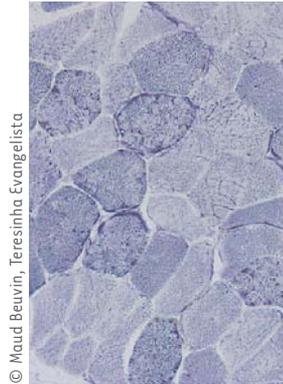


► Les calpainopathies sont des dystrophies musculaires des ceintures héréditaires, le plus souvent avec une transmission autosomique récessive (AR). Des formes autosomiques dominantes (AD) de présentation moins sévère sont de plus en plus rapportées. Les calpainopathies avec mutations autosomiques récessives du gène de la calpaïne 3 (*CAPN3*) sont associées à la dystrophie musculaire des ceintures de type R1 (OMIM 253600) ou LGMD-2A, selon l'ancienne nomenclature. La LGMD-R1 est la plus fréquente de toutes les formes de LGMD, sa prévalence étant estimée entre 10 et 70 cas par million d'habitants. Il existerait ainsi entre 670 et 4 200 patients atteints de LGMD-R1 en France. Les patients présentent une myopathie proximale symétrique et axiale se manifestant entre la première et la deuxième décennie. L'évolution est variable. Le taux de Créatine-Phospho-Kinase sérique est élevé et il n'y a pas d'atteinte cardiaque. Au niveau thérapeutique, la forme autosomique récessive de calpainopathie se prête à des stratégies de remplacement de gène. La viabilité d'un transfert de calpaïne 3 médié par un AAV recombinant a été démontrée dans des modèles animaux et un passage en clinique est attendu dans les prochaines années. En attendant, des études d'histoire naturelle sont nécessaires afin de préparer les futurs essais cliniques. ◀

Les calpainopathies sont dues à des variants pathologiques, bi-alléliques ou mono-alléliques, dans le gène *CAPN3*, celui-ci codant une enzyme protéolytique, la calpaïne 3 [1]. La calpaïne 3 (NP_000061.1 *CAPN3*) est une cystéine protéase non lysosomale de 94-kDa, dépendante du calcium et principalement exprimée dans les muscles squelettiques. Les fonctions de la calpaïne 3, non complètement élucidées à ce jour, sont à la fois protéolytiques et non protéolytiques. Elle joue

Calpainopathies État des lieux et perspectives thérapeutiques

Edoardo Malfatti¹, Isabelle Richard^{2,3}



© Maud Beuvin, Teresinha Evangelista

¹Centre Expert de Pathologie Neuromusculaire, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France et Centre de Référence de Pathologie Neuromusculaire Nord/Est/Île-de-France.

²Généthon, 91000, Évry, France.

³Université Paris-Saclay, Université Évry, Inserm, Généthon, Unité de Recherche Intégrare, UMR_S951, 91000, Évry, France.
edoardo.malfatti@aphp.fr

un rôle dans le maintien de l'intégrité et de la fonction musculaire, en régulant le renouvellement des protéines sarcomériques et en maintenant l'intégrité de la structure des sarcomères [2]. Dans la fibre musculaire, la calpaïne 3 est, du fait de sa liaison avec la titine [3,4], située dans au moins deux régions du sarcomère, la bande I et la ligne M. Le déficit en calpaïne 3 produit des altérations sarcomériques qui finissent par entraîner la mort des fibres musculaires.

Des mutations dans le gène *CAPN3* ont été initialement décrites chez les « Petits Blancs des Hauts » [1,5], une population endogame établie dans l'île française de la Réunion, dans l'Océan Indien. Ce groupe de patients présentait une dystrophie musculaire à début juvénile avec une tendance à marcher sur la pointe des pieds, des difficultés à courir, une *scapula alata*, une démarche dandinante, et une hyperlordose. Parmi les autres caractéristiques, M. Fardeau et collaborateurs avaient noté une faiblesse symétrique des muscles proximaux plus que des muscles distaux des membres, du tronc et de la zone périscapulaire, une laxité des muscles abdominaux, une scoliose et des rétractions tendineuses notamment au niveau des tendons d'Achille. La biopsie musculaire montrait un tableau de nécrose et de régénération avec en plus un aspect lobulé du sarcoplasme des fibres révélé par les techniques oxydatives (Figure 1). Ce tableau, correspondait parfaitement à l'entité clinico-pathologique décrite par Erb en 1884. La dystrophie des ceintures liée à des mutations du gène *CAPN3* a été appelée pendant longtemps « LGMD-2A », en référence à la nomenclature internationale adoptée en 1995 à Naarden, aux Pays-Bas [6]. Plus récemment, elle a été renommée LGMD-R1, en 2017, suite à la révision de la nomenclature intervenue à l'occasion d'un nouveau workshop de l'European Neuromuscular Center (ENMC) [7]. Depuis la découverte du

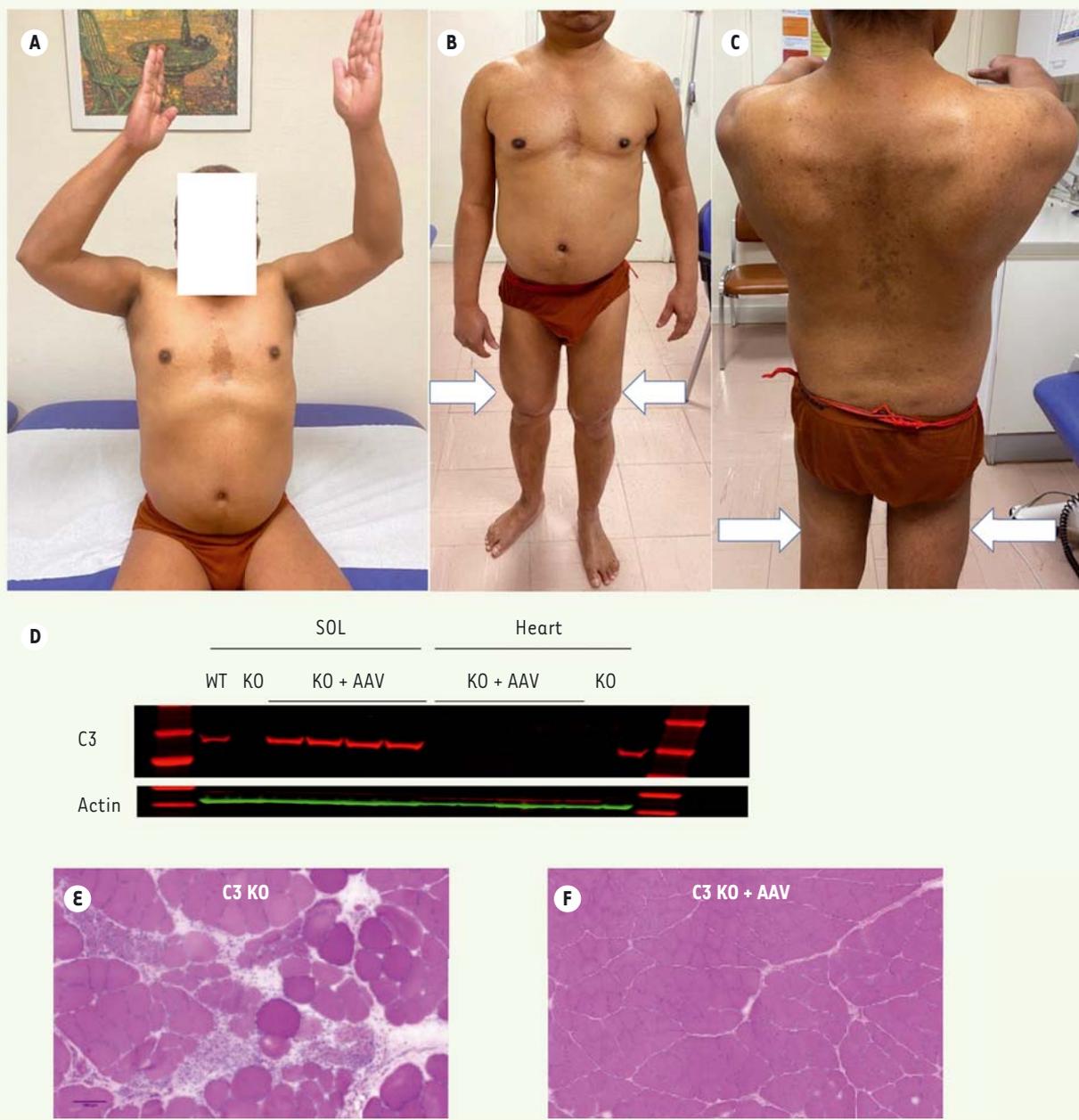


Figure 1. A-C. Tableau clinique d'un patient atteint de LGMD-R1. A. Déficit de l'élévation de bras avec rétropulsion du dos lors de la manœuvre. **B.** Protrusion abdominale en relation avec la faiblesse des muscles abdominaux. Aspect bien galbé de la loge externe de la cuisse (flèches), probablement d'origine compensatoire. **C.** *Scapulae alatae* symétrique. Atrophie de la loge postérieure de la cuisse. **D-F. Démonstration de l'efficacité du transfert de gène de la calpaïne 3 dans un modèle animal. D.** Western-blot montrant l'expression du transgène dans le muscle soléaire et son absence dans le cœur. **E.** Histologie du muscle avant transfert de gène dans un modèle *knock-out* pour la calpaïne 3. **F.** Histologie du muscle après transfert de gène dans le même modèle qui montre une nette amélioration du tableau histopathologique avec absence de fibres en nécrose et de signes de régénération.

gène en 1994, près de 500 variants pathologiques affectant tous les domaines de la protéine ont été répertoriés (www.lovd.nl). Les premières observations de calpaïnopathie autosomique dominante (LGMD-D4) ont été rapportées d'abord chez trente-six patients pro-

venant de dix familles non apparentées, tous portant une délétion de 21 pb (c.643_663del21), récurrente, et en phase. Le phénotype clinique était comparable à celui de la forme autosomique récessive bien que moins



sévère et, dans une certaine mesure, plus asymétrique [8]. La LGMD-D4 a également été décrite dans un groupe de seize patients non apparentés portant une délétion hétérozygote en phase (c.598_621del15) [9]. Plus récemment, des variants faux-sens ont été décrits comme pathologiques dans d'autres familles [10-12].

Les calpainopathies représentent à ce jour la forme la plus fréquente de LGMD, avec une prévalence rapportée de 10 à 70 cas par million d'habitants [13]. En France, il existerait en théorie entre 670 et 4 200 patients atteints d'une LGMD-R1 mais la réalité se situe plus dans la partie basse de la fourchette. Des mutations récurrentes ont été décrites dans certaines populations (Île de La Réunion, Pays Basque, Croatie, Inde, communautés Amish) [13] faisant fortement suspecter l'existence d'effets fondateurs.

Dans l'optique de l'arrivée imminente d'essais cliniques de thérapie génique, la collecte de données sur l'histoire naturelle et la mise en place de registres de patients représentent des étapes préalables primordiales. Dans ce contexte, un groupe d'intérêt labellisé par la filière nationale des maladies neuromusculaires FILNEMUS et consacré aux calpainopathies a vu très récemment le jour.

Clinique

La présentation clinique de la LGMD-R1 est celle d'une dystrophie musculaire progressive avec faiblesse musculaire symétrique prédominant sur les muscles axiaux du tronc et les muscles proximaux des quatre membres. Les patients développent progressivement, au début de l'adolescence le plus souvent, des difficultés pour monter les escaliers, pour courir et se relever de la position assise. S'ensuit une faiblesse axiale des muscles para-vertébraux et des membres supérieurs, avec un déficit de l'élévation des bras (Figure 1A). À l'examen physique, le patient se présente avec un ventre proéminent (Figure 1A), des muscles bien galbés de la loge antérieure des cuisses (Figure 1A), probablement d'origine compensatoire, une hyperlordose, et une *scapula alata* symétrique (Figure 1C). Des rétractions modérées, les plus souvent achilléennes, peuvent apparaître. La marche est dandinante. L'amyotrophie touche d'abord la loge postérieure de la cuisse (Figure 1C) puis la loge des adducteurs. Des douleurs rachidiennes peuvent accompagner ce tableau en cas de déficit musculaire axial marqué (environ 50 % des cas) [10]. La situation de handicap qui découle de ces déficiences a un impact important sur le maintien de la position debout et sur les transferts. La perte de la marche survient en moyenne dans les quinze années qui suivent le début de la maladie [14]. Les CPK sont constamment élevées, sauf à un stade fonctionnel très avancé de la maladie où elles ont tendance à se normaliser. Il n'y a pas d'atteinte cardiaque. Dans une première étude d'histoire naturelle de la LGMD-R1 [14], 11 % des patients présentaient une capacité vitale inférieure à 50 %. Si l'atteinte respiratoire, de type restrictif, est très rarement observée dans la LGMD-R1, il faut néanmoins systématiquement la rechercher.

Même si le tableau clinique est en général très homogène, le déficit en calpaïne peut parfois imiter de nombreuses autres maladies neuromusculaires telles que les myopathies inflammatoires (myosite

à éosinophiles) ou les myopathies métaboliques (la forme tardive de maladie de Pompe en particulier). Des cas bénins de faiblesse musculaire minime et/ou hyperCKémie isolée ont été également décrits [13]. Il est souvent difficile de différencier cliniquement une calpainopathie d'une autre forme de dystrophie musculaire des ceintures tant les phénotypes peuvent être chevauchants.

Le phénotype clinique associé aux formes autosomiques dominantes est très homogène, indépendamment du type de mutation, dans ce cas précis des délétions ou des variants faux sens. Les patients ont une hyperCKémie isolée ou une myopathie proximale et axiale évoluant lentement, avec marche dandinante, *scapula alata* et hyperlordose de début à l'âge adulte. Un certain degré d'asymétrie a été rapporté [8]. Les CPK sont augmentées chez tous les patients, y compris chez les asymptomatiques [12].

Diagnostic

Le diagnostic de certitude des lésions de nécrose/régénération associées à une calpainopathie primitive repose sur l'analyse du gène *CAPN3*. La biopsie musculaire permet en amont de mettre en évidence des lésions de nécrose/régénération associées, dans certains cas, à la présence de fibres lobulées composées de myofibrilles désalignées [15]. Le Western blot de la calpaïne 3 est utile dans le diagnostic de la calpainopathie et hautement spécifique lorsque la protéine est absente ou fortement réduite. Environ deux tiers des individus porteurs de variants pathologiques dans le gène *CAPN3* présentent une perte complète ou une réduction sévère de la protéine calpaïne 3. Les 20 à 30 % restants ont une quantité normale de protéine (mais avec une perte de fonction de celle-ci) [16], ce qui peut induire en erreur. Les résultats des immunoblots de la calpaïne 3 doivent donc être interprétés avec prudence, car l'analyse n'est ni complètement spécifique ni complètement sensible. En outre, les résultats doivent être interprétés en prenant en compte l'expression des autres protéines musculaires et le degré de préservation de l'échantillon étudié. On notera que la diminution du signal de la calpaïne 3 est parfois due à d'autres myopathies (titinopathie, dysferlinopathie), cette diminution étant alors considérée comme un phénomène secondaire.

L'IRM musculaire met souvent en évidence un pattern de substitution fibro-adipeuse très évocateur impliquant principalement, aux membres inférieurs, les adducteurs de hanche et les ischio-jambiers [17]. Les extenseurs de la colonne vertébrale sont plus sévèrement touchés que les rotateurs de la colonne vertébrale, comme en

témoigne l'incidence plus élevée des lordoses, par rapport aux scolioses. L'importance de la substitution fibro-adipeuse musculaire est significativement corrélée avec le type de mutation du gène *CAPN3* : les patients n'ayant en particulier aucun ou un seul allèle nul ont une atteinte plus légère, par rapport à ceux présentant deux allèles nuls (ces allèles prédisant l'absence de la protéine calpaïne 3). L'infiltration grasseuse du muscle est également fortement corrélée avec les évaluations fonctionnelles [17].

Perspectives thérapeutiques

Les déficits en calpaïne 3 sont majoritairement autosomiques récessifs et en rapport avec une perte de fonction de la protéine. Les formes, plus rares, à transmission dominante pourraient également être associées à une perte de fonction. Il reste encore de nombreux points à élucider concernant le rôle exact de cette protéase. L'identification du gène qui la code a déjà ouvert la voie au développement d'une approche thérapeutique par remplacement de gène. À ce jour, et en général, cette stratégie repose pour les maladies neuromusculaires sur un transfert de gène médié par des vecteurs dérivés du virus adéno-associé (AAV).

Une telle approche est en développement à Généthon. Une première preuve de principe a été obtenue en 2006, montrant l'efficacité d'un vecteur AAV1 exprimant la calpaïne 3 sous la dépendance d'un promoteur musculaire spécifique capable de restaurer le phénotype de souris déficientes en calpaïne 3, après injection intramusculaire ou loco-régionale [18]. Cette étude a montré une expression du transgène avec une localisation satisfaisante au niveau des sarcomères, qui s'est accompagnée d'une restauration de l'activité protéolytique, une correction de l'atrophie musculaire ainsi qu'une amélioration de la force. L'injection systémique de ce produit de thérapie génique a toutefois conduit à une cardiotoxicité liée à l'expression ectopique de la calpaïne 3 dans le cœur. Ces difficultés ont conduit à la mise au point et à l'utilisation de vecteurs viraux de seconde génération, ceux-ci permettant de faire disparaître la cardiotoxicité sans pour autant compromettre l'effet thérapeutique dans le muscle squelettique [19]. Ce résultat a été obtenu soit par l'introduction de séquences cibles d'un micro ARN spécifique du muscle cardiaque, le miR208a, au niveau de la cassette d'expression du transgène, soit par l'utilisation de séquences promotrices dérivées du promoteur endogène. Afin de confirmer la bonne tolérance de ce nouveau type de vecteur, une étude pilote de biodistribution et de sécurité a été menée chez le primate non humain, démontrant qu'une injection unique du vecteur était bien tolérée pour une dose correspondant à la dose thérapeutique, avec, en particulier, une absence totale d'effet délétère au niveau cardiaque [20]. Notre équipe s'est aussi attachée à comprendre les mécanismes responsables de la toxicité et a identifié un mécanisme permettant d'expliquer comment l'activité de la calpaïne 3 était régulée dans le muscle squelettique [20]. Une région particulière de la titine, une protéine impliquée dans l'élasticité du muscle à laquelle s'accroche la calpaïne 3, va en effet jouer un rôle inhibiteur de l'activité enzymatique. De façon intéressante, ce mécanisme de régulation semble

différer entre cœur humain et cœur de souris. Fort de ces résultats encourageants, un essai clinique est aujourd'hui en préparation à Généthon. ♦

SUMMARY

Calpainopathies: state of the art and therapeutic perspectives

Calpainopathies are inherited limb-girdle muscular dystrophies, most often following an autosomal recessive (AR) transmission. Autosomal dominant (AD) forms with less severe presentation are increasingly reported. Calpainopathies with autosomal recessive (AR) mutations of the calpain3 gene (*CAPN3*) are associated with limb girdle muscular dystrophy type R1 (LGMD-R1, OMIM 253600) also referred to as LGMD-2A according to the old nomenclature. LGMD-R1 is the commonest form of all LGMDs, with an estimated prevalence of 10 to 70 cases per million inhabitants, that is a cohort of between 670 and 4,200 patients in France theoretically. Patients present a symmetrical proximal axial myopathy manifesting itself between the first and second decade. The clinical course is variable. The level of Creatine-Kinase (CK) is usually high and there is no cardiac involvement. From a therapeutic perspective, the autosomal recessive form of calpainopathy is quite suitable to gene replacement strategies; the viability of recombinant AAV-mediated calpain 3 transfer has been demonstrated in animal models and clinical trials are expected in the coming years. Meanwhile, natural history studies are needed to prepare for future clinical trials. ♦

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Célia Thévenard (Généthon) pour son aide lors de l'écriture du manuscrit.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Richard I, Broux O, Allamand V, et al. Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* 1995 ; 81 : 27-40.
2. Duguez S, Bartoli M, Richard I. Calpain 3: a key regulator of the sarcomere? *FEBS J* 2006 ; 273 : 3427-36.
3. Kinbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K Muscle-specific calpain, p94, interacts with the extreme C-terminal region of connectin, a unique region flanked by two immunoglobulin C2 motifs. *Arch Biochem Biophys* 1997 ; 342 : 99-107.
4. Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, et al. Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 31158-62.
5. Fardeau M, Hillaire D, Mignard C, et al. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain* 1996 ; 119 : 295-308.

RÉFÉRENCES

6. Bushby KM Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC consortium on limb-girdle dystrophies. *Neuromuscul Disord* 1995 ; 5 : 71-4.
7. Straub V, Murphy A, Udd B, group Lws. 229th ENMC international workshop: limb girdle muscular dystrophies. Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscul Disord* 2018 ; 28 : 702-10.
8. Vissing J, Barresi R, Witting N, et al. A heterozygous 21-bp deletion in CAPN3 causes dominantly inherited limb girdle muscular dystrophy. *Brain* 2016 ; 139 : 2154-63.
9. Nallamilli BRR, Chakravorty S, Kesari A, et al. Genetic landscape and novel disease mechanisms from a large LGMD cohort of 4656 patients. *Ann Clin Trans Neurol* 2018 ; 5 : 1574-87.
10. Gonzalez-Mera L, Ravenscroft G, Cabrera-Serrano M, et al. Heterozygous CAPN3 missense variants causing autosomal-dominant calpainopathy in seven unrelated families. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2020 ; Sep 8. doi: 10.1111/nan.12663.
11. Vissing J, Dahlqvist JR, Roudaut C, et al. A single c.1715G>C calpain 3 gene variant causes dominant calpainopathy with loss of calpain 3 expression and activity. *Hum Mutat* 2020 ; 41 : 1507-13.
12. Cerino M, Campana-Salort E, Salvi A, et al. Novel CAPN3 variant associated with an autosomal dominant calpainopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2020 ; 46 : 564-78.
13. Lostal W, Urtizberea JA, Richard I. 233rd ENMC International workshop: clinical trial readiness for calpainopathies, Naarden, The Netherlands, 15-17 September 2017. *Neuromuscul Disord* 2018 ; 28 : 540-9.
14. Richard I, Hogrel JY, Stockholm D, et al. Natural history of LGMD2A for delineating outcome measures in clinical trials. *Ann Clin Trans Neurol* 2016 ; 3 : 248-65.
15. Keira Y, Noguchi S, Kurokawa R, et al. Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling. *Neurosci Res* 2007 ; 57 : 513-21.
16. Milic A, Daniele N, Lochmuller H, et al. A third of LGMD2A biopsies have normal calpain 3 proteolytic activity as determined by an in vitro assay. *Neuromuscul Disord* 2007 ; 17 : 148-56.
17. Barp A, Laforet P, Bello L, et al. European muscle MRI study in limb girdle muscular dystrophy type R1/2A (LGMDR1/LGMD2A). *J Neurol* 2020 ; 267 : 45-56.
18. Bartoli M, Roudaut C, Martin S, et al. Safety and efficacy of AAV-mediated calpain 3 gene transfer in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Mol Ther* 2006 ; 13 : 250-9.
19. Roudaut C, Le Roy F, Suel L, et al. Restriction of calpain3 expression to the skeletal muscle prevents cardiac toxicity and corrects pathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Circulation* 2013 ; 128 : 1094-104.
20. Lostal W, Roudaut C, Faivre M, et al. Titin splicing regulates cardiotoxicity associated with calpain 3 gene therapy for limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Sci Trans Med* 2019 ; 11 (520).

TIRÉS À PART

E. Malfatti



18^{èmes} Journées de la Société Française de Myologie

