J.P., Yuan, B., Bell, G.W., Herbolsheimer, E., Hannett, N.M., Sun, K., Odom, D.T., Otte, A.P., Volkert, T.L., Bartel, D.P.,

- Melton, D.A., Gifford, D.K., Jaenisch, R., Young, R.A., 2006. Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 125, 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.043>
- Lek, A., Evesson, F.J., Lemckert, F.A., Redpath, G.M.I., Lueders, A.-K., Turnbull, L., Whitchurch, C.B., North, K.N., Cooper, S.T., 2013. Calpains, Cleaved Mini-DysferlinC72, and L-Type Channels Underpin Calcium-Dependent Muscle Membrane Repair. *Journal of Neuroscience* 33, 5085–5094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3560-12.2013>
- Lek, A., Evesson, F.J., Sutton, R.B., North, K.N., Cooper, S.T., 2012. Ferlins: Regulators of Vesicle Fusion for Auditory Neurotransmission, Receptor Trafficking and Membrane Repair: Ferlins. *Traffic* 13, 185–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01267.x>
- Lennon, N.J., Kho, A., Bacskai, B.J., Perlmutter, S.L., Hyman, B.T., Brown, R.H., 2003. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 278, 50466–50473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307247200>
- Lerario, A., Cogiamanian, F., Marchesi, C., Belicchi, M., Bresolin, N., Porretti, L., Torrente, Y., 2010. Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy. *BMC Musculoskelet Disord* 11, 157. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-11-157>
- Leriché-Guérin, K., Anderson, L.V.B., Wrogemann, K., Roy, B., Goulet, M., Tremblay, J.P., 2002. Dysferlin expression after normal myoblast transplantation in SCID and in SJL mice. *Neuromuscular Disorders* 12, 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(01\)00254-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(01)00254-1)
- Levenberg, S., Ferreira, L.S., Chen-Konak, L., Kraehenbuehl, T.P., Langer, R., 2010. Isolation, differentiation and characterization of vascular cells derived from human embryonic stem cells. *Nat Protoc* 5, 1115–1126. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.31>
- Lévy, N., Wein, N., Barthelemy, F., Mouly, V., Garcia, L., Krahn, M., Bartoli, M., 2010. Therapeutic exon ‘switching’ for dysferlinopathies? *Eur J Hum Genet* 18, 969–970. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.73>
- Li, C., Haller, G., Wehl, C.C., 2022. Current and Future Approaches to Classify VUSs in LGMD-Related Genes. *Genes* 13, 382. <https://doi.org/10.3390/genes13020382>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup, 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Liewluck, T., Milone, M., 2018. Untangling the complexity of limb-girdle muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 58, 167–177. <https://doi.org/10.1002/mus.26077>
- Lin, B., Li, Y., Han, L., Kaplan, A.D., Ao, Y., Kalra, S., Bett, G.C.L., Rasmusson, R.L., Denning, C., Yang, L., 2015. Modeling and study of the mechanism of dilated cardiomyopathy using induced pluripotent stem cells derived from individuals with Duchenne muscular dystrophy. *Disease Models & Mechanisms* 8, 457–466. <https://doi.org/10.1242/dmm.019505>
- Linssen, W., 1997. Miyoshi-type distal muscular dystrophy. Clinical spectrum in 24 Dutch patients. *Brain* 120, 1989–1996. <https://doi.org/10.1093/brain/120.11.1989>
- Linssen, W.H.J.P., de Voogt, W.G., Krahn, M., Bernard, R., Levy, N., Wokke, J.H.J., Ginjaar, H.B., de Visser, M., 2013. Long-term follow-up study on patients with Miyoshi phenotype of distal muscular dystrophy. *Eur J Neurol* 20, 968–974. <https://doi.org/10.1111/ene.12129>

- Lira, V.A., Okutsu, M., Zhang, M., Greene, N.P., Laker, R.C., Breen, D.S., Hoehn, K.L., Yan, Z., 2013. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J* 27, 4184–4193. <https://doi.org/10.1096/fj.13-228486>
- Liu, C., Oikonomopoulos, A., Sayed, N., Wu, J.C., 2018. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development* 145, dev156166. <https://doi.org/10.1242/dev.156166>
- Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizberea, J.A., Hentati, F., Hamida, M.B., Bohlega, S., Culper, E.J., Amato, A.A., Bossie, K., Oeltjen, J., Bejaoui, K., McKenna-Yasek, D., Hosler, B.A., Schurr, E., Arahata, K., de Jong, P.J., Brown, R.H., 1998. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20, 31–36. <https://doi.org/10.1038/1682>
- Liu, Z., Cai, Y., Wang, Y., Nie, Y., Zhang, C., Xu, Y., Zhang, X., Lu, Y., Wang, Z., Poo, M., Sun, Q., 2018. Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* 172, 881–887.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.020>
- Llangua, T., Nagy, N., Conatser, L., Dial, C., Sutton, R.B., Hirsch, M.L., 2017. Structure-Based Designed Nano-Dysferlin Significantly Improves Dysferlinopathy in BLA/J Mice. *Molecular Therapy* 25, 2150–2162. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.05.013>
- Lo Cicero, A., Jaskowiak, A.-L., Egesipe, A.-L., Tournois, J., Brinon, B., Pitrez, P.R., Ferreira, L., de Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., Nissan, X., 2016. A High Throughput Phenotypic Screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 6, 34798. <https://doi.org/10.1038/srep34798>
- LoMauro, A., Gandossini, S., Russo, A., Diella, E., Pistininzi, C., Marchi, E., Pascuzzo, R., Vantini, S., Aliverti, A., D'Angelo, M.G., 2021. Over three decades of natural history of limb girdle muscular dystrophy type R1/2A and R2/2B: Mathematical modelling of a multifactorial study. *Neuromuscul Disord* 31, 489–497. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.02.018>
- Lorain, S., Peccate, C., Le Hir, M., Griffith, G., Philippi, S., Précigout, G., Mamchaoui, K., Jollet, A., Voit, T., Garcia, L., 2013. Dystrophin rescue by trans-splicing: a strategy for DMD genotypes not eligible for exon skipping approaches. *Nucleic Acids Research* 41, 8391–8402. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt621>
- Löser, P., Schirm, J., Guhr, A., Wobus, A.M., Kurtz, A., 2010. Human Embryonic Stem Cell Lines and Their Use in International Research. *Stem Cells* 28, 240–246. <https://doi.org/10.1002/stem.286>
- Lostal, W., Bartoli, M., Bourg, N., Roudaut, C., Bentaïb, A., Miyake, K., Guerchet, N., Fougèrouse, F., McNeil, P., Richard, I., 2010. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet* 19, 1897–1907. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq065>
- Lostal, W., Bartoli, M., Roudaut, C., Bourg, N., Krahn, M., Pryadkina, M., Borel, P., Suel, L., Roche, J.A., Stockholm, D., Bloch, R.J., Levy, N., Bashir, R., Richard, I., 2012. Lack of Correlation between Outcomes of Membrane Repair Assay and Correction of Dystrophic Changes in Experimental Therapeutic Strategy in Dysferlinopathy. *PLoS ONE* 7, e38036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038036>
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- Lu, M., Xu, L., Wang, M., Guo, T., Luo, F., Su, N., Yi, S., Chen, T., 2018. miR-149 promotes the myocardial differentiation of mouse bone marrow stem cells by targeting Dab2. *Mol Med Rep* 17, 8502–8509. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8903>
- Lu, Q.L., Rabinowitz, A., Chen, Y.C., Yokota, T., Yin, H., Alter, J., Jadoon, A., Bou-Gharios, G., Partridge, T., 2005. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 198–203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406700102>
- Lukyanenko, V., Muriel, J.M., Bloch, R.J., 2017. Coupling of excitation to Ca²⁺ release is modulated by dysferlin. *J Physiol* 595, 5191–5207. <https://doi.org/10.1113/JP274515>
- Ma, J., Pichavant, C., du Bois, H., Bhakta, M., Calos, M.P., 2017. DNA-Mediated Gene Therapy in a Mouse Model of Limb Girdle Muscular Dystrophy 2B. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 7, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.10.005>
- Maffioletti, S.M., Gerli, M.F.M., Ragazzi, M., Dastidar, S., Benedetti, S., Loperfido, M., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Tedesco, F.S., 2015. Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPS cells. *Nat Protoc* 10, 941–958. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.057>
- Maffioletti, S.M., Sarcar, S., Henderson, A.B.H., Mannhardt, I., Pinton, L., Moyle, L.A., Steele-Stallard, H., Cappellari, O., Wells, K.E., Ferrari, G., Mitchell, J.S., Tyzack, G.E., Kotiadis, V.N., Khedr, M., Ragazzi, M., Wang, W., Duchen, M.R., Patani, R., Zammit, P.S., Wells, D.J., Eschenhagen, T., Tedesco, F.S., 2018. Three-Dimensional Human iPSC-Derived Artificial Skeletal Muscles Model Muscular Dystrophies and Enable Multilineage Tissue Engineering. *Cell Reports* 23, 899–908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.091>
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K., Hochedlinger, K., 2007. Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55–70. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.014>
- Mahjneh, I., Bushby, K., Pizzi, A., Bashir, R., Marconi, G., 1996a. Limb-girdle muscular dystrophy: a follow-up study of 79 patients. *Acta Neurol Scand* 94, 177–189. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1996.tb07050.x>
- Mahjneh, I., Passos-Bueno, M.R., Zatz, M., Vainzof, M., Marconi, G., Nashef, L., Bashir, R., Bushby, K., 1996b. The phenotype of chromosome 2p-linked limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 6, 483–490. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(96\)00390-2](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(96)00390-2)
- Malcher, J., Heidt, L., Goyenvalle, A., Escobar, H., Marg, A., Beley, C., Benchaouir, R., Bader, M., Spuler, S., García, L., Schöwel, V., 2018. Exon Skipping in a Dysf-Missense Mutant Mouse Model. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 13, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.08.013>
- Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J.L., Muntoni, F., Kim, J., Philippi, S., Spuler, S., Levy, N., Blumen, S.C., Voit, T., Wright, W.E., Aamiri, A., Butler-Browne, G., Mouly, V., 2011. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle* 1, 34. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-34>
- Marg, A., Schoewel, V., Timmel, T., Schulze, A., Shah, C., Daumke, O., Spuler, S., 2012. Sarcolemmal repair is a slow process and includes EHD2. *Traffic* 13, 1286–1294. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01386.x>

- Mariano, A., Henning, A., Han, R., 2013. Dysferlin-deficient muscular dystrophy and innate immune activation. *FEBS J* 280, 4165–4176. <https://doi.org/10.1111/febs.12261>
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J.M., Dennis, L.M., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P.A., Bartel, D.P., Jaenisch, R., Young, R.A., 2008. Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. *Cell* 134, 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.020>
- Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M.M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J.A., Pietu, G., Peschanski, M., Martinat, C., 2011. Mutant Human Embryonic Stem Cells Reveal Neurite and Synapse Formation Defects in Type 1 Myotonic Dystrophy. *Cell Stem Cell* 8, 434–444. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.004>
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Marty, N.J., Holman, C.L., Abdullah, N., Johnson, C.P., 2013. The C2 Domains of Otoferlin, Dysferlin, and Myoferlin Alter the Packing of Lipid Bilayers. *Biochemistry* 52, 5585–5592. <https://doi.org/10.1021/bi400432f>
- Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., Sandri, M., 2009. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 10, 507–515. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.008>
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., 2006. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Human Reproduction* 21, 503–511. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei345>
- Mateos-Aierdi, A.J., Dehesa-Etxebeste, M., Goicoechea, M., Aiastui, A., Richaud-Patin, Y., Jiménez-Delgado, S., Raya, A., Naldaiz-Gastesi, N., López de Munain, A., 2021. Patient-specific iPSC-derived cellular models of LGMDR1. *Stem Cell Research* 53, 102333. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102333>
- Matsuda, C., 2001. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics* 10, 1761–1766. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.17.1761>
- Matsuda, C., Kameyama, K., Tagawa, K., Ogawa, M., Suzuki, A., Yamaji, S., Okamoto, H., Nishino, I., Hayashi, Y.K., 2005. Dysferlin Interacts with Affixin (β -Parvin) at the Sarcolemma. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 334–340. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.4.334>
- Matsuda, C., Kiyosue, K., Nishino, I., Goto, Y., Hayashi, Y.K., 2015. Dysferlinopathy Fibroblasts Are Defective in Plasma Membrane Repair. *PLoS Curr* 7. <https://doi.org/10.1371/currents.md.5865add2d766f39a0e0411d38a7ba09c>
- Matsuda, C., Miyake, K., Kameyama, K., Keduka, E., Takeshima, H., Imamura, T., Araki, N., Nishino, I., Hayashi, Y., 2012. The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72). *PLoS Curr* 4, e5035add8caff4. <https://doi.org/10.1371/5035add8caff4>
- Mauro, A., 1961. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *J Biophys Biochem Cytol* 9, 493–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>

- Mayeuf, A., Relaix, F., 2011. [Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle]. *Med Sci (Paris)* 27, 521–526. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011275018>
- Mayorga, M.E., Penn, M.S., 2012. miR-145 is differentially regulated by TGF- β 1 and ischaemia and targets Disabled-2 expression and wnt/ β -catenin activity. *J Cell Mol Med* 16, 1106–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01385.x>
- Mázala, D.A., Novak, J.S., Hogarth, M.W., Nearing, M., Adusumalli, P., Tully, C.B., Habib, N.F., Gordish-Dressman, H., Chen, Y.-W., Jaiswal, J.K., Partridge, T.A., 2020. TGF- β -driven muscle degeneration and failed regeneration underlie disease onset in a DMD mouse model. *JCI Insight* 5, 135703. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.135703>
- McDade, J.R., Archambeau, A., Michele, D.E., 2014. Rapid actin-cytoskeleton-dependent recruitment of plasma membrane-derived dysferlin at wounds is critical for muscle membrane repair. *FASEB j.* 28, 3660–3670. <https://doi.org/10.1096/fj.14-250191>
- McDade, J.R., Michele, D.E., 2014. Membrane damage-induced vesicle-vesicle fusion of dysferlin-containing vesicles in muscle cells requires microtubules and kinesin. *Human Molecular Genetics* 23, 1677–1686. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt557>
- McGrath, M.J., Eramo, M.J., Gurung, R., Sriratana, A., Gehrig, S.M., Lynch, G.S., Lourdes, S.R., Koentgen, F., Feeney, S.J., Lazarou, M., McLean, C.A., Mitchell, C.A., 2021. Defective lysosome reformation during autophagy causes skeletal muscle disease. *J Clin Invest* 131, 135124. <https://doi.org/10.1172/JCI135124>
- McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., 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>
- McNally, E.M., Ly, C.T., Rosenmann, H., Mitrani Rosenbaum, S., Jiang, W., Anderson, L.V., Soffer, D., Argov, Z., 2000. Splicing mutation in dysferlin produces limb-girdle muscular dystrophy with inflammation. *Am J Med Genet* 91, 305–312. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(20000410\)91:4<305::aid-ajmg12>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(20000410)91:4<305::aid-ajmg12>3.0.co;2-s)
- McNally, E.M., Pytel, P., 2007. Muscle Diseases: The Muscular Dystrophies. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2, 87–109. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091936>
- McNeil, P., 2009. Membrane repair redux: redox of MG53. *Nat Cell Biol* 11, 7–9. <https://doi.org/10.1038/ncb0109-7>
- McNeil, P.L., 2002. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. *J Cell Sci* 115, 873–879. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.5.873>
- Mellgren, R.L., Zhang, W., Miyake, K., McNeil, P.L., 2007. Calpain is required for the rapid, calcium-dependent repair of wounded plasma membrane. *J Biol Chem* 282, 2567–2575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604560200>
- Ménard, C., Hagege, A.A., Agbulut, O., Barro, M., Morichetti, M.C., Brasselet, C., Bel, A., Messas, E., Bissery, A., Bruneval, P., Desnos, M., Pucéat, M., Menasché, P., 2005. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *The Lancet* 366, 1005–1012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67380-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67380-1)
- 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., Nagaraja, H., Stephens, R., Lantry, L., Morris, G.E., Burghes, A.H.M., 1995.

Myoblast Transfer in the Treatment of Duchenne's Muscular Dystrophy. *N Engl J Med* 333, 832–838. <https://doi.org/10.1056/NEJM199509283331303>

Mendell, J.R., Moxley, R.T., Griggs, R.C., Brooke, M.H., Fenichel, G.M., Miller, J.P., King, W., Signore, L., Pandya, S., Florence, J., 1989. Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 320, 1592–1597. <https://doi.org/10.1056/NEJM198906153202405>

Mercuri, E., Bönnemann, C.G., Muntoni, F., 2019. Muscular dystrophies. *The Lancet* 394, 2025–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32910-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32910-1)

Meregalli, M., Navarro, C., Sitzia, C., Farini, A., Montani, E., Wein, N., Razini, P., Beley, C., Cassinelli, L., Parolini, D., Belicchi, M., Parazzoli, D., Garcia, L., Torrente, Y., 2013. Full-length dysferlin expression driven by engineered human dystrophic blood derived CD133+ stem cells. *FEBS J* 280, 6045–6060. <https://doi.org/10.1111/febs.12523>

Merkle, F.T., Eggan, K., 2013. Modeling human disease with pluripotent stem cells: from genome association to function. *Cell Stem Cell* 12, 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.05.016>

Mesa, L.E., Dubrovsky, A.L., Corderi, J., Marco, P., Flores, D., 1991. Steroids in duchenne muscular dystrophy - Deflazacort trial. *Neuromuscular Disorders* 1, 261–266. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(91\)90099-E](https://doi.org/10.1016/0960-8966(91)90099-E)

Metallo, C.M., Ji, L., de Pablo, J.J., Palecek, S.P., 2008. Retinoic Acid and Bone Morphogenetic Protein Signaling Synergize to Efficiently Direct Epithelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26, 372–380. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0501>

Metti, S., Gambarotto, L., Chrisam, M., Baraldo, M., Braghetta, P., Blaauw, B., Bonaldo, P., 2020. The Polyphenol Pterostilbene Ameliorates the Myopathic Phenotype of Collagen VI Deficient Mice via Autophagy Induction. *Front Cell Dev Biol* 8, 580933. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580933>

Mettlen, M., Loerke, D., Yarar, D., Danuser, G., Schmid, S.L., 2010. Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology* 188, 919–933. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908078>

Miller, J.D., Ganat, Y.M., Kishinevsky, S., Bowman, R.L., Liu, B., Tu, E.Y., Mandal, P.K., Vera, E., Shim, J., Kriks, S., Taldone, T., Fusaki, N., Tomishima, M.J., Krainc, D., Milner, T.A., Rossi, D.J., Studer, L., 2013. Human iPSC-Based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-Induced Aging. *Cell Stem Cell* 13, 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.006>

Miller, R.G., Sharma, K.R., Pavlath, G.K., Gussoni, E., Mynhier, M., Yu, P., Lanctot, A.M., Greco, C.M., Steinman, L., Blau, H.M., 1997. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: The San Francisco study. *Muscle Nerve* 20, 469–478. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199704\)20:4<469::AID-MUS10>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199704)20:4<469::AID-MUS10>3.0.CO;2-U)

Minasi, M.G., Riminucci, M., De Angelis, L., Borello, U., Berarducci, B., Innocenzi, A., Caprioli, A., Sirabella, D., Baiocchi, M., De Maria, R., Boratto, R., Jaffredo, T., Broccoli, V., Bianco, P., Cossu, G., 2002. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 129, 2773–2783. <https://doi.org/10.1242/dev.129.11.2773>

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S., 2003. The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631–642. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00393-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00393-3)

- Miyoshi, K., Kawai, H., Iwasa, M., Kusaka, K., Nishino, H., 1986. Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain* 109 (Pt 1), 31–54. <https://doi.org/10.1093/brain/109.1.31>
- Mizuno, Y., Chang, H., Umeda, K., Niwa, A., Iwasa, T., Awaya, T., Fukada, S., Yamamoto, H., Yamanaka, S., Nakahata, T., Heike, T., 2010. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB j.* 24, 2245–2253. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137174>
- Mohan, M., Matin, A., Davies, F.E., 2017. Update on the optimal use of bortezomib in the treatment of multiple myeloma. *Cancer Manag Res* 9, 51–63. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S105163>
- Monjaret, F., Bourg, N., Suel, L., Roudaut, C., Le Roy, F., Richard, I., Charton, K., 2014. Cis -splicing and Translation of the Pre- Trans -splicing Molecule Combine With Efficiency in Spliceosome-mediated RNA Trans -splicing. *Molecular Therapy* 22, 1176–1187. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.35>
- Moore, U., Gordish, H., Diaz-Manera, J., James, M.K., Mayhew, A.G., Guglieri, M., Fernandez-Torron, R., Rufibach, L.E., Feng, J., Blamire, A.M., Carlier, P.G., Spuler, S., Day, J.W., Jones, K.J., Bharucha-Goebel, D.X., Salort-Campana, E., Pestronk, A., Walter, M.C., Paradas, C., Stojkovic, T., Mori-Yoshimura, M., Bravver, E., Pegoraro, E., Lowes, L.P., Mendell, J.R., Bushby, K., Straub, V., 2021. Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy R2 are the same disease. *Neuromuscular Disorders* 31, 265–280. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.01.009>
- Moradi, S., Mahdizadeh, H., Šarić, T., Kim, J., Harati, J., Shahsavarani, H., Greber, B., Moore, J.B., 2019. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Res Ther* 10, 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>
- Moreau, A., Reissq, J., Delanoe-Ayari, H., Pierre, M., Janin, A., Deliniere, A., Bessièrè, F., Meli, A.C., Charrabi, A., Lafont, E., Valla, C., Bauer, D., Morel, E., Gache, V., Millat, G., Nissan, X., Faucherre, A., Jopling, C., Richard, S., Mejat, A., Chevalier, P., 2021. Deciphering DSC2 arrhythmogenic cardiomyopathy electrical instability: From ion channels to ECG and tailored drug therapy. *Clinical and Translational Medicine* 11. <https://doi.org/10.1002/ctm2.319>
- Morrisette, D.A., Parachikova, A., Green, K.N., LaFerla, F.M., 2009. Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *J Biol Chem* 284, 6033–6037. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800030200>
- Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D.N., Chuzhanova, N.A., 2008. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum. Mutat.* 29, 1037–1047. <https://doi.org/10.1002/humu.20763>
- Mukund, K., Subramaniam, S., 2020. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 12, e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Mullard, A., 2022. 2021 FDA approvals. *Nat Rev Drug Discov* 21, 83–88. <https://doi.org/10.1038/d41573-022-00001-9>
- Mullard, A., 2021. 2020 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* 20, 85–90. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00002-0>
- Müller, K.I., Ghelue, M.V., Lund, I., Jonsrud, C., Arntzen, K.A., 2021. The prevalence of hereditary neuromuscular disorders in Northern Norway. *Brain Behav* 11, e01948. <https://doi.org/10.1002/brb3.1948>

- Mummery, C.L., Ward, D., Passier, R., 2007. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes by coculture with endoderm in serum-free medium. *Curr Protoc Stem Cell Biol* Chapter 1. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc01f02s2>
- Muriel, J., Lukyanenko, V., Kwiatkowski, T., Bhattacharya, S., Garman, D., Weisleder, N., Bloch, R.J., 2022. The C2 domains of dysferlin: roles in membrane localization, Ca²⁺ signalling and sarcolemmal repair. *The Journal of Physiology* 600, 1953–1968. <https://doi.org/10.1113/JP282648>
- Nagaraju, K., Rawat, R., Veszelovszky, E., Thapliyal, R., Kesari, A., Sparks, S., Raben, N., Plotz, P., Hoffman, E.P., 2008. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol* 172, 774–785. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070327>
- Nagashima, T., Chuma, T., Mano, Y., Goto, Y., Hayashi, Y.K., Minami, N., Nishino, I., Nonaka, I., Takahashi, T., Sawa, H., Aoki, M., Nagashima, K., 2004. Dysferlinopathy associated with rigid spine syndrome. *Neuropathology* 24, 341–346. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2004.00573.x>
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101–106. <https://doi.org/10.1038/nbt1374>
- Nallamilli, B.R.R., Chakravorty, S., Kesari, A., Tanner, A., Ankala, A., Schneider, T., da Silva, C., Beadling, R., Alexander, J.J., Askree, S.H., Whitt, Z., Bean, L., Collins, C., Khadilkar, S., Gaitonde, P., Dastur, R., Wicklund, M., Mozaffar, T., Harms, M., Rufibach, L., Mittal, P., Hegde, M., 2018. Genetic landscape and novel disease mechanisms from a large LGMD cohort of 4656 patients. *Ann Clin Transl Neurol* 5, 1574–1587. <https://doi.org/10.1002/acn3.649>
- Negrone, E., Butler-Browne, G.S., Mouly, V., 2006. Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. *Pathologie Biologie* 54, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2005.09.001>
- Neumeyer, A.M., Cross, D., McKenna-Yasek, D., Zawadzka, A., Hoffman, E.P., Pegoraro, E., Hunter, R.G., Munsat, T.L., Brown, R.H., 1998. Pilot study of myoblast transfer in the treatment of Becker muscular dystrophy. *Neurology* 51, 589–592. <https://doi.org/10.1212/WNL.51.2.589>
- Nevo, Y., Halevy, O., Genin, O., Moshe, I., Turgeman, T., Harel, M., Biton, E., Reif, S., Pines, M., 2010. Fibrosis inhibition and muscle histopathology improvement in laminin- α 2-deficient mice. *Muscle Nerve* 42, 218–229. <https://doi.org/10.1002/mus.21706>
- Ng, R., Banks, G.B., Hall, J.K., Muir, L.A., Ramos, J.N., Wicki, J., Odom, G.L., Konieczny, P., Seto, J., Chamberlain, J.R., Chamberlain, J.S., 2012. Animal Models of Muscular Dystrophy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 105, 83–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00004-4>
- Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schüle, B., Dolmetsch, R.E., Langston, W., Palmer, T.D., Pera, R.R., 2011. LRRK2 Mutant iPSC-Derived DA Neurons Demonstrate Increased Susceptibility to Oxidative Stress. *Cell Stem Cell* 8, 267–280. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.01.013>
- Nguyen, K., Bassez, G., Bernard, R., Krahn, M., Labelle, V., Figarella-Branger, D., Pouget, J., Hammouda, E.H., Bérout, C., Urtizberea, A., Eymard, B., Leturcq, F., Lévy, N., 2005. Dysferlin mutations in LGMD2B, Miyoshi myopathy, and atypical dysferlinopathies. *Hum. Mutat.* 26, 165–165. <https://doi.org/10.1002/humu.9355>

- Nguyen, K., Bassez, G., Krahn, M., Bernard, R., Laforêt, P., Labelle, V., Urtizbera, J.A., Figarella-Branger, D., Romero, N., Attarian, S., Leturcq, F., Pouget, J., Lévy, N., Eymard, B., 2007. Phenotypic Study in 40 Patients With Dysferlin Gene Mutations: High Frequency of Atypical Phenotypes. *Arch Neurol* 64, 1176–1182. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.8.1176>
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., Smith, A., 1998. Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* 95, 379–391. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81769-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81769-9)
- Nigro, V., Savarese, M., 2016. Next-generation sequencing approaches for the diagnosis of skeletal muscle disorders. *Curr Opin Neurol* 29, 621–627. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000371>
- Nigro, V., Savarese, M., 2014. Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myol* 33, 1–12.
- Niks, E.H., Aartsma-Rus, A., 2017. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opinion on Biological Therapy* 17, 225–236. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1271872>
- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., Muramatsu, M., 1999. The Gene for the Embryonic Stem Cell Coactivator UTF1 Carries a Regulatory Element Which Selectively Interacts with a Complex Composed of Oct-3/4 and Sox-2. *MOL. CELL. BIOL.* 19, 13.
- Nissan, X., Blondel, S., Navarro, C., Maury, Y., Denis, C., Girard, M., Martinat, C., De Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., Peschanski, M., 2012. Unique Preservation of Neural Cells in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Is Due to the Expression of the Neural-Specific miR-9 MicroRNA. *Cell Reports* 2, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.015>
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G., 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- Nixon, R.A., Yang, D.-S., 2011. Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis* 43, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.021>
- Nosengo, N., 2016. Faced with skyrocketing costs for developing new drugs, researchers are looking at ways to repurpose older ones — and even some that failed in initial trials. 3.
- Nygaard, H.B., Wagner, A.F., Bowen, G.S., Good, S.P., MacAvoy, M.G., Strittmatter, K.A., Kaufman, A.C., Rosenberg, B.J., Sekine-Konno, T., Varma, P., Chen, K., Koleske, A.J., Reiman, E.M., Strittmatter, S.M., van Dyck, C.H., 2015. A phase Ib multiple ascending dose study of the safety, tolerability, and central nervous system availability of AZD0530 (saracatinib) in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 7, 35. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0119-0>
- Okahashi, S., Ogawa, G., Suzuki, M., Ogata, K., Nishino, I., Kawai, M., 2008. Asymptomatic Sporadic Dysferlinopathy Presenting with Elevation of Serum Creatine Kinase. Typical Distribution of Muscle Involvement Shown by MRI but not by CT. *Intern. Med.* 47, 305–307. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.47.0519>
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., Hamada, H., 1990. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461–472. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90597-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90597-8)
- Ono, H., Suzuki, N., Kanno, S., Kawahara, G., Izumi, R., Takahashi, T., Kitajima, Y., Osana, S., Nakamura, N., Akiyama, T., Ikeda, K., Shijo, T., Mitsuzawa, S., Nagatomi, R., Araki, N., Yasui, A.,

- Warita, H., Hayashi, Y.K., Miyake, K., Aoki, M., 2020. AMPK Complex Activation Promotes Sarcolemmal Repair in Dysferlinopathy. *Molecular Therapy* 28, 1133–1153. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.02.006>
- Ontell, M., Hughes, D., Bourke, D., 1988. Morphometric analysis of the developing mouse soleus muscle. *Am J Anat* 181, 279–288. <https://doi.org/10.1002/aja.1001810306>
- Osaki, T., Uzel, S.G.M., Kamm, R.D., 2020. On-chip 3D neuromuscular model for drug screening and precision medicine in neuromuscular disease. *Nat Protoc* 15, 421–449. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0248-1>
- Ottenheijm, C.A.C., Granzier, H., 2010. Lifting the Nebula: Novel Insights into Skeletal Muscle Contractility. *Physiology* 25, 304–310. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2010>
- Ouyang, Q., Zhang, K., Lin, D., Feng, C.G., Cai, Y., Chen, X., 2020. Bazedoxifene Suppresses Intracellular Mycobacterium tuberculosis Growth by Enhancing Autophagy. *mSphere* 5, e00124-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00124-20>
- Pangalos, M.N., Schechter, L.E., Hurko, O., 2007. Drug development for CNS disorders: strategies for balancing risk and reducing attrition. *Nat Rev Drug Discov* 6, 521–532. <https://doi.org/10.1038/nrd2094>
- Paradas, C., González-Quereda, L., De Luna, N., Gallardo, E., García-Consuegra, I., Gómez, H., Cabello, A., Illa, I., Gallano, P., 2009. A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscular Disorders* 19, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.09.015>
- Paradas, C., Llauger, J., Diaz-Manera, J., Rojas-Garcia, R., De Luna, N., Iturriaga, C., Marquez, C., Uson, M., Hankiewicz, K., Gallardo, E., Illa, I., 2010. Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology* 75, 316–323. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ea1564>
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G.Q., 2008a. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 134, 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.041>
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., Daley, G.Q., 2008b. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141–146. <https://doi.org/10.1038/nature06534>
- Parton, R.G., Way, M., Zorzi, N., Stang, E., 1997. Caveolin-3 Associates with Developing T-tubules during Muscle Differentiation. *Journal of Cell Biology* 136, 137–154. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.1.137>
- Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton, G.R., Hoffman, E.P., 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>
- Patel, N.J., Van Dyke, K.W., Espinoza, L.R., 2017. Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2B and Miyoshi Presentations of Dysferlinopathy. *Am J Med Sci* 353, 484–491. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2016.05.024>
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., Studer, L., 2004. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12543–12548. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404700101>

Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D.J., Schöler, H.R., 1998. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mechanisms of Development* 71, 89–98. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00002-1)

Philippi, S., Bigot, A., Marg, A., Mouly, V., Spuler, S., Zacharias, U., 2012. Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy. *PLoS Curr* 4, RRN1298. <https://doi.org/10.1371/currents.RRN1298>

Philippi, S., Lorain, S., Beley, C., Peccate, C., Précigout, G., Spuler, S., Garcia, L., 2015. Dysferlin rescue by spliceosome-mediated pre-mRNA trans-splicing targeting introns harbouring weakly defined 3' splice sites. *Human Molecular Genetics* 24, 4049–4060. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv141>

Pitrez, P.R., Estronca, L., Monteiro, L.M., Colell, G., Vazão, H., Santinha, D., Harhour, K., Thornton, D., Navarro, C., Egesipe, A.-L., Carvalho, T., Dos Santos, R.L., Lévy, N., Smith, J.C., de Magalhães, J.P., Ori, A., Bernardo, A., De Sandre-Giovannoli, A., Nissan, X., Rosell, A., Ferreira, L., 2020. Vulnerability of progeroid smooth muscle cells to biomechanical forces is mediated by MMP13. *Nat Commun* 11, 4110. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17901-2>

Potter, R.A., Griffin, D.A., Sondergaard, P.C., Johnson, R.W., Pozsgai, E.R., Heller, K.N., Peterson, E.L., Lehtimäki, K.K., Windish, H.P., Mittal, P.J., Albrecht, D.E., Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L.R., 2018. Systemic Delivery of Dysferlin Overlap Vectors Provides Long-Term Gene Expression and Functional Improvement for Dysferlinopathy. *Human Gene Therapy* 29, 749–762. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.062>

Pradhan, S., 2009. Clinical and magnetic resonance imaging features of “diamond on quadriceps” sign in dysferlinopathy. *Neurol India* 57, 172–175. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.51287>

Pradhan, S., 2008. Diamond on quadriceps: a frequent sign in dysferlinopathy. *Neurology* 70, 322. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000298091.07609.a0>

Pramono, Z.A.D., Lai, P.S., Tan, C.L., Takeda, S., Yee, W.C., 2006. Identification and characterization of a novel human dysferlin transcript: dysferlin_v1. *Hum Genet* 120, 410–419. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0230-1>

Pramono, Z.A.D., Tan, C.L., Seah, I.A.L., See, J.S.L., Kam, S.Y., Lai, P.S., Yee, W.C., 2009. Identification and characterisation of human dysferlin transcript variants: implications for dysferlin mutational screening and isoforms. *Hum Genet* 125, 413–420. <https://doi.org/10.1007/s00439-009-0632-y>

Pryadkina, M., Lostal, W., Bourg, N., Charton, K., Roudaut, C., Hirsch, M.L., Richard, I., 2015. A comparison of AAV strategies distinguishes overlapping vectors for efficient systemic delivery of the 6.2 kb Dysferlin coding sequence. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2, 15009. <https://doi.org/10.1038/mtm.2015.9>

Puttaraju, M., Jamison, S.F., Mansfield, S.G., Garcia-Blanco, M.A., Mitchell, L.G., 1999. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat Biotechnol* 17, 246–252. <https://doi.org/10.1038/6986>

Rao, L., Qian, Y., Khodabukus, A., Ribar, T., Bursac, N., 2018. Engineering human pluripotent stem cells into a functional skeletal muscle tissue. *Nat Commun* 9, 126. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02636-4>

Ratni, H., Ebeling, M., Baird, J., Bendels, S., Bylund, J., Chen, K.S., Denk, N., Feng, Z., Green, L., Guerard, M., Jablonski, P., Jacobsen, B., Khwaja, O., Kletzl, H., Ko, C.-P., Kustermann, S., Marquet, A., Metzger, F., Mueller, B., Naryshkin, N.A., Paushkin, S.V., Pinard, E., Poirier, A., Reutlinger, M.,

- Weetall, M., Zeller, A., Zhao, X., Mueller, L., 2018. Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (SMN2) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J Med Chem* 61, 6501–6517. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00741>
- Rawat, R., Cohen, T.V., Ampong, B., Francia, D., Henriques-Pons, A., Hoffman, E.P., Nagaraju, K., 2010. Inflammasome Up-Regulation and Activation in Dysferlin-Deficient Skeletal Muscle. *The American Journal of Pathology* 176, 2891–2900. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090058>
- Rayavarapu, S., Van der meulen, J.H., Gordish-Dressman, H., Hoffman, E.P., Nagaraju, K., Knobloch, S.M., 2010. Characterization of Dysferlin Deficient SJL/J Mice to Assess Preclinical Drug Efficacy: Fasudil Exacerbates Muscle Disease Phenotype. *PLoS ONE* 5, e12981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012981>
- Redpath, G.M.I., Woolger, N., Piper, A.K., Lemckert, F.A., Lek, A., Greer, P.A., North, K.N., Cooper, S.T., 2014. Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair. *MBoC* 25, 3037–3048. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0947>
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., Buckingham, M., 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435, 948–953. <https://doi.org/10.1038/nature03594>
- Relaix, F., Zammit, P.S., 2012. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage. *Development* 139, 2845–2856. <https://doi.org/10.1242/dev.069088>
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., Ben-Hur, T., 2001. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 1134–1140. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1134>
- Richard, I., Broux, O., Fougereuse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C., Hillaire, D., Passos-Bueno, M.-R., Zatz, M., Jackson, C.E., Cohen, I.D., Beckmann, J.S., 1995. Mutations in the Proteolytic Enzyme Calpain 3 Cause Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2A. *Cell* 81, 27–40.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H.L., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 17, 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., Richard-Bulteau, H., Vignaud, A., Baas, D., Defour, A., Freyssenet, D., Tanti, J.-F., Le-Marchand-Brustel, Y., Ferrier, B., Conjard-Duplany, A., Romanino, K., Bauché, S., Hantaï, D., Mueller, M., Kozma, S.C., Thomas, G., Rüegg, M.A., Ferry, A., Pende, M., Bigard, X., Koulmann, N., Schaeffer, L., Gangloff, Y.-G., 2009. Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy. *J Cell Biol* 187, 859–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903131>
- Robinson, J., Berselli, G.B., Ryadnov, M.G., Keyes, T.E., 2020. Annexin V Drives Stabilization of Damaged Asymmetric Phospholipid Bilayers. *Langmuir* 36, 5454–5465. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00035>
- Roche, J.A., Ru, L.W., O’Neill, A.M., Resneck, W.G., Lovering, R.M., Bloch, R.J., 2011. Unmasking Potential Intracellular Roles For Dysferlin through Improved Immunolabeling Methods. *J Histochem Cytochem.* 59, 964–975. <https://doi.org/10.1369/0022155411423274>

- Roche, J.A., Tulapurkar, M.E., Mueller, A.L., van Rooijen, N., Hasday, J.D., Lovering, R.M., Bloch, R.J., 2015. Myofiber damage precedes macrophage infiltration after in vivo injury in dysferlin-deficient A/J mouse skeletal muscle. *Am J Pathol* 185, 1686–1698. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.020>
- Rowin, J., Meriggioli, M.N., Cochran, E.J., Sanders, D.B., 1999. Prominent inflammatory changes on muscle biopsy in patients with Miyoshi myopathy. *Neuromuscul Disord* 9, 417–420. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(99\)00041-3](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(99)00041-3)
- Roy, N.S., Cleren, C., Singh, S.K., Yang, L., Beal, M.F., Goldman, S.A., 2006. Functional engraftment of human ES cell–derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12, 1259–1268. <https://doi.org/10.1038/nm1495>
- Rüegg, M.A., Glass, D.J., 2011. Molecular mechanisms and treatment options for muscle wasting diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51, 373–395. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100537>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.-F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K.A., Walshire, J., Kehoe, T.L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L.A., Hudson, F.P., Dingfield, L., Zhu, X., Haller, J.A., Sohn, E.H., Mahajan, V.B., Pfeifer, W., Weckmann, M., Johnson, C., Gewaily, D., Drack, A., Stone, E., Wachtel, K., Simonelli, F., Leroy, B.P., Wright, J.F., High, K.A., Maguire, A.M., 2017. Efficacy and safety of voretigene neparovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* 390, 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Sakai-Takemura, F., Narita, A., Masuda, S., Wakamatsu, T., Watanabe, N., Nishiyama, T., Nogami, K., Blanc, M., Takeda, S., Miyagoe-Suzuki, Y., 2018. Premyogenic progenitors derived from human pluripotent stem cells expand in floating culture and differentiate into transplantable myogenic progenitors. *Sci Rep* 8, 6555. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24959-y>
- Salani, S., Lucchiari, S., Fortunato, F., Crimi, M., Corti, S., Locatelli, F., Bossolasco, P., Bresolin, N., Comi, G.P., 2004. Developmental and tissue-specific regulation of a novel dysferlin isoform. *Muscle Nerve* 30, 366–374. <https://doi.org/10.1002/mus.20106>
- Salari, N., Fatahi, B., Valipour, E., Kazeminia, M., Fatahian, R., Kiaei, A., Shohaimi, S., Mohammadi, M., 2022. Global prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res* 17, 96. <https://doi.org/10.1186/s13018-022-02996-8>
- Sampaolesi, M., Blot, S., D’Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.-L., Galvez, B.G., Barthélémy, I., Perani, L., Mantero, S., Guttinger, M., Pansarasa, O., Rinaldi, C., Cusella De Angelis, M.G., Torrente, Y., Bordignon, C., Bottinelli, R., Cossu, G., 2006. Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444, 574–579. <https://doi.org/10.1038/nature05282>
- Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D’Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., 2003. Cell Therapy of α -Sarcoglycan Null Dystrophic Mice Through Intra- Arterial Delivery of Mesoangioblasts 301, 7.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., Brivanlou, A.H., 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10, 55–63. <https://doi.org/10.1038/nm979>
- Schiaffino, S., Mammucari, C., 2011. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* 1, 4. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4>

- Schiaffino, S., Reggiani, C., Akimoto, T., Blaauw, B., 2021. Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy. *JND* 8, 169–183. <https://doi.org/10.3233/JND-200568>
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- Schoewel, V., Marg, A., Kunz, S., Overkamp, T., Carrazedo, R.S., Zacharias, U., Daniel, P.T., Spuler, S., 2012. Dysferlin-Peptides Reallocate Mutated Dysferlin Thereby Restoring Function. *PLoS One* 7, e49603. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049603>
- Schöler, H.R., Hatzopoulos, A.K., Balling, R., Suzuki, N., Gruss, P., 1989. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *The EMBO Journal* 8, 2543–2550. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08392.x>
- Schuessler-Lenz, M., Enzmann, H., Vamvakas, S., 2020. Regulators' Advice Can Make a Difference: European Medicines Agency Approval of Zynteglo for Beta Thalassemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 107, 492–494. <https://doi.org/10.1002/cpt.1639>
- Schwarz, B.A., Bar-Nur, O., Silva, J.C.R., Hochedlinger, K., 2014. Nanog Is Dispensable for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Current Biology* 24, 347–350. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.050>
- Sciorati, C., Galvez, B.G., Brunelli, S., Tagliafico, E., Ferrari, S., Cossu, G., Clementi, E., 2006. Ex vivo treatment with nitric oxide increases mesoangioblast therapeutic efficacy in muscular dystrophy. *Journal of Cell Science* 119, 5114–5123. <https://doi.org/10.1242/jcs.03300>
- Selcen, D., Stilling, G., Engel, A.G., 2001. The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* 56, 1472–1481. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.11.1472>
- Sellers, S.L., Milad, N., White, Z., Pascoe, C., Chan, R., Payne, G.W., Seow, C., Rossi, F., Seidman, M.A., Bernatchez, P., 2018. Increased nonHDL cholesterol levels cause muscle wasting and ambulatory dysfunction in the mouse model of LGMD2B. *J Lipid Res* 59, 261–272. <https://doi.org/10.1194/jlr.M079459>
- Selvaraj, S., Dhoke, N.R., Kiley, J., Mateos-Aierdi, A.J., Tungtur, S., Mondragon-Gonzalez, R., Killeen, G., Oliveira, V.K.P., López de Munain, A., Perlingeiro, R.C.R., 2019a. Gene Correction of LGMD2A Patient-Specific iPSCs for the Development of Targeted Autologous Cell Therapy. *Molecular Therapy* 27, 2147–2157. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.011>
- Selvaraj, S., Mondragon-Gonzalez, R., Xu, B., Magli, A., Kim, H., Lainé, J., Kiley, J., Mckee, H., Rinaldi, F., Aho, J., Tabti, N., Shen, W., Perlingeiro, R.C., 2019b. Screening identifies small molecules that enhance the maturation of human pluripotent stem cell-derived myotubes. *eLife* 8, e47970. <https://doi.org/10.7554/eLife.47970>
- Seo, K., Kim, E.K., Choi, J., Kim, D.-S., Shin, J.-H., 2021. Functional recovery of a novel knockin mouse model of dysferlinopathy by readthrough of nonsense mutation. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 21, 702–709. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.04.015>
- Seror, P., Krahn, M., Laforet, P., Leturcq, F., Maisonobe, T., 2008. Complete fatty degeneration of lumbar erector spinae muscles caused by a primary dysferlinopathy. *Muscle Nerve* 37, 410–414. <https://doi.org/10.1002/mus.20910>

- Shelton, M., Kocharyan, A., Liu, J., Skerjanc, I.S., Stanford, W.L., 2016. Robust generation and expansion of skeletal muscle progenitors and myocytes from human pluripotent stem cells. *Methods* 101, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.019>
- Shin, H.Y., Jang, H., Han, J.H., Park, H.J., Lee, Jung Hwan, Kim, S.W., Kim, S.M., Park, Y.-E., Kim, D.-S., Bang, D., Lee, M.G., Lee, Ji Hyun, Choi, Y.-C., 2015. Targeted next-generation sequencing for the genetic diagnosis of dysferlinopathy. *Neuromuscular Disorders* 25, 502–510. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.03.006>
- Shoji, E., Sakurai, H., Nishino, T., Nakahata, T., Heike, T., Awaya, T., Fujii, N., Manabe, Y., Matsuo, M., Sehara-Fujisawa, A., 2015. Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 5, 12831. <https://doi.org/10.1038/srep12831>
- Singh, A.M., Reynolds, D., Cliff, T., Ohtsuka, S., Mattheyses, A.L., Sun, Y., Menendez, L., Kulik, M., Dalton, S., 2012. Signaling Network Crosstalk in Human Pluripotent Cells: A Smad2/3-Regulated Switch that Controls the Balance between Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* 10, 312–326. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.014>
- Singh, B.N., Prateeksha, Gupta, V.K., Chen, J., Atanasov, A.G., 2017. Organic Nanoparticle-Based Combinatory Approaches for Gene Therapy. *Trends in Biotechnology* 35, 1121–1124. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.07.010>
- Sinnreich, M., Therrien, C., Karpati, G., 2006. Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* 66, 1114–1116. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000204358.89303.81>
- Skoglund, G., Lainé, J., Darabi, R., Fournier, E., Perlingeiro, R., Tabti, N., 2014. Physiological and ultrastructural features of human induced pluripotent and embryonic stem cell-derived skeletal myocytes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 8275–8280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322258111>
- Smith, A.S.T., Passey, S.L., Martin, N.R.W., Player, D.J., Mudera, V., Greensmith, L., Lewis, M.P., 2016. Creating Interactions between Tissue-Engineered Skeletal Muscle and the Peripheral Nervous System. *Cells Tissues Organs* 202, 143–158. <https://doi.org/10.1159/000443634>
- Soheili, T., Gicquel, E., Poupiot, J., N'Guyen, L., Le Roy, F., Bartoli, M., Richard, I., 2012. Rescue of sarcoglycan mutations by inhibition of endoplasmic reticulum quality control is associated with minimal structural modifications. *Hum. Mutat.* 33, 429–439. <https://doi.org/10.1002/humu.21659>
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., Isacson, O., Jaenisch, R., 2009. Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors. *Cell* 136, 964–977. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.013>
- Sondergaard, P.C., Griffin, D.A., Pozsgai, E.R., Johnson, R.W., Grose, W.E., Heller, K.N., Shontz, K.M., Montgomery, C.L., Liu, J., Clark, K.R., Sahenk, Z., Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L.R., 2015. AAV-Dysferlin Overlap Vectors Restore Function in Dysferlinopathy Animal Models. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 256–270. <https://doi.org/10.1002/acn3.172>
- Song, W., Gao, K., Huang, P., Tang, Z., Nie, F., Jia, S., Guo, R., 2020. Bazedoxifene inhibits PDGF-BB induced VSMC phenotypic switch via regulating the autophagy level. *Life Sci* 259, 118397. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118397>

Sougawa, N., Miyagawa, S., Fukushima, S., Kawamura, A., Yokoyama, J., Ito, E., Harada, A., Okimoto, K., Mochizuki-Oda, N., Saito, A., Sawa, Y., 2018. Immunologic targeting of CD30 eliminates tumourigenic human pluripotent stem cells, allowing safer clinical application of hiPSC-based cell therapy. *Sci Rep* 8, 3726. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21923-8>

Sreetama, S.C., Chandra, G., Van der Meulen, J.H., Ahmad, M.M., Suzuki, P., Bhuvanendran, S., Nagaraju, K., Hoffman, E.P., Jaiswal, J.K., 2018. Membrane Stabilization by Modified Steroid Offers a Potential Therapy for Muscular Dystrophy Due to Dysferlin Deficit. *Molecular Therapy* 26, 2231–2242. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.021>

Srivastava, N.K., Yadav, R., Mukherjee, S., Sinha, N., 2018. Perturbation of muscle metabolism in patients with muscular dystrophy in early or acute phase of disease: In vitro, high resolution NMR spectroscopy based analysis. *Clinica Chimica Acta* 478, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.12.036>

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K., 2008. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science* 322, 945–949. <https://doi.org/10.1126/science.1162494>

Steinhardt, R.A., 2005. The Mechanisms of Cell Membrane Repair: A Tutorial Guide to Key Experiments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1066, 152–165. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.017>

Steinhardt, R.A., Bi, G., Alderton, J.M., 1994. Cell Membrane Resealing by a Vesicular Mechanism Similar to Neurotransmitter Release. *Science* 263, 390–393. <https://doi.org/10.1126/science.7904084>

Stramare, R., Beltrame, V., Dal Borgo, R., Gallimberti, L., Frigo, A.C., Pegoraro, E., Angelini, C., Rubaltelli, L., Feltrin, G.P., 2010. MRI in the assessment of muscular pathology: a comparison between limb-girdle muscular dystrophies, hyaline body myopathies and myotonic dystrophies. *Radiol med* 115, 585–599. <https://doi.org/10.1007/s11547-010-0531-2>

Straub, V., Murphy, Alexander, Udd, B., Corrado, A., Aymé, S., Bönneman, C., de Visser, M., Hamosh, A., Jacobs, L., Khizanishvili, N., Kroneman, M., Laflorêt, P., Murphy, Alex, Nigro, V., Rufibach, L., Sarkozy, A., Swanepoel, S., Torrente, I., Udd, B., Urtizbera, A., Vissing, J., Walter, M., 2018. 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscular Disorders* 28, 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.05.007>

Sukoyan, M.A., Vatolin, S.Y., Golubitsa, A.N., Zhelezova, A.I., Semenova, L.A., Serov, O.L., 1993. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: Comparisons of their pluripotencies. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 148–158. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360205>

Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., Suemori, H., 2007. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene* 26, 5564–5576. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210353>

Sun, D., Gao, W., Hu, H., Zhou, S., 2022. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharmaceutica Sinica B* S2211383522000521. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>

Suwinska, A., Ciemerych, M.A., 2011. Factors Regulating Pluripotency and Differentiation in Early Mammalian Embryos and Embryo-derived Stem Cells, in: *Vitamins & Hormones*. Elsevier, pp. 1–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386015-6.00022-6>

Swartz, E.W., Baek, J., Pribadi, M., Wojta, K.J., Almeida, S., Karydas, A., Gao, F.-B., Miller, B.L., Coppola, G., 2016. A Novel Protocol for Directed Differentiation of C9orf72-Associated Human Induced Pluripotent Stem Cells Into Contractile Skeletal Myotubes. *Stem Cells Translational Medicine* 5, 1461–1472. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0340>

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanandomchai, H., Masterson, K., Larson, J., Eaton, D., Sadler-Fredd, K., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Jensen, J., Patton, P., Gokhale, S., Stouffer, R.L., Wolf, D., Mitalipov, S., 2013. Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* 153, 1228–1238. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.006>

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>

Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., Andrews, N.W., 2010. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J Cell Biol* 189, 1027–1038. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003053>

Tanaka, A., Woltjen, K., Miyake, K., Hotta, A., Ikeya, M., Yamamoto, T., Nishino, T., Shoji, E., Sehara-Fujisawa, A., Manabe, Y., Fujii, N., Hanaoka, K., Era, T., Yamashita, S., Isobe, K., Kimura, E., Sakurai, H., 2013. Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation from Human iPS Cells: Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy In Vitro. *PLoS ONE* 8, e61540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061540>

Tang, S.J., Fesharaki-Zadeh, A., Takahashi, H., Nies, S.H., Smith, L.M., Luo, A., Chyung, A., Chiasseu, M., Strittmatter, S.M., 2020. Fyn kinase inhibition reduces protein aggregation, increases synapse density and improves memory in transgenic and traumatic Tauopathy. *Acta Neuropathol Commun* 8, 96. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00976-9>

Tao, W., Moore, R., Smith, E.R., Xu, X.-X., 2016. Endocytosis and Physiology: Insights from Disabled-2 Deficient Mice. *Front Cell Dev Biol* 4, 129. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00129>

Taveau, M., Bourg, N., Sillon, G., Roudaut, C., Bartoli, M., Richard, I., 2003. Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol Cell Biol* 23, 9127–9135. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9127-9135.2003>

Taylor, C.J., Bolton, E.M., Pocock, S., Sharples, L.D., Pedersen, R.A., Bradley, J.A., 2005. Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching 366, 7.

Taylor, R.P., Lindorfer, M.A., 2007. Drug Insight: the mechanism of action of rituximab in autoimmune disease—the immune complex decoy hypothesis. *Nat Rev Rheumatol* 3, 86–95. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0424>

Tedesco, F.S., Gerli, M.F.M., Perani, L., Benedetti, S., Ungaro, F., Cassano, M., Antonini, S., Tagliafico, E., Artusi, V., Longa, E., Tonlorenzi, R., Ragazzi, M., Calderazzi, G., Hoshiya, H., Cappellari, O., Mora, M., Schoser, B., Schneiderat, P., Oshimura, M., Bottinelli, R., Sampaolesi, M., Torrente, Y., Broccoli, V., Cossu, G., 2012. Transplantation of Genetically Corrected Human iPSC-Derived Progenitors in

Mice with Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 4.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003541>

Tedesco, F.S., Hoshiya, H., D'Antona, G., Gerli, M.F.M., Messina, G., Antonini, S., Tonlorenzi, R., Benedetti, S., Berghella, L., Torrente, Y., Kazuki, Y., Bottinelli, R., Oshimura, M., Cossu, G., 2011. Stem Cell-Mediated Transfer of a Human Artificial Chromosome Ameliorates Muscular Dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 3. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002342>

Terrill, J.R., Radley-Crabb, H.G., Iwasaki, T., Lemckert, F.A., Arthur, P.G., Grounds, M.D., 2013. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *FEBS J* 280, 4149–4164. <https://doi.org/10.1111/febs.12142>

Therrien, C., Di Fulvio, S., Pickles, S., Sinnreich, M., 2009. Characterization of Lipid Binding Specificities of Dysferlin C2 Domains Reveals Novel Interactions with Phosphoinositides. *Biochemistry* 48, 2377–2384. <https://doi.org/10.1021/bi802242r>

Therrien, C., Dodig, D., Karpati, G., Sinnreich, M., 2006. Mutation impact on dysferlin inferred from database analysis and computer-based structural predictions. *Journal of the Neurological Sciences* 250, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2006.07.004>

Thompson, R., Straub, V., 2016. Limb-girdle muscular dystrophies — international collaborations for translational research. *Nat Rev Neurol* 12, 294–309. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.35>

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science, New Series* 282, 1145–1147.

Thorley, M., Duguez, S., Mazza, E.M.C., Valsoni, S., Bigot, A., Mamchaoui, K., Harmon, B., Voit, T., Mouly, V., Duddy, W., 2016. Skeletal muscle characteristics are preserved in hTERT/cdk4 human myogenic cell lines. *Skeletal Muscle* 6, 43. <https://doi.org/10.1186/s13395-016-0115-5>

Tidball, J.G., 2017. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol* 17, 165–178. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.150>

Togo, T., Krasieva, T.B., Steinhardt, R.A., 2000. A Decrease in Membrane Tension Precedes Successful Cell-Membrane Repair. *MBoC* 11, 4339–4346. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4339>

Tominaga, K., Tominaga, N., Williams, E.O., Rufibach, L., Schöwel, V., Spuler, S., Viswanathan, M., Guarente, L.P., 2022. 4-Phenylbutyrate restores localization and membrane repair to human dysferlin mutations. *iScience* 25, 103667. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103667>

Tremblay, J.P., Malouin, F., Roy, R., Huard, J., Bouchard, J.P., Satoh, A., 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>

Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., Hopkins, C.R., 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* 9, 129–161.
<https://doi.org/10.1146/annurev.cb.09.110193.001021>

Turan, S., Farruggio, A.P., Srafa, W., Day, J.W., Calos, M.P., 2016. Precise Correction of Disease Mutations in Induced Pluripotent Stem Cells Derived From Patients With Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy* 24, 685–696. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.40>

- Turgeman, T., Hagai, Y., Huebner, K., Jassal, D.S., Anderson, J.E., Genin, O., Nagler, A., Halevy, O., Pines, M., 2008. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscular Disorders* 18, 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.06.386>
- Ueyama, H., Kumamoto, T., Horinouchi, H., Fujimoto, S., Aono, H., Tsuda, T., 2002. Clinical Heterogeneity in Dysferlinopathy. *Intern. Med.* 41, 532–536. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.41.532>
- Umakhanova, Z.R., Bardakov, S.N., Mavlikeev, M.O., Chernova, O.N., Magomedova, R.M., Akhmedova, P.G., Yakovlev, I.A., Dalgatov, G.D., Fedotov, V.P., Isaev, A.A., Deev, R.V., 2017. Twenty-Year Clinical Progression of Dysferlinopathy in Patients from Dagestan. *Front Neurol* 8, 77. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00077>
- Usha Kalyani, R., Perinbam, K., Jeyanthi, P., Al-Dhabi, N.A., Valan Arasu, M., Esmail, G.A., Kim, Y.O., Kim, H., Kim, H.-J., 2020. Fer1L5, a Dysferlin Homologue Present in Vesicles and Involved in C2C12 Myoblast Fusion and Membrane Repair. *Biology (Basel)* 9, E386. <https://doi.org/10.3390/biology9110386>
- Vafiadaki, E., Reis, A., Keers, S., Harrison, R., Anderson, L.V.B., Raffelsberger, T., Ivanova, S., Hoger, H., Bittner, R.E., Bushby, K., Bashir, R., 2001. Cloning of the mouse dysferlin gene and genomic characterization of the SJL-Dysf mutation: *Neuroreport* 12, 625–629. <https://doi.org/10.1097/00001756-200103050-00039>
- Vallecillo-Zúniga, M.L., Poulson, P.D., Luddington, J.S., Arnold, C.J., Rathgeber, M., Kartchner, B.C., Hayes, S., Gill, H., Valdoz, J.C., Spallino, J.L., Garfield, S., Dodson, E.L., Arthur, C.M., Stowell, S.R., Van Ry, P.M., 2021. Therapeutic Benefit of Galectin-1: Beyond Membrane Repair, a Multifaceted Approach to LGMD2B. *Cells* 10, 3210. <https://doi.org/10.3390/cells10113210>
- Vallecillo-Zúniga, M.L., Rathgeber, M.F., Poulson, P.D., Hayes, S., Luddington, J.S., Gill, H.N., Teynor, M., Kartchner, B.C., Valdoz, J., Stowell, C., Markham, A.R., Arthur, C., Stowell, S., Van Ry, P.M., 2020. Treatment with galectin-1 improves myogenic potential and membrane repair in dysferlin-deficient models. *PLoS One* 15, e0238441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238441>
- Vallier, L., Alexander, M., Pedersen, R.A., 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science* 118, 4495–4509. <https://doi.org/10.1242/jcs.02553>
- Vallier, L., Touboul, T., Chng, Z., Brimpari, M., Hannan, N., Millan, E., Smithers, L.E., Trotter, M., Rugg-Gunn, P., Weber, A., Pedersen, R.A., 2009. Early Cell Fate Decisions of Human Embryonic Stem Cells and Mouse Epiblast Stem Cells Are Controlled by the Same Signalling Pathways. *PLoS ONE* 4, e6082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006082>
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuis, P.D.J., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., Turnbull, A., Singh, A., Joubran, J., Hazlewood, A., Zhou, J., McCartney, J., Arumugam, V., Decker, C., Yang, J., Young, C., Olson, E.R., Wine, J.J., Frizzell, R.A., Ashlock, M., Negulescu, P., 2009. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18825–18830. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904709106>
- Van Hoof, D., D'Amour, K.A., German, M.S., 2009. Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research* 3, 73–87. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.08.003>

van Nies, P., Westerlaken, I., Blanken, D., Salas, M., Mencía, M., Danelon, C., 2018. Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells. *Nat Commun* 9, 1583. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03926-1>

Van Ry, P.M., Wuebbles, R.D., Key, M., Burkin, D.J., 2015. Galectin-1 Protein Therapy Prevents Pathology and Improves Muscle Function in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy* 23, 1285–1297. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.105>

Verwey, N., Gazzoli, I., Krause, S., Mamchaoui, K., Mouly, V., Aartsma-Rus, A., 2020. Antisense-Mediated Skipping of Dysferlin Exons in Control and Dysferlinopathy Patient-Derived Cells. *Nucleic Acid Ther* 30, 71–79. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0788>

Vilchez, J.J., Gallano, P., Gallardo, E., Lasa, A., Rojas-García, R., Freixas, A., De Luna, N., Calafell, F., Sevilla, T., Mayordomo, F., Baiget, M., Illa, I., 2005. Identification of a Novel Founder Mutation in the DYSF Gene Causing Clinical Variability in the Spanish Population. *Arch Neurol* 62, 1256. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.8.1256>

Vilquin, J.T., 2005. Myoblast transplantation: clinical trials and perspectives. Mini-review. *Acta Myol* 24, 119–127.

Wainger, B.J., Macklin, E.A., Vucic, S., McIllduff, C.E., Paganoni, S., Maragakis, N.J., Bedlack, R., Goyal, N.A., Rutkove, S.B., Lange, D.J., Rivner, M.H., Goutman, S.A., Ladha, S.S., Mauricio, E.A., Baloh, R.H., Simmons, Z., Pothier, L., Kassis, S.B., La, T., Hall, M., Evora, A., Klements, D., Hurtado, A., Pereira, J.D., Koh, J., Celnik, P.A., Chaudhry, V., Gable, K., Juel, V.C., Phielipp, N., Marei, A., Rosenquist, P., Meehan, S., Oskarsson, B., Lewis, R.A., Kaur, D., Kiskinis, E., Woolf, C.J., Eggen, K., Weiss, M.D., Berry, J.D., David, W.S., Davila-Perez, P., Camprodon, J.A., Pascual-Leone, A., Kiernan, M.C., Shefner, J.M., Atassi, N., Cudkovicz, M.E., 2021. Effect of Ezogabine on Cortical and Spinal Motor Neuron Excitability in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* 78, 186. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.4300>

Walter, M.C., Reilich, P., Thiele, S., Schessl, J., Schreiber, H., Reiners, K., Kress, W., Müller-Reible, C., Vorgerd, M., Urban, P., Schrank, B., Deschauer, M., Schlotter-Weigel, B., Kohnen, R., Lochmüller, H., 2013. Treatment of dysferlinopathy with deflazacort: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Orphanet J Rare Dis* 8, 26. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-26>

Walton, J.N., Nattrass, F.J., 1954. On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain* 77, 169–231. <https://doi.org/10.1093/brain/77.2.169>

Wang, B., Yang, Z., Brisson, B.K., Feng, H., Zhang, Z., Welch, E.M., Peltz, S.W., Barton, E.R., Brown, R.H., Sweeney, H.L., 2010. Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression. *Journal of Applied Physiology* 109, 901–905. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01366.2009>

Ward, A., Chaffman, M.O., Sorkin, E.M., 1986. Dantrolene: A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Malignant Hyperthermia, the Neuroleptic Malignant Syndrome and an Update of Its Use in Muscle Spasticity. *Drugs* 32, 130–168. <https://doi.org/10.2165/00003495-198632020-00003>

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., Rossi, D.J., 2010. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>

- Weiler, T., Bashir, R., Anderson, L.V.B., Davison, K., Moss, J.A., Britton, S., Nylen, E., Keers, S., Vafiadaki, E., Greenberg, C.R., Bushby, K.M.D., Wrogemann, K., 1999. Identical Mutation in Patients with Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2B Or Miyoshi Myopathy Suggests a Role for Modifier Gene(s). *Human Molecular Genetics* 8, 871–877. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.871>
- Wein, N., Avril, A., Bartoli, M., Beley, C., Chaouch, S., Laforêt, P., Behin, A., Butler-Browne, G., Mouly, V., Krahn, M., Garcia, L., Lévy, N., 2010. Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum. Mutat.* 31, 136–142. <https://doi.org/10.1002/humu.21160>
- Weisleder, N., Takizawa, N., Lin, P., Wang, X., Cao, C., Zhang, Y., Tan, T., Ferrante, C., Zhu, H., Chen, P.-J., Yan, R., Sterling, M., Zhao, X., Hwang, M., Takeshima, M., Cai, C., Cheng, H., Takeshima, H., Xiao, R.-P., Ma, J., 2012. Recombinant MG53 Protein Modulates Therapeutic Cell Membrane Repair in Treatment of Muscular Dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003921>
- Wenzel, K., Carl, M., Perrot, A., Zabojszcza, J., Assadi, M., Ebeling, M., Geier, C., Robinson, P.N., Kress, W., Osterziel, K.-J., Spuler, S., 2006. Novel sequence variants in dysferlin-deficient muscular dystrophy leading to mRNA decay and possible C2-domain misfolding. *Hum. Mutat.* 27, 599–600. <https://doi.org/10.1002/humu.9424>
- Wenzel, K., Geier, C., Qadri, F., Hubner, N., Schulz, H., Erdmann, B., Gross, V., Bauer, D., Dechend, R., Dietz, R., Osterziel, K.J., Spuler, S., Özcelik, C., 2007. Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med* 85, 1203–1214. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0253-7>
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., Jaenisch, R., 2008. c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2, 10–12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.12.001>
- White, Z., Milad, N., Tehrani, A.Y., Chen, W.W.-H., Donen, G., Sellers, S.L., Bernatchez, P., 2019. Angiotensin II receptor blocker losartan exacerbates muscle damage and exhibits weak blood pressure-lowering activity in a dysferlin-null model of Limb-Girdle muscular dystrophy type 2B. *PLoS ONE* 14, e0220903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220903>
- Wicklund, M.P., Kissel, J.T., 2014. The Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *Neurologic Clinics* 32, 729–749. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2014.04.005>
- Williams, L.A., Davis-Dusenbery, B.N., Eggan, K.C., 2012. SnapShot: Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Cell* 149, 1174–1174.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.015>
- Wilmot, I., Leslie, S., Martin, N.G., Peschanski, M., Rao, M., Trounson, A., Turner, D., Turner, M.L., Yamanaka, S., Taylor, C.J., 2015. Development of a global network of induced pluripotent stem cell haplobanks. *Regen Med* 10, 235–238. <https://doi.org/10.2217/rme.15.1>
- Wilmot, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Wolfe, R.R., 2006. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr* 84, 475–482. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.3.475>
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H.-K., Nagy, A., 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770. <https://doi.org/10.1038/nature07863>

- Woudt, L., Di Capua, G.A., Krahn, M., Castiglioni, C., Hughes, R., Campero, M., Trangulao, A., González-Hormazábal, P., Godoy-Herrera, R., Lévy, N., Urtizberea, J.A., Jara, L., Bevilacqua, J.A., 2016. Toward an objective measure of functional disability in dysferlinopathy. *Muscle Nerve* 53, 49–57. <https://doi.org/10.1002/mus.24685>
- Wu, J., Hunt, S.D., Matthias, N., Servián-Morilla, E., Lo, J., Jafar-Nejad, H., Paradas, C., Darabi, R., 2017. Generation of an induced pluripotent stem cell line (CSCRMi001-A) from a patient with a new type of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD) due to a missense mutation in POGlut1 (Rumi). *Stem Cell Research* 24, 102–105. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.08.020>
- Wu, Z., Chang, P.-C., Yang, J.C., Chu, C.-Y., Wang, L.-Y., Chen, N.-T., Ma, A.-H., Desai, S.J., Lo, S.H., Evans, C.P., Lam, K.S., Kung, H.-J., 2010. Autophagy Blockade Sensitizes Prostate Cancer Cells towards Src Family Kinase Inhibitors. *Genes Cancer* 1, 40–49. <https://doi.org/10.1177/1947601909358324>
- Xiao, L., Yuan, X., Sharkis, S.J., 2006. Activin A Maintains Self-Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 24, 1476–1486. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0299>
- Xu, R.-H., Sampsel-Barron, T.L., Gu, F., Root, S., Peck, R.M., Pan, G., Yu, J., Antosiewicz-Bourget, J., Tian, S., Stewart, R., Thomson, J.A., 2008. NANOG Is a Direct Target of TGFβ/Activin-Mediated SMAD Signaling in Human ESCs. *Cell Stem Cell* 3, 196–206. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.001>
- Xu, Z., Yue, Y., Lai, Y., Ye, C., Qiu, J., Pintel, D.J., Duan, D., 2004. Trans-Splicing Adeno-Associated Viral Vector-Mediated Gene Therapy Is Limited by the Accumulation of Spliced mRNA but Not by Dual Vector Coinfection Efficiency. *Human Gene Therapy* 896–905.
- Yamaji, S., Suzuki, A., Kanamori, H., Mishima, W., Yoshimi, R., Takasaki, H., Takabayashi, M., Fujimaki, K., Fujisawa, S., Ohno, S., Ishigatsubo, Y., 2004. Affixin interacts with α-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell–substrate interaction. *Journal of Cell Biology* 165, 539–551. <https://doi.org/10.1083/jcb.200308141>
- Yamanaka, S., 2020. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* 27, 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>
- Yamanaka, S., Blau, H.M., 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704–712. <https://doi.org/10.1038/nature09229>
- Yan, Z., Zhang, Y., Duan, D., Engelhardt, J.F., 2000. Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6716–6721. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6716>
- Yang, S.H., Qiao, X., Fong, L.G., Young, S.G., 2008. Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Biochim Biophys Acta* 1781, 36–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2007.11.003>
- Yin, H., Price, F., Rudnicki, M.A., 2013. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiological Reviews* 93, 23–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2011>
- Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1993. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75, 187–197.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2009. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* 324, 797–801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482>

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2007. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318, 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>

Zhen, Y., Radulovic, M., Vietri, M., Stenmark, H., 2021. Sealing holes in cellular membranes. *EMBO J* 40. <https://doi.org/10.15252/embj.2020106922>

Zhou, J., Hernandez, G., Tu, S.-W., Scholes, J., Chen, H., Tseng, C.-P., Hsieh, J.-T., 2005. Synergistic induction of DOC-2/DAB2 gene expression in transitional cell carcinoma in the presence of GATA6 and histone deacetylase inhibitor. *Cancer Res* 65, 6089–6096. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3672>

Zhu, W., Zhou, B., Zhao, C., Ba, Z., Xu, H., Yan, X., Liu, W., Zhu, B., Wang, L., Ren, C., 2019. Myoferlin, a multifunctional protein in normal cells, has novel and key roles in various cancers. *J Cell Mol Med* 23, 7180–7189. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14648>

Titre : Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour modéliser les mécanismes physiopathologiques associés aux dystrophies musculaires des ceintures de type R2.

Mots clés : Dystrophies musculaires des ceintures, Cellules souches pluripotentes humaines induites, Muscle squelettique, Modélisation pathologique, Criblage à haut débit.

Résumé : Les dystrophies musculaires des ceintures (ou LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies) désignent un ensemble de maladies génétiques rares caractérisées par une atrophie et une faiblesse spécifique des muscles squelettiques du bassin (ceinture pelvienne) et des épaules (ceinture scapulaire). Parmi la trentaine de formes de LGMD identifiées, la LGMD R2 (ou anciennement LGMD 2B) est causée par une déficience en dysferline, due à des mutations du gène *DYSF*, qui est une protéine essentielle à la physiologie des muscles squelettiques. Depuis l'identification de la cause génétique sous-jacente à la LGMD R2 en 1998, des avancées majeures en termes de diagnostic, de compréhension physiopathologique et de développement de stratégies thérapeutiques ont été réalisées. Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun traitement thérapeutique disponible sur le marché pour les patients, soulignant la nécessité d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la LGMD R2.

Dans ce contexte, le premier objectif de ma thèse consistait à mettre en place les conditions expérimentales permettant la production de cellules musculaires squelettiques à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC) et à évaluer le potentiel de ce modèle cellulaire pour modéliser les LGMD. Grâce à un protocole robuste de différenciation myogénique, j'ai ainsi pu générer des populations homogènes et fonctionnelles de myoblastes et de myotubes exprimant la majorité des gènes et des protéines impliqués dans les LGMD et démontrer la fiabilité de ce modèle cellulaire à récapituler les phénotypes spécifiques à une LGMD, la LGMD R9.

Une fois ce nouveau modèle cellulaire caractérisé, le second objectif de ma thèse était d'identifier de nouvelles voies moléculaires régulées par la dysferline. Par une approche transcriptomique, j'ai ainsi identifié dans les myotubes dérivés de hiPSC de patients LGMD R2 une dérégulation du niveau d'expression de Disabled-2 (Dab2), un adaptateur de l'endocytose médiée par les clathrines. Dans l'ensemble, les résultats démontrent que Dab2 est inversement régulé par les niveaux de dysferline. Dab2 étant impliqué dans la régulation de l'internalisation du récepteur aux lipoprotéines de faible densité (LDLr) et de l'absorption des LDL riches en cholestérol, nous avons alors émis l'hypothèse que sa dérégulation pourrait être impliquée dans la physiopathologie de la LGMD R2, et plus particulièrement dans l'homéostasie défectueuse du cholestérol chez les patients. Au-delà de l'étude de ce processus moléculaire fondamental d'endocytose du cholestérol, ce projet pourrait ouvrir une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement de la LGMD R2 en modulant l'homéostasie du cholestérol à l'aide de nouveaux outils génétiques ou d'une pharmacologie facilement accessible.

En parallèle, au cours de ma thèse, j'ai développé un autre projet visant à empêcher pharmacologiquement la dégradation des formes mal conformées mais fonctionnelles de la dysferline. C'est notamment le cas de la mutation faux-sens L1341P de la dysferline qui conduit à un mauvais repliement de la protéine, son agrégation dans le réticulum endoplasmique et sa dégradation ultérieure par l'ERAD (endoplasmic reticulum-associated protein degradation machinery). Dans ce programme de recherche translationnel, l'effet de 2239 médicaments repositionnables a été évalué sur l'expression et la localisation de ce variant de la dysferline, aboutissant à l'identification de deux inducteurs d'autophagie, le saracatinib et le bazédoxifène comme médicaments candidats. Au-delà de l'identification d'une nouvelle option thérapeutique pour les patients atteints de LGMD R2, nos résultats mettent en lumière une procédure réutilisable pour évaluer l'effet de milliers de médicaments repositionnables sur des troubles musculaires similaires causés par des mutations faux-sens dégradées par l'ERAD.