

**Formulaire de stage (sur une page maximum)**  
**Parcours M2 GGBS 2020-21**

**Laboratoire :** Thérapie Génique Translationnelle des Maladies Génétiques

**Intitulé/N° d'équipe :** UMR1089 INSERM

**Nom-Prénom de l'encadrant :** FRAYSSE Bodvaël

**Courriel de l'encadrant :** bodvael.fraysse@univ-nantes.fr

**Titre du stage :** Traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne et de la cardiomyopathie associée par inhibition du canal TRPC3

**Résumé du projet proposé :**

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie héréditaire conduisant à l'absence d'expression de la dystrophine et à la dégénérescence musculaire. Les patients DMD perdent la marche à l'adolescence et survivent rarement au-delà de 40 ans en raison de complications cardio-respiratoires. Des essais cliniques de thérapie génique par rAAV-microdystrophine sont en cours. L'objectif étant de transformer la DMD en une dystrophinopathie moins grave, la dystrophie musculaire de Becker (BMD). Cependant, la BMD reste une maladie dont les patients atteints meurent souvent avant l'âge de 60 ans en raison d'une cardiomyopathie. Dans la BMD et la DMD, la nécrose des cellules musculaires est déclenchée par un influx accru de calcium. Dans les muscles de rat DMDmdx, un modèle animal récent et particulièrement pertinent de DMD, nous avons mesuré une augmentation de l'expression des canaux TRPC3 dans les muscles squelettiques. Nous avons également constaté qu'après un traitement par rAAV-microdystrophine chez des rats DMDmdx, l'afflux de calcium dans les cellules musculaires était réduit mais toujours plus élevé que chez les rats WT. Nous avons conclu que le traitement par rAAV-microdystrophine ne stabilisait pas complètement l'entrée de calcium et que le ciblage de l'influx de calcium en inhibant les canaux TRPC3 pourrait avoir des effets synergiques bénéfiques contre la pathologie.

Après nous être focalisés sur l'expression des canaux TRPC3 dans les muscles squelettiques, nous souhaitons nous intéresser à leur expression dans le muscle cardiaque et aux stratégies d'inhibition de ces canaux. Afin de tester des stratégies thérapeutiques basées sur l'inhibition de TRPC3, nous avons synthétiser des transgènes codant pour le canal wild-type (WT) de rat et pour deux mutants. Un canal TRPC3 fonctionnel est constitué de 4 sous-unités. Les mutants que nous avons sélectionnés sont connus pour s'associer aux formes WT lors de la formation de tétramères, avec pour conséquence l'inhibition du canal. Cette stratégie d'inhibition sera comparée à celle mettant en œuvre l'inhibiteur le plus spécifique connu à ce jour, Pyr-10. Les stratégies d'inhibition moléculaire et pharmacologique seront testées in vitro, lors de ce stage, dans une lignée cellulaire de muscle squelettique de rat (L6), dans laquelle nous avons pu vérifier que TRPC3 s'exprimait.

Le stage proposé consistera en l'utilisation de techniques classiques de western-blot et RT-PCR pour mesurer l'expression génique et protéique des canaux TRPC3 dans des homogénats de cœur de rats DMDmdx prélevés lors d'une précédente campagne d'expérimentation. Ces études pourront être complétées par des expériences d'immunofluorescences sur cardiomyocytes isolés pour préciser la localisation subcellulaire de l'expression des canaux d'intérêt. De plus le stage mettra en œuvre les techniques de culture cellulaire et de transfection in vitro, associées à des mesures de perméabilité de la membrane plasmique au calcium, via l'utilisation de la sonde calcique fluorescente Fura-2 et d'un microscope inversé, de façon à tester les stratégies d'inhibition de TRPC3.