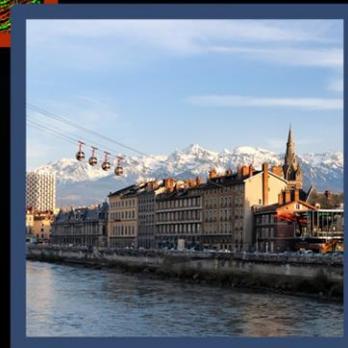
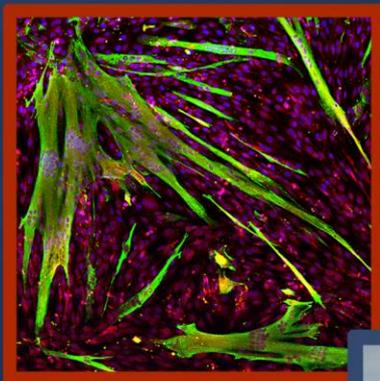


X<sup>èmes</sup> Journées Annuelles de la  
Société Française de Myologie  
&  
Colloque Myogenèse

Myopathies congénitales  
et calcium



**GRENOBLE**

World Trade Center

**14 -16 novembre 2012**

**Secrétariat scientifique**  
Isabelle Marty et Joël Lunardi  
[isabelle.marty@ujf-grenoble.fr](mailto:isabelle.marty@ujf-grenoble.fr)  
[jlunardi@chu-grenoble.fr](mailto:jlunardi@chu-grenoble.fr)

**RÉSUMÉS DES COMMUNICATIONS**

## La SFM remercie



**B:OMARIN**

**genzyme**



La Région Rhône-Alpes



Ainsi que :

**La Ville de Grenoble**

**La Métro**

**La SFR-1 : RMN Biomédicale et Neurosciences (UJF Grenoble)  
l'INSERM.**

## PROGRAMME

### Mercredi 14 novembre 2012

- 10h30 Accueil des participants, affichage des posters
- 11h00 **Ouverture des X<sup>èmes</sup> JSFM**  
C. Desnuelle, J. Lunardi, I. Marty, JP. Romanet (Doyen de la Faculté de Médecine), M. Destot (Maire de Grenoble)
- 11h30 **Symposium LFB /Biomarin**  
**Approches fonctionnelle et thérapeutique de la jonction neuromusculaire**  
*Modérateurs : J.C. Antoine - B. Eymard*
- Analyse structurale de la plaque motrice par études immunocytochimiques de la biopsie musculaire.  
*Nathalie Streichenberger, Laurent Schaeffer (Lyon)*
  - Risque de thrombose et traitement des Maladies neuromusculaires dysimmunitaires.  
*Luc Darnige (Paris)*
  - Interactions moléculaires dans la fonction pré-synaptique de la plaque motrice.  
*Michael Seagar (Marseille)*
- 12h30 Visite des Posters affichés - Buffet
- 13h30 Réunion du Groupe d'Etudes en Myologie - GEM  
*Modérateurs : A. Urtizberea - N.Romero*
- 15h30 **Session Poster Flash 1** - *Coordonnateur : N. Koulmann*
- 16h30 Visite des Posters Affichés - Pause café
- 17h00 **Session 1 - Mécanismes physiopathologiques dans les myopathies congénitales**  
*Modérateurs : G. Bonne - I. Marty*
- Flux calciques dans le muscle squelettique.  
*Bruno Allard (Lyon)*
  - Mechanisms of calcium dysregulation in core myopathies.  
*Susan Treves (Bâle - Suisse)*
  - Core formation in Mouse Models of Malignant Hyperthermia and Central Core Disease.  
*Simona Boncompagni (Cheti- Italie)*
  - Stress oxydatif dans les myopathies associées à SEPNI et à RYR1: de la physiopathologie à la thérapie.  
*Ana Ferreira (Paris)*
- 19h30 Dîner SFM (sur inscription)

## PROGRAMME

### Jeudi 15 novembre 2012

8h30 **Session 2 : Myopathies à cores**

*Modérateurs : J. Fauré – I. Péniçon-Besnier - L.Féasson*

- Génétique des pathologies associées au gène du récepteur de la ryanodine de type I (RYR1).  
*Joël Lunardi (Grenoble)*
- Approche morphologique des myopathies à cores.  
*Norma Romero (Paris)*
- Approche clinico-radiologique des myopathies à cores.  
*Robert Carlier (Paris)*

9h30 **Session Poster flash 2** - Coordonnateur : G. Bassez

10h30 Visite des Posters Affichés - Pause café

11h00 **Session 3 : Les autres pathologies du cycle calcique**

*Modérateurs : J. Lunardi – M. Fardeau*

- Anesthésie, Hyperthermie maligne et myopathies.  
*Renée Krivosic (Lille)*
- Le coup de chaleur d'exercice peut-il résulter d'un trouble du cycle cellulaire du calcium dans le muscle ?  
*Lionel Bourdon (Brétigny sur Orge)*
- Maladie de Brody: données cliniques.  
*Thierry Kuntzer (Lausanne- Suisse)*

12h00 Remise du Prix Master

12h30 Assemblée Générale SFM

13h00 : Visite des Posters Affichés - Buffet

14h00 **Session 4 - Session commune SFM / Colloque Myogénèse**

*Modérateurs : C. Desnuelle - P. Maire*

- La thérapie saut d'exon appliquée à un cas de myopathie congénitale.  
*Isabelle Marty (Grenoble)*
- Congenital myopathies - Blurring the boundaries while sharpening the focus.  
*Carsten Bonnemann (Bethesda -USA)*

14h50 Présentations orales sélectionnées sur abstract

*Modérateurs : C. Desnuelle - P. Maire*

- |             |                     |  |
|-------------|---------------------|--|
| 14h50-15h10 | <b>K. Dieterich</b> | The neuronal endopeptidase ECEL1 is associated with autosomal recessive distal arthrogyrosis                 |
| 15h10-15h30 | <b>J. Laporte</b>   | Phosphoinositide-dependent and independent roles of myotubularin in skeletal muscle in vivo                  |
| 15h30-15h50 | <b>M. Saclier</b>   | Differentially activated macrophages orchestrate the myogenesis during regeneration of human skeletal muscle |
| 15h50-16h10 | <b>A. Bouter</b>    | Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire   |
| 16h10-16h30 | <b>D. Duprez</b>    | Implication d'Egr1 dans la formation et la réparation du tendon  |

16h30 Visites des Posters Affichés– Pause café

17h30 Présentations orales sélectionnées sur abstract

*Modérateurs: G. Butler-Browne - E. Gomes*

- |             |                   |  |
|-------------|-------------------|--|
| 17h30-17h50 | <b>S. Bretaud</b> | Involvement of collagen XVb in zebrafish neuro-muscular development  |
| 17h50-18h10 | <b>V. Gache</b>   | Nuclear positioning during skeletal muscle fibers formation  |
| 18h10-18h30 | <b>G. Laverny</b> | Role of androgen and glucocorticoid receptors in mouse skeletal muscle   |
| 18h30-18h50 | <b>A. Roux</b>    | Prednisolone and mdx mice : a good and a bad friend ?  |
| 18h50-19h10 | <b>F. Rannou</b>  | Effects of lactate on the voltage-gated sodium channels of rat skeletal muscle: modulating current opinion                       |
| 19h10-19h30 | <b>L. Picchio</b> | Novel Drosophila model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression |

19h30 fin des JSFM

19h45 Buffet

## PROGRAMME

### Vendredi 16 novembre 2012

**9h00-13h00**

**Colloque Myogénèse**

9h00

Présentations sélectionnées sur abstract

*Modérateur : E. Gomes - P. Maire*

9h00-9h20

**S. Vassilopoulos**

A role for clathrin heavy chain in costamere formation and maintenance

9h20-9h40

**S. Rome**

Myotubes sorted specific exosomal miRNAs which regulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation

9h40-10h00

**F. Antigny**

IP3 receptors type1 and type 3 are required for human myoblast differentiation.

10h00-10h20

**A.S. Armand**

Role of the MyoD/NFATc2 complex into myofiber formation and specification during mouse myogenesis

10h30

Pause café offerte par Genzyme

10h50

Présentations sélectionnées sur abstract

*Modérateur : E. Gomes - P. Maire*

10h50-11h10

**V. Gribova**

Effect of RGD-functionalization and stiffness modulation of polyelectrolyte multilayer films on muscle cell differentiation

11h10-11h30

**M. Guegneau**

Effets du syndrome métabolique sur les fibres musculaires chez l'homme âgé

11h30-11h50

**S. Lotteau**

Characterization of thermosensory cation channels TRPV1 in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle.

11h50-12h10

**L. Pierson**

Comparative analysis of *C. elegans* models for muscular dystrophies

12h10-12h30

**G. Robin**

Sarcoplasmic reticulum calcium leak under resting conditions in normal and dystrophic skeletal muscle

12h30-12h50

**J. Mc Key**

Involvement of the Lix1 gene in the neuromuscular development of the gastrointestinal tract in the chick embryo



## **RESUMES DES COMMUNICATIONS ORALES**

### **Symposium LFB /Biomarin Approches fonctionnelle et thérapeutique de la jonction neuromusculaire**

## Analyse structurale de la plaque motrice par études immunocytochimiques de la biopsie musculaire.

Nathalie Streichenberger<sup>1</sup>, Thomas Simonet<sup>2</sup>, Dominique Baas<sup>2</sup>, Perrine Devic<sup>2</sup>,  
Philippe Petiot<sup>3</sup>, Christophe Vial<sup>3</sup>, Françoise Bouhour<sup>3</sup>, Hélène Gervais<sup>3</sup>,  
Laurent Schaeffer<sup>2</sup>

1. Hospices Civils de Lyon – Université Lyon 1 – CNRS UMR5292 - INSERM U1028. 2. Laboratoire de Biologie Moléculaire de la cellule, CNRS UMR5239, ENS Lyon, Université Lyon1, Hospices civils de Lyon. 3. Hospices Civils de Lyon.

Une biopsie musculaire pour être représentative d'une pathologie, doit toujours être réalisée après un bilan clinique, biologique et éventuellement fonctionnel et d'imagerie : le site à biopsier et la quantité de muscle à prélever sont alors choisis pour une rentabilité optimale.

Dans le cadre d'une analyse structurale des plaques motrices dans un contexte de diagnostic tout venant, le muscle deltoïde dans sa portion inférieure moyenne est une zone pertinente. La stimulation du muscle per opératoire permet la détection in vivo des plaques motrices.

Une fois prélevé, le muscle est conditionné pour être fixé et congelé selon un processus spécifique pour les diagnostics de routine.

Les cytopathies mitochondriales sont caractérisées en microscopie optique, après techniques de colorations spéciales et histoenzymatiques, par : des fibres rouges déchiquetées, une expression variable des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale et une surcharge en lipides : ces anomalies sont inconstantes, d'intensité variable et doivent être rapportées à l'âge du patient.

L'analyse de la biopsie musculaire en microscopie optique après techniques de colorations spéciales et histoenzymatiques dans le cadre d'une myasthénie est le plus souvent subnormale.

L'étude morphologique des jonctions neuromusculaires est basée sur le marquage des compartiments pré et post synaptiques des jonctions neuromusculaires. Les jonctions neuromusculaires des muscles myasthéniques montrent de façon reproductible une augmentation de la fragmentation des gouttières primaires et un aplatissement de ces dernières. Des agrégats de RACH aneuxaux ainsi que des extensions neuritiques non liées à des agrégats de RACH sont présents dans la plupart des cas.

Nous avons également développé des approches de biologie moléculaire pour mettre en évidence des défauts de la neurotransmission. Le principe de ces analyse repose sur le fait que l'activité électrique du muscle réprime l'expression musculaire de certains gènes (les sous unités du RACH hormis epsilon, la myogénine, HDAC4, ...). La mesure relative des quantités de plusieurs de ces gènes par RT-PCR révèle qu'ils constituent de bons marqueurs des perturbations de la neurotransmission et qu'ils permettraient de limiter l'analyse morphologique des jonctions neuromusculaires à celles qui présentent une dérégulation de l'expression de ces marqueurs.

L'approche par RT PCR présente le double avantage d'être d'une part beaucoup plus rapide que l'analyse morphologique des jonctions neuromusculaires et d'autre part d'être informative même si la biopsie ne comporte pas de plaques motrices. Elle pourrait donc être envisagée à partir de biopsies à l'aiguille.

Analyse des jonctions neuromusculaires dans d'autres pathologies neuromusculaires : la symptomatologie et l'analyse de la littérature suggère que les jonctions neuromusculaires pourraient être affectées dans d'autres pathologies que les myasthénies. Nous avons donc initié un programme de caractérisation des jonctions neuromusculaires dans différentes pathologies. Nous présenterons les premiers résultats pour les myopathies mitochondriales qui montrent une atteinte des jonctions neuromusculaires.

## Risque de thrombose et traitements des maladies neuro-musculaires dysimmunitaires

Dr Luc DARNIGE

*Service d'hématologie biologique, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP Paris*

La survenue d'évènements thrombotiques est un effet indésirable rare (1.1% à 13% selon la pathologie concernée) mais potentiellement sévère des traitements par immunoglobulines rapportée depuis le milieu des années 80. Les thromboses survenant en territoire artériel sont plus fréquentes et plus précoces après le traitement par immunoglobulines que celles survenant en territoire veineux. Ces thromboses peuvent survenir après administration par voie intraveineuse ou sous cutanée.

Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont impliqués, dont l'augmentation de viscosité induite par l'augmentation du taux plasmatique d'immunoglobulines et la présence dans certaines préparations de facteur XI activé (activité procoagulante). Deux types de facteurs de risques sont individualisés et devront être pris en compte pour la prévention : l'existence de facteurs de risques chez le patient tels que l'âge, les pathologies cardio-vasculaires, l'immobilisation... et des facteurs de risque liés aux modalités du traitement par immunoglobulines : doses élevées, absence de prémédication et notamment pré hydratation, débit rapide de perfusion, et premier traitement par Immunoglobulines.

## La fonction pré-synaptique de la plaque motrice : mécanismes moléculaires, neurotoxines et maladies autoimmunes

*Michael SEAGAR, Nicole MOUTOT, Oussama EL FAR*

*INSERM / Aix-Marseille Université UMR1072, Faculté de médecine Nord, Marseille*

Notre laboratoire étudie les mécanismes moléculaires qui couplent les signaux électriques à la libération des neurotransmetteurs et effectue des tests sérologiques pour le diagnostic des canalopathies autoimmunes et du botulisme.

Au niveau des terminaisons nerveuses des motoneurones, des vésicules synaptiques remplies d'acétylcholine s'arriment à la membrane plasmique et subissent des étapes de maturation qui les rendent compétentes pour la fusion. Quand l'influx calcique déclenche la machinerie d'exocytose, un pore de fusion connectant la lumière des vésicules synaptiques à la fente synaptique s'ouvre et permet la libération des neurotransmetteurs par exocytose. L'exocytose nécessite l'assemblage de complexes moléculaires, comprenant plusieurs familles de protéines. Les SNAREs synaptiques (syntaxine 1, SNAP-25 et VAMP2/synaptobrevine) constituent la machinerie de fusion membranaire de base. Ces protéines sont les cibles de l'activité métalloprotéasique des neurotoxines botuliques et tétanique, puissants inhibiteurs de l'exocytose. Les SNAREs sont intrinsèquement insensibles au  $Ca^{2+}$  et la fonction «récepteur de  $Ca^{2+}$  cytoplasmique» est apportée par les synaptotagmines, protéines vésiculaires qui s'associent au SNAREs et aux phospholipides acides de manière  $Ca^{2+}$ -dépendante, conférant ainsi la sensibilité calcique à la libération d'acétylcholine.

Lorsque le potentiel d'action sodique envahit la terminaison axonale, il active les canaux  $Ca^{2+}$  voltage-dépendants de type  $Ca_v2.1$  (canaux P/Q). Ces canaux sont physiquement associés au SNAREs/synaptotagmines afin d'assurer un accroissement rapide et localisé de la concentration intraterminale en  $Ca^{2+}$ . Ils constituent la cible principale des autoanticorps qui réduisent la libération d'acétylcholine dans le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton (LEMS). Certains patients produisent des anticorps anti- $Ca_v2.2$  (canaux N), qui constituent un deuxième marqueur intéressant de LEMS. Alors que leur rôle dans la pathogenèse n'est pas démontré, leur titre évolue de manière indépendante de celui des anti- $Ca_v2.1$  au cours de la maladie. Les canaux potassium de type  $K_v1.1$  déterminent la durée du potentiel d'action et contrôlent indirectement l'influx calcique au travers des canaux  $Ca_v2$ . Ainsi les antagonistes des canaux  $K_v1.1$ , tels que le 3,4-diaminopyridine (Firdapse), constituent un traitement efficace de LEMS, car en augmentant la durée du potentiel d'action axonal, ils stimulent l'entrée calcique et rehaussent la libération d'acétylcholine. Dans la neuromyotonie acquise (syndrome d'Isaac), ces mêmes canaux  $K_v1.1$  sont la cible d'autoanticorps qui inhibent l'influx potassique conduisant à des crampes, fasciculations et myokymies.

## **RESUMES DES COMMUNICATIONS ORALES**

### **Session 1**

#### **Mécanismes physiopathologiques dans les myopathies congénitales**

## Flux calciques dans le muscle squelettique

Bruno ALLARD.

Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire UMR CNRS 5534 - Université Claude Bernard Lyon 1.

La cellule musculaire squelettique se contracte en réponse à la propagation d'un potentiel d'action sur le sarcolemme et le long des tubules transverses. La dépolarisation des tubules transverses provoque un changement de conformation du récepteur des dihydropyridines (DHPR) qui active à son tour un canal calcique du réticulum sarcoplasmique (RS), le récepteur de la ryanodine, entraînant une libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS et la contraction de la cellule. La relaxation musculaire résulte de la repolarisation de la cellule à des valeurs de potentiel de repos qui met fin à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  et de la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par les  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases du RS.

Pendant la phase d'excitation, il est connu qu'une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  en provenance du milieu externe se développe (i) à travers les DHPRs, qui assurent aussi en parallèle une fonction de canal calcique voltage-dépendant, (ii) par un phénomène de type Excitation-Coupled  $\text{Ca}^{2+}$  Entry (ECCE), voie de passage voltage-dépendante qu'il reste à identifier, (iii) à travers des canaux activés par la déplétion calcique du RS, de type SOCE (Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry) dont la nature moléculaire reste aussi controversée. Le rôle fonctionnel de ces différentes voies d'entrée calcique pendant la phase d'excitation reste méconnu. Dans les conditions de repos se développent à la fois un influx sarcolemmal de  $\text{Ca}^{2+}$  et une fuite de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Les voies de passage et les propriétés de régulation de ces influx ne sont également pas clairement établies. L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  de source externe, principalement à travers les DHPRs, est détectée à l'aide de techniques électrophysiologiques consistant à mesurer le courant créé par le passage transmembranaire du  $\text{Ca}^{2+}$  en condition de potentiel imposé.

Une autre technique très résolutive utilisée pour mesurer l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  consiste à substituer du  $\text{Mn}^{2+}$  au  $\text{Ca}^{2+}$  externe et mesurer l'extinction de fluorescence émise par un indicateur calcique cytosolique que la fixation de  $\text{Mn}^{2+}$  induit suite à son influx. Les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane du RS sont appréhendés par des techniques fluorimétriques qui consistent principalement à mesurer les variations de  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytosolique que ces flux génèrent à l'aide d'indicateurs fluorescents dont l'intensité de lumière qu'ils émettent dépend de la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  qui s'y fixe.

L'utilisation d'indicateurs calciques de faible affinité accumulés dans le RS, couplée à la présence d'un tampon calcique cytosolique ou, plus récemment, l'utilisation de protéines caméléons spécifiquement exprimées dans le RS après transfert de gène permettent aussi de mesurer les variations de  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans la lumière du RS.

L'utilisation de ces techniques expérimentales a permis de mettre en évidence le rôle clef joué par la perturbation des différents flux calciques dans de nombreuses pathologies musculaires.

## Mechanisms of calcium dysregulation in core myopathies.

*Susan TREVES\**, *Francesco ZORZATO\*\**.

*\*Departments of Anesthesia and Biomedicine, Basel University Hospital, 4031 Basel, Switzerland, \*\* Department of Experimental and Diagnostic Medicine, University of Ferrara, 44100 Ferrara, Italy*

A growing number of congenital neuromuscular disorders are linked to mutations in *RYR1*, the gene encoding the RyR1 Ca<sup>2+</sup> release channel. Indeed more than 200 distinct mutations in *RYR1* have been identified to date in patients with the subclinical myopathy Malignant Hyperthermia (MH), King Denborough syndrome, the congenital core myopathy central core disease, some forms of multiminicore disease, centronuclear myopathy and congenital fiber type disproportion. Over the past decades our research has focused on understanding the mechanisms whereby mutations in the same gene (the *RYR1*) can be associated with such variable and at times opposing phenotypes.

We as well as others have established that one class of *RYR1* mutations causes the channels to become hypersensitive to activation by electrical and pharmacological stimuli (MH). A second class of mutations (CCD) result in leaky channels leading to depletion of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores. A third class of *RYR1* mutations linked to CCD causes excitation-contraction uncoupling, whereby activation of the voltage sensor Ca<sub>v</sub>1.1 is unable to release calcium from the sarcoplasmic reticulum. The fourth class of mutations cause a decrease of RyR1 protein expression on SR membranes. Such alterations of the functional properties of the RyR1 are also associated with alterations of downstream Ca<sup>2+</sup> - dependent signalling pathways which may participate in the pathological process.

Understanding how mutations directly and indirectly affect the properties of the Ca<sup>2+</sup> release channel may help develop novel therapeutic strategies aimed at improving muscle function in this group of patients suffering from congenital myopathies.

## Core formation in Mouse Models of Malignant Hyperthermia and Central Core Disease

Simona BONCOMPAGNI

CeSI-Center for Research on Ageing & DNI -Department of Neuroscience and Imaging,  
University G. d'Annunzio, Chieti, Italy.

Central core disease is a congenital myopathy, characterized by hypotonia and proximal muscle weakness and presenting with well-delineated areas of myofibrillar disorganization (cores) lacking mitochondrial activity. More than 90% of CCD families have been linked to mutations in the gene encoding for the sarcoplasmic reticulum (SR)  $Ca^{2+}$  release channel, i.e. ryanodine receptor (RyR1), a protein also linked to Malignant Hyperthermia, a life-threatening pharmacogenetic disorder triggered by exposure to halogenated anesthetics.

It appears that CCD and the formation of cores can be caused by two types of mutants: those that are excessively active (defined as *leaky*), which elevate cytosolic  $Ca^{2+}$  levels, and those that has diminished capacity for  $Ca^{2+}$  release (defined as *un-coupled*) and do not elevate cytosolic  $Ca^{2+}$  levels.

Using electron microscopy, we have studied the formation of cores in mouse lines carrying either *leaky* RYR1 (Y524S/+, a mutations linked to MH with cores) or *un-coupled* mutations (I4895T/+, one of the most frequent and highly penetrant CCD mutations, but no apparent susceptibility to MH). Studying these mouse models we first established that those mutations lead to ultrastructural changes that closely mimic the structural alterations observed in muscle biopsies from CCD patients, e.g. the formation of areas of myofibrillar disorganization lacking mitochondria.

However, the steps leading to formation of structural cores in the two models seem to be substantially different. Y524S/+ fibers develop localized regions (*early cores*) of mitochondria swelling and sarco-tubular disruption as early as 2 months of age. With time fibers develop large contractures, characterized by lack of SR and mitochondria, and eventually unstructured cores resembling those of humans skeletal muscle biopsies. In I4895T/+, on the other hand, formation of cores does not seem to involve necessarily mitochondrial damage, but more likely mitochondrial relocation, which are progressively displaced from the center of the cores and accumulate at the core periphery, while retaining their normal non-swollen structure. Z-line streaming and formation of contractures are the most common alterations affecting myofibrils in the latter model.

Overall, these studies of the ultrastructure of CCD and MH mice suggest that un-coupled I4895T/+ and leaky Y524S/+ mutations result in two distinct, and both progressive, pathologies.

## Stress Oxydatif dans les myopathies associées à SEPNI et à RYR1: de la physiopathologie à la thérapie

Sandrine ARBOGAST<sup>1</sup>, Charline RAMAHEFASOLO<sup>1</sup>, James DOWLING<sup>2</sup>, Ana FERREIRO<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> Equipe « Myopathies à début précoce », UMR787 INSERM/UPMC, Institut de Myologie ; et <sup>3</sup> Consultation des Maladies Neuromusculaires ; GH Pitié-Salpêtrière, Paris ; <sup>2</sup> Departments of Pediatrics and Neurology, University of Michigan Medical Center, Ann Arbor, US

Les myopathies à cores représentent collectivement la forme la plus prévalente de myopathie non-dystrophique de l'enfant. Elles n'ont pas de traitement et peuvent être associées à des complications squelettiques et respiratoires potentiellement létales. Leurs bases génétiques ne sont pas complètement caractérisées, mais des mutations de RYR1 ou de SEPNI, codant deux protéines du réticulum sarcoplasmique, sont responsables d'une proportion importante de cas. RYR1 code le récepteur à la ryanodine du muscle squelettique, un composant essentiel du couplage excitation-contraction. SEPNI code la sélénoprotéine N (SelN), dont le rôle reste en partie inconnu.

Nous avons utilisé des modèles *ex vivo* (cultures primaires de cellules musculaires ou fibroblastes de patients mutés), *in vivo* (souris KO SEPNI, zebrafish *relatively relaxed* (*ryr*)) et *in vitro* (C2C12 knocked-down par siRNA) de déficience en RyR1 et en SelN pour identifier des voies physiopathologiques altérées pouvant représenter des cibles thérapeutiques dans les myopathies à cores. Par des études biochimiques, protéiques, transcriptionnelles et pharmacologiques, nous avons établi que le stress oxydatif est un mécanisme physiopathologique primaire dans la SEPNI-related myopathy, et que SelN est une protéine clé dans la défense antioxydante dans le muscle humain. Par ailleurs, alors que l'anomalie majeure identifiée dans les myopathies associées aux mutations de RYR1 est un défaut dans le couplage excitation-contraction, nous avons démontré que le stress oxydatif joue aussi un rôle important dans leur pathophysiologie, et que celui-ci est dû à une surproduction de radicaux libres par les mitochondries. Les cellules humaines exprimant des mutations RYR1 ou SEPNI montrent une survie réduite en conditions oxydantes qui a été totalement restaurée par un pré-traitement avec l'antioxydant N-acetylcystéine (NAC). Nous avons aussi testé l'efficacité *in vivo* du NAC sur le zebrafish *ryr* et observé une amélioration radicale du phénotype moteur de ce modèle animal de déficience en RyR1. En conclusion, le stress oxydatif joue un rôle important, primaire et secondaire, dans la physiopathologie des myopathies associées à SEPNI et à RYR1 respectivement. Le traitement antioxydant par NAC a efficacement corrigé le phénotype aussi bien *ex vivo* qu'*in vivo*, et par conséquent représente une première perspective thérapeutique sûre, disponible, viable et économique pour les patients atteints de ces myopathies.



## RESUMES DES COMMUNICATIONS ORALES

### Session 2 Myopathies à cores

## Génétique des pathologies associées au récepteur de la ryanodine de type 1 (RYR1)

Joël LUNARDI, Nicole MONNIER, Julien FAURE  
Grenoble

L'isoforme RYR1 du récepteur de la ryanodine code pour un canal calcique principalement exprimé au niveau du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique. A ce jour, plus de 350 mutations ont été rapportées dans le gène *RYR1*. Ces mutations sont associées à deux grandes familles de pathologies, d'une part les myopathies induites associées à RYR1 telle l'hyperthermie maligne; d'autre part les myopathies congénitales associées (RYR1-Related Congenital Myopathies).

Les RYR1-RCM sont caractérisées 1) par une présentation clinique allant de formes modérées peu ou non progressives, parfois à révélation tardive, à des formes néonatales très sévères voire létales; 2) par un mode de transmission autosomique dominant ou récessif et 3) par des phénotypes histologiques incluant des anomalies « classiques » telles que les cores (centraux, multiples, mini...) mais s'étendant également à des anomalies moins spécifiques telles que la disproportion de la taille des fibres ou la présence de centralisations nucléaires ... Les anomalies histologiques pouvant varier par ailleurs avec l'âge ou le muscle exploré.

La majorité des phénotypes s'inscrivent ainsi dans un continuum clinique et histologique qui rend difficile une nosographie basée exclusivement sur l'une ou l'autre de ces deux présentations. L'intégration des données apportées par les études génétiques peut alors apporter un éclairage intéressant. Ainsi par exemple, les mutations associées aux formes dominantes de myopathies à cores tel le CCD sont causées à plus de 80% par des mutations localisées dans le domaine membranaire de RYR1 tandis que les mutations associées aux formes récessives sont réparties de manière uniforme tout au long du gène. L'analyse extensive du gène *RYR1* a montré que nombre de cas « sporadiques » étaient en fait des formes récessives et que des mutations *de novo/dominantes* sont identifiées dans près de la moitié des cas sporadiques restants.

Si la majorité des mutations récessives sont des mutations faux-sens, de nombreuses mutations affectent la quantité de RYR1 présent dans le muscle. Les différentes combinaisons de mutations peuvent en partie expliquer la variabilité des présentations cliniques et histologiques des RYR1-RCM.

## Approche morphologique des myopathies à cores

Norma ROMERO

Paris

**Résumé non communiqué.**

## Clinique et imagerie musculaire des myopathies à cores

Dr Susana QUIJANO-ROY<sup>1</sup>, Pr. Robert-Yves CARLIER<sup>2</sup>

Groupe Hospitalier Paris Ile-de-France Ouest - Hôpital Raymond Poincaré, 104 boulevard Raymond Poincaré - 92380 GARCHES. (1) Pôle Pédiatrie – Service de Pédiatrie – Centre de Référence Maladies Neuromusculaires ; (2) Pôle Neuro-locomoteur – Service d'Imagerie Médicale.

Les myopathies à cores constituent un groupe de myopathies héréditaires à début précoce avec une hétérogénéité clinique et génétique. L'orientation diagnostique et l'interprétation des résultats moléculaires des patients avec cores peuvent être difficiles. La mutation dans le gène du récepteur de la ryanodine (*RYR1*) en est la cause la plus fréquente, mais d'autres gènes ont été aussi décrits chez des patients avec une myopathie 'à cores' (*SEPN1*, *ACTA1*, *TTN*, *MYH7*). Le gène *RYR1* est difficile à séquencer du fait de sa longueur. Une transmission autosomique dominante et moins souvent récessive est rapportée dans la littérature. Il a aussi été décrit des cas de patients mutés pour *RYR1* chez des patients avec des altérations moins spécifiques sans cores dans le muscle.

Dans ce contexte, l'imagerie musculaire peut apporter des arguments décisifs utiles au diagnostic définitif. Concernant le gène *RYR1*, une description des patterns ou altérations en IRM des groupes musculaires a été faite depuis environ dix ans. Cette description ne concerne que les cuisses et les jambes explorées avec quelques sections axiales uniquement. Il s'agit d'une modification du signal en T1 témoignant d'un contenu graisseux intra-musculaire accentué. Les muscles les plus altérés sont les vastes, l'adducteur majeur, le biceps femoris et le sartorius pour la cuisse et le soléaire pour la jambe.

Les évolutions technologiques de l'IRM dans le domaine des études corps entier nécessaires aux bilans oncologiques ont été transposées depuis 2003 dans notre centre pour les maladies neuromusculaires. L'exploration du corps entier permet d'apporter des descriptions plus complètes des altérations sur plus de 50 muscles dans le plan axial et dans le plan frontal depuis le massif facial jusqu'aux pieds. L'expérience de deux centres parisiens enfant et adulte chez des patients avec des myopathies à cores ou mutés pour *RYR1* suggère un intérêt particulier de l'imagerie corps entier dans ce type de pathologie. Une atteinte diffuse est souvent rencontrée même chez des patients peu symptomatiques. Dans un petit nombre de cas un profil atypique a été signalé. L'étude du corps entier, en plus des anomalies classiques observées au niveau de membres inférieurs permet de détecter une atteinte des loges masticatrices particulièrement fréquente, ce qui permet de s'orienter vers le *RYR1* dans certains cas qui feront l'objet de la présentation. Des exemples de patients avec cores et mutation d'autres gènes, ainsi que des patients avec biopsie musculaire myopathique non spécifique et mutation du gène *RYR1* seront aussi exposés.

Pour conclure :

L'IRM corps entier peut-être d'un apport non négligeable dans l'orientation diagnostique et l'interprétation des résultats moléculaires des patients mutés pour le gène *RYR1* ou avec des anomalies ultra structurales de type cores.

## RESUMES DES COMMUNICATIONS ORALES

### Session 3

#### Les autres pathologies du cycle calcique

## Anesthésie, Hyperthermie Maligne et Myopathies

Renée KRIVOSIC-HORBER, A. F. DALMAS

*Unité Hyperthermie Maligne, Centre des maladies rares neuro-musculaires, Pole d'anesthésie Réanimation, CHRU LILLE 59037, France.*

L'hyperthermie Maligne (HM) est une complication de l'anesthésie survenant chez des individus présentant une anomalie génétique au cours d'anesthésie générale comprenant un anesthésique volatil halogéné et/ou un curare dépolarisant. L'expression clinique est un hypermétabolisme musculaire pouvant être majeur et entraîner le décès. Les signes observés sont une élévation du CO<sub>2</sub> expiré, une rigidité musculaire suivie d'une rhabdomyolyse et une hyperthermie. Le traitement est basé sur l'arrêt de l'anesthésique déclenchant et l'administration de dantrolène IV. L'anomalie génétique se trouve le plus souvent dans le gène RYR1. L'expression clinique est asymptomatique, mais une élévation chronique des CPK est observée chez 30 % des sujets sensibles HM. Le diagnostic de la sensibilité HM repose sur la réalisation de tests électrophysiologiques (IVCT) sur des fragments de muscle prélevés par biopsie chirurgicale et/ou la mise en évidence d'une mutation causale dans le RYR1. Les myopathies congénitales à central et multi minicores comportent souvent des mutations ou variants dans le gène RYR1 ce qui conduit à considérer que ces patients sont à risque HM. L'existence de ce risque n'est pas prouvée pour les autres myopathies. D'autres complications anesthésiques sont à redouter chez les patients myopathes. Le médecin anesthésiste doit donc disposer d'informations précises sur le type de myopathie pour optimiser la technique anesthésique.

## Le coup de chaleur d'exercice peut-il résulter d'un trouble du cycle cellulaire du calcium dans le muscle ?

*Lionel BOURDON, Sébastien BANZET et Nathalie KOULMANN  
Institut de recherche biomédicale des armées, Brétigny-sur-Orge*

Le coup de chaleur d'exercice (CCE) est un accident grave qui touche des sujets en bonne santé, au cours d'un exercice physique intense et d'une durée d'au moins 30 à 40 minutes, tel qu'une course longue distance ou un triathlon, effectué en environnement contraignant. Son incidence est en augmentation depuis une dizaine d'année dans les pays occidentaux. Le CCE se manifeste le plus souvent par des troubles de la conscience, de gravité variable, survenant juste avant ou juste après le terme normal de l'effort, mais qui dans tous les cas imposent son arrêt, et une hyperthermie supérieure à 40 °C. En l'absence d'un refroidissement efficace rapide, l'évolution spontanée se fait, après une latence de 12 à 24 h, vers l'aggravation des signes d'encéphalopathie et l'apparition de signes de défaillance multiviscérale, associant troubles hépatiques, insuffisance rénale et troubles de la coagulation dans les formes graves. Une rhabdomyolyse, de gravité très variable, est constamment observée.

L'application de tests de dépistage de l'hyperthermie maligne peranesthésique (HM) aux patients victimes d'un CCE a observé un nombre anormalement élevé de réponses positives, analogues à celles observées dans l'HM, mais aussi équivoques qui signent un dysfonctionnement musculaire de nature non déterminée. Des études récentes sur les mécanismes du couplage excitation-contraction et sur la génétique des protéines du complexe de mobilisation du calcium du tissu musculaire suggèrent que l'un des facteurs causaux du CCE pourrait résider dans un dysfonctionnement de ce processus, directement provoqué par l'effort musculaire intense et prolongé.

## Brody disease: further clinical description

Thierry KUNTZER

*Department des neurosciences cliniques - Unité nerf-muscle - 1011 Lausanne, Suisse, thierry-kuntzer@chuv.ch*

Brody disease is a rare inherited myopathy due to reduced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA)1 activity caused by mutations in *ATP2A1*, which causes delayed muscle relaxation and silent cramps.

So far the disease has mostly been diagnosed by measurement of SERCA1 activity. Since mutation analysis became more widely available, it has appeared that not all patients with reduced SERCA1 activity indeed have *ATP2A1* mutations, and a distinction between Brody disease (with *ATP2A1* mutations) and Brody syndrome (without *ATP2A1* mutations) was proposed.

Brody disease presents with an onset in the 1st decade, a generalized pattern of muscle stiffness, delayed muscle relaxation after repetitive contraction on physical examination, and autosomal recessive inheritance. Patients with Brody syndrome more often report myalgia and experience a considerable impact on daily life. Future research should focus on the possible mechanisms of reduction of SERCA activity in Brody syndrome and other genetic causes, and on evaluation of treatment options.

## RESUMES DES COMMUNICATIONS ORALES

### Session 4

Session commune SFM / Club Myogène

## La thérapie saut d'exon appliquée à un cas de myopathie congénitale

*Isabelle MARTY et John RENDU*

*Grenoble Institut des Neurosciences- Inserm U836- Equipe Muscle et Pathologies – Grenoble  
et Laboratoire Biochimie Génétique et Moléculaire – CHU Grenoble*

Les relâchements de calcium pour la contraction du muscle squelettique sont réalisés par le Récepteur de la ryanodine RyR1. Nous avons étudié la situation particulière d'un patient atteint de Central Core Disease, porteur d'une mutation intronique profonde identifiée dans notre laboratoire. Cette mutation crée un site donneur d'épissage et active un site cryptique accepteur d'épissage. Ceci conduit à l'inclusion d'un nouvel exon 101 bis de 99 nucléotides qui aboutit à la disparition de la protéine RyR1. Le but de ce projet est de corriger cette mutation par une stratégie de saut d'exon. Cette stratégie visant à restaurer la production d'un ARNm normal de RyR1 est appliquée à des cultures primaires (myoblastes) d'un patient porteur de cette mutation. Différents oligonucléotides antisens (2'OMeAONs) ont été testés, et les plus efficaces ont été utilisés pour développer des lentivirus U7snRNA. La transduction de ces vecteurs viraux dans les cellules en culture primaire restaure l'épissage de RyR1 au niveau ARNm et rétablit un niveau suffisant de protéine pour restaurer des relâchements de calcium identique à celui de cellules contrôle, évalués par imagerie calcique. Cet essai valide pour la première fois l'utilisation du saut d'exon comme stratégie thérapeutique potentielle pour certains cas de myopathie congénitale à core.

**Congenital myopathies**  
**Blurring the boundaries, sharpening the focus:**  
**A clinician's perspective**

Carsten BÖNNEMANN

*Neuromuscular and Neurogenetic Disorders of Childhood Section - National Institute of Neurological Disorders and Stroke - National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*

Congenital myopathies are clinico-pathological entities essentially defined by characteristic histopathological and ultrastructural findings in the muscle biopsy in patients with early-onset weakness. The three "classic" groups are represented by the nemaline myopathies, the core myopathies and the centro-nuclear myopathies, each of which now shows an increasing degree of genetic and clinical heterogeneity, with increasing associated clinical spectra. On the histopathological level there are overlapping histological and clinical features that may combine typical features of more than one classical entity (such in rod-core disease). Clearly, mutations in the same gene may underly more than one clinico-pathological entity and more than one clinical entity. This blurring of traditional boundaries does suggest that there may be pathomechanisms that are spanning across various congenital myopathies. Work in biopsy material and in animal models, especially in mouse and zebrafish have helped define such pathophysiological concepts that reach across the boundaries of previously defined entities. The shared pathophysiological concept with currently the most support from clinical and animal work concerns the regulation of excitation contraction coupling via the functional unit at the triad, increased oxidative stress, abnormal autophagy regulation, and abnormalities of regulation and function of the contractile (myofibrillar) apparatus. I will attempt to relay these findings back to the clinic and highlight potential implications for the development of therapeutic approaches to the congenital myopathies.



## RESUMES DES COMMUNICATIONS ORALES

### Colloque Myogénèse

## The neuronal endopeptidase ECEL1 is associated with autosomal recessive distal arthrogryposis

Dieterich K\*, Quijano-Roy S, Monnier N, Zhou Jie, Fauré J, Avila Smirnow D, Carlier R, Laroche C, Marcotelles P, Mercier S, Mégarbané A, Odent S, Romero N, Sternberg D, Marty I, Estournet B, Jouk P-S, Melki J, Lunardi J.

\*Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France

Distal arthrogryposis (DA) is a subgroup of arthrogryposis multiplex congenita (AMC) characterized by multiple congenital joint limitations. Using a pangenomic approach in 2 consanguineous families with DA, we identified a common morbid locus that mapped to chromosome 2q37 and harbored the Endothelin Converting Enzyme Like 1 (*ECEL1*) gene. We screened a panel of 20 DA families and identified 7 different mutations in six families. All mutations resulted either in the absence of the protein or into the synthesis of a non-functional protein, suggesting a loss of function mechanism. *ECEL1* encodes a neuronal endopeptidase expressed in the peripheral (PNS) and central nervous system during fetal life and plays a major role in intramuscular branching of motoneurons in skeletal muscle.

Patients presented with a homogeneous phenotype characterized by limited knee flexion, flexed third to fifth fingers and relatively spared index finger, severe muscle atrophy in lower limbs and tongue. Muscle imaging showed a recognizable pattern of the thigh muscles. No dysfunction of the neuromuscular transmission was evidenced.

On the whole, clinical features point towards a disorder involving the PNS. A developmental dysfunction is suggested by the predominantly prenatal expression of *ECEL1*, the non-progressive course of the disease and K.O. mouse data.

## Phosphoinositide-dependent and independent roles of myotubularin in skeletal muscle *in vivo*

L Amosii<sup>1</sup>, K Hnia<sup>1</sup>, H Tronchère<sup>2</sup>, G Chicanne<sup>2</sup>, D L. Bertazzi<sup>3</sup>, A Brech<sup>4</sup>, BS. Cowling<sup>1</sup>, MM Müllers<sup>5</sup>, A Ferry<sup>6</sup>, S Friant<sup>3</sup>, B Payrastre<sup>2</sup>, J Laporte<sup>1</sup> (jocelyn@igbmc.fr)  
<sup>1</sup> IGBMC, Illkirch. <sup>2</sup> INSERM U1048, Toulouse. <sup>3</sup> CNRS UMR7156, Strasbourg. <sup>4</sup> Institute for Cancer Research The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway. <sup>5</sup> CNRS 2843, Metz. <sup>6</sup> UMRS974, Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Myotubularin (MTM1) is a phosphoinositides 3-phosphatase regulating phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns3P) and mutated in X-linked myotubular (centronuclear) myopathy. While MTM1 is ubiquitously expressed, the importance of its activity in skeletal muscle and in the pathology was not investigated.

We characterized the murine MTM1 knock-out model that reproduces faithfully the histopathological findings from human patients. Re-expression of phosphatase-inactive MTM1 mutants with Adeno-associated virus improved most phenotypes, to a similar extent compared to wild-type MTM1. Mass assay measurement of PtdIns3P showed this rescue was not correlated to a normalization of PtdIns3P level. However, phosphatase inactive mutants of MTM1 did not rescue fully the aberrant shape of triads, membrane structures underlying excitation-contraction coupling. *In vivo* manipulation of PtdIns3P level in muscle from wild-type mice and subcellular localization of PtdIns3P confirmed an important role of PtdIns3P in triad membrane shape.

These findings support a phosphatase-independent role of MTM1 in the general organization of skeletal muscle, while PtdIns3P is implicated in membrane curvature at the triad.

## Differentially activated macrophages orchestrate the myogenesis during regeneration of human skeletal muscle

Marielle Saclier<sup>1</sup>, Michael Kjaer<sup>2</sup>, Bénédicte Chazaud<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – Institut Cochin - U1016 - UMR8104, Université Paris Descartes, Paris ; <sup>2</sup> - Institute of Sports Medicine, Centre for Healthy Ageing, University of Copenhagen

Macrophages exert either beneficial or deleterious effects on tissue repair, depending on their activation/polarization state. They are crucial for adult skeletal muscle repair, notably by acting on muscle stem cells/myogenic precursors. However, these interactions have not been fully characterized. Here, we explored both *in vitro* and *in vivo* in human the interactions of differentially activated MPs with muscle stem cells/precursors during myogenesis and skeletal muscle regeneration. We showed *in vitro* that through the differential secretion of cytokines and growth factors, pro-inflammatory macrophages inhibited myogenic precursor cell (MPC) fusion while anti-inflammatory macrophages stimulated MPC migration and strongly promoted MPC differentiation by increasing their commitment into differentiated myocytes and the formation of mature myotubes. Furthermore, *in vivo* time course of expression of myogenic and macrophage markers were studied in regenerating human healthy muscle after damaging. We showed that regenerating areas containing proliferating MPCs were preferentially associated with macrophages expressing pro-inflammatory markers. In the same muscle, regenerating areas containing differentiating myogenin positive MPCs were preferentially coupled to macrophages harboring anti-inflammatory markers. These data demonstrate for the first time in human that macrophages sequentially orchestrate myogenesis during regeneration of damaged skeletal muscle. These results support the emerging concept that inflammation, through macrophage activation, controls stem cell fate and coordinates tissue repair.

## Rôle de l'Annexine-A5 dans la réparation membranaire

Anthony Bouter,<sup>1</sup> Céline Gounou,<sup>1</sup> Rémi Bérat,<sup>1</sup> Sisareuth Tan,<sup>1</sup> Bernard Gallois,<sup>2</sup> Thierry Granier,<sup>2</sup> Béatrice Langlois d'Estaintot,<sup>2</sup> Ernst Pöschl,<sup>3</sup> Bent Brachvogel,<sup>4</sup> Alain R. Brisson<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Imaging and NanoBioTechnology, <sup>2</sup>Crystallography of Biological Macromolecules, UMR-5248 CBMN CNRS-University Bordeaux1, Talence, F-33402, France, <sup>3</sup>School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, NR4 7TJ, UK, <sup>4</sup>Center for Biochemistry, University of Cologne, Cologne, D-50931, Germany

La rupture de la membrane plasmique est un événement physiologique survenant dans les cellules exposées à des stress mécaniques fréquents (cellules musculaires squelettiques ou cardiaques, cellules épithéliales...). Alors qu'une cellule normale est capable de réparer ces ruptures rapidement, l'absence ou un défaut de réparation conduit à la mort cellulaire et peut contribuer au développement de maladies dégénératives, telles que les dystrophies musculaires. Nous avons récemment montré que l'Annexine-A5 (AnxA5) participe à une étape clé du processus de réparation des cellules périvasculaires: suite à l'influx local de Ca<sup>2+</sup> du milieu extracellulaire (mM Ca<sup>2+</sup>) vers le milieu intracellulaire (µM Ca<sup>2+</sup>), l'AnxA5 se lie sur les bords de la zone de rupture où elle forme un réseau bidimensionnel. Ce réseau empêche l'expansion de la rupture, en s'opposant aux forces de tension exercées par le cytosquelette, et permet ainsi la réparation de la membrane\*.

Les résultats ayant conduit à ces conclusions ainsi que le protocole d'étude *in vitro* de la réparation membranaire, basé sur la création de micro-ruptures par irradiation laser seront décrits lors de cette présentation.

\*Bouter et al. (2011) *Nat. Commun.* 2:270 doi: 10.1038/ncomms1270.

## Implication d'Egr1 dans la formation et la réparation du tendon

M-J Guerquin<sup>1,2</sup>, B Charvet<sup>1,2</sup>, G Nourissat<sup>1,3,4</sup>, E Havis<sup>1,2</sup>, O Ronsin<sup>1,5</sup>, M-A Bonnin<sup>1,2</sup>, M Ruggiu<sup>1,2</sup>, I Olivera<sup>1,2</sup>, K Kadler<sup>6</sup>, T Baumberger<sup>1,5</sup>, L Doursounian<sup>4</sup>, F Berenbaum<sup>1,3,4</sup>, D Duprez<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> UPMC, Univ Paris 06, Paris, France. <sup>2</sup> CNRS, UMR 7622, Developmental Biology laboratory, 75005 Paris, France. <sup>3</sup> UR 4, UPMC, Paris, France. <sup>4</sup> AP-HP, Service de chirurgie orthopédique et traumatologique, Hôpital Saint-Antoine, Paris. <sup>5</sup> Institut des NanoSciences de Paris (INSP), CNRS, UMR 7588, Paris, France. <sup>6</sup> Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom.

La réparation de tendon reste un défi clinique. La formation et la réparation des tendons reposent sur des combinaisons spécifiques de facteurs de transcription, de facteurs de croissance et de paramètres mécaniques qui contrôlent la production et l'organisation spatiale du collagène de type I. Nous avons examiné la fonction du facteur de transcription Egr1 dans la formation et la réparation du tendon en utilisant des modèles d'animaux et les cellules souches mésenchymateuses (MSCs). Les tendons adultes de souris *Egr1*<sup>-/-</sup> présentent un défaut d'expression des marqueurs de tendon et ont des propriétés mécaniques altérées. *Egr1* est nécessaire pour la réponse moléculaire normale dans un modèle de lésion tendineuse chez la souris. *Egr1* est suffisant pour induire la différenciation des MSCs en cellules de tendon. Cet effet est partiellement médié par TGF- $\beta$ 2. Cette étude démontre pour la première fois la participation d'Egr1 dans la formation et la réparation du tendon.

## Involvement of collagen XVb in zebrafish neuro-muscular development

E. Guillon\*, S. Bretaud\*, D. Le Guellec# and F. Ruggiero\*

\*IGFL, ENS de Lyon, UMR-CNRS 5242, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, # DyHTIT, CNRS-FRE 3310, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07

The extracellular matrix acts as a structural support for muscle fibers and is essential for muscle function. Collagen XV is a component of basement membrane zone, mainly expressed in skeletal muscle. No mutation in the human gene has been identified yet, but *Col15a*<sup>-/-</sup> mice presented a skeletal myopathy<sup>1</sup>. To detail the role of this collagen in muscle development and the underlying mechanism, we used the zebrafish model. Two paralogs in the zebrafish genome, named *col15a1a* and *col15a1b* have been identified. We previously reported that *col15a1a* expression is restricted to notochord<sup>2</sup> while *col15a1b* is transiently expressed during morphogenesis by adaxial cells, the slow fiber precursors<sup>3</sup>. We now show that *col15a1b* expression in these cells is dependent on the Sonic hedgehog pathway and that the protein is deposited in the medial surface of the somite. Morpholino knock-down of *col15a1b* results in slow fiber defects and abnormal myogenesis. Lack of *col15a1b* also disturbs primary motoneuron migration that could explain the global myotome alteration observed at later stages. These data provide new insights into the role of this collagen in neuro-muscular development. 1. Eklund *et al*, 2001, PNAS, 98 :1194-9. 2. Pagnon-Minot *et al*, 2008, Biol Dev, 316:21-35. 3. Bretaud *et al*, 2011, GEP, 11:129-34

## Nuclear positioning during skeletal muscle fibers formation

*V. Gache<sup>1</sup>, B. Cadot<sup>1</sup>, T. Metzger<sup>2</sup>, M. Xu<sup>2</sup>, S. Falcone<sup>1</sup>, E. Folker<sup>2</sup>, B. Richardson<sup>2</sup>, M. Baylies<sup>2</sup>, E. Gomes<sup>1</sup>.*

*1. Inserm U787, Paris ; 2. Sloan-Kettering Institute, New York.*

The basic unit of skeletal muscle in metazoans is the multinucleate myofiber, within which individual nuclei are regularly positioned. Improperly positioned nuclei are a hallmark of numerous muscle diseases, including centronuclear myopathies, but it is unclear whether correct nuclear positioning is necessary for muscle function.

We performed in vitro time-lapse video microscopy on myotubes to measure nuclei speed and localization in early myotubes. Using a cytoskeleton targeting drugs approach and a siRNA screen on molecular motors, we identified two distinct microtubules dependent nuclei movements in myotubes. The first movement occurs just after fusion: entering nucleus of the myoblast moved towards the center of the myotube. This nuclear movement is driven by dynein/dynactin complex, regulated by Cdc42, Par6 and Par3.

The second movement occurs inside the myotube and is responsible for the alignment of nuclei. This nuclear movement is driven by the interaction between a kinesin and the Microtubule Associated Protein Map7. This complex maintains an anti-parallel network of microtubules in myotubes and allows nuclei to correctly align within the myotube. We demonstrate that myonuclear positionings is physiologically important.

Our results show for the first time that the ability to correctly position myonuclei correlates with better muscle growth and function. Correcting nuclear positioning defects in patients with muscle diseases might benefit muscle strength and improve muscle function.

## Role of androgen and glucocorticoid receptors in mouse skeletal muscles

*Gilles Laverny<sup>1</sup>, Mélanie Schuh<sup>1</sup>, Vanessa Ueberschlag<sup>1</sup>, Laetitia Gargowitsch-Poncet<sup>1</sup>, Jean-Marc Bornert<sup>1</sup>, Nadia Messadecq<sup>1</sup>, Arnaud Ferry<sup>2</sup>, Pierre Chambon<sup>1</sup> and Daniel Metzger<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964, Université de Strasbourg, Collège de France, Illkirch, France. <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U974, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7215, Université Paris Descartes, Paris, France.*

Skeletal muscles play an important role in stature, respiration and locomotion, and serve as the most significant repository for proteins in the body. Fasting, various diseases and ageing induce muscle atrophy and weakness that is often severely debilitating, can lead to physical dependence, and therefore has a high socio-economical impact.

Glucocorticoids (GC) are widely used for the treatment of inflammatory and auto-immune disorders, but a prolonged therapy is limited due to muscle wasting. In contrast, androgens exert anabolic effects on skeletal muscle, but their use is limited as they promote prostate cancer.

Most of the effects of these hormones are transduced by two members of the nuclear receptor superfamily, the androgen and GC receptors (AR and GR, respectively). As the molecular and cellular pathways controlled by these hormones in skeletal muscle remain poorly understood, we generated mice in which AR and GR are selectively ablated in skeletal muscle myofibers. Our results show that myofiber GR negatively regulates limb muscle mass through anti-anabolic and catabolic activities, while AR is essential for maximal force production in limb skeletal muscles by controlling the integrity of the myofibrillar organisation of sarcomeres.

The identification of the molecular mechanisms controlled by these two steroid hormones in skeletal muscles might allow to design new screens to improve their tissue selectivity for clinical use, and identify new drug target to combat muscle wasting.

## Prednisolone and *mdx* mice : a good and a bad friend ?

Roux A<sup>1</sup>, Lafoux A<sup>1</sup>, Carre – Pierrat M<sup>2</sup>, Segalat L<sup>2</sup> and Huchet – Cadiou C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> UMR INSERM U1087 / UMR CNRS 6291, Institut du Thorax, Université de Nantes, France.

<sup>2</sup> UMR CNRS 5534, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire CGMC, Université Claude Bernard Lyon 1, France.

The corticosteroids prednisolone or deflazacort, a prednisone analog, are currently used for the treatment of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). However, the use of glucocorticoids in DMD remains controversial in part because of their significant side effects and limit its therapeutic usefulness, especially in young.

The purpose of this study was to analyze the effect of continuous prednisolone administration on *mdx* (C57Bl6mdx5cv) and healthy mice (C57Bl6) at various concentration. To analyze whether treatment ameliorate or not locomotor function, a wide variety of behavioural, functional and biochemical assays was used to assess the effects of prednisolone administered for 2, 7 and 12 weeks by feeding.

Prednisolone administration to *mdx* mice results in an improvement in grip strength and this effect was related to an increase in edl muscle force. In *mdx* mice, this significant improvement in disease phenotype was mainly observed after 2 weeks of treatment. However, these positive effects were associated with side effects on growth and muscle weight. Furthermore, these amelioration in skeletal muscle function was smaller to those observed in healthy mice.

## Effects of lactate on the voltage-gated sodium channels of rat skeletal muscle: modulating current opinion

F. Rannou<sup>1</sup>, R. Leschiera<sup>1</sup>, M.A. Giroux-Metges<sup>1</sup>, J.P. Pennec<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie, EA 1274-M2S, Faculté de Médecine, Brest, F-29200 France

During muscle contraction, lactate production and translocation across the membrane increase. Less is known regarding a potential effect of lactate on the voltage-gated sodium channel ( $Na_v$ ) of skeletal muscle. The electrophysiological properties of muscle  $Na_v$  were studied in the absence and in the presence of lactate (10 mM) by using the macro-patch-clamp method in dissociated fibers from rat *Peroneus Longus* (PL). Lactate in the external medium (Petri dish + pipette) increases the maximal sodium current, while the voltage-dependence of activation and fast inactivation are shifted toward the hyperpolarized potentials. Lactate induces a leftward shift in the relationship between the kinetic parameters and the imposed potentials, resulting in an earlier recruitment of muscle  $Na_v$ . The slow inactivation process is decreased by lactate, corresponding to an enhancement in the number of excitable  $Na_v$ . In an additional series of experiments, lactate (10 mM) was only added to the Petri dish, while the pipette remained sealed on the membrane area. In this approach, the  $Na_v$  properties were unaffected by lactate compared with control condition, indicating an extracellular pathway. These effects are consistent with an enhancement in excitability, providing new insights into the role of lactate in muscle physiology and suggesting new hypothesis in the pathophysiology of glycolysis defects (*Journal of Applied Physiology*, 2012).

## Novel *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1: phenotypic characterization and genome-wide view of altered gene expression

*Picchio Lucie, Plantie Emilie, Yoan Renaud, Preethi Poovathumkadavil, Krzysztof Jagla*

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is a multisystemic RNA-dominant disorder characterized by myotonia and muscle degeneration. In DM1 patients, the mutant *dmpk* transcripts containing expanded CUG repeats form nuclear foci and interfere with biogenesis of other mRNAs. The toxic effect of CUG repeats is in part mediated by the sequestration of Muscleblind like-1 (MBNL1) splicing factor and mis-regulation of its targets. However, several pathological defects observed in DM1, and their link with disease progression, remain poorly understood. In attempt to fill this gap we have generated inducible transgenic *Drosophila* lines with increasing number of CTG repeats. Targeting expression of these repeats to the larval muscles recapitulates in a repeat size-dependent manner the major DM1 symptoms (muscle hypercontraction, splitting of muscle fibers, reduced fiber size or decreased myoblast fusion ability). Comparative transcriptional profiling performed on the generated DM1 lines and on the *muscleblind-(mb1)-RNAi* line revealed altered expression of several categories of genes. Among the genes whose expression is affected in *mb1RNAi* contexts we find several single-transcript genes suggesting an indirect influence of *mb1* on gene expression. One of identified single-transcript genes negatively regulated by *mb1* is *Muscle protein 20 (Mp20)* involved in myoblast fusion and causing the reduced number of nuclei in larval muscles in *mb1RNAi* knockdown context.

## A role for clathrin heavy chain in costamere formation and maintenance

*S Vassilopoulos<sup>1</sup>, C Gentil<sup>1</sup>, J Lainé<sup>1</sup>, P-O Buclez<sup>1</sup>, A Ferry<sup>1</sup>, F M. Brodsky<sup>2</sup>, G Bonne<sup>1</sup>, T Voit<sup>1</sup>, L Garcia<sup>1</sup>, F Piétri-Rouxel<sup>1\*</sup> and M Bitoun<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup> Institut de Myologie, UPMC-Paris 6, INSERM U974, CNRS UMR 7215, Paris, F-75013, France. <sup>2</sup> Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, UCSF, San Francisco, USA.

Several diseases are caused by mutations in genes encoding proteins belonging to the intracellular membrane trafficking machinery. Recent work from our team, interested in centronuclear myopathy caused by mutations in dynamin 2 has suggested that a clathrin-dependent endocytosis defect might be a central pathophysiologic mechanism of this pathology. Clathrin heavy chain (CHC) is the main component of clathrin coated vesicles, well characterized for its role in vesicle formation during endocytosis and trafficking from intracellular compartments. The possible role of CHC in organizing the contractile apparatus was put forth a few years ago but these observations were never pursued in order to establish the function of clathrin during myogenesis. Here we used an siRNA-mediated CHC knock-down in-vitro strategy and an shRNA combined to AAV-mediated gene transfer to achieve in-vivo knockdown. CHC depletion induced sarcomeric disorganisation and led to rapid muscle degeneration and subsequent regeneration. Our results raise the possibility that clathrin heavy chain contributes to sarcomeric structure through interactions with costameric proteins and highlight a role for CHC in skeletal muscle which may be relevant to muscle physiology and could be associated to muscle diseases of unknown aetiology.

## Myotubes sorted specific exosomal miRNAs which regulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation

*A Forterre<sup>(1)</sup>, A Jalabert<sup>(1)</sup>, K Chikh<sup>(1)</sup>, S Pesenti<sup>(1)</sup>, V Euthine<sup>(1)</sup>, A Granjon<sup>(1)</sup>, E Errazuriz<sup>(2)</sup>, E Lefai<sup>(1)</sup>, H Vidal<sup>(1)</sup> and S Rome<sup>(1)\*</sup>*

*(1) Laboratory CarMeN (INSERM 1060, INRA 1235, INSA), University of Lyon, Faculté de Médecine Lyon-Sud, Chemin du Grand Revoyet, 69600 Oullins, France ; (2) Centre Commun d'Imagerie de Laënnec (CeCIL), SFR Santé Lyon-Est, University of Lyon, FRANCE*

*\* Contact Information : Dr. Sophie Rome, srome@univ-lyon1.fr, (+33) 42623 5920 ; fax (+33) 42623 5916*

**Background :** Exosomes are vesicles derived from the late endosomal system secreted constitutively. As we have found that muscle cells secrete exosomes, we addressed the question whether skeletal muscle exosomes contained specific miRNAs and whether they could act as endocrine signals during myogenesis.

**Results:** We compared the miRNA repertoires sorted in exosomes from C2C12 myoblasts and myotubes. The majority of muscle cell miRNAs were exported in exosomes (171 and 182 miRNAs, in exosomes from myoblasts and myotubes, respectively). However, some miRNAs were found expressed at higher levels in exosomes than in their donor cells and vice versa. Interestingly, miRNAs from C2C12 exosomes were regulated during myogenesis. Functional analysis of their predicted target genes indicated that these regulated miRNAs were involved in the control signaling pathways. We found that two miRNAs (*i.e.* ; miR-133a and miR-145) which are normally not expressed in proliferating myoblasts, were detected in myoblasts incubated with myotube exosomes but not with myoblast exosomes. Exosome from myotubes could also transfer other small RNAs (siRNA) in myoblasts. By using Sirtuin 1 as reported gene, we demonstrated that miRNAs secreted by myotubes are functional and can silence Sirtuin 1 at the protein level in myoblasts. As Sirtuin 1 regulates muscle gene expression and differentiation, our results show that miRNAs from exosome myotubes could contribute in the commitment of myoblasts in the process of differentiation.

**Conclusion:** Exosomal transfer of siRNA would be a new powerful mean of orchestrating gene expression to coordinate myoblast cell differentiation during the induction of cell-cycle quiescence.

## IP3 receptors type1 and type 3 are required for human myoblast differentiation.

*F. Antigny, L. Bernheim and M. Frieden.*

*Department of Basic Neurosciences, Geneva Medical Center, 1, rue Michel Servet, 1211 Geneva 4, Switzerland*

Myogenesis process involves the expression of muscle-specific transcription factors such as myogenin and MEF2 (myocyte enhancer factor 2), and is fundamentally regulated by intracellular Ca<sup>2+</sup> fluctuations. Both ER Ca<sup>2+</sup> release and Ca<sup>2+</sup> entry generate Ca<sup>2+</sup> signals required for myoblasts to differentiate. Two families of ER Ca<sup>2+</sup> channels are expressed in mammalian cells, the inositol-1,2,3 trisphosphate receptors (IP3R) and the ryanodine receptors (RyR). We assessed the role of IP3R family in human primary myoblast differentiation, as RyR are not expressed in proliferating myoblasts. Human myoblasts expressed the three isoforms of IP3R (IP3R1, IP3R2 and IP3R3). Silencing IP3R1 and IP3R3 using siRNAs reduced MEF2 and myogenin expression by 75% and 60%, respectively, while silencing IP3R2 did not impact on myogenesis. Accordingly, IP3R1 overexpression significantly increased the number of MEF2 positive cells, suggesting an acceleration of the differentiation process in these conditions. Moreover, a decreased expression of IP3R1 reduced significantly NFAT activity, in agreement with the Ca<sup>2+</sup>-dependency of the NFAT signaling pathway. Finally, we could show that IP3R1 expression strongly increased during the first 48h of differentiation, while IP3R3 expression decreased 24-48h after the initiation of differentiation suggesting a role of IP3R1 in mature myotubes. Indeed, KCl-induced Ca<sup>2+</sup> elevation was reduced in IP3R1 knockdown myotubes. Together, these data demonstrate that IP3R1 and 3-induced Ca<sup>2+</sup> release are required during normal human myoblast differentiation.

## Role of the MyoD/NFATc2 complex into myofiber formation and specification during mouse myogenesis

*Daou N, Lecolle S, Baghdadi M, Saclier M, Della Gaspera B, Charbonnier F, Chanoine C and Armand AS.*

*CESeM, UMR 8194, CNRS, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints-Pères 75006 Paris, France*

Calcineurin/NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) signaling is involved in multiple aspects of skeletal muscle development and disease. A number of studies demonstrate that calcineurin plays a regulatory role in skeletal muscle adaptation and muscle regeneration by its ability to promote myotube differentiation. Calcineurin dephosphorylates members of NFAT transcription factors allowing NFAT translocation into the nucleus where it cooperates with other transcription factors to induce transcription of target genes. We demonstrated that calcineurin/NFATc3 signaling is required for primary myogenesis by transcriptional cooperation with the basic helix loop helix transcription factor MyoD (Armand et al., 2008)

We now show that the NFATc2 isoform is also able to physically interact with MyoD. However, NFATc2 and MyoD interaction is unique, since the interacting domains are different from those involved in the NFATc3/MyoD interaction. The biological significance of such NFATc2/MyoD interaction is completely unknown and is likely crucial as *myod:nfatc2* double deletion is lethal. Our *in vitro* and *in vivo* studies show that MyoD and NFATc2 cooperate to regulate muscle fiber formation and specification during secondary myogenesis: we have indeed revealed a significant muscle aplasia in the double mutant *nfatc2/myod* embryos and a specific fall of expression of the neonatal myosin heavy chain (MHC) in double mutants.

Altogether these data show that NFATc2 and MyoD cooperate *in vivo* during late myogenesis. Now, using microarray strategy, we focus on the target genes regulated by the NFATc2/MyoD complex. *Armand et al. 2008. J Biol Chem. 283 : 29004-10*

## Effect of RGD-functionalization and stiffness modulation of polyelectrolyte multilayer films on muscle cell differentiation

*V Gribova<sup>1,2</sup>, C Gauthier-Rouvière<sup>3</sup>, C Albigès-Rizo<sup>4</sup>, R Auzely-Velty<sup>2</sup>, C Picart<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>LMGP/Minatoc, CNRS UMR5628, Grenoble. <sup>2</sup>CERMAV, CNRS UPR5301, St Martin d'Hères. <sup>3</sup>CRBM, CNRS UMR5237, Montpellier. <sup>4</sup>IAB, INSERM U823, Grenoble.*

Skeletal muscle tissue engineering holds promise for the replacement of muscle due to an injury and for the treatment of muscle diseases. Although RGD substrates have been widely explored in tissue engineering, to date, there is no study investigating the combined effects of RGD nanoscale presentation and matrix stiffness on myogenesis.

We use polyelectrolyte multilayer films (PEM) with tunable mechanical properties and functionalized with an RGD-containing peptide derived from type I collagen, one of the key components of muscle ECM, to influence the cell fate of skeletal muscle progenitors by stimulating them mechanically and/or biochemically via cell surface receptors such as integrins.

Our results showed that RGD presentation on soft films and film stiffness could both induce cell adhesion, though involved integrins were different. Moreover, soft RGD-presenting films appeared as being appropriate for myogenic differentiation of C2C12 myoblasts, while stiff films increased cell migration, proliferation and inhibited myogenic differentiation. The differences of cell behavior seem to be dependent on Rho/ROCK signaling pathway, which appeared highly regulated by the combination of film stiffness and RGD peptide.

Our model films allowed seeing how such important events in myogenesis like adhesion, migration, proliferation, myogenin expression and fusion are regulated by the combination of substrate elasticity and presence of an adhesive ligand.

## Effets du syndrome métabolique sur les fibres musculaires chez l'homme âgé

*Gueugneau M, Coudy-Gandilhon C, Meunier B, Barboiron C, Listrat A, Feasson L\*, Barthelemy JC\*, Picard B, Béchet D.*

*INRA, UMR 1019, UNH & URH, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, 63122 Saint Genes Champanelle, France; \*Unité de Recherche PPEH, Service de Physiologie Clinique et de l'Exercice, CHU Nord, 42023 Saint Etienne, France.*

Le vieillissement est associé à une perte musculaire et à l'apparition du syndrome métabolique (SM) qui est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires. Cependant, les effets de ce syndrome sur le muscle squelettique des personnes âgées restent à préciser. L'objectif de ce travail est donc de décrire les changements liés à l'âge et au SM dans la structure et la fonction du muscle squelettique. Pour cela, des coupes sériées ont été réalisées à partir de biopsies du muscle vastus lateralis provenant d'individus jeunes (25 ans) et âgés (75 ans) avec ou sans SM. La proportion, l'aire, la forme et le contenu en lipides des fibres ont été caractérisés selon leur type contractile à l'aide d'anticorps spécifiques et par analyse d'image. Le typage métabolique des fibres a également été déterminé via une coloration de l'activité de la cytochrome-C-oxydase (COX). Les résultats montrent que, lors du vieillissement, les fibres de type II ont une aire diminuée avec une déformation accrue. Chez les personnes âgées atteintes de SM, l'aire des fibres est augmentée par rapport aux personnes âgées contrôles ; une forte diminution de l'activité COX est également observée, ceci étant associé à une accumulation lipidique importante.

En conclusion, ce travail souligne les altérations notables de morphologie et de métabolisme des fibres chez les personnes âgées atteintes de syndrome métabolique.

## Characterization of thermosensory cation channels TRPV1 in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle.

*Lotteau S<sup>[1]</sup>, Ducreux S<sup>[1]</sup>, Romestaing C<sup>[2]</sup>, Legrand C<sup>[1]</sup>, Van Coppenolle F<sup>[1]</sup>  
[1] UMR CNRS 5534 ; Centre de Génétique et Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Université Claude Bernard Lyon 1, France. [2] UMR CNRS 5023 ; Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Université Lyon 1, France.*

TRPV1 channel (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) represents a non-selective cation channel activated by capsaicin, acidosis and high temperature. TRPV1 is highly expressed in the central nervous system where its physiological role in nociception is clearly identified. Even if previous studies have shown that TRPV1 channel is also expressed in the sarcoplasmic reticulum (rat cell line; Xin *et al.*, 2005), its contribution to calcium homeostasis and muscle contraction remains unknown.

In contrast to earlier reports, our Western blots and immunofluorescence analysis showed TRPV1 presence only at the SR membrane (preferably at the longitudinal part), close to SERCA1 pumps. Using intracellular calcium imaging (Fluo4-AM), we studied the channel functionality into isolated FDB mouse fibers. TRPV1 activation either by pharmacological agents (capsaicin and resiniferatoxin) or physiological change (temperature) induced an increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . This latter is almost abolished by TRPV1 antagonist (capsazepine) pretreatment. Blocking ryanodine receptors (dantrolene or ryanodine) also led to a reduced capsaicin-induced  $Ca^{2+}$  elevation, suggesting that TRPV1 may participate to a secondary SR calcium liberation of greater amplitude.

Altogether, our data better define where TRPV1 is localized and evidence its functionality in adult skeletal muscle cells.

## Comparative analysis of *C. elegans* models for muscular dystrophies

*L Pierson, M-C Mariol, N Brouilly, E Martin, E Vallin, L Walter and K Gieseler*  
CGphiMC, CNRS-UMR5534, Université Claude Bernard Lyon 1

Muscular dystrophies are characterized by a progressive weakness and degeneration of muscles. More than 30 distinct genetic defects causing muscular dystrophies have been identified, and many remain unknown. Current therapeutic approaches aim at restoring the function of the implicated gene. Although such strategies are encouraging, they cannot be used as universal treatments for the large panel of muscular dystrophies. Thus, the identification of secondary defects common to different muscular dystrophies will identify new targets for future therapies or palliative treatments.

In order to determine the cellular impairments or signaling pathways shared by different muscular dystrophies, we use the powerful genetic model organism *Caenorhabditis elegans*. We have established a library of 20 *C. elegans* models for muscular dystrophies caused by different primary genetic defects.

In a first step, we have developed different subcellular markers to characterize the process of muscle degeneration in a *C. elegans* model for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) by electron and fluorescence microscopies. We are now using these markers to compare the degenerative process in the different *C. elegans* models and to identify common subcellular features for muscular dystrophies caused by different primary genetic defects. The most relevant subcellular markers will be used to identify pharmacological and genetic suppressors that can efficiently alleviate the phenotypes of all or a subset of the disease models.

## Sarcoplasmic reticulum calcium leak under resting conditions in normal and dystrophic skeletal muscle

*G Robin, C Berthier, B Allard.*

*Université Lyon 1, CNRS UMR 5534, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires, Villeurbanne, France*

Depolarization of skeletal muscle fiber elicits a conformational change of the dihydropyridine receptor (DHPR) in the tubular membrane that controls the opening of the ryanodine receptor (RyR), the sarcoplasmic reticulum (SR)  $\text{Ca}^{2+}$  release channel. At rest, it is assumed that RyRs are kept in a closed state imposed by the repressive action of DHPRs and generate a weak  $\text{Ca}^{2+}$  leak. However, a direct control of RyRs gating by DHPRs has never been demonstrated in resting muscle fiber. We monitored slow changes in SR  $\text{Ca}^{2+}$  content using the  $\text{Ca}^{2+}$  indicator Fluo5N loaded in the SR of voltage-clamped mouse muscle fibers. We first showed that external  $\text{Ca}^{2+}$  removal and the dihydropyridine compound nifedipine induced a SR  $\text{Ca}^{2+}$  efflux at -80 mV and prevented SR  $\text{Ca}^{2+}$  refilling following depolarization-evoked SR  $\text{Ca}^{2+}$  depletion. The rate of SR  $\text{Ca}^{2+}$  efflux was also shown to be controlled in a voltage-dependent manner within a membrane potential range more negative than -50 mV. These results indicate that SR  $\text{Ca}^{2+}$  efflux through RyRs is actively controlled by DHPRs in resting skeletal muscle. Finally we demonstrated that the resting SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak is significantly elevated in muscle fibers from the *mdx* mouse, the murine model of Duchenne Muscular Dystrophy. This elevated SR  $\text{Ca}^{2+}$  leak may contribute to alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in *mdx* muscle.



## Résumés des posters

## Numérotation des posters

Alao MJ	15	Lainé V	52
Bankolé LC	34	Lorin C	18
Banzet S	21	Malfatti / Chaves	5
Barthelemy F	19	Malfatti / Laforet	40
Barthelemy /Courier	10	Manel V	2
Bel C	28	Maués de Paula A	9
Bertrand A	13	Mercier S	37
Blondelle J	22	Michon CC	38
Bouhour F	6	Monge C	20
Cancelinha C	14	Mougeolle A	25
Cancès C	29	Nadaj-Pakleza A	4
Cherrallah A	16	Pernet L	39
Choumert A	30	Prokic I	8
Dieterich K	42	Rau F	45
Dionnet E	50	Ravelojaona M	47
Dogan C	31	Remiche G	3
Dupont A	12	Roux A	36
Echebarria Mendieta SG	1	Saint-Jean C	46
Fraysse B	7	Schuh M	41
Gaillard MC	51	Sébastien M	53
Gentil C	17	Semplicini C	32
Godard-Bauché S	44	Simonet T	43
Gueugneau M	23	Theret M	49
Kergoulay V	11	Ueberschlag V	54
Kostallari E	48	Vassilopoulos S	26
Laforêt P	35	Vuillerot C	33
Lafoux A	24	Wojtowicz I	27

1

### **RYR 1 ,caveolin-3 and nebulin-1 mutation-myopathies and Ca2+ function (rod-cores sampling)**

SG Echebarria Mendieta, Neurology Service. Osakidetza-Basque Health Service

**INTRODUCTION :** The description of Inose M et al in 1999 ( Muscle Nerve ) related Caveolin-3 and sarcoglycans in the vacuolar myopathies and centronuclear myopathy .Central nuclei are associated too to RYR 1 mutations ( Jungbluth H 2007 )

**METHODS :** Comparatives in ultrastructural and immunohistochemical methods in core myopathy by RYR 1 mutation , rod-core myopathies by nebulin-1 mutations.

**RESULTS :** Linear correlation may be obtained between derangement in T-type sarcolemmal system in caveolinopathies ( Woodman 2004 ) and core and rod-core myopathies.

**CONCLUSIONS :** L-type calcium channels may be related to distal myopathy phenotypes in caveolin-3 and core or rod-core myopathies.

2

### **Mutations dominantes de RYR1 : variabilités phénotypiques intra familiales.**

Manel V. (1), Furby A. (2), Chabrier S. (2), Féasson L. (2), Streichenberger N. (1), Gautheron V. (2), Monnier N. (3)

1. Centre Référent des maladies neuromusculaires rares Rhône-Alpes, CHU Lyon, 2. Centre Référent des maladies neuromusculaires rares Rhône-Alpes, CHU Saint-Etienne 3. Centre Référent des maladies neuromusculaires rares Rhône-Alpes, CHU Grenoble

Les mutations dominantes dans le récepteur de la ryanodine 1 (RYR1) sont responsables de myopathies congénitales à central core et de la susceptibilité à l'hyperthermie maligne.

Dans une même famille, on peut observer des variations phénotypiques avec en particulier une forme clinique plus marquée chez les enfants et/ou un début plus précoce de la myopathie. L'origine de ces variations reste débattue.

Nous rapportons l'observation de trois familles présentant une variabilité phénotypique intrafamiliale, les formes les plus sévères et les plus précoces étant retrouvées à la 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> génération. Dans ces trois familles l'étude génétique a mis en évidence une mutation hétérozygote dominante. En outre une hétérozygotie composite soit avec une mutation soit avec un double polymorphisme a été identifiée dans le gène *RYR1* chez les enfants présentant une myopathie plus sévère.

Afin de mieux appréhender ces variations intrafamiliales, nous montrons l'intérêt à poursuivre les analyses génétiques au-delà de la première mutation connue dans la famille chez les sujets plus précocement et plus sévèrement atteints. Différentes hypothèses seront discutées.

3

### **A novel large rearrangement in ryanodine receptor 1 (RYR1) gene associated with adolescence-onset recessive core myopathy**

G Remiche(1), H Kadhim(2), M Abramowicz(3), N Mavroudikis(1), N Monnier(4), J Lunardi(4) 1. Service de Neurologie, Hôpital Erasme, 2. Neuropathologie, CHU-Brugmann, and 3. Service de Génétique Médicale, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Belgique. 4. Biochimie Génétique et Moléculaire & INSERM U836, CHRU de Grenoble, Université Joseph Fourier, France.

**Objective:** Refine genotype-phenotype correlation of *RYR1* gene in late-onset recessive core myopathy (CM).

**Background:** Late-onset and recessive inheritance in CM came to light in the past decade. Large genomic rearrangement in *RYR1* gene was only recently reported namely in neonatal recessive CM.

**Methods:** We describe a family harbouring a new mutation in the *RYR1* gene involved in late-onset recessive CM. Full clinical, biological, pathological and molecular genetic assessments were performed in two affected patients.

**Results:** Two sisters presented adolescent-onset generalized progressive myopathy. Late repeat muscle biopsy showed remarkable CM with non-distinction of fiber types on oxidative enzymes stainings.

***RYR1* gene analyses** disclosed two heterozygous mutations in both patients. One was a previously described missense mutation (p.Arg4558Gln, c.13673G>A). The second was a novel large deletion (c.13150\_14188del) that likely resulted in the loss of *RYR1* channel. Segregation study confirmed biparental inheritance.

**Conclusions:** We report a novel large deletion of the *RYR1* gene associated with a recessive late-onset core myopathy. Our observation enlarges the spectrum of *RYR1*-related CM.

4

### **Un cas particulier d'une myopathie congénitale à multi-minicores avec une dissection de l'artère carotide interne compliquée d'un AVC ischémique.**

A Nadaj-Pakleza (1, 2), S Godard-Ducceschi (2), F Letournel (3), A Pasco-Papon (4), P Marcorelles (5), P Richard (6)

(1) Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires Nantes/Angers, CHU d'Angers (2) Service de Neurologie, CHU d'Angers (3) Laboratoire de la Biologie Cellulaire, CHU d'Angers (4) Service de Radiologie, CHU d'Angers (5) Laboratoire d'Anatomie Pathologique, CHU de Brest (6) Unité Fonctionnelle de Cardiogénétique et Myogénétique, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris.

Une femme de 32 ans a présenté un AVC ischémique sylvien gauche. Une artériographie a montré une occlusion post-bulbaire de l'artère carotide interne gauche liée à une dissection et par ailleurs elle a révélé une séquelle d'une dissection de la branche de l'artère rénale droite. Une hypoxie et une hypercapnie sévères ont été constatées dès le début de son hospitalisation avec de façon surprenante une bonne tolérance clinique. Après 6 jours d'hospitalisation ses paramètres respiratoires et son état clinique se sont aggravés, nécessitant une intubation et une mise sous ventilation mécanique. Après une extubation, une hypercapnie est réapparue et a nécessité une mise sous ventilation non invasive. L'interrogatoire de la patiente a révélé l'existence depuis l'enfance de troubles pour se relever de la position accroupie et une intolérance modérée aux efforts physiques. Une biopsie musculaire a révélé l'existence de multiples zones de désorganisations sarcomériques (minicores). Deux nouvelles mutations dans le gène de la sélénoprotéine N1 ont été retrouvées. La question se pose d'un possible lien entre la pathologie vasculaire et la myopathie congénitale à multiminicores.

## Myopathie congénitale avec 'Cylindrical spirals' associée à une encéphalopathie épileptique

**E Malfatti**<sup>1,2,3,4,5</sup>, M Chaves<sup>6</sup>, Remi Belance<sup>7</sup>, Mai Tao Viou<sup>1,5</sup>, E Lacène<sup>1,5</sup>, M Beuvin<sup>1,5</sup>, E Sarrazin<sup>7</sup>, R Deschamps<sup>7</sup>, M Fardeau<sup>1,5</sup>, and N B Romero<sup>1,3,4,5</sup>  
<sup>1</sup>Unité de Morphologie Neuromusculaire, Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Universitaire La Pitié-Salpêtrière, Paris, France., <sup>2</sup>Department of Neurological, Neurosurgical, and Behavioral Sciences, University of Siena; Siena, Italy., <sup>3</sup>Inserm, UMRS\_974, Paris F-75013, France., <sup>4</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UM 76, CNRS, UMR 7215, Institut de Myologie, IFR14, Paris F-75013, France., <sup>5</sup>Centre de référence de Pathologies Neuromusculaires Paris-Est, Institut de Myologie, GHU Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; Paris, France., <sup>6</sup>Italian Hospital, Buenos Aires, Argentina., <sup>7</sup>CHU de Fort de France, Martinique, France

La myopathie congénitale avec 'Cylindrical spirals' (CSs) est caractérisée par la présence de spirales membranaires concentriques révélée en microscopie électronique dans la biopsie musculaire.

Nous avons effectué une analyse clinique, études histochimique et ultrastructurale de la biopsie musculaire d'une patiente issue d'une famille consanguine d'origines antillaise (mère) et marocaine (père).

La patiente a présenté un tableau d'hypotonie sévère dès la naissance associée à des crises épileptiques myocloniques et tonico-cloniques résistantes à la thérapie anticonvulsivante. Elle ne présentait pas d'atteinte cardiaque. Une biopsie musculaire effectuée à l'âge d'un an et un mois a montré la présence de vacuoles bordées remplies de matériel fortement fuchinophile au trichrome de Gomori, localisées en région intermyofibrillaire et sousarcolemmale. Ces structures ont été retrouvées uniquement dans les fibres de type II et sont intensément colorées aux réactions oxydatives (NADH-TR et Menadione alpha-glycero-phosphate). L'analyse ultrastructurale a révélé la présence, dans plusieurs fibres, de structures sphéroïdales et ovoïdales ayant à l'intérieur des lamelles concentriques ressemblant à des spirales (Cylindrical spirals). Ces structures sont souvent entourées de granules des glycogènes ou des structures tubulaires. La sœur aînée de la proposita présente un tableau d'hypotonie musculaire et d'encéphalopathie épileptique débuté à l'âge de 7 mois. La mère présente une épilepsie bien contrôlée avec la thérapie. Dans cette étude, nous décrivons la première famille présentant une myopathie congénitale avec 'cylindrical spirals' et atteinte du système nerveux central.

## Calcium homeostasis in autosomal dominant centronuclear myopathy

**B Fraysse**<sup>1</sup>, S Vassilopoulos<sup>1</sup>, G Bonne<sup>1</sup>, P Guicheney<sup>2</sup>, M Bitoun<sup>1</sup>

1. Institut de Myologie. Inserm U974, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, CNRS UMR 7215 Paris, France. 2. Inserm U956, Paris, France.

Centronuclear myopathy (CNM) is a rare congenital myopathy characterized by the presence of centrally located nuclei in a large number of muscle fibres. Autosomal dominant CNM is due to mutations in the gene encoding dynamin 2 (DNM2) involved in endocytosis and intracellular membrane trafficking. *DNM2*-related CNM includes a spectrum of phenotypes ranging from mild forms in adult patients to severe forms in infants. We developed a knock-in mouse model expressing the most frequent *DNM2*-CNM mutation; i.e. KI-*Dnm2*<sup>R465W</sup> model. Heterozygous (HTZ) KI-*Dnm2* mice progressively develop muscle atrophy, impairment of contractile properties and morphological abnormalities mainly affecting mitochondria and reticulum. In addition, clear signs of defective calcium homeostasis have been highlighted in isolated muscle fibres of *Flexor Digitorum Brevis* muscle from HTZ mice. Here, we study the calcium homeostasis in bundles of fibres from *Extensor Digitorum Longus* (EDL) and *Soleus* muscles from adult HTZ KI-*Dnm2* mice. We showed an increase in free cytosol Ca<sup>2+</sup> concentration in EDL muscles probably due to change in sarcolemma permeability to Ca<sup>2+</sup>. However, impairment of force development monitored in EDL appears not linked to a change of calcium transient. Further studies will be performed to determine the impact of the calcium homeostasis defect in the pathophysiology of the *DNM2*-related CNM.

## Némaline myopathie par mutation du gène de la nébuline: variétés phénotypiques illustrées par 3 familles.

**F Bouhour**<sup>1</sup>, J Svahn<sup>1,2</sup>, F Dubois-Teklali<sup>3</sup>, H Gervais-Bernard<sup>1</sup>, C Vial<sup>1</sup> pour le Centre de référence maladies neuromusculaires Rhône-Alpes <sup>1</sup> Service ENMG, hôpital neurologique Pierre Wertheimer, Hospices civils de Lyon, <sup>2</sup> Université Claude Bernard, Lyon 1, <sup>3</sup> Service de neuropédiatrie, CHU de Grenoble

La myopathie à bâtonnets ou némaline myopathie (NM) est une des plus fréquentes myopathies congénitales. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire diffuse de début néonatal et par la présence, dans les fibres musculaires, de bâtonnets, structures éosinophiles colorées en rouge par le trichrome de Gomori. 7 gènes sont actuellement identifiés. Les mutations les plus courantes sont la mutation du gène ACTA1 et celle du gène de la nébuline.

Nous décrivons 3 familles de NM avec mutation du gène de la nébuline diagnostiquées dans la région Rhône-Alpes.

2 frères, nés en 2007 et 2010, présentent dans un contexte d'hypotonie néonatale sévère, une atteinte respiratoire nécessitant pour l'un une VNI et pour l'autre une ventilation mécanique ; tous deux sont tétraplégiques.

Deux sœurs et un frère issus d'un mariage consanguin consultent à l'âge adulte pour un trouble de la marche et une dysphagie associée à une dysmorphie faciale. Les antécédents sont marqués par une hypotonie néonatale avec troubles de déglutition, un retard des acquisitions motrices.

Mme Com... présente à l'âge de 16 ans, au décours d'une anesthésie générale, une insuffisance respiratoire nécessitant 6 mois de ventilation mécanique et 1 an de VNI. Elle reste asymptomatique pendant 16 ans puis décompense sous la forme d'une hypoventilation alvéolaire liée à une atteinte diaphragmatique. La découverte d'une NM conduit à examiner sa sœur jumelle chez qui est mise en évidence une atteinte respiratoire sans gène ambulatoire.

Ces observations illustrent les variétés phénotypiques des NM par mutation du gène de la nébuline.

## Pathological mechanisms of autosomal recessive centronuclear myopathy

**I Prokic**, BS Cowling, C Kretz, C Koch, J Laporte IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Inserm U964, CNRS UMR7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France

Centronuclear myopathies (CNM) are a group of congenital disorders characterized by hypotonia and typical skeletal muscle biopsies showing small rounded fibres with central nuclei. Several forms exist: X-linked with mutations in MTM1, a dominant form with mutations in dynamin 2, and an autosomal recessive form (ARCNM) with mutations in amphiphysin 2/BIN1. The aim of this research is to better understand the role of BIN1 in healthy muscle and in the pathology of CNM. We are characterizing constitutive (CMV) and muscle-specific (HSA) knockout mice lines generated by targeted homologous recombination in ES cells, for exon 11 (muscle specific exon encoding a phosphoinositide (PI) binding motif) and exon 20 (encoding the SH3 domain) of BIN1. The deletions are expected to disrupt the regulation of BIN1 by PIs (potentially the link with MTM1) or the interaction with DNM2, respectively. The exon 11 KO mice have a mild phenotype, with nuclear mislocalization significantly impaired and no change in life expectancy. Both the CMV and HSA KO of exon 20 were perinatally lethal. This work should lead to the first characterization of an animal model for ARCNM and to a better comprehension of pathological mechanisms, which are still not known.

## Further heterogeneity in myopathy with tubular aggregates?

**A Maues de Paula**<sup>1,2</sup>, M Bartoli<sup>2</sup>, S Courrier<sup>2</sup>, J Pouget<sup>3</sup>, N Levy<sup>2,4</sup>, JF Pellissier<sup>1</sup>, D Figarella-Branger<sup>1</sup>, M Krahn<sup>2,4</sup>, S Attarian<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> APHM, Hôpital d'Adultes de la Timone, Service d'Anatomie Pathologique et Neuropathologie, 13385, Marseille, France, <sup>2</sup> Aix-Marseille Univ, UMR 910, Faculté de Médecine Timone, 13385, Marseille, <sup>3</sup> APHM, Hôpital d'Adultes de la Timone, Service de Neurologie, Pôle de Neurosciences Cliniques, Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires et de la SLA, 13385, Marseille, France, <sup>4</sup> APHM, Hôpital d'Enfants de la Timone, Département de Génétique Médicale et de Biologie Cellulaire, 13385, Marseille, France

**INTRODUCTION:** Myopathy with tubular aggregates (MTA) is a rare disease characterized by the presence of numerous tubular aggregates in muscle biopsy. The pathogenesis is still uncertain and four clinical groups have been described.

**METHODS:** Among 15 MTA cases found in our department, we identified four index cases (3 sporadic and 3 cases from the same family) which do not correspond to any of the previously described clinical groups. All were adults with hyperCKemia. While the three sporadic cases also presented exercise induced hyperthermia, the three patients from the same family were completely asymptomatic. The proband in this family had hyperCKemia as an incidental finding.

**RESULTS:** All the three members had numerous tubular aggregates on their muscle biopsies. Positive in vitro contracture tests were observed in two of two patients tested of this family. Sequence analysis of the RYR1 gene showed no mutations in the hotspots usually mutated in malignant hyperthermia. Sequencing of all exons in CASQ1, SAR-1, QDPR, and ATP2A2 evidenced no sequence variations. No disease-causing sequence variations were identified in the DYSF, SRL, ATP2A1, TRDN and ASPH genes.

**DISCUSSION:** Overall, our work supports further heterogeneity for clinical groups of MTA, and excludes the implication of nine genes involved in calcium homeostasis and binding from the pathogenesis of the MTA family described here.

## Identification de mutations d'épissage dans les dysferlinopathies

**V Kergourlay**<sup>1</sup>, M Krahn<sup>1,2</sup>, G Blandin<sup>1</sup>, C Béroud<sup>1</sup>, F Barthélémy<sup>1</sup>, P Gaillardat<sup>3</sup>, M Tosi<sup>3</sup>, N Lévy<sup>1,2</sup>, M Bartoli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Aix Marseille Université, UMR\_S 910, Faculté de Médecine Timone, Marseille. <sup>2</sup> Inserm U614, Faculté de Médecine, Rouen. <sup>3</sup> APHM, Hôpital d'Enfants de la Timone, Département de Génétique Médicale, Marseille.

Les dysferlinopathies sont des dystrophies musculaires autosomiques récessives causées par des mutations dans le gène *DYSF*, qui code la dysferline. Le diagnostic moléculaire des dysferlinopathies est difficile en raison de la taille du gène *DYSF* (transcrit de 6,4kb; 55 exons), et de son large spectre mutationnel. En effet, plus de 400 variants sont rapportés, dont plus de 30% sont de type faux-sens. L'identification fréquente de nouveaux variants faux-sens en routine diagnostique nous confronte au problème de l'interprétation de l'effet délétère ou non-pathogène. Il est également difficile de prédire si une mutation faux-sens modifiera l'épissage en touchant des séquences régulatrices exoniques d'épissage. Ces modifications peuvent conduire à l'apparition d'épissage aberrant. Ce projet consiste donc à développer un outil permettant de vérifier *in cellulo* l'impact des mutations faux-sens sur l'épissage. L'exon muté que l'on étudie ainsi que ses régions introniques flanquantes sont intégrées dans un mini gène comportant deux autres exons. Les anomalies d'épissage sont ensuite visualisées par RT-PCR après transfection et extraction d'ARN. Ce travail permettra de conclure sur le caractère délétère des mutations faux-sens modifiant l'épissage, et pourra, à terme, être utilisé en routine diagnostique.

## Characterization of the modular domains of dysferlin for gene transfer.

**Florian Barthélémy**<sup>1</sup>, Virginie Kergourlay<sup>1</sup>, Sébastien Courrier<sup>1</sup>, Nicolas Lévy<sup>1,2</sup>, Martin Krahn<sup>1,2</sup> and Marc Bartoli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Myologie Translationnelle UMR\_S 910, Aix Marseille Université, Marseille, France, <sup>2</sup> Département de Génétique Médicale, Hôpital d'enfants de la Timone, AP-HM, Marseille, France

Dysferlin, a protein involved in muscle membrane repair and T-tubule homeostasis, contains several functional domains (including 7 C2 domains). Some independent function for each domain has been proposed based on their specific partners. Identification of a partially functional, naturally occurring "mini-dysferlin" protein composed of the C-terminus part of the protein (Krahn et al., 2010), push us to better characterize the modular properties of dysferlin. We have tested different combinations of dysferlin domains to obtain the most functional construct for a "mini-gene" transfer using AAV vectors. Features of the native dysferlin and notably topological and phylogenetic studies were conserved in the design of six different "midi-dysferlins".

We first analyzed the expression and stability of our constructs and we found that, even if proteins show different levels of expression, their stability are not affected. We investigated also their interactions properties with some of the known partners of dysferlin. Then, using micro-patterned support of culture (CYTOO technology), we showed that all most of our constructs are correctly addressed to the plasma membrane. This demonstrated that the full enchainment of C2 domains is not mandatory to address dysferlin to the plasma membrane. Finally, based on our biochemical and biological studies of these constructs, we confirm the functional modularity of dysferlin. Altogether, this approach will improve our knowledge of dysferlin functions and allow us to develop a mini-gene transfer therapeutic strategy.

## Repeated administration of polyvalent immunoglobulins improves muscle strength in dysferlin-deficient SJL/J mouse

**Aurélien DUPONT**, Olivier BIONDI, Romain K GHERARDI, Louise DELTOUR, François Jérôme AUTHIER.

Dysferlinopathy forms a group of inherited myopathies caused by dysferlin deficiency, with muscle pathology characterized by the presence of widespread complement activation and conspicuous inflammation, suggesting that immunomodulatory drugs could be effective. We pre-clinically investigated the potential benefit of polyvalent immunoglobulins (po-Ig) in dysferlinopathy by subjecting dysferlin-deficient SJL/J mice to 5 consecutive weekly infusions of 2mg/g human po-Ig. Evaluation included (i) traction strength measurement; (ii) spontaneous activity quantification; and (iii) quantification of histopathological injuries. Po-Ig administration induced a significant increase of forelimbs strength. Hind limbs strength, spontaneous activity and muscle pathology remained unchanged. In conclusion, these results provide the first evidence for a potential therapeutic efficiency of po-Ig in dysferlinopathy. Further studies are needed to determine the actual place of po-Ig and other immunomodulatory drugs in Myoshi/LGMD2B patients care.

## Mutation in Lamin A/C gene causes mechanosensing defects in human myoblasts

<sup>1</sup>A Bertrand, <sup>1</sup>C Ehret, <sup>1</sup>K Mamchaoui, <sup>1</sup>S Ziaei, <sup>1</sup>J Lainé, <sup>2</sup>M Mayer, <sup>3</sup>I Desguerre, <sup>1,4</sup>G Bonne, <sup>1</sup>C Coirault.

<sup>1</sup>UPMC Paris 6, UM 76, INSERM U974, CNRS UMR 7215, Institut de Myologie, GHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France, <sup>2</sup>AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Service de Neuropédiatrie, Paris, France, <sup>4</sup>AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, U.F. Cardiogénétique et Myogénétique, Service de Biochimie Métabolique, Paris, France.

The mechanisms underlying mechanosensitivity are critical for muscle development and functionality. The presence of lamin A/C is essential for intact nucleoskeleton and mechanical transmission between the nucleus and the extracellular matrix. However, whether mutation in the *LMNA* gene (encoding for lamin A/C) causes mechanosensing defects in human myoblasts has never been directly tested.

Myoblasts with *LMNA* p.Lys32del mutations (*d32*) and normal human myoblasts (WT) were immortalized and cultured in a linear 3D fibrin matrix. At day 1, WT have spontaneously aligned along the gel axis whereas *d32* cells exhibited random orientation. Mutated myoblasts had larger and more abundant actin bundles, and vinculin adhesion sites were longer and thicker compared with WT (each  $p < 0.05$ ). Uni-axial cyclic stretch of the gel induced a thickening of actin stress fibers and vinculin sites in WT, absent in *d32*, and in blebbistatin- or Y-27632-treated WT. Similar results were obtained in *d32* primary myoblasts from another patient and in myoblasts with *LMNA* p.Arg249Trp mutation.

We provide first evidence that lamin A/C mutation causes defects in myoblast mechanosensing that may contribute to mechanical damage in striated muscles from L-CMD.

## Myopathie de Duchenne au Bénin : diagnostic et suivi

MJ Alao, GG Sagbo, A Lalèyè, MO Adjagba.  
Faculté des Sciences de la Santé, Cotonou, Bénin

### Introduction

La maladie de Duchenne est une maladie récessive liée à l'X due à une mutation dans le gène DMD. Peu de cas étaient rapportés en Afrique noire. Nous rapportons ici notre expérience de diagnostic et de suivi des myopathies de Duchenne à Cotonou.

### Méthodes

Les patients étaient vus en consultation de génétique médicale pour difficulté de marche, perte de marche ou amyotrophie. Après un interrogatoire, chaque patient était examiné avec notamment une description de la topographie des atteintes musculaires. Un bilan fait du dosage de créatine phosphokinase, radiographie pulmonaire, électromyogramme et recherche de mutation dans le gène DMD après extraction d'ADN. Les données cliniques, para-cliniques et évolutives étaient recueillies. Dix patients étaient suivis pour myopathie de Duchenne.

### Résultats

Les âges moyens de diagnostic et de début des troubles étaient respectivement de 14 ans et 11 ans. Tous avaient une amyotrophie des quatre membres et une hypertrophie des mollets. Des déformations rachidiennes étaient notées dans 6 cas index. Le nombre de personnes atteintes dans les dix familles était 37. Tous avaient des taux de CPK élevés témoin d'une dystrophie. Des mutations avaient été retrouvées dans six cas. Le suivi était fait de contrôles cliniques trimestriels et des séances de kinésithérapie musculo-articulaire et respiratoire.

### Conclusion

Le diagnostic pourrait être amélioré par la réalisation de biopsie musculaire et le screening des protéines membranaires.

## Dystrophie musculaire congénitale de type 1A – une série pédiatrique

Candida Cancelinha<sup>1</sup>, Carmen Costa<sup>1</sup>, Jorge Oliveira<sup>2</sup>, Isabel Fineza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>- Service de Neurologie Pédiatrique, Centre de Développement Luis Borges, Hôpital Pédiatrique de Coimbra, Portugal. <sup>2</sup>- Institute Nationale de Santé Dr. Ricardo Jorge (INSA), Porto, Portugal

La dystrophie musculaire congénitale de type 1A (MCD1A) représente 30-50% des dystrophies musculaires congénitales (MCD) dans la population européenne.

Méthodes: Étude rétrospective descriptive d'une consultation neuromusculaire dans un hôpital pédiatrique. Analyse des dossiers des patients ayant un diagnostic de MCD1A, pour la caractérisation clinique, démarche diagnostique et évolution.

Résultats: Sur un total de 25 cas de MCD ont été inclus 14 (57%) patients (11 familles) avec MCD1A, quatre familles consanguines. Hypotonie néonatale et faiblesse musculaire ont été la principale forme de présentation, tous les cas ont développé des contractures articulaires dans la première année de vie.

Le diagnostic a été fait par biopsie musculaire, le étude immunohistochimique a révélé un déficit en mérosine et/ ou l'imagerie suggérant la leucodystrophie, avec confirmation génétique dans tous les cas.

La moitié des patients ont acquis une position assise sans appui, la totalité se déplace en fauteuil roulant; seulement deux cas ont montré une légère déficience cognitive.

L'insuffisance respiratoire chronique a été le principal comorbidité, 10 (71%) patients nécessitant d'une ventilation non invasive. Trois patients (21%) ont requis la gastrostomie, douze (86%) développé scoliose, quatre (29%) ont été opérés. Quatre patients (29%) avaient une épilepsie, facile à contrôler. Deux patients sont décédés (14%) à la suite d'infections respiratoires.

Commentaire: Le MCD1A était le diagnostic principal dans le groupe de MCD, souvent plus élevé que celui qui est décrit dans la littérature; la présentation clinique et l'évolution a été la connue, mettant en évidence un pourcentage significatif avec l'épilepsie.

## Analyses des délétions du gène de la dystrophine par PCR multiplexes en Algérie

Cherrallah A. <sup>(1,2)</sup>, Hamadouche T. <sup>(3)</sup>, Nouioua S. <sup>(4)</sup>, Makri S. <sup>(5)</sup>, Chaouch M. <sup>(6)</sup>, Tazir M. <sup>(4)</sup>, Benhassine T. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Faculté des Sciences Biologiques, USTHB, Alger, Algérie; <sup>(2)</sup> Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques, Université Saad Dahlab, Blida; <sup>(3)</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences, Boumerdes, Algérie; <sup>(4)</sup> Service de Neurologie, CHU Alger Centre, Alger, Algérie; <sup>(5)</sup> Service de Neurologie, EHS Ali Aït Idir, Alger, Algérie; <sup>(6)</sup> Service de Neurologie, EHS Ben Aknoun, Alger, Algérie

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et celle de Becker (BMD) sont des maladies neuromusculaires résultant d'une altération dans le gène codant la dystrophine (*DMD*). De plus, ces pathologies résultent principalement de délétions intragéniques ayant pour conséquence la perturbation (DMD) ou non (BMD) du cadre de lecture.

Afin d'analyser l'étendue de ces délétions et prédire leurs conséquences sur le cadre de lecture chez des patients Algériens présentant une étiquette clinique de dystrophinopathie, 30 patients de sexe masculin, réceptionnés dans trois centres hospitaliers d'Alger Centre au cours du premier semestre de l'année 2012, ont été explorés en réalisant deux amplifications multiplexes ciblant les exons les plus fréquemment délétés dans le gène *DMD*.

Des délétions intragéniques d'un ou plusieurs exons dans le gène *DMD* ont été caractérisées chez 16 des 30 patients explorés. Toutes les délétions étaient localisées dans l'un des deux hot-spots mutationnels avec une nette prédominance pour la région englobant les exons 43 à 52 (14/16). Les cadres de lectures ont pu être déterminés chez 12 des 16 patients délétés et seule une exception à la loi des cadres de lecture a pu être notée.

Un diagnostic génétique précis a été posé chez plus de la moitié des nos patients, soulignant ainsi l'intérêt de sa réalisation en première instance lorsqu'une suspicion clinique de dystrophinopathie est évoquée.

## nNOS $\mu$ mislocalization and RYR1 hypernitrosylation in del45-55 Becker patients

Gentil C<sup>1</sup>, Leturcq Fr<sup>2,3</sup>, Ben Yaou Rabah<sup>2,4</sup>, Kaplan J-C<sup>3</sup>, Garcia L<sup>1</sup>, Voit T<sup>1</sup> and Piétri-Rouxel F<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UM76-UPMC/U974-Inserm/UMR7215-CNRS-Institut de Myologie Paris, France. <sup>2</sup>AP-HP, Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, GH-Cochin, Paris, France. <sup>3</sup>Institut Cochin, CNRS UMR8104/InsermU1016/Université Paris-Descartes, Paris, France. <sup>4</sup>Département de recherche clinique, Institut de myologie, GH-Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

Duchenne (DMD) and Becker (BMD) muscular dystrophies are muscle-wasting diseases caused by mutations in the *DMD* gene encoding dystrophin. Out-of-frame deletions give rise to DMD whereas in-frame deletions result in BMD. BMD patients exhibit a less severe disease because an abnormal but functional dystrophin is produced. This is the rationale for attempts to correct the reading frame by using an exon-skipping strategy. Today, an approach of exons 45 to 55 multi-skipping is in development. This strategy could correct the mRNA reading frame in almost 75% of DMD patients with a deletion. However, the resulting dystrophin lacks part of the binding site for the neuronal nitric oxide synthase (nNOS $\mu$ ). We thus investigated the nNOS $\mu$  status in muscle biopsies from twelve BMD patients with genomic deletion of exons 45 to 55. We found that the strictly cytosolic mislocalization of nNOS $\mu$  was associated with the more severe phenotypes. The cytosolic NO production correlated with both hypernitrosylation of the calcium-release-channel-RyR1 and release of calstabin-1. This study shows that the terminal truncation of the nNOS binding domain in the "therapeutic" del45-55 dystrophin is not innocuous since, it may perturb the nNOS dependent stability of the RyR1/calstabin-1 complex.

## Investigation of myotube formation using the micropatterning technology

F Barthélémy<sup>1</sup>, J Young<sup>2</sup>, M Raul<sup>2</sup>, and M Bartoli<sup>1</sup>

1- Myologie Translationnelle, UMR\_S 910, Aix Marseille Université, Marseille, France 2- Cytoo SA, Grenoble, France

The shape of the cell spreading surface influences their fate independently of the surface of adhesion. For myotube formation, the proper connections of myoblasts, and the different stimuli received (chemical or mechanical) are determinant. This project consisted of evaluating a micro-patterned cell culture support (developed in collaboration with CYTOO), which involves a repetition of cell-adhesive lines on a cell-repelling area. This pattern was designed to optimize the alignment of myoblasts for the standardization of myotube formation. We choose C2C12 as a model for their high ability to form myotubes. We first used line patterns of different width to evaluate the orientation of myoblast-myoblast contact in efficient fusion. We have shown that independently of the width, myoblasts don't fuse properly, although they are properly aligned, whatever the culture conditions used (number of starting cells, kinetic of cell spreading and differentiation). Surprisingly, the few myotubes observed did not mature completely, suggesting that this process needs additional conditions such as myotube-myotube contacts. Finally, the fusion was not improved when using drugs known to positively influence myotube formation. We used the fusion index (number of nuclei per cell) and labeling with myotube specific markers (MHC and actin) as parameters to evaluate the formation of myotubes. Altogether these results suggest that the line shape is not adapted for myotube formation when using C2C12.

## Mise en évidence des différences membranaires et structurales entre cardiomyocytes contrôlé et *mdx* par SICM et FFT

Lorin C, Aguettaz E, Krzesiak A, Bois P, Favier JF, Cognard C, Sebille S.

IPBC, FRE 3511 CNRS/Université de Poitiers

L'objectif est de déterminer si surface membranaire et architecture intracellulaire des cardiomyocytes (souris *mdx* modèle murin de la DMD) sont différentes de celles des souris normales. Il est connu qu'une cardiopathie est associée chez l'homme à la maladie de Duchenne. Aussi est-il important de savoir s'il existe des différences dans l'organisation membranaire des structures à l'origine des mouvements de calcium : membrane de surface, tubules transverses, réticulum sarcoplasmique et protéines associées. Cette étude utilise une technique (SICM) permettant d'imager la surface membranaire, et de l'imagerie d'immunofluorescence permettant, par FFT, de repérer les irrégularités de positionnement des structures protéiques impliquées. Le SICM a été calibré et un protocole de traitement d'image, non destructeur, a été mis-au-point. Puis des images topographiques des cardiomyocytes ont permis de montrer une désorganisation de l'alternance sillon/crête ainsi que des accidents (« nids-de-poule ») chez les *mdx*. L'étude par FFT a permis de montrer que cette désorganisation s'accompagne de celle des tubules transverses et des récepteurs à la dihydropyridine mais pas de celle du réticulum sarcoplasmique et des récepteurs à la ryanodine. Conclusion : l'absence de dystrophine pourrait conduire à ces désorganisations. Le travail va se poursuivre pour étudier ces processus non plus au repos mais dans les conditions où les cardiomyocytes seront étirés à l'aide de fibres de carbone.

## Controlled biomimetic environment: from single cell to skeletal muscle tissue engineering

C Monge<sup>1</sup>, K Ren<sup>1</sup>, N Saha<sup>1,3</sup>, D Peyrade<sup>2</sup>, K Glinel<sup>3</sup>, C Picart<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LMGP, CNRS UMR 5628 (LMGP), Grenoble Institute of Technology and CNRS, 3 parvis Louis Néel, F-38016 Grenoble Cedex, France; <sup>2</sup>LTM, CNRS/UJF-Grenoble1/CEA, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9-France; <sup>3</sup>IMCN, BSMA - Croix du Sud 1 bte L7.04.02 à 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

From the exit from the quiescent state to the orientation and fusion of myoblasts, cellular events are dictated by the cell environment. *In vitro*, chemical and mechanical properties of substrates are known to influence cell behavior from adhesion and spreading to differentiation. Modulation of the properties of the cell environment is an essential part of the challenge of controlling cell fate for *in vitro* studies. In our group, we are currently developing strategies to control muscle cell behavior by modulation of mechanical or topographical cues. Our approach is to use a biomimetic film made by the layer-by-layer assembly of poly(L-lysine) and hyaluronic acid (PLL/HA). A first strategy relies on the selective cross-linking of the films using photo-sensitive polyelectrolyte to create a pattern of rigidity. This pattern is efficient in guiding and controlling muscle cell morphology and subsequently cell fate by confining or stretching the cells. The second strategy is to use a microstructured substrate coated with the biomimetic film to drive differentiation of immortalized and primary myoblasts into a polarized network of myotubes. Such coating may be used for skeletal muscle tissue engineering and for the study in well-defined conditions of the process of muscle maturation *in vitro*. Indeed, with the help of these innovative biomaterials, we aim at studying (1) the molecular mechanisms of cell fusion in condition of controlled positioning (lateral or strict end-to end) and (2) the influence of a lateral constriction of the nucleus on muscle cell development.

## Intérêt des microARNs plasmatiques comme biomarqueurs de lésions musculaires d'exercice

Banzet S<sup>1</sup>, Girard O<sup>2</sup>, Racinais S<sup>2</sup>, Chennaoui M<sup>1</sup>, Drogou C<sup>1</sup>, Chalabi H<sup>2</sup> et Koulmann N<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Brétigny sur Orge, France. <sup>2</sup> Aspetar hospital, Doha, Qatar.

10 sujets sains masculins ont réalisé, à 6 semaines d'intervalle, un exercice sur tapis roulant selon 2 modalités, excentrique (provoquant des lésions musculaires) ou concentrique (non lésionnel). La créatine kinase et la myoglobine plasmatiques ont été mesurées au repos, à l'arrêt, puis 2h, 6h, 24h, 48h et 72h après l'exercice. Par ailleurs des mesures de force maximale volontaire et des questionnaires de douleur ont été réalisés. Les microARNs musculaires et/ou cardiaques (hsa-mir-1, 133a, 133b, 206, 208a, 208b, 499) et des microARNs impliqués dans des processus musculaires (hsa-mir-181a, 181b, 214) ont été mesurés par RT-PCR dans le plasma.

L'exercice excentrique a provoqué une baisse prolongée de la force maximale volontaire et des douleurs persistant à 72h. La créatine kinase et la myoglobine ont augmenté en réponse au deux types d'exercices sans différence significative. Les niveaux plasmatiques d'hsa-mir-1, 133a, 133b et 208b ont augmenté en réponse à l'exercice excentrique, avec un pic observé 6h après l'exercice. Hsa-mir-499-5p a augmenté en réponse à l'exercice avec une grande variabilité interindividuelle, hsa-mir-206 et 208a sont restés indétectables. Hsa-mir-181b et 214 ont augmenté de manière transitoire en réponse à l'arrêt l'exercice concentrique. Les microARNs musculaires circulant sont des biomarqueurs sensibles de lésions musculaires modérées, d'autres microARN plasmatiques varient indépendamment des lésions.

## Proteomics of muscle aging in women

Gueugneau M, Coudy-Gandilhon C, Chambon C, Bijlsma A<sup>3</sup>, Maier A<sup>3</sup>, Butler-Browne G\*, Picard B, Béchet D

INRA, UMR 1019, UNH & URH, Centre de Recherche en Nutrition Humaine, 63122 Saint Genes Champanelle, France ; <sup>3</sup>Leiden University Medical Center, Department of Gerontology and Geriatrics, 2333 ZA Leiden, Netherlands; \*UMRS 974 - UPMC Paris 6 University / U974 - Inserm / UMR7215 – CNRS, Pitié-Salpêtrière 75651 Paris, France.

A top-down differential proteomic approach was developed to identify novel biomarkers for muscle aging (sarcopenia). Total and sarcoplasmic extracts were prepared from mature (54 years) and old (78 years) post-menopausal women, and overlapping IPG-Strips were used for optimal resolution. Out of a total of 1919 spots, 133 were differentially expressed in old compared with mature muscle, and mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) identified 107 spots which corresponded to 74 different proteins.

We observed important modifications in cytosolic energy metabolism (triose-phosphate-isomerase, glycogen-phosphorylase, glycerol-3-P-dehydrogenase, creatine-kinase), and in mitochondrial Krebs (pyruvate-dehydrogenase, aconitase) and oxidative phosphorylation pathways (cytochrome-c-oxidase, NADH-dehydrogenase), which may be related to dysfunctions in old muscle force generation. A fraction of the differentially expressed proteins were linked to myofiber proteins (myosin light-chains, troponins-T, myozenin), which may account for alterations in contractile properties. Other features support perturbations in cytoprotection and detoxification processes, as we observed differential regulation of several molecular chaperones (HSPA9, HSPA1A) and of proteins implicated in reactive aldehyde detoxification (aldose reductase), ion homeostasis (selenium-binding protein) and endoplasmic reticulum stress (sarcalumenin, calsequestrin). We further noticed down-regulation of proteins involved in RNA-editing (apobec2) and mitochondrial translation (EF-TuMT)

To conclude, several biomarkers of these proteomic analyses were previously unrecognized as differentially expressed in old muscles, and may represent novel starting points for elucidating some mechanisms of sarcopenia.

## Of dogs, mice and cells: role of HACD1 in muscle development and physiology

J Blondelle<sup>1</sup>, Y Ohno<sup>2</sup>, M Maurer<sup>1</sup>, G Walmsley<sup>3</sup>, L Guillaud<sup>1</sup>, J Demarquoy<sup>4</sup>, R Piercy<sup>3</sup>, A Kihara<sup>2</sup>, L Tiret<sup>1</sup>, F Pilot-Storck<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Alfort School of Veterinary Medicine, Maisons-Alfort; <sup>2</sup> University of Hokkaido, Sapporo, Japan; <sup>3</sup> Royal Veterinary College, London, UK; <sup>4</sup> University of Bourgogne, Dijon

In dogs, a mutation in *PTPLA/HACD1* leads to a congenital centronuclear myopathy (CNM). We generated *Hacd1*-knockout mice. At 6 mo of age, their weight and spontaneous locomotion were decreased by 17% and 50% respectively. Mass and strength of tibialis anterior muscle were decreased by 30%. Muscle atrophy was associated with an up-regulation of atrogenes related to both ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways. *Hacd1*-KO mice exhibited an increased tolerance to glucose, associated with an increased sensitivity to insulin.

*HACD1* encodes a 3-hydroxyacylCoA dehydratase that catalyzes the third step of very long chain fatty acids (VLCFAs) elongation. *HACD1* encodes 3 distinct isoforms. Among them, only HACD1-fl, from a full-length transcript exhibited an HACD activity. In C2C12 cells, HACD1 deficiency impaired myoblasts fusion. Addition of specific sera or expression of HACD1-fl rescued this phenotype, suggesting that in CNM dogs and mice, the early essential role of HACD1 in muscle differentiation is overcome by redundant humoral factors, likely VLCFA.

Lipids composition of sera and HACD1-deficient myoblasts and muscles are being investigated to unravel lipids with essential roles in muscle differentiation, metabolism and maintenance.

## Exercise training is less effective on skeletal muscle function of TRP vanilloid-1 knock-out mice.

Lafoux A[1], Lotteau S[2], Roux A[1], Van Coppenolle F[2], Huchet-Cadiou C[1] and Ducreux S[2]

[1] UMR INSERM U1087/UMR CNRS 6291, Institut du Thorax, Université de Nantes, France ; [2] UMR CNRS 5534 ; Centre de Génétique et Physiologie Moléculaire et Cellulaire, Université Claude Bernard Lyon 1, France.

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) is a non-selective cation channel activated by capsaicin, acidosis and high temperature (>42°C). In skeletal muscle, TRPV1 acts as functional Ca<sup>2+</sup> leak channel only located at the SR membrane. A recent work has shown that TRPV1 activation by dietary capsaicin improves exercise endurance and energy metabolism (via PGC1- $\alpha$  upregulation; Luo *et al.*, 2012). To further investigate the role of TRPV1 on skeletal muscle physiology, we presently used mice lacking functional TRPV1.

Animals (C57Bl6 wild type – WT - and TRPV1-KO) were divided in two groups: submitted or not to exercise. The trained group performed a running program of 30 min per day, 3 days per week, for 4 weeks. To analyze muscle function, *in vivo* functional assays (wire test, grip test) and *in vitro* experiments on fast- (EDL) and slow- (soleus) twitch muscles were realized. To investigate Ca<sup>2+</sup> homeostasis, biochemical analysis (Western blot analysis of SR membranes) and intracellular calcium measurements (Fluo-4AM) were also performed.

On the basis of our primary observations, we hypothesized that the absence of TRPV1 in skeletal muscles of mutant mice might directly impact on the effects of exercise.

25

## Influence d'un stress oxydant sur la cavéoline dans les cellules musculaires. Etude en relation avec la fonte musculaire liée à l'âge.

A Mougeolle, E Dargelos, S Poussard, O Lambert.  
Architecture de complexes membranaires et processus cellulaires, CBMN UMR-5248, Université de Bordeaux, Allée Geoffroy St-Hilaire, F-33600 Pessac, France  
La sarcopénie est une maladie dégénérative liée à l'âge qui conduit à une perte progressive de la masse musculaire. Elle se traduit par une diminution de la taille et du nombre des fibres musculaires due à une accumulation de stress oxydant. Les cavéoles sont de petites invaginations de la membrane plasmique structurées par leur protéine majoritaire la cavéoline. Dans le muscle squelettique, les cavéoles sont impliquées dans la médiation des signaux liés à la régulation du stress oxydant et ont un rôle important dans la formation d'un tissu sain. En effet, une modification d'expression de cavéoline-3 conduit à l'établissement de maladies musculaires graves (LGMD-1C et myopathie de Duchenne). Afin de mieux comprendre le rôle des cavéoles dans l'établissement de la sarcopénie, nous avons mis au point un modèle cellulaire de vieillissement. Nous étudions l'impact d'un stress oxydant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sur la cavéoline-1 dans les myoblastes et sur la cavéoline-3 dans les myotubes de souris. Les premiers résultats montrent que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit une augmentation des espèces réactives de l'oxygène. Nous avons également mis en évidence qu'un stress oxydant chronique ou aigu conduit à une diminution importante de l'expression des cavéolines-1 et -3. Dans le même temps, nous avons observé par analyse confocale une modification de la distribution cellulaire de la cavéoline-3. Des études en cours visent à approfondir notre compréhension de ce mécanisme.

27

## *Drosophila* $\alpha$ B-crystallin orthologue *lethal (2) essential for life (lefl)* is required for muscle shaping and for proper sarcomere organisation

I. Wojtowicz, K. Jagla and T. Jagla

GRoD (Genetic Reproduction and Development), INSERM 1103  
CNRS 6293, Clermont University

The *Drosophila lethal (2) essential for life (lefl)* gene is the orthologue of  $\alpha$ B-crystallin involved in Desminopathies in human. It codes for a small heat shock protein (sHSP) with chaperon activity. *lefl* protein displays muscle-specific expression in late embryos and accumulates in a dotted pattern close to the muscle cell membranes. High density of *lefl*-containing protein complexes are present at extremities of muscles at locations that correspond to anchoring sites of F-actin filaments. Consistent with this observation perturbing F-actin anchoring in muscles leads to the loss of dotted *lefl* pattern and to affected muscle shapes. The loss and gain of function *lefl* phenotypes support its role in shaping embryonic muscles. In muscles of 3rd instar larvae *lefl* protein is mainly located on Z-disc and M line extensions linking sarcomeres with muscle membrane. It co-localizes with Vimentin-like and Lamin C proteins, which like Desmin in vertebrates, are intermediate filament proteins in *Drosophila*. Under attenuation of *lefl* expression a number of perturbations of muscle pattern occur such as splitting or incorrect muscle attachment. Moreover, it has been noticed that muscles of *lefl*-deficient larvae are shorter and narrower with smaller number of nuclei and sarcomeres. Ultrastructural analyses confirmed altered sarcomeres organization showing mitochondria with barely visible mitochondrial crests and increased amount of glycogen between myofilaments. We also demonstrated that muscle-specific *lefl* knockdown causes altered arrangement of Vimentin-like protein indicating affected intermediate filament structure. We observed a meshwork-like organization of Vimentin-labeled filaments on the surface of myofibrils indicating that *lefl* and Vimentin-like proteins interact. Thus, the mis-arrangement of intermediate filaments observed in muscles with attenuated *lefl* expression appears reminiscent of defects in human Desminopathies caused by mutations in  $\alpha$ B-crystallin gene

26

## A role for clathrin heavy chain in costamere formation and maintenance

S Vassilopoulos<sup>1</sup>, C Gentil<sup>1</sup>, J Lainé<sup>1</sup>, PO Buclez<sup>1</sup>, A Ferry<sup>1</sup>, FM. Brodsky<sup>2</sup>, G Bonne<sup>1</sup>, T Voit<sup>1</sup>, L Garcia<sup>1</sup>, F Piétri-Rouxel<sup>1\*</sup> and M Bitoun<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Institut de Myologie, UPMC-Paris 6, INSERM U974, CNRS UMR 7215, Paris, F-75013, France. <sup>2</sup> Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, UCSF, San Francisco, USA.

Several diseases are caused by mutations in genes encoding proteins belonging to the intracellular membrane trafficking machinery. Recent work from our team, interested in centronuclear myopathy caused by mutations in dynamin 2 has suggested that a clathrin-dependent endocytosis defect might be a central pathophysiologic mechanism of this pathology. Clathrin heavy chain (CHC) is the main component of clathrin coated vesicles, well characterized for its role in vesicle formation during endocytosis and trafficking from intracellular compartments. The possible role of CHC in organizing the contractile apparatus was put forth a few years ago but these observations were never pursued in order to establish the function of clathrin during myogenesis. Here we used an siRNA-mediated CHC knock-down in-vitro strategy and an shRNA combined to AAV-mediated gene transfer to achieve in-vivo knockdown. CHC depletion induced sarcomeric disorganisation and led to rapid muscle degeneration and subsequent regeneration. Our results raise the possibility that clathrin heavy chain contributes to sarcomeric structure through interactions with costameric proteins and highlight a role for CHC in skeletal muscle which may be relevant to muscle physiology and could be associated to muscle diseases of unknown aetiology.

28

## Le thésaurus Myobase : un outil de connaissance des maladies neuromusculaires

[www.myobase.org](http://www.myobase.org)>Classifications des maladies neuromusculaires

C. Bel, A. Bidault des Chaumes, I. Mahaut, L. Orssaud  
AFM-Téléthon, Service Documentation, 1 rue de l'Internationale, BP 59, Evry Cedex 91002, FR

Myobase est la base de données bibliographiques dédiée aux maladies neuromusculaires et au handicap moteur, éditée par le service documentation de l'AFM-Téléthon. Myobase est bilingue français/anglais, sa mise à jour est quotidienne, elle contient plus de 30 000 documents.

Le thésaurus Myobase est une liste structurée de termes concernant les aspects cliniques, scientifiques, psycho-sociaux du domaine neuromusculaire. C'est un outil indispensable pour décrire les documents (indexation) et donc les retrouver.

La branche «Maladies neuromusculaires » du thésaurus Myobase (1) a été développée spécifiquement en tenant compte de l'évolution de la nosologie encore mouvante de ces maladies. Elle est présentée sur [www.myobase.org](http://www.myobase.org) sous forme de deux classifications en français ou en anglais : l'une clinique et l'autre par protéines impliquées dans ces maladies.

Cliquer sur le nom de la maladie donne accès à des informations médico-scientifiques, telles que :

- > les synonymes français et anglais
- > le mode de transmission
- > la localisation de la mutation
- > le nom de la protéine impliquée
- > le numéro MIM (*Mendelian Inheritance in Man*)
- > le code ORPHA (ORPHANET pour les maladies rares)
- > toutes les références des documents indexés avec le nom de la maladie correspondante.

(1) reprise dans le portail terminologique TermSciences

## MALADIES NEUROMUSCULAIRES A EXPRESSION NEO-NATALE : EXPERIENCES DU CR Grand-Sud-Ouest 2007 - 2012.

C Cancès<sup>1</sup>, C Espil<sup>2</sup>, U Walter Louvier<sup>3</sup>, F Rivier<sup>3</sup>, MO Marcou<sup>1</sup>, O Brissaud<sup>2</sup>, C Milesi<sup>3</sup>, E Bieth<sup>4</sup>, E Uro-Coste<sup>5</sup>

1. Unités de Neurologie pédiatrique & Réanimation, CHU Toulouse, 2. Unités de Neurologie Pédiatrique & Réanimation, CHU Bordeaux, 3. Unités de Neurologie Pédiatrique & Réanimation, CHU Montpellier, 4. Service de génétique moléculaire, CHU Toulouse, 5. Laboratoire d'anatomopathologie, CHU Toulouse

### Objectifs

Analyse des données cliniques, étiologiques et du type de prise en charge des enfants nés entre 2007 et 2012 avec une détresse respiratoire survenue avant J30 de vie, rapportée à une origine musculaire, dystrophie myotonique de type 1 et amyotrophie spinale infantile exclues.

### Résultats

Quinze enfants ont été répertoriés. Onze enfants ont nécessité une ventilation assistée initiale, et 4 une assistance différée ou sous forme de CPAP. L'hypotonie est le principal symptôme inaugural, suivi d'un dysfonctionnement bulbaire avec troubles de déglutition/alimentation, d'une dysmorphie faciale et d'anomalies orthopédiques.

Des hypothèses étiologiques anatomopathologiques ont été formulées chez 8 patients : 6 myopathies congénitales, une dystrophie musculaire congénitale et une myopathie métabolique. Aucune confirmation génétique n'a cependant pu être obtenue. Trois autres patients ont eu un diagnostic génétique définitif : 2 Syndromes Myasthéniques Congénitaux (CHRNE, Rapsine) et une mutation IGHMBP2.

Onze patients sont décédés, dont 6 dans le cadre d'une prise en charge palliative. Deux patients bénéficient d'une VA sur trachéotomie, un d'une VNI et un a une autonomie respiratoire complète. Trois patients ont acquis une marche autonome.

### Conclusions

Déterminer un diagnostic précis reste encore laborieux, rendant l'élaboration d'un pronostic clinique très incertain. La prise en charge thérapeutique reste hétérogène.

- (1) Un protocole commun d'explorations a donc été adopté dans un objectif d'harmonisation de nos prises en charge.

## L'Observatoire DM-Scope : premières applica en recherche sur les dystrophies myotoniques

C Dogan (1), D Hamroun (2), M Fabbro (1), B Eymard (3), Réseau Clinique Français des Dystrophies Myotoniques, G Bassez (1)

<sup>1</sup> Centre de Référence Maladies Neuromusculaires GNMH, CHU Mondor, Créteil, France, <sup>2</sup> Institut Universitaire de Recherche Clinique, CHU Montpellier, Montpellier, France, <sup>3</sup> Centre de Référence Maladies Neuromusculaires Paris-Est, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France

### INTRODUCTION

L'extrême variabilité clinique des dystrophies myotoniques (DM1, DM2) représente un frein à la recherche.

### OBJECTIFS

L'Observatoire des dystrophies myotoniques, fondé pour contourner cet obstacle, permet la constitution de groupes homogènes de patients pour les études cliniques.

### METHODES

L'outil DM Scope, qui combine des applications épidémiologiques et cliniques, agrège de nombreuses consultations neuromusculaires (30) et la plus large cohorte DM actuellement connue (1350 patients). De récents développements facilitent la mise en place de protocoles de recherche.

### RESULTATS

L'observatoire a permis de caractériser la cataracte dans la population DM et de sensibiliser la communauté ophtalmologique, de recruter les patients éligibles aux études de l'histoire naturelle de la maladie (NATHIS-DM1), et l'évaluation de la ventilation assistée précoce (DYVINE) et de contribuer à une recherche plus fondamentale étudiant les mécanismes de rares contractions intergénérationnelles des CTG. Enfin, il aide à préparer une recommandation temporaire d'utilisation (RTU) pour des prescriptions en dehors des autorisations de mises sur le marché (modafinil).

### DISCUSSION

Grâce au travail collaboratif du réseau neuromusculaire DM français, DM-Scope soutient désormais la recherche dans les dystrophies myotoniques.

### CONCLUSION

Cette plateforme est ouverte aux projets régionaux ou nationaux naissants sur le thème des DM.

## Intérêt du Test d'effort long à l'EMG dans la maladie de Mc Ardle

A Choumert<sup>1,2</sup>, J Svahn<sup>2,3</sup>, F Bouhour<sup>3,4</sup>, H Gervais-Bernard<sup>1,3,4</sup>, N Streichenberger<sup>4,5</sup>, M Piraud<sup>4,6</sup>, C Vial<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Service de neurologie C, hôpital neurologique Pierre Wertheimer, Hospices civils de Lyon, <sup>2</sup> Université Claude Bernard, Lyon 1, <sup>3</sup> Service ENMG, hôpital neurologique Pierre Wertheimer, Hospices civils de Lyon, <sup>4</sup> Centre de référence maladies neuromusculaires rares, Rhône-Alpes, <sup>5</sup> Service d'anatomopathologie, centre de Biologie Est, Hospices civils de Lyon, <sup>6</sup> Service de Maladies héréditaires du métabolisme et pathologies mitochondriales, centre de Biologie Est, Hospices civils de Lyon

La maladie de McArdle est une myopathie métabolique héréditaire de transmission autosomique récessive qui s'exprime le plus souvent par une intolérance à l'effort. Cependant, il existe une grande variabilité clinique. Le test de référence est l'épreuve d'effort (grip test ou bicyclette ergométrique) qui montre une absence d'élévation de la lactacidémie. Le diagnostic positif nécessite souvent une biopsie musculaire qui montre des vacuoles glycogéniques et un déficit partiel en myophosphorylase. Le diagnostic définitif se fait par l'étude génétique.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'intérêt de l'électroneuromyogramme (stimulations répétitives sous ischémie et test d'effort long) afin de réaliser directement une analyse génétique des mutations du gène PYGM en évitant la biopsie musculaire. Nous présentons quatre patients, âgés de 19 à 62 ans, porteur d'une maladie de McArdle. Trois d'entre eux se sont présentés avec une hyperCKémie ou un déficit permanent ; la biopsie musculaire a conduit au diagnostic. Le dernier est un tableau d'intolérance à l'effort dont le diagnostic a été porté sans biopsie musculaire.

Les stimulations répétitives sous ischémie n'ont pas été concluantes pour deux des trois patients testés. Par contre, le test d'effort long a permis de mettre en évidence chez les trois patients testés une réduction d'amplitude significative du potentiel global d'action musculaire, précoce et partiellement corrigé après 30 minutes post-exercice. Ce pattern semble assez spécifique des glycogénoses.

En conclusion, le test d'effort long, de réalisation simple et non douloureux, accessible à tout électromyographe pourrait être pratiqué en première intention lorsque l'interrogatoire oriente vers une maladie de Mc Ardle.

## Apport de l'IRM musculaire et de la spectroscopie RMN du carbone 13 dans la maladie de McArdle.

C Semplicini<sup>1</sup>, RY Carlier<sup>2</sup>, T Stojkovic<sup>1,2</sup>, A Behin<sup>1,2</sup>, B Eymard<sup>1,2</sup>, C Wary<sup>2</sup>, P Carlier<sup>2</sup>, P Laforêt<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre de référence Pathologie Neuromusculaire Paris Est, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France, <sup>2</sup> Institut de Myologie, Paris, France

La Maladie de McArdle est une myopathie métabolique rare le plus souvent bénigne, due à des mutations du gène PYGM (myophosphorylase). L'altération de la glycogénolyse musculaire se manifeste par crampes et des myalgies au cours de l'effort, et par des épisodes de rhabdomyolyses. Un petit nombre de patients développe également une faiblesse musculaire permanente, généralement après l'âge de 50 ans.

Quinze patients, âgés de 28 à 83 ans (médiane : 49 ans), avec un diagnostic confirmé de maladie de McArdle ont été étudiés par résonance magnétique nucléaire avec une IRM corps entier (11 cas) ou des membres inférieurs (4 cas), et une spectroscopie RMN du Carbone 13 (8 cas). Les résultats de ces examens ont été comparés avec l'examen clinique, les taux de CPK et les résultats du grip test. Quatre patients seulement (âgés de 47, 50, 55 et 83 ans) présentaient des altérations visibles sur l'IRM musculaire, avec atteinte des muscles axiaux. Tous ces patients présentaient une faiblesse musculaire cliniquement évidente. L'examen par RMN du carbone 13 montrait une accumulation de glycogène avec un ratio glycogène/créatine entre 1.6 et 5.28 (contrôles du laboratoire 0.83+/-0.18)

L'imagerie musculaire confirme l'absence d'altérations de l'architecture musculaire chez les patients atteints de maladie de McArdle qui ne présentent pas de faiblesse manifeste, et permet d'évaluer avec précision l'atteinte des muscles axiaux chez les 4 patients ayant des anomalies. La spectroscopie RMN du C13 a montré dans tous les cas une accumulation anormale de glycogène. Cette première étude d'imagerie musculaire permet de considérer l'IRM comme mesure d'efficacité des futurs traitements pour la maladie de McArdle.

## NM-Score: a new motor function classification for patients with neuromuscular diseases

C. Vuillerot<sup>1,3</sup>, P. Ripperit<sup>1</sup>, S. Roche<sup>2,3</sup>, C. Bérard<sup>1</sup>, R. Ecochard<sup>2,3</sup> and the NM-Score study group

<sup>1</sup> L'Escale, HFME, HCL, France, <sup>2</sup> Service Biostatistiques, HCL, France, <sup>3</sup>UMR CNRS 5558 Equipe Biostatistiques Santé

**Introduction:** Considering the current progress made in terms of research and caretaking of neuromuscular diseases (NMD), interest of developing valid outcome measures to assess evolution of motor function has recently increased. We suggest a new classification in levels of motor function performances for patients (adults and children) with NMD over standing position and transfers (D1), axial and proximal (D2) and distal (D3) motor function analogous to the staging and grading system used for tumor.

**Objective:** Describe construction and validation study of NM-Score.

**Methods:** A first version of NM-score was proposed by experts. Content validity was examined using a Delphi survey process. Each patient was classified using NM-score independently by two raters to analyse inter-rater reliability.

**Criterion validity** consist in concurrent comparison of NM-Score to gold standard (MFM, Vignos and Brooke).

**Results:** Inter-rater reliability was examined on 71 patients. Chance-corrected agreements ( $\kappa$ ) of 0.760, 0.690 and 0.642 were determined for NM-Score D1, D2 and D3, respectively. 158 patients were enrolled in criterion validity study. The best correlations are found for the domain D1 (Vignos 0.86 and MFM score D1-0.88) and domain D2 (Brooke 0.64 and MFM D2 -0.7).

**Conclusions:** These results support criterion reliability and reproducibility of NM-Score to promote its use in clinical practice and research.

## Evaluation de l'efficacité du bezafibrate sur le métabolisme musculaire au cours de l'exercice dans les déficits en CPT2 et en VLCAD de l'adulte

P. Laforêt (1), MC Ørngreen (2), K Lindhardt (2), A Behin (1), B Chabrol (3), I Penisson-Besnier (4), A.-L. Bedat-Millet (5), C Acquaviva-Bourdain (6), C Vianey-Saban (6), J Vissing (2)

1. Centre de Référence de pathologie neuromusculaire Paris-Est, Paris, France. 2. Neuromuscular Clinic and Research Unit, Rigshospitalet, Denmark 3. Centre de Référence des maladies métaboliques de l'enfant, Marseille, France 4. Centre de Référence Maladies Neuromusculaires Nantes-Angers, CHU Angers, France. 5. Département de Neurologie, Hôpital Charles Nicolle, CHU de Rouen, France 6. Centre de Référence des Maladies Héréditaires du Métabolisme, Hospices Civils de Lyon, France

**Introduction :** Des travaux récents ont montré que le bezafibrate (befizal<sup>®</sup>), pouvait corriger les déficits en CPTII et en VLCAD sur des cultures de cellules humaines. Par ailleurs, un essai clinique pilote mené en ouvert chez 6 patients ayant une forme de l'adulte de déficit en CPTII, a montré une amélioration de l'oxydation des acides gras à longues chaînes sur les biopsies musculaires après 6 mois de traitement (Bonnefont PJ et al., 2009).

**Méthodes :** Dans le prolongement de l'étude pilote, nous avons mené un nouvel essai randomisé, en double aveugle contre placebo, et en cross-over, de façon à évaluer l'efficacité du bezifal chez 10 adultes ayant un déficit en CPT2 ou en VLCAD. Les patients avaient tous présenté des épisodes de rhabdomyolyses et se plaignaient pour la plupart d'une intolérance musculaire pour les efforts prolongés. Le critère de jugement principal a été l'analyse du turn-over du [U-<sup>13</sup>C]-palmitate (isotope stable) permettant d'étudier le métabolisme des acides gras *in vivo*, au cours de la réalisation d'une épreuve d'effort sur ergocycle précédée d'une perfusion d'isotope stable du palmitate. Ces analyses ont été effectuées au début et à la fin de chaque période de traitement.

**Résultats :** Les analyses de l'oxydation du palmitate au cours de l'effort n'ont montré aucune différence entre les périodes de traitement et sous placebo. Cet essai clinique n'a donc pas montré d'amélioration du métabolisme des graisses *in vivo* au cours du traitement par bezafibrate, chez les patients ayant une anomalie de la beta-oxydation.

## Exercice et FSHD: Résultats préliminaires des effets d'un entraînements de 6 mois.

### Etude contrôlée randomisée.

L.-C. Bankole<sup>1,3,4</sup>, G. Millet<sup>1,2</sup>, J. Temesi<sup>1,2</sup>, B. Wuyam<sup>1,4</sup>, D. Bachasson<sup>1,4</sup>, F. Kadi<sup>3</sup>, J.-C. Antoine<sup>1</sup>, L. Feasson<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Unité de Myologie – LPE-EA4338 UJM/CHU St-Etienne, <sup>2</sup>Laboratoire HP2 – INSERM-ER117 UJF/CHU Grenoble., <sup>3</sup>School of Health and Medical Sciences, Örebro University, Sweden., <sup>4</sup>Centre Référent Maladies Neuromusculaires Rhône-Alpes

La dystrophie fascio-scapulo-humérale (FSHD) fait partie des myopathies dont la progression peut être relativement modérée mais avec une perte d'autonomie directement reliée à la fatigabilité. Sans traitement curatif, la pratique de l'activité physique régulière est de plus en plus acceptée comme une thérapie palliative. Cependant trop peu d'études contrôlées et randomisées ont été réalisées et la plupart sur de brèves périodes.

#### Objectif

Evaluation des effets d'un entraînement mixte endurance/force, supervisé et à domicile pendant 24 semaines sur la fonction motrice de patients FSHD. Etude prospective multicentrique, contrôlée et randomisée.

#### Méthode

Randomisation : entraînés/contrôles. 24 semaines d'entraînements sur ergocycle à domicile. 3 séances hebdomadaires de 35 min dont 2 séances d'exercices aérobies et une séance d'intervalle training.

#### Résultats/discussion

Les résultats préliminaires des 16 premiers patients inclus concernent les évaluations à l'exercice (VO<sub>2</sub>max/PMA), le test de marche (TM6), la force du quadriceps (MVC) et la qualité de vie (SF36).

Ils témoignent de l'efficacité de ce type d'entraînement en terme de bénéfices fonctionnels chez des patients FSHD.

#### Remerciements.

Les patients ont été recrutés par les médecins du Centre Référent Neuromusculaire Rhône-Alpes. **Cyrille BANKOLE** et cette étude ont reçu le soutien financier de l'Université d'Örebro et de l'AFM.

## Prednisolone and mdx mice : a good and a bad friend ?

Roux A<sup>1</sup>, Lafoux A<sup>1</sup>, Carre – Pierrat M<sup>2</sup>, Segalat L<sup>2</sup> and Huchet – Cadiou C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>UMR INSERM U1087 / UMR CNRS 6291, Institut du Thorax, Université de Nantes, France. <sup>2</sup>UMR CNRS 5534, Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire CGMC, Université Claude Bernard Lyon 1, France.

The corticosteroids prednisolone or deflazacort, a prednisone analog, are currently used for the treatment of Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). However, the use of glucocorticoids in DMD remains controversial in part because of their significant side effects and limit its therapeutic usefulness, especially in young.

The purpose of this study was to analyze the effect of continuous prednisolone administration on *mdx* (C57Bl6mdx5cv) and healthy mice (C57Bl6) at various concentration. To analyze whether treatment ameliorate or not locomotor function, a wide variety of behavioural, functional and biochemical assays was used to assess the effects of prednisolone administered for 2, 7 and 12 weeks by feeding.

Prednisolone administration to *mdx* mice results in an improvement in grip strength and this effect was related to an increase in edl muscle force. In *mdx* mice, this significant improvement in disease phenotype was mainly observed after 2 weeks of treatment. However, these positive effects were associated with side effects on growth and muscle weight. Furthermore, these amelioration in skeletal muscle function was smaller to those observed in healthy mice.

## Poikilodermie congénitale, infiltration adipeuse musculaire et fibrose pulmonaire : un nouveau syndrome

S. Mercier<sup>1,2</sup>, J.-M. Mussini<sup>2,3</sup>, A. Magot<sup>2,4</sup>, S. Kury<sup>5</sup>, B. Isidor<sup>1</sup>, S. Bézieau<sup>5</sup>, A. David<sup>1</sup>, S. Barbarot<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Service de Génétique Médicale, CHU de Nantes, Nantes, France, <sup>2</sup> Centre de Référence des Maladies Neuromusculaires Nantes-Angers, <sup>3</sup> Laboratoire d'Anatomie Pathologique A, CHU de Nantes, Nantes, France, <sup>4</sup> Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles, CHU de Nantes, Nantes, France, <sup>5</sup> Service de génétique Médicale, Unité de Génétique Moléculaire, CHU de Nantes, Nantes, France, <sup>6</sup> Service de Dermatologie, CHU de Nantes, Nantes, France

Nous rapportons le cas d'un garçon âgé de 7 ans suivi initialement pour une poikilodermie congénitale associée à une hypotrichose et à une intolérance à la chaleur. A l'âge de 6 ans, sont apparus un lymphoedème modéré des quatre extrémités, une dermatose à type d'eczéma chronique des pieds et une atteinte musculaire très rapidement évolutive avec rétractions tendineuses et déformation des pieds en varus. A l'âge de 7 ans, l'usage d'un fauteuil roulant est devenu nécessaire pour les déplacements extérieurs. Le dosage des enzymes musculaires est normal et le tracé de l'électromyogramme est myogène au niveau des membres inférieurs. L'IRM musculaire montre une infiltration adipeuse massive des membres inférieurs confirmée par l'étude de la biopsie musculaire. L'étude histologique de la biopsie cutanée révèle une dégénérescence du tissu élastique avec des anomalies à la fois dans le derme papillaire et le derme profond. Enfin, les épreuves fonctionnelles respiratoires sont en faveur d'un syndrome restrictif débutant.

Le diagnostic de syndrome de Rothmund-Thomson a été exclu sur l'évolution clinique et la normalité de l'étude moléculaire du gène *RECQL4*. Une seule observation Sud-Africaine familiale de transmission autosomique dominante rapporte un phénotype très similaire associant une poikilodermie, des contractures tendineuses, une fibrose pulmonaire progressive et surtout des anomalies histologiques identiques.

Notre cas permet de confirmer l'existence de ce nouveau syndrome associant poikilodermie congénitale, infiltration adipeuse musculaire et fibrose pulmonaire progressives. Les bases moléculaires et physiopathologiques ne sont pas connues. Dans cet objectif, une étude d'exome est en cours chez le cas index.

## HSF1 au secours de la myopathie IBMPFD ?

Lydia Pernet<sup>1</sup>, Virginie Faure<sup>1</sup>, Claire Vourc'h<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut Albert Bonniot, CRI INSERM/UJF U823 Equipe 10, « Stress et dynamique de l'organisation des génomes », Grenoble – France

L'IBMPFD (Inclusion Body Myopathy, Paget disease of the bone, and frontotemporal dementia) est causée par des mutations de VCP (Valosin Containing Protein), chaperonne associée à la dégradation des protéines. Les formes mutées de VCP colocalisent avec des agrégats protéiques qui ne sont plus pris en charge par la cellule.

Notre stratégie consiste à activer la voie de signalisation HSF1 (Heat Shock Factor 1) dans les cellules IBMPFD afin de diminuer la formation d'agrégats protéiques et faciliter leur dégradation.

Le facteur de transcription HSF1 contrôle l'expression de chaperonnes HSPs (Heat Shock Proteins). Elles permettent le repliement des protéines mal enroulées et la prévention de la formation d'agrégats. HSF1 interagit avec VCP et l'histone déacétylase HDAC6 qui facilite l'autophagie.

Nous étudions le rôle de VCP et de HDAC6 dans la dégradation des protéines en lien avec la voie de signalisation HSF1.

## Profil cognitif et glyco-génose de type III : une étude prospective.

CC Michon<sup>1</sup>, M Gargiulo<sup>1</sup>, V Hahn-Barma<sup>1</sup>, A Nadaj-Pakleza<sup>2</sup>, MD, A Herson<sup>1</sup>, E Guichart-Gomez<sup>1</sup>, M Bertoux<sup>1</sup>, M Sarazin<sup>1</sup>, MD, PhD, B Eymard<sup>1</sup>, MD, PhD, P Labruno<sup>3</sup>, MD, PhD, P Laforet<sup>1</sup>, MD

<sup>1</sup> APHP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, <sup>2</sup> CHU, Angers, <sup>3</sup> APHP, Hôpital Antoine-Béclère, Paris

**Contexte :** Alors que des difficultés d'adaptation sociale ont souvent été rapportées dans la glyco-génose de type III, les conséquences cognitives et psychologiques de la maladie n'ont jamais été évaluées. L'objectif de cette étude est d'explorer l'atteinte cognitive chez ces patients.

**Méthode :** sept patients (âge moyen : 38.8 ± 11,6 ans) atteints de GSDIII ont bénéficié d'une évaluation neuropsychologique. Les tests proposés évaluaient l'efficacité globale, les fonctions exécutives, la cognition sociale, l'apathie et la mémoire épisodique.

**Résultats :** tous les patients présentaient des fluctuations attentionnelles. 5/7 patients présentaient une atteinte de l'efficacité globale avec une atteinte des fonctions exécutives, des difficultés dans la reconnaissance des émotions et une atteinte de la théorie de l'esprit. Les capacités en mémoire sont préservées. Des troubles psychopathologiques ont été observés.

**Conclusion :** ces résultats font penser qu'il existe une atteinte du SNC dans la GSDIII. Nous posons l'hypothèse que l'atteinte de la reconnaissance des émotions et de la théorie de l'esprit est une conséquence d'un dysfonctionnement orbito-frontal. Ceci pourrait expliquer les difficultés d'adaptation sociale observées. Ces observations doivent être prises en compte dans le suivi de ces patients.

## Les complications cardiaques sont un facteur majeur de comorbidité et mortalité chez les patients porteurs de la mutation 'MELAS' *MT-TL1 3243A>G*

E Malfatti<sup>1,2,3</sup>, MD, P Laforet<sup>2</sup>, MD, C Jardel<sup>4</sup>, PhD, T Stojkovic<sup>2</sup>, MD, A Behin<sup>2</sup>, MD, B Eymard<sup>2</sup>, MD, PhD, A Lombès<sup>5</sup>, MD, PhD, H-M Bécané<sup>2</sup>, MD, N Berber<sup>2</sup>, PhD, C Meune<sup>5,7</sup>, MD, PhD, D Duboc<sup>5,7</sup>, MD, PhD, and K Wahbi<sup>2,8</sup>, MD

<sup>1</sup> Unité de Morphologie Neuromusculaire, Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, F-75013, France. <sup>2</sup> AP-HP, Groupe Hospitalier-Universitaire Pitié-Salpêtrière, Centre de référence des maladies neuromusculaires Paris-Est, Paris, France. <sup>3</sup> Département de Sciences Neurologiques, Neurochirurgicales et du Comportement, Université de Sienna, Sienna, Italie. <sup>4</sup> UF de Cardio et Myogénétique- Biochimie Métabolique- Hôpital Pitié Salpêtrière APHP Paris 5. <sup>5</sup> Département de Cardiologie – Hôpital Cochin, APHP Paris 6. <sup>6</sup> INSERM, U975, Paris F-75013, Paris. <sup>7</sup> Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité University, 75006 Paris, France. <sup>8</sup> Pierre et Marie Curie- Paris 6 University, Myology Institute, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris

La mutation m. 3243A>G dans le gène *MT-TL1* de l'ADN mitochondrial (mutation MELAS) est associée à une grande variabilité phénotypique. Une atteinte cardiaque est fréquemment observée mais les conséquences sur le pronostic à long terme sont mal connues.

Nous avons étudié rétrospectivement une cohorte de 41 patients (âge médian=47 ans, 13 hommes) porteurs de la mutation m.3243A>G. Nous avons recueilli les données relatives à leur première évaluation dans notre service qui comprenait des consultations neurologiques et cardiologiques, une électrocardiographie, une échocardiographie et un Holter ECG. La survenue de complications cardiaques a été effectuée lors des évaluations programmées une fois par an et les événements cardiologiques et causes de décès ont été déterminés.

3 patients présentaient des antécédents d'épisodes « stroke-like », 2 de syndrome coronarien aigu, et un de transplantation cardiaque. L'ECG a montré un syndrome de Wolff Parkinson White dans 7 cas, et l'Holter-ECG a révélé une fibrillation auriculaire dans un cas. L'échocardiographie a montré une hypertrophie ventriculaire gauche (VG), une dysfonction VG ou les deux altérations associées dans 18 patients. Au cours d'un suivi médian de 5 ans, 11 patients (27%) sont décédés et 7 patients ont présenté des complications cardiaques graves. L'analyse statistique multi-variée a montré que le seul paramètre associé avec la survenue d'un décès ou d'une complication cardiaque grave était une hypertrophie VG.

En conclusion l'atteinte cardiaque constitue une complication majeure des maladies mitochondriales associées à la mutation MELAS. L'existence d'une hypertrophie ventriculaire gauche se révèle être le principal facteur pronostic de complication cardiaque dans notre population.

## Myofiber androgen receptor controls limb muscle strength

M Schuh<sup>1</sup>, G Laverny<sup>1</sup>, L Gargowitsch-Poncet<sup>1</sup>, N Messadecq<sup>1</sup>, A Ferry<sup>2</sup>, P Chambon<sup>1</sup> and D Metzger<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964, Université de Strasbourg, Collège de France, Illkirch, France., <sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U974, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7215, Université Paris Descartes, Paris, France.

Loss of muscle mass and function is a feature of various diseases (e.g. neuromuscular disorders, cancer, sepsis and AIDS), immobilization and aging. Muscle weakness is often severely debilitating, can lead to physical dependence, increased occurrence of falls and bone fracture, and therefore has a high socio-economical impact.

Clinical studies indicate that testosterone replacement in hypogonadal men, as well as in men with sarcopenia, increases skeletal muscle mass and strength. Their use is however limited, because androgens promote prostate cancer development. Moreover, other clinical studies indicate that androgens stimulate muscle mass, but not strength. Despite the use of androgenic steroids by athletes, the effects of such molecules on muscle performance and physical functions remain poorly characterized.

Androgens mediate their effects predominantly through the androgen receptor (AR), a member of the ligand-dependent nuclear receptor superfamily. To characterize androgen signaling in skeletal muscles, we generated mice in which AR is selectively and efficiently ablated in myofibers. We have shown that AR in myofibers controls limb muscle strength but not muscle mass. We are currently characterizing the underlying molecular mechanisms, to develop new screens to identify androgen analogs that promote muscle strength but not prostatic epithelial cell proliferation, and identify new drug targets to promote muscle strength.

## Deux nouvelles mutations ponctuelles dans le gène de l'agrine associées à un syndrome myasthénique congénital causent un défaut de sécrétion.

T. Simonet<sup>1</sup>, V. Risson<sup>1</sup>, S. Bauche<sup>2</sup>, E. Girard<sup>1</sup>, J. Koenig<sup>2</sup>, Bruno Eymard<sup>3</sup>, D. Hantai<sup>2</sup>, L. Schaeffer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR 5239 ENS Lyon/CNRS/Université Lyon 1/ Hospices civils de Lyon., <sup>2</sup> Institut du Cerveau et de la Moelle, Hôpital de la Salpêtrière, Paris., <sup>3</sup> Institut de Myologie, Hôpital de la Salpêtrière, Paris.

L'agrine est un protéoglycan de la lame basale. La production d'agrine neurale par les motoneurons est essentielle à la formation et au maintien de la jonction neuromusculaire (JNM).

En 2009, la collaboration entre l'Institut de Myologie et l'ENS de Lyon a permis de décrire la première mutation dans le gène de l'agrine responsable d'un syndrome myasthénique congénital (SMC) (Huzé et al., 2009).

Nous rapportons ici le cas d'une patiente atteinte d'un SMC et portant deux mutations ponctuelles différentes sur chaque allèle, localisées dans le domaine LG2 de l'agrine.

L'analyse morphologique d'une biopsie du deltoïde montre une désorganisation des JNM avec une fragmentation des gouttières primaires et un compartiment presynaptique anormal appauvri en vésicules.

Les études fonctionnelles réalisées avec des agrines recombinantes purifiées montrent que les mutations n'affectent pas la capacité de l'agrine à agréger le récepteur de l'acétylcholine *in vivo* ou dans les myotubes C2C12. Par contre la transfection des vecteurs d'expression pour les agrines mutantes dans des cellules de neuroblastome montre que les mutations limitent fortement la sécrétion d'agrine par les cellules. L'une des mutations bloque précocement la translocation de l'agrine dans la cellule puisqu'elle n'atteint pas l'appareil de Golgi et élimine presque totalement la sécrétion d'agrine. L'autre mutation induit l'accumulation de l'agrine à la membrane plasmique et induit une réduction de 2 à 3 fois de la sécrétion de la protéine. Ces travaux constituent la première description d'un SMC dû à un défaut de sécrétion d'un facteur neural et identifient ce processus cellulaire comme un acteur important du bon fonctionnement de la jonction neuromusculaire.

## The neuronal endopeptidase ECEL1 is associated with autosomal recessive distal arthrogryposis

Dieterich K\*, Quijano-Roy S, Monnier N, Zhou Jie, Fauré J, Avila Smirnow D, Carlier R, Laroche C, Marcocelles P, Mercier S, Mégarbané A, Odent S, Romero N, Sternberg D, Marty I, Estournet B, Jouk PS, Melki J, Lunardi J

\*Inserm U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France.

Distal arthrogryposis (DA) is a subgroup of arthrogryposis multiplex congenita (AMC) characterized by multiple congenital joint limitations. Using a pangenomic approach in 2 consanguineous families with DA, we identified a common morbid locus that mapped to chromosome 2q37 and harbored the Endothelin Converting Enzyme Like 1 (*ECEL1*) gene. We screened a panel of 20 DA families and identified 7 different mutations in six families. All mutations resulted either in the absence of the protein or into the synthesis of a non-functional protein, suggesting a loss of function mechanism. *ECEL1* encodes a neuronal endopeptidase expressed in the peripheral (PNS) and central nervous system during fetal life and plays a major role in intramuscular branching of motoneurons in skeletal muscle.

Patients presented with a homogeneous phenotype characterized by limited knee flexion, flexed third to fifth fingers and relatively spared index finger, severe muscle atrophy in lower limbs and tongue. Muscle imaging showed a recognizable pattern of the thigh muscles. No dysfunction of the neuromuscular transmission was evidenced.

On the whole, clinical features point towards a disorder involving the PNS. A developmental dysfunction is suggested by the predominantly prenatal expression of *ECEL1*, the non-progressive course of the disease and K.O. mouse data.

## Peripheral nerve hyperexcitability with preterminal nerve and neuromuscular junction remodeling in Schwartz-Jampel syndrome.

S Godard-Bauche<sup>1,2,3,5</sup>, D Boerio<sup>9</sup>, CS Davoine<sup>1,2,3</sup>, V Bernard<sup>2,6,7</sup>, M Stum<sup>1,2,3</sup>, C Bureau<sup>1,2,3</sup>, M Fardeau<sup>8</sup>, NB Romero<sup>4,8</sup>, B Fontaine<sup>1,2,3,4</sup>, J Koenig<sup>1,2,3</sup>, D Hantai<sup>1,2,3</sup>, A Guegen<sup>10</sup>, E Fournier<sup>1,2,3,4</sup>, B Eymard<sup>1,2,3,4</sup>, S Nicole<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U975; <sup>2</sup>UPMC; <sup>3</sup>CNRS, UMR7225; <sup>4</sup>AP-HP; <sup>5</sup>EPHE; <sup>6</sup>Inserm, U952; <sup>7</sup>CNRS, UMR7224; <sup>8</sup>Institut de Myologie, Paris; <sup>9</sup>Institut of Neurology, London; <sup>10</sup>Fondation Ophthalmologique Rothschild, Paris.

Schwartz-Jampel syndrome (SJS) is a recessive disorder characterized by stiffness with muscle hyperactivity that results from deficiency in perlecan, a basement membrane proteoglycan. The analysis of a mouse model has suggested that SJS is a peripheral nerve hyperexcitability due to synaptic acetylcholinesterase deficiency and preterminal nerve segment amyelination. We investigated one 35-year-old patient with SJS to confirm this issue in humans. Perlecan deficiency with hypomorphic mutations was observed in the patient. ENMG showed normal nerve conduction, neuromuscular transmission and CMAP, whereas threshold tracking technics did not detect changes in peripheral nerve excitability. Needle-EMG detected complex repetitive discharges. Altogether, the electrophysiological analyses suggested a distal neurogenic origin for the muscle hyperactivity. The histological survey of neuromuscular junctions (deltoid muscle) showed partial denervation of synaptic gutters, reinnervation by terminal sprouting, reduced amount of acetylcholinesterase and amyelination of the preterminal axonal segment. With the recent investigation done on our SJS mouse model, our results favor the hypothesis of a presynaptic origin for muscle hyperactivity resulting in SJS stiffness.

Supported by AFM, INSERM, CNRS, and UPMC.

## Développement de nouveaux modèles cellulaires pour la DM1.

F. Rau, A. Jollet, V. Mouly, A. Klein and D. Furling

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie autosomique dominante causée par une expansion de triplets CTG dans la région 3' non codante du gène *DMPK*. Le nombre de triplets CTG peut atteindre plusieurs milliers chez les patients DM1 alors qu'il est inférieur à 38 chez les individus non atteints. La DM1 fait partie d'une nouvelle famille de maladie à gain-de-fonction des ARN et l'expression des ARNs *DMPK* contenant des expansions CUG (ARN-expCUG) est un élément central dans le développement de la pathologie. Les ARN-expCUG sont séquestrés dans le noyau sous forme d'agrégats et altèrent notamment la fonction de facteurs d'épissage comme MBNL1 et CUGBP1 conduisant à des défauts de maturation de certains ARNm. Ainsi il a été montré que le défaut de maturation des pré-ARNm du CIC-1 est responsable de la myotonie observée dans les patients DM1. Cependant les mécanismes impliqués dans l'atrophie musculaire induite par l'expression de triplets CTG répétés sont encore mal connus. Afin d'examiner les modifications induites par les ARN-expCUG dans les cellules musculaires, nous avons développé un modèle de cellules musculaires humaine permettant d'induire de manière conditionnelle l'expression de grandes répétitions CTG. Nos résultats préliminaires montrent que l'induction d'ARN-expCUG entraîne une perturbation de la maturation de certains ARNs validant ce nouveau modèle cellulaire. L'étude des modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles précocement induites par les ARN-expCUG est en cours.

## Remodelages microvasculaires dans le muscle d'hommes drépanocytaires – Etude des parois capillaires

Marion Ravelojaona<sup>1</sup>, Laurent Messonnier<sup>2</sup>, Léonard Féasson<sup>1,3</sup>  
LPE, Universités St-Etienne<sup>1</sup> et Savoie<sup>2</sup> - Unité de Myologie – Centre Référent Maladies Neuromusculaires Rares Rhône-Alpes – CHU de St-Etienne<sup>3</sup>

La drépanocytose est une hémoglobinopathie autosomique récessive aux répercussions vasculaires sévères. Nous avons décrit un remodelage microvasculaire dans le muscle d'hommes drépanocytaires homozygotes (SCD): diminutions de densité et de tortuosité des microvaisseaux, augmentation de leur diamètre. SCD versus hétérozygotes (SCT) et contrôles (C).

Objectif: Etude qualitative des parois microvasculaires de muscles d'hommes drépanocytaires.

### Méthode

Analyse histologique du réseau microvasculaire du vastus lateralis de 27 camerounais (10 C; 10 SCT; 7 SCD) par un double marquage IF CD31/SM-MHC (présence de fibres musculaires lisses pariétales) et par Van Gieson et HES (présence de tissus fibreux et mesure d'épaisseur de parois).

### Résultats

Absence de SM-MHC et de tissu fibreux dans la paroi microvasculaire pour les 3 groupes. Pas de différence significative d'épaisseur de paroi entre les 3 groupes. Cependant, le rapport épaisseur de paroi/diamètre capillaire est plus faible chez SCD que chez SCT, lui-même plus restreint que chez C.

### Conclusion

L'absence de SM-MHC et d'augmentation de l'épaisseur des parois capillaires exclut un phénomène d'artérialisation expliquant l'augmentation du calibre microvasculaire des homozygotes.

Cependant, le maintien de la même épaisseur oriente vers un processus de distension de paroi, la fragilisant. Ces observations accessibles sur le muscle peuvent contribuer à la compréhension du processus physiopathologique de la drépanocytose dont le pronostic vital est souvent grèvé par la fragilité vasculaire.

## L'expression de répétitions CTG altère le statut redox des myoblastes DM1.

C. Saint-Jean, E. Gasnier, F. Rau, B. Fraysse, G.

Butler-Browne, A. Klein and D. Furling

La dystrophie myotonique de type 1 (DM1) est une maladie autosomique dominante qui affecte plus particulièrement le muscle squelettique avec une myotonie et une atrophie musculaire progressive, le muscle cardiaque et le système nerveux central. La DM1 est causée par une expansion de triplets CTG dans la région 3' non codante du gène *DMPK*. Le nombre de triplets CTG peut atteindre plusieurs milliers chez les patients DM1 alors qu'il est inférieur à 38 chez les individus non atteints. L'expression des ARNs *DMPK* contenant des expansions CUG (ARN-expCUG), qui sont retenus dans le noyau sous forme d'agrégats, apparaît comme un élément central dans le développement de la pathologie. Dans ce travail, nous avons cherché à déterminer si les agrégats nucléaires d'ARN-expCUG étaient à l'origine d'un stress cellulaire. Nos résultats montrent que les myoblastes DM1 isolés de patients DM1 avec de grandes répétitions CTG (>2000) ont un niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) plus élevée que les myoblastes contrôles. L'utilisation d'un modèle cellulaire permettant d'induire de manière conditionnelle l'expression de grandes répétitions CTG nous a permis de démontrer que l'expression d'ARN-expCUG, qui sont des ARN non codants, est à l'origine d'un stress oxydatif dans les myoblastes DM1. L'étude des conséquences de cette augmentation de ROS sur l'arrêt prolifératif précoce des myoblastes DM1 suite à une induction prématuré de p16, est actuellement en cours.

## Prix Master

## Prix 2010

### Microcirculation et croissance musculaire : rôle des péricytes dans la niche des cellules satellites musculaires

E Kostallari, Y Baba-Amer, P Lafuste, R Gherardi  
INSERM U955/E10, IMRB, Créteil

Le muscle squelettique comporte deux types principaux de cellules souches : les cellules satellites (CSm), résidant sous la lame basale de la fibre musculaire à proximité des capillaires sanguins, et les péricytes, localisés dans un dédoublement de la lame basale des capillaires.

Notre objectif vise à définir le rôle des cellules microvasculaires dans la niche des CSM.

Par l'immunohistochimie, nous avons observé un ratio péricytes:cellules endothéliales (CE) très élevé dans le muscle adulte (90%). Chez la souris adulte, 73% des CSM sont situés à proximité d'un péricyte. Lors du développement post-natal, les péricytes initialement éloignés se rapprochent progressivement des CSM, rendant possible une communication paracrine. *In vitro*, les co-cultures et les cultures de fibres isolées en milieux conditionnés montrent que les CE induisent la croissance des CSM alors que les péricytes stimulent leur différenciation. La combinaison de tests ELISA et de stratégies d'inhibition a montré une croissance des CSM CE-dépendante induite par le BMP4 et le PDGF-BB, et une différenciation péricytes-dépendante induite par l'IL6, l'IGF-1, l'IGFBP-3 et l'IGFBP-6. *In vivo*, l'ablation des péricytes entraîne une diminution des CSM quiescentes, dont il reste à déterminer la cause.

Ces résultats montrent que les cellules microvasculaires participent de façon paracrine au comportement des CSM, de la période post-natale jusqu'à l'acquisition de l'homéostasie du tissu musculaire adulte.

## Prix 2011

### AMPK $\alpha$ 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration

Marine Théret, Rémi Mounier

Institut Cochin, U1016, UMR8104, Université Paris Descartes

Macrophages play important roles in the inflammatory process. They participate to the inflammatory response and control the resolution of inflammation. The molecular mechanisms by which macrophages skew from a pro-inflammatory (M1) to an anti-inflammatory (M2) profile are still poorly understood. We describe a novel function of AMPK $\alpha$ 1, a master regulator of energy homeostasis, in the regulation of macrophage skewing that occurs during normal muscle regeneration. We showed that muscle regeneration was delayed and impaired in AMPK $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> mice. *In vivo* loss-of-function and rescue experiments, by using the macrophage specific LysM-Cre;AMPK $\alpha$ 1<sup>fl/fl</sup> mouse and bone marrow transplantation of AMPK $\alpha$ 1<sup>+/+</sup> cells into AMPK $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> recipients, respectively, showed that macrophage AMPK $\alpha$ 1 was required for proper muscle repair. A series of *in vitro* experiments using bone marrow-derived macrophages and cytokinic activation revealed that AMPK $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> macrophages hardly acquired the M2 phenotypes. Their functions were altered, particularly the capability of M2 macrophages to stimulate myogenic precursor cell differentiation was lost in AMPK $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> macrophages. *In vivo*, leukocytes sorted from AMPK $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> regenerating muscle did not acquire the expression of M2 markers during the time course of muscle repair and maintained high expression levels of M1 markers. Finally, in CX3CR1<sup>GFP/+</sup>;AMPK $\alpha$ 1<sup>-/-</sup> muscle, the number of CX3CR1/GFP<sup>hi</sup>LY6C/Gr-1<sup>neg</sup> macrophages (M2phenotype) was decreased compared to WT muscle. These results show that AMPK $\alpha$ 1 is crucial for macrophage skewing from pro- toward anti-inflammatory phenotype during resolution of inflammation and muscle regeneration.

## Candidat 2012

### Etude physiopathologique du rôle de la protéine FAT1 dans la Dystrophie Facio Scapulo Hum  rale.

E Dionnet (1), F Puppo (1), M Krahn (2), M Bartoli(1)

1. INSERM UMR\_910, Aix - Marseille Université, Marseille, France 2. INSERM UMR\_910, Département de Génétique Médicale et de Biologie Cellulaire, Aix - Marseille Université, APHM, Hôpital d'Enfants de la Timone, Marseille, France

La Dystrophie Facio-Scapulo-Humérale (FSHD) est une dystrophie autosomique dominante pour laquelle aucun gène responsable n'a encore pu être identifié. La majorité des patients sont porteurs d'une large délétion d'unités macrosatellites répétées en tandem (D4Z4) localisées en 4q35. Néanmoins, cette contraction de D4Z4 n'est pas retrouvée chez 5% des malades alors répertoriés comme atteints de FSHD2. Notre projet s'est basé sur de récents travaux qui ont montré que, chez des souris hypomorphes pour le gène Fat1, on retrouvait des anomalies phénotypiques similaires à celles observées chez les patients. Par une approche haut-débit chez des patients FSHD2, nous avons identifié des mutations faux-sens dans des domaines cadhérines de FAT1. Nous avons alors mis en place des études structurales afin d'expliquer l'impact qu'elles pourraient avoir sur la structure tridimensionnelle de la protéine. L'objectif est de comprendre comment une modification de structure ou de fonction de FAT1 peut induire des déficiences musculaires et conduire à l'apparition de la Dystrophie Facio Scapulo Humérale. Une des conséquences directe de ces travaux sera de pouvoir développer un test diagnostic fiable qui devrait permettre de détecter l'affection le plus prématurément possible et ainsi apporter les soins préventifs nécessaires aux futurs patients.

## Candidat 2012

### Analyses de profils   pig  netiques dans la dystrophie facio-scapulo-humérale : de la méthylation de l'ADN vers des corrélations génotype-phénotype

Gaillard MC<sup>1</sup>, Brouqsault N<sup>1</sup>, Chaix C<sup>2</sup>, Vovan C<sup>2</sup>, Roche S<sup>1</sup>, Morere J<sup>1</sup>, Lévy N<sup>1,2</sup>, Bernard R<sup>2</sup>, Nguyen K<sup>2</sup>, Magdinier F<sup>1</sup>

1, Laboratoire « Génétique Médicale et G  n  mique Fonctionnelle », UMR S\_910, Aix-Marseille Université, INSERM.   quipe «   pig  netique, Chromatine et Maladies ». Faculté de Médecine de la Timone. Marseille. 2, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Laboratoire de Génétique Médicale, Hôpital de la Timone-enfants, Marseille.

La dystrophie facio-scapulo-humérale (FSHD) est une pathologie autosomique dominante liée dans 95% des cas à la délétion d'un macrosatellite de 3,3 kb situé en 4q35 (D4Z4). Aucun gène candidat n'a pour l'instant été identifié comme responsable de la maladie mais l'existence de patients FSHD2, (sans contraction D4Z4) et de porteurs asymptomatiques suggèrent des changements   pig  netiques tels que la méthylation de l'ADN ou l'organisation 3D du locus.

Pour cela, des analyses quantitatives sur une large cohorte de patients, porteurs asymptomatiques et contrôles au niveau adulte et fœtal ont été réalisées par immunoprécipitation d'ADN méthylé (MeDIP). Ces résultats montrent que les cytosines méthylées sont réparties de façon hétérogène le long de D4Z4 et que les profils de méthylation des patients et des porteurs asymptomatiques présentent des différences en fonction du nombre de répétitions D4Z4. De plus, nous avons mis au point une technique hautement résolvante de peignage moléculaire sur des cellules modèles permettant de visualiser la répartition des cytosines méthylées au niveau de chaque répétition.

Ce projet permettra de caractériser précisément l'implication de D4Z4 et de la méthylation de l'ADN dans la pathologie. Enfin, nos travaux apportent un éclairage nouveau sur la physiopathologie de la FSHD et des perspectives dans l'identification de régulations   pig  netiques.

Mots-clés : FSHD,   pig  netique, chromatine, méthylation de l'ADN, D4Z4.

## Candidat 2012

### Caractérisation fonctionnelle de deux mutations gain-de-fonction dans la sous-unité alpha du canal calcique voltage-dépendant de type L chez *C. elegans*

Viviane Lainé, Jean Rony Ségor, Maëlle Jospin  
CNRS UMR 5534, Université Lyon 1, Villeurbanne, F-69622, France

Le canal calcique voltage-dépendant de type L, ou récepteur aux dihydropyridines (DHPR), joue un rôle fondamental dans le couplage excitation contraction de la cellule musculaire striée. Un dysfonctionnement de ce canal est à l'origine de pathologies congénitales, telles que le syndrome de Timothy ou la paralysie périodique hypokaliémique. Alors que les bases moléculaires de ces mutations sont connues, leurs conséquences sur les propriétés du canal demeurent mal comprises, en raison de la difficulté à exprimer le canal dans des systèmes hétérologues. L'utilisation du modèle *Caenorhabditis elegans* pourrait constituer une approche alternative pour la compréhension de l'effet de ces mutations. En effet, chez *C. elegans* les modalités d'activation du couplage excitation contraction impliquent les mêmes acteurs moléculaires que chez les Vertébrés, et il existe plus de 150 mutations répertoriées dans la sous-unité alpha du DHPR, appelée EGL-19. Parmi ces mutations, seules deux ont été décrites comme des mutations gain-de-fonction, l'une d'elle concernant un résidu aminé modifié chez des patients atteints du syndrome de Timothy. Dans cette étude, en couplant des analyses phénotypiques, de l'imagerie calcique et des enregistrements électrophysiologiques *in situ*, nous montrons que le tonus musculaire élevé de ces mutants est dû à un décalage de la voltage-dépendance vers les potentiels plus négatifs, associé à des défauts d'inactivation du canal.

## Candidat 2012

### Control of muscle mass and strength by glucocorticoids

V Ueberschlag<sup>1</sup>, G Laverny<sup>1</sup>, L Gargowitsch-Poncet<sup>1</sup>, A Ferry<sup>2</sup>, P Chambon<sup>1</sup> and D Metzger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7104, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U964, Université de Strasbourg, Collège de France, Illkirch, France. <sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U974, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 7215, Université Paris Descartes, Paris, France.

Skeletal muscles are dynamic tissues that play an important role in stature, locomotion, and metabolic processes. Muscle weakness is a major health problem, as it increases the occurrence of falls and bone fracture, and can lead to physical dependence.

Many studies have associated muscle atrophy induced by fasting, ageing or diseases with increased circulating glucocorticoid levels. In addition, glucocorticoids (GC), that are widely used for the treatment of inflammatory and auto-immune disorders, induce muscle wasting, thereby limiting their prolonged use. The cellular and molecular mechanisms by which glucocorticoids regulate muscle mass and function remain poorly understood.

GC activity is mainly mediated through the glucocorticoid receptor (GR), a member of the nuclear receptor superfamily. To characterise GR signaling in muscle, we generated mice in which GR is selectively ablated in skeletal muscle myofibers at adulthood. Our results demonstrate that GC-induced muscular atrophy is mediated by myofiber GR that exerts both anti-anabolic and catabolic effects in skeletal muscles. Further analysis of this mouse model will help to unravel the cellular and molecular mechanism of GC-induced muscle atrophy, thus opening new avenues to select GC with increased tissue selectivity, and identify new drug target to combat muscle wasting.

## Candidat 2012

### Rôle de la protéine STOP, stabilisatrice des microtubules dans le muscle : de la molécule à la fonction.

M Sébastien<sup>1</sup>, A Fourest-Lieuvin<sup>1</sup>, B Giannesini<sup>3</sup>, A Osseni<sup>1</sup>, C Bosc<sup>2</sup>, A Schweitzer<sup>2</sup>, A Andrieux<sup>2</sup>, I Marty<sup>1</sup>

1- Equipe Muscle et Pathologies et 2- Equipe Physiopathologie du cytosquelette, Grenoble Institut des Neurosciences, Inserm U836, Grenoble; 3- Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale, UMR CNRS 6612, Marseille

La libération de calcium responsable de la contraction du muscle squelettique est réalisée par un complexe macromoléculaire, situé au niveau des triades, une structure composée d'un tubule-T et de deux citernes terminales du reticulum sarcoplasmique. Nous avons montré récemment qu'au sein de ce complexe, la triadine participerait à la mise en place de l'architecture de la cellule musculaire et jouerait un rôle structural en liant les triades au réseau de microtubules. Les protéines qui stabilisent les microtubules, telle la protéine STOP, ont une fonction essentielle en maintenant la structure interne et en assurant le trafic intracellulaire des cellules très structurées comme les neurones, où elles ont été particulièrement étudiées. Afin de caractériser le rôle que pourrait jouer les microtubules dans la fonction musculaire, et en particulier leur stabilisation par la protéine STOP, nous avons caractérisé le phénotype musculaire de la souris KO pour cette protéine STOP. Nous avons confirmé la présence de la protéine dans les muscles squelettiques de souris, et nous avons pu montrer que l'absence de protéine STOP conduit à une faiblesse musculaire.



## Notes



SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MYOLOGIE

[www.sfmyologie.org](http://www.sfmyologie.org)

**Comité Scientifique:**

C. Desnuelle

G. Bassez

G. Bonne

G. Buttler-Browne

F. Chapon

M. Fardeau

L. Féasson

D. Hantai

N. Koulman

I. Pénisson-Besnier

J. Pouget

F. Rivier

NB. Romero

A. Urtizbera

**Comité local d'organisation:**

J. Fauré

N. Koulmann

E. Lagrange

J. Lunardi

I. Marty