

**FICHE SUJET DE THESE**

Sujet N° (à remplir par l'ED) :	FINANCEMENT : <input type="checkbox"/> Demandé <input checked="" type="checkbox"/> Acquis	Origine du financement : ANR
Titre de la thèse : <b>TRITDMD : Inhibition d'un canal TRP (Transient Receptor Potential) pour compléter le traitement de la Dystrophie Musculaire de Duchenne par thérapie génique micro-dystrophine</b>		3 mots-clés : DMD Thérapie génique Homéostasie calcique
Unité/équipe encadrante : <b>TaRGeT, Translational Research in Gene Therapies – INSERM UMR 1089</b>		
Directeur de thèse : <b>Dr. Caroline LE GUINER</b> Co-encadrant : <b>Dr. Bodvaël FRAYSSE</b>		N° de tél : 02 28 08 04 23 Mail : caroline.le-guiner@univ-nantes.fr bodvael.frayssse@univ-nantes.fr
<u>Contexte socioéconomique et scientifique (env. 10 lignes) :</u> Des essais cliniques actuels pour traiter la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) utilisent des vecteurs AAVr (Adeno-Associated Virus recombinant) portant des transgènes codant pour des dystrophines tronquées appelées microdystrophines (MDs). Le but est de transformer la DMD en BMD (Becker Muscular Dystrophy), une dystrophinopathie moins sévère. Mais la BMD reste une pathologie mortelle, réduisant l'espérance de vie des patients. Il est donc urgent de trouver des stratégies de 2ème génération qui seront alternatives ou complémentaires à la thérapie génique MD. L'augmentation de la perméabilité au Ca <sup>2+</sup> du sarcolemme (SPCa) joue un rôle essentiel dans la nécrose des cellules musculaires observée dans la DMD. Et nous avons récemment démontré des augmentations concomitantes de l'expression des canaux TRPC3 dans les muscles de rats DMD <sup>mdx</sup> (modèle animal de la DMD), augmentations qui ne sont que partiellement prévenues par les AAVr-MD. Cibler le canal TRPC3 pour réduire la SPCa représente donc une stratégie complémentaire pertinente au traitement par AAVr-MD. Dans la présente demande, plusieurs approches pour inhiber le canal TRPC3 seront testées <i>in vitro</i> . Les canaux TRPC3 étant exprimés de manière ubiquitaire et ayant des rôles dans le système cardiovasculaire, le cerveau et l'immunité, des stratégies ayant des actions spécifiques aux tissus musculaires seront sélectionnées pour limiter le risque d'effets secondaires délétères. Des approches compatibles avec l'utilisation d'AAVr pour cribler différents types de mutants dominants négatifs seront testées. Les mutants les plus efficaces <i>in vitro</i> seront ensuite évalués chez des rats DMD <sup>mdx</sup> en monothérapie et en association avec un AAVr-MD, afin d'évaluer l'efficacité d'un tel traitement combinatoire pour une approche thérapeutique à long-terme pour la DMD.		
<u>Hypothèses et questions posées (env. 8 lignes) :</u> Il s'agira d'effectuer un criblage différentes stratégies moléculaires d'inhibition du canal TRPC3, via l'expression de différents 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 un modèle cellulaire de cellules 293 HEK surexprimant le canal TRPC3 (modèle déjà maîtrisé au laboratoire), mais aussi 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 mutants les plus prometteurs seront testés <i>in vivo</i> en comparant les fonctions musculaires et cardiaques (cellulaires, histologiques, structurales et fonctionnelles) de rats DMD <sup>mdx</sup> ayant reçus une injection ou non d'un vecteur AAVr ciblant exprimant ce mutant seul, ou en complément d'une injection de AAVr-MD.		
<u>Grandes étapes de la thèse (env. 12 lignes) :</u> 1) Criblage <i>in vitro</i> de différentes stratégies moléculaires d'inhibition du canal TRPC3, dans le modèle cellulaire de cellules 293 HEK surexprimant le canal TRPC3, en parallèle de la molécule Pyr10. 2) Évaluation <i>in vitro</i> de stratégies moléculaires d'inhibition du canal TRPC3 les plus efficaces, dans des organoïdes musculaires DMD (après mise au point de leurs conditions de transfection / transduction, et des techniques de mesure de force. 3) Participation à la production et à la caractérisation des vecteurs viraux AAV codant pour les inhibiteurs du canal TRPC3. 4) Une fois les outils moléculaires validés et les AAVr correspondants produits, des rats DMD <sup>mdx</sup> (~8 animaux par groupe expérimental) seront injectés par voie systémique. Ces animaux seront comparés à des rats WT et DMD <sup>mdx</sup> non traités. Les animaux seront suivis 6 mois après le début de l'injection, temps pendant lequel, des mesures échocardiographiques 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.		
<u>Compétences scientifiques et techniques requises par le candidat (2 lignes) :</u> Compétences scientifiques et organisationnelles : pathophysiologie de la DMD, biologie des canaux calciques, rigueur, autonomie Compétences techniques : biologie cellulaire (culture cellulaire, transfection cellulaire), biologie moléculaire (extraction d'ADN et d'ARN, qPCR, RTqPCR), biochimie (Western-Blot), de microscopie, cytofluorimétrie. Une expérience en expérimentation animale sur rongeur sera un plus.		
<u>3 publications de l'équipe d'accueil relatives au domaine (5 dernières années) :</u> 1) <b>Le Guiner C</b> , Xiao X, Larcher T, Lafoux A, Huchet C, Toumaniantz G, Adjali O, Anegon I, Remy S, Grieger J, Li J, Farrokhi V, Neubert H, Owens J, McIntyre M, Moullier P, Samulski RJ. Evaluation of an AAV9-mini-dystrophin gene therapy candidate in a rat model of Duchenne muscular dystrophy. <i>Mol Ther Methods Clin Dev.</i> 2023 May 18;30:30-47.		

2) Bourdon A, François V, Zhang L, Lafoux A, **Fraysse B**, Toumaniantz G, Larcher T, Girard T, Ledevin M, Lebreton C, Hivonnait A, Creisméas A, Allais M, Marie B, Guguin J, Blouin V, Remy S, Anegon I, Huchet C, Malerba A, Kao B, Le Heron A, Moullier P, Dickson G, Popplewell L, Adjali O, Montanaro F, **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. *Gene Ther.* 2022 Sep;29(9):520–35.

3) 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. *J Transl Med.* 2021 Dec 20;19(1):519.

Collaborations nationales et internationales :

**Institut du Thorax (Nantes) – Équipe de Michel DE WAARD**

**INRAE UMR 703, PanTher (Nantes) – Équipe de Thibaut LARCHER**