

FICHE SUJET DE THESE

Sujet N° (à remplir par l'ED) :	FINANCEMENT : <input checked="" type="checkbox"/> Demandé <input type="checkbox"/> Acquis	Origine du financement : CDE Nantes Université
Titre de la thèse : Thérapie génique de la Dystrophie Musculaire de Duchenne par ciblage du canal TRPC3		3 mots-clés : canal calcique, DMD, thérapie génique
Unité/équipe encadrante : TaRGeT - UMR 1089 - Groupe thématique: Thérapie génique des maladies musculaires		
Directeur de thèse : Caroline LE GUINER (directeur de thèse) + Bodvaël FRAYSSE (co-encadrant)		N° de tél : 02 28 08 04 23 Mail : caroline.le-guiner@univ-nantes.fr
<p><u>Contexte socioéconomique et scientifique (env. 10 lignes)</u> : La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique causée par l'absence d'expression de la dystrophine suite à des mutations de son gène situé sur le chromosome X. Elle affecte environ 1/5 000 des garçons nouveau-nés et se caractérise par une mort prématurée des patients du fait d'une dégénérescence des muscles squelettiques et cardiaques. Malgré de nombreuses études précliniques et cliniques il n'existe pas à ce jour de traitement curatif de la DMD. Parmi les différentes pistes envisagées, la thérapie génique semble être la plus prometteuse. Cependant, le gène de la dystrophine est l'un des plus grands du génome humain et les vecteurs viraux de thérapie génique les plus efficaces ne peuvent porter un transgène codant pour la protéine complète. Un compromis est d'utiliser un transgène codant pour une protéine tronquée mais partiellement fonctionnelle, appelée micro-dystrophine (MD). Le principe de l'utilisation des MD comme transgènes thérapeutiques peut être décrit grossièrement en la transition de la DMD en une dystrophie musculaire de Becker (BMD), une dystrophinopathie moins sévère. Si chez les patients BMD la maladie est plus bénigne, une faiblesse musculaire est souvent observée à l'adolescence et leur espérance de vie moyenne est de 45 ans. Il est donc urgent de trouver des stratégies thérapeutiques alternatives ou complémentaires à la thérapie génique, qui pourraient traiter à la fois les patients DMD. Ces stratégies doivent cibler des événements significatifs et primordiaux de la pathogenèse. Dans ce contexte, nous avons montré une augmentation de l'expression du canal TRPC3 dans les muscles striés de rat <i>DMD^{mdx}</i>, un modèle animal de la DMD reproduisant les atteintes des muscles striés observées chez l'homme. L'application d'un inhibiteur de TRPC3 permet d'annuler la différence de SPCa entre les fibres musculaires squelettiques des rats WT (wild-type) et <i>DMD^{mdx}</i>. L'augmentation de la SPCa est considérée comme une étape précoce et déterminante dans la pathogenèse de la DMD. Dans ce projet nous souhaitons tester des pistes thérapeutiques pour traiter la DMD en ciblant les canaux TRPC3.</p>		
<p><u>Hypothèses et questions posées (env. 8 lignes)</u> : Il s'agira de tester différentes stratégies moléculaires d'inhibition des canaux TRPC3 basées sur l'expression de mutants TRPC3 connus pour inhiber l'activité des canaux en formant des hétérotétramères dominants-négatifs avec les protéines endogènes. L'efficacité de ces différents inhibiteurs moléculaires sera d'abord comparée <i>in vitro</i> à celle de Pyr10, un inhibiteur pharmacologique spécifique de TRPC3. L'efficacité sera évaluée via l'aptitude des différents traitements à réduire l'expression et/ou l'activité des canaux TRPC3 et la SPCa en conséquence. Les expériences <i>in vitro</i> s'effectueront dans une lignée de cellules de rat et dans des organoïdes musculaires générés à l'aide de cellules iPS humaines dérivées de patients DMD. Au terme des expériences <i>in vitro</i>, le ou les traitements les plus prometteurs seront testés <i>in vivo</i> en comparant les fonctions musculaires et cardiaques (cellulaires, histologiques, structurales et fonctionnelles) de rats <i>DMD^{mdx}</i> et WT ayant reçus une injection ou non de rAAV ciblant l'expression ou l'activité des canaux TRPC3 (rAAV-shRNA-anti-TRPC3 ; rAAV-TRPC3-mutants) seule ou en complément d'une injection de rAAV-MD.</p>		
<p><u>Grandes étapes de la thèse (env. 12 lignes)</u> : La première étape de la thèse consistera à la mise en place des expériences <i>in vitro</i>. Il s'agira de tester les outils moléculaires <i>in vitro</i> dans une lignée de cellules myogéniques de rats et dans des organoïdes musculaires composés de cellules musculaires dérivées de cellules humaines à pluripotence induite. Une fois les outils moléculaires validés et les AAV correspondants produits, des rats WT et <i>DMD^{mdx}</i> (~10 animaux par groupe expérimental) seront injectés par voie systémique. Ces animaux seront comparés à des rats WT et <i>DMD^{mdx}</i> non traités. Les animaux seront conservés 6 mois après le début de l'injection, temps pendant lequel, des mesures échographiques seront réalisées pour évaluer la fonction cardiaque et la contractilité du diaphragme <i>in vivo</i>. Au sacrifice, une partie des animaux sera utilisée pour réaliser des prélèvements destinés à des analyses RTqPCR et Western-blot afin de mesurer l'expression des gènes d'intérêt. Une attention particulière sera portée à la composition des hétérotétramères auxquels les canaux TRPC3 participent. Des coupes histologiques seront également utilisées pour évaluer l'évolution de la maladie dans les muscles striés. L'autre partie des animaux servira à réaliser des expériences sur des fibres musculaires et des cardiomyocytes isolés afin d'étudier l'homéostasie calcique et la contractilité de ces cellules.</p>		
<p><u>Compétences scientifiques et techniques requises par le candidat (2 lignes)</u> : L'étudiant(e) devra faire preuve d'autonomie et de rigueur afin de coordonner l'ensemble du projet qui ne pourra être réalisé seul(e), mais en collaboration avec d'autres membre de l'équipe et avec des équipes collaboratrices. En outre, l'étudiant(e) devra maîtriser les techniques de base de biochimie et biologie moléculaire, de culture cellulaire, de microscopie et de cytofluorimétrie, dont il (elle) sera plus particulièrement en charge dans ce projet.</p>		
<p><u>3 publications de l'équipe d'accueil relatives au domaine (5 dernières années)</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bourdon A, François V, Zhang L, Lafoux A, Fraysse B, Toumaniantz G, Larcher T, Girard T, Ledevin M, Lebreton C, Hivonnait A, Creimeas A, Allais M, Marie B, Guguin J, Blouin V, Huchet C, Malarba A, Kao B, Le Heron A, Moullier P, Dickson G, Poplewell L, Adjali O, Montanaro F and Le Guiner C. Evaluation of the dystrophin carboxy-terminal domain for micro-dystrophin gene therapy in cardiac and skeletal muscles in the DMDmdx rat model. <i>Gene Ther</i>, 2022 Sep; 29 (9): 520-535. - Creisméas A, Gazaille C, Bourdon A, Lallemand MA, François V, Allais M, Ledevin M, Larcher T, Toumaniantz G, Lafoux A, Huchet C, Anegon I, Adjali O, Le Guiner C, Fraysse B. TRPC3, but not TRPC1, as a good therapeutic target for standalone or complementary treatment of DMD. <i>J Transl Med</i>. 2021 Dec 20;19(1):519. - RNA-Seq Analysis of an Antisense Sequence Optimized for Exon Skipping in Duchenne Patients Reveals No Off-Target Effect. Domenger C, Allais M, François V, Léger A, Lecomte E, Montus M, Servais L, Voit T, Moullier P, Audic Y, Le Guiner C. <i>Mol Ther Nucleic Acids</i>. 2018 Mar 2;10:277-291. 		
<p><u>Collaborations nationales et internationales</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - R. Jude SAMULSKI, Université de Caroline du Nord, USA 		

- Pr David MACK, Université de Seattle, USA
- Dr Peter ARTHUR et Pr Miranda GROUNDS, Université de Perth, Australie
- Dr Marc BITOUN, Centre de Recherche en Myologie (UMRS 974), Paris, France
- Dr Michel DEWAARD, L'Institut du Thorax, Nantes, France
- Dr Gilles TOUMANIANTZ, L'Institut du Thorax, Nantes, France
- Dr Thibaut LARCHER, PanTher, INRAE UMR 703, Nantes, France