



HAL
open science

Effet de l'exercice physique, combiné ou non à une thérapie génique, sur la fonction musculaire de modèles murins de dystrophie musculaire de Duchenne

Alexandra Monceau

► **To cite this version:**

Alexandra Monceau. Effet de l'exercice physique, combiné ou non à une thérapie génique, sur la fonction musculaire de modèles murins de dystrophie musculaire de Duchenne. Physiologie [q-bio.TO]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS172 . tel-03993727

HAL Id: tel-03993727

<https://hal.science/tel-03993727>

Submitted on 2 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

École doctorale Complexité du Vivant (ED 515)

Centre de Recherche en Myologie

Équipe 4 - Repeat Expansions & Myotonic Dystrophy (REDs)

Effet de l'exercice physique, combiné ou non à une thérapie génique, sur la fonction musculaire de modèles murins de dystrophie musculaire de Duchenne

Par **Alexandra Monceau**

Thèse de Doctorat

Dirigée par le **Pr. Arnaud Ferry**

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 30/09/2021

Devant un jury composé de :

Pr. Onnik Agbulut	Président du Jury
Dr. Julien Ochala	Rapporteur
Dr. Amélie Rébillard	Rapporteur
Dr. Athanassia Sotiropoulos	Examineur
Dr. Capucine Trollet	Examineur
Dr. Julien Messéant	Membre invité
Pr. Arnaud Ferry	Directeur de thèse

" Success consists of going
from failure to failure without
loss of enthusiasm."

Winston Churchill

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je souhaiterais remercier mon directeur de thèse, le Pr. Arnaud Ferry, de m'avoir fait découvrir la physiologie de l'exercice lors de mon stage de M1, puis de m'avoir fait confiance par la suite en me prenant en thèse. Je vous remercie énormément pour vos conseils scientifiques, notamment, tout au long de la rédaction de cette thèse. Un grand merci pour votre réactivité quand je n'arrivais pas à accéder à certains articles ou que j'avais besoin d'explications. Pouvoir compter sur votre expérience m'a été d'une grande aide pour pouvoir maîtriser un peu plus chaque jour mon sujet.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse qui m'ont suivi durant ces années : Onnik Agbulut, France Piétri-Rouxel et Emmanuelle Havis. Vos conseils et votre soutien m'ont été très précieux afin de mener à terme ce projet.

Ce travail a été réalisé grâce à plusieurs plateformes et collaborations. J'adresse donc mes remerciements au plateau technique MyoVector pour m'avoir fourni mes constructions AAV. Plus particulièrement, j'aimerais remercier Pierre Meunier pour sa réactivité et son aide pour que je puisse réaliser le dosage de gv. J'en profite également pour remercier Delphine Trochet de m'avoir passé tout le matériel nécessaire à cette manip. Merci à Mégane Lemaitre et Benoit Giroux de l'UMS28 pour les mesures de force. Les journées à l'animalerie passées à vos côtés ont toujours été un plaisir. Je remercie aussi Pierre Joanne, Gaëlle Revet et à nouveau Onnik Agbulut de l'Institut de Biologie Paris-Seine. Merci de m'avoir accueilli à l'IBPS pour m'aider à mettre au point mon protocole d'immunomarquage. Merci pour les anticorps, les primers et d'avoir réalisé l'électrophorèse des MHC. Vous avez rendu ma thèse (et mes IFs) encore plus belle.

Durant ces 3 ans, j'ai eu la chance de travailler au sein des REDs, une grande équipe qui a toujours été là pour me soutenir et me faire avancer techniquement. Alors merci à toute l'équipe. En premier lieu, un grand merci à notre chef d'équipe, Denis Furling, car ta porte a toujours été ouverte pour m'écouter. J'ai apprécié tes nombreux conseils avisés. Merci au « groupe Gourdon », pour votre gentillesse, et d'avoir été là pour me passer un protocole de génotypage en dépannage. Merci à Arnaud Klein et Michel Ney pour votre aide quotidienne, et d'avoir été présent pour répondre à n'importe

quelle question. Merci à Gilles Moulay de m'avoir appris à faire une maxiprep et de me m'avoir donné pleins d'astuces sur Image J. Frédérique Rau, merci pour tes conseils pour le protocole de PCR dystrophine. Merci à Ludovic Arandel de m'avoir appris à injecter les souris. Alain Sureau, un énorme merci pour ton aide et ta patience quand je débarquais dans ton bureau avec des problèmes de biologie moléculaire. J'ai apprécié ta pédagogie et tout le temps que tu m'as accordé. Merci également à Xavière Lornage, tes conseils scientifiques, tes encouragements quotidiens, ton soutien, notamment durant le 1^{er} confinement m'ont énormément touché. Tu as toujours su trouver les mots pour me remotiver quand je n'y arrivais plus toute seule. Je voudrais aussi remercier Dylan Moutachi, qui a eu la gentillesse de me faire mes westerns blots dystrophine. Travailler avec toi pendant un an a été un véritable plaisir. Je te remercie pour ta bonne humeur, ton soutien, et ton aide au quotidien.

J'aimerais aussi remercier mon ancienne équipe de M2, notamment, Julien Messéant, Myriam Boëx et Stéphanie-Godard-Bauché, de m'avoir soutenue pendant mon M2 et ces dernières années. Plus particulièrement, je souhaiterais remercier Julien Messéant de m'avoir formée et préparée à cette thèse. Tu as toujours été pour moi un modèle de ce que doit être un chercheur. Tout au long de mon projet, j'ai essayé d'appliquer au mieux tous les conseils et toute la rigueur que tu m'as apprise.

Merci également à mes collègues et amis Éline, Charles et Saline. Votre amitié a été un moteur durant cette thèse. Je n'oublierai jamais tous ces moments passés à vos côtés, en congrès, en soirée, au cinéma, lors des pique-niques, des dimanches jeu de société et j'en passe. Éline, merci pour ton soutien de chaque jour, j'ai adoré passer mes pauses avec toi au microscope électronique en écoutant du Taylor Swift. Je regrette de ne pas avoir réussi à te convertir à Keen'V et Orelsan mais je sais que nous avons devant nous de longues années d'amitié pour y remédier... Charles je te remercie pour ton humour incroyable. Tu as toujours su trouver le bon mot pour dédramatiser n'importe quelle situation. Je regrette de ne pas partager ta dernière année de thèse, mais tu auras toujours tout mon soutien et je n'ai aucun doute sur ta réussite. Ma chère Saline, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur inconditionnelle. Ne change jamais, le monde serait plus beau avec plus de gens comme toi. Enfin je remercie également, toute « l'Élite de la nation », pour tous ces supers moments avec vous. Vous avez réussi à me faire pique-niquer dehors même quand il faisait moins de 10°, et çà c'est un exploit qui restera dans les annales.

Merci à mes partenaires de bibliothèque, Laure, Pauline et Paul, d'avoir supporté, durant cette dernière année, la grande bavarde que je suis. J'ai apprécié tous nos moments passés ensemble. J'espère que quand vous lèverez la tête devant vos fausses fenêtres vous penserez un petit peu à moi. Je vous souhaite pleins de réussite pour vos thèses respectives.

J'aimerais maintenant remercier mes amies Roxanne et Amélie. Vous êtes non seulement des supers amies mais aussi des modèles de persévérance et de travail. Vous êtes mon inspiration et mon réconfort et tellement d'autres choses qu'il serait trop long de citer. Dans tous les cas, merci d'être à mes côtés depuis tant d'années, de toujours trouver les mots pour me remonter le moral. Roxanne merci d'avoir relu l'intégralité ma thèse, et Amélie pour tous tes conseils scientifiques en immuno et d'avoir pris de mes nouvelles quotidiennement.

Je remercie aussi « mes gens formidables » : Lucie, Dahlia, Ombeline, Lovelyse, Adrien et Quentin. J'apprécie tellement votre amitié depuis tant d'années et je me réjouis chaque jour que nous ne nous soyons pas perdus de vue après le lycée. Je sais que j'ai été peu présente pour vous durant ces trois années de thèse, mais promis je vais me rattraper.

Laura, Pierre et Axel, je ne vous oublie pas, merci pour votre amitié et votre soutien.

Enfin, j'aimerais remercier mes parents. Vous êtes mes piliers, mes soutiens indéfectibles. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussée à me dépasser et à aller le plus loin possible. Merci papa, de m'avoir appris à faire des formules de 3km sur Excel et d'avoir pris le temps d'écouter chaque répétition de présentation. Merci maman d'être restée zen, quand moi je ne l'étais pas. Je vous remercie pour tout. Je vous aime.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	3
TABLES DES MATIÈRES.....	6
TABLE DES FIGURES.....	12
TABLES DES TABLEAUX.....	17
ABSTRACT	19
RÉSUMÉ.....	20
ABBREVIATIONS	21
INTRODUCTION.....	24
I. PRÉAMBULE	25
II. LE MUSCLE SQUELETTIQUE	27
II.1. Introduction	27
II.2. Organisation du muscle squelettique.....	28
II.3. Le sarcomère	29
II.4. La transmission neuromusculaire	30
II.5. Le couplage excitation-contraction	32
II.1. les mécanismes moléculaires de la contraction.....	34
II.2. Les différents modes de contraction musculaire.....	37
II.3. Le costamère et la transmission de la force	39
III. LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE (DMD).....	41
III.1. Généralités.....	41
III.1.1. Quelques rappels historiques	41
III.1.2. Description clinique	42
III.1.3. Pathophysiologie	44
III.2. Le gène <i>DMD</i> et la dystrophine	47
III.2.1. Le gène <i>DMD</i>	47
III.2.2. Structure de la dystrophine <i>Dp427</i>	48
IV. LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE LA DMD	50
IV.1. Introduction	50
IV.2. La souris <i>mdx</i> : modèle classique de la DMD	51
IV.2.1. Introduction.....	51
IV.2.2. Données histopathologiques	52

IV.2.3.	<i>Données cliniques et physiologiques</i>	54
IV.3.	La souris D2-mdx : un modèle sévère de la DMD	56
IV.3.1.	<i>Introduction</i>	56
IV.3.2.	<i>Données histopathologiques</i>	57
IV.3.3.	<i>Données cliniques et physiologiques</i>	58
V.	LES TRAITEMENTS DE LA DMD	60
V.1.	Introduction	60
V.2.	La thérapie génique pour restaurer la dystrophine	60
V.2.1.	<i>Les thérapies en cours de développement</i>	60
V.2.2.	<i>La thérapie cellulaire</i>	61
V.2.3.	<i>L'édition génique</i>	61
V.2.4.	<i>La translecture des codons stop</i>	62
V.2.5.	<i>Le transfert de gène de mini- ou micro-dystrophine</i>	62
V.2.6.	<i>Le saut d'exon</i>	65
V.3.	Les traitements pour diminuer les symptômes cliniques.....	68
V.3.1.	<i>Les principaux traitements symptomatiques à l'étude</i>	68
V.3.2.	<i>Traitements visant à promouvoir des fibres plus lentes et plus oxydatives</i> 70	
VI.	L'EXERCICE PHYSIQUE DANS LA DMD	73
VI.1.	Vers une prescription de l'exercice physique chez les patients atteints de DMD ?	73
VI.2.	Les différents modèles animaux d'exercice chroniques.....	74
VI.2.1.	<i>Introduction</i>	74
VI.2.2.	<i>La course volontaire</i>	75
VI.2.3.	<i>La natation</i>	75
VI.2.4.	<i>Le tapis roulant et le rotarod</i>	76
VI.2.5.	<i>La surcharge mécanique ou « overload » (OVL)</i>	76
VI.2.6.	<i>L'électrostimulation</i>	77
VI.3.	Effet de la course volontaire et de la surcharge mécanique sur le muscle strié squelettique	77
VI.3.1.	<i>Les bienfaits de l'exercice physique chronique chez la souris mdx</i>	77
VI.3.2.	<i>Les bienfaits de l'exercice physique chronique chez la souris D2-mdx</i>	82
VII.	OBJECTIFS EXPÉRIMENTAUX	83

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Effet de l'exercice physique d'endurance chronique, combiné à la surexpression de Prox1, sur la fonction musculaire de souris mdx 85

I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE	86
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	89
II.1. Protocole expérimentale.....	89
II.2. Transfert de Prox1	90
II.3. Mesure de la force Maximale	91
II.4. PCR quantitative en temps réel (réaction en chaîne par polymérase)	92
II.5. Histologie	93
II.6. Électrophorèse SDS-PAGE des isoformes de la chaîne lourde de la myosine (en collaboration avec L'Institut Biologie Paris Seine).....	95
II.7. Analyses statistiques.....	95
III. RÉSULTATS.....	97
III.1. Effet du transfert de Prox1 dans le muscle mdx soumis à un exercice volontaire	97
<i>III.1.1. Le transfert de Prox1 dans le muscle mdx exercé volontairement favorise des caractéristiques contractiles plus lentes</i>	<i>97</i>
<i>III.1.2. Le transfert de Prox1 dans le muscle mdx exercé volontairement diminue encore plus la fragilité musculaire</i>	<i>99</i>
<i>III.1.3. Le transfert de Prox1 dans le muscle mdx exercé volontairement réduit la force maximale isométrique absolue et induit une atrophie musculaire.....</i>	<i>101</i>
III.2. Effet du transfert de Prox1 dans le muscle mdx sédentaire	103
<i>III.2.1. Le transfert de Prox1 dans le muscle mdx sédentaire favorise des caractéristiques contractiles plus lentes mais ne réduit pas la fragilité</i>	<i>103</i>
<i>III.2.2. Le transfert de Prox1 dans le muscle mdx sédentaire réduit également la force maximale isométrique absolue.....</i>	<i>106</i>
IV. DISCUSSION	108
IV.1. Le transfert de Prox1 n'améliore que la fragilité chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire.....	108
IV.2. Le transfert de Prox1 réduit la production de force maximale chez les souris mdx	110
V. CONCLUSION.....	112

Travail expérimentale (Axe 2) - Effet de l'exercice physique d'endurance sur une thérapie génique qui restaure l'expression de la dystrophine113

I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE	114
II. MATÉRIEL ET MÉTHODE	116
II.1. Protocole expérimental.....	116
II.2. Restauration de la dystrophine par thérapie de saut d'exon (en collaboration avec la plateforme MYOVECTOR)	117
II.3. Mesure de force	118
II.4. Histologie & Immunohistochimie	119
II.5. Western Blot Dystrophine.....	120
II.6. Quantification du nombre de génomes vecteurs (gv).....	121
II.7. Extraction d'ARN et quantification du saut d'exon 23	122
II.8. PCR quantitative	123
II.9. Analyses statistiques.....	124
III. RÉSULTATS.....	126
III.1. L'exercice de course volontaire n'induit pas de dommages musculaires chez les souris D2-mdx adultes	126
III.2. L'exercice de course volontaire diminue l'efficacité de la thérapie génique chez les souris D2-mdx adultes.....	130
IV. DISCUSSION	141
V. CONCLUSION.....	145

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 3) - Effet de l'exercice physique chronique mimant un entraînement de résistance sur la fonction musculaire d'un modèle murin sévère de DMD.....146

I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE	147
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	149
II.1. Protocole expérimental.....	149
II.2. Mesure de force	151
II.3. Histologie et Immunohistochimie	151
II.4. Analyses statistiques.....	153
III. RÉSULTATS.....	154
III.1. L'OVL augmente la fonction musculaire chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	154
III.1.1. Force maximale absolue (P0).....	154

III.1.2.	<i>Force maximale spécifique (sP0)</i>	154
III.1.3.	<i>Résistance à la fatigue</i>	154
III.2.	L'exercice de résistance chronique induit une hypertrophie musculaire chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx	156
III.2.1.	<i>Masse musculaire</i>	156
III.2.2.	<i>Nombre de fibres</i>	156
III.2.3.	<i>Diamètre minimum des fibres (min feret)</i>	157
III.3.	L'OVL provoque un remodelage musculaire vers des fibres plus lentes chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	160
III.4.	L'OVL n'augmente pas la MEC ni le pourcentage de fibres centro-nuclées chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	163
III.4.1.	<i>Matrice extracellulaire (MEC)</i>	163
III.4.2.	<i>Fibres centro-nuclées</i>	164
IV.	DISCUSSION	168
IV.1.	La performance musculaire est très améliorée dans un modèle murin sévère de DMD.....	168
IV.1.	L'OVL induit une hypertrophie musculaire dans un modèle murin sévère de DMD	169
IV.2.	L'OVL induit un remodelage musculaire plus important dans un modèle murin sévère de DMD.....	170
IV.3.	L'OVL n'induit pas de dommages musculaires dans un modèle murin sévère de DMD.....	170
V.	CONCLUSION	172
<u>DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES</u>		173
I.	DISCUSSION GÉNÉRALE	174
I.1.	Prox1 améliore la fragilité dans un modèle murin peu sévère de DMD, seulement s'il est combiné à l'exercice physique chronique d'endurance (Axe 1).....	175
I.2.	L'exercice physique chronique d'endurance diminue l'efficacité d'une thérapie visant à exprimer la dystrophine dans un modèle murin sévère de DMD (Axe 2).....	177
I.3.	L'exercice physique chronique de résistance améliore la fonction musculaire dans un modèle murin sévère de DMD (Axe 3)	179
I.4.	Les différents types d'exercice physique chroniques ont des effets variables sur la fonction musculaire (Axes 1, 2 et 3)	180
I.5.	L'exercice physique chronique ne provoque pas de dommages musculaires (Axes 1, 2 et 3)	181

I.6. L'exercice physique chronique provoque un remodelage musculaire (Axes 1, 2 et 3)	181
I.7. L'exercice physique chronique combiné à une thérapie induit des effets variables selon la thérapie génique (Axes 1, 2 et 3).....	183
II. CONCLUSION GÉNÉRALE	185
<i>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	<i>186</i>

TABLE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure I- 1. Photographie du muscle squelettique	27
Figure I- 2: Représentation schématique de l'organisation structurale du muscle strié squelettique	28
Figure I- 3 : Représentation schématique d'une myofibrille.....	30
Figure I- 4 : La transmission neuromusculaire	31
Figure I- 5 : Le couplage excitation-contraction.	33
Figure I- 6 : Repompement du calcium dans le réticulum sarcoplasmique.....	34
Figure I- 7 : Schéma des différentes phases de la contraction musculaire	35
Figure I- 8 : Schéma du nouveau mécanisme proposé de contraction musculaire impliquant un sarcomère à trois filaments (impliquant la titine).....	36
Figure I- 9 : Schéma montrant l'activation du filament épais de myosine par la contrainte mécanique (stress).....	37
Figure I- 10 : Les différents modes de contraction musculaire.....	38
Figure I- 11 : Schéma des protéines qui composent les costamères du muscle squelettique	39
Figure I- 12 : Vue de dos et de profil d'un jeune garçon atteint de « pseudo-hypertrophie.....	41
Figure I- 13 : Récapitulatif des principaux mécanismes physiopathologiques envisagés de la DMD	46
Figure I- 14 : Les différentes dystrophines issues du gène DMD.....	47
Figure I- 15 : Structure schématique de la dystrophine.....	48
Figure I- 16 : Image représentatives de l'histopathologie musculaire de la souris mdx	53
Figure I- 17 : Représentation d'un décrétement de la force observé chez la souris mdx lors de neuf contractions excentriques à 100H	55
Figure I- 18 : Image représentatives de l'histopathologie musculaire de la souris mdx.	57
Figure I- 19 : Principe du saut d'exon	65
Figure I- 20 : Construction de l'AAV-U7dex23	67
Figure I- 22 : Schéma de la voie calcineurine/NFAT.....	72

Figure I- 23 : Photo d'une cage avec roue d'activité	75
Figure I- 24 : Schéma représentatif d'une surcharge mécanique.....	77

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (AXE 1)

Figure A1- 1 : Schéma du protocole expérimental	90
Figure A1- 2: Effet du transfert de <i>Prox1</i> sur l'expression de <i>Prox1</i> et de marqueurs de la spécification du type de fibre chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire (première série d'expériences)	98
Figure A1- 3 : Effet du transfert de <i>Prox1</i> sur la fragilité (susceptibilité aux lésions musculaires) et sur l'expression des gènes qui y sont associés chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire (première série d'expériences)	100
Figure A1- 4 : Effet du transfert de <i>Prox1</i> sur la force maximale absolue (P0) et spécifique (sP0), le poids musculaire et l'expression génétique de marqueurs d'atrophie chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire (première série d'expériences)	102
Figure A1- 5 : Effet du transfert de <i>Prox1</i> sur l'expression de <i>Prox1</i> et des marqueurs de la spécification du type de fibre chez les souris mdx sédentaires (deuxième série d'expériences).....	104
Figure A1- 6 : Effet du transfert de <i>Prox1</i> sur la fragilité (susceptibilité aux lésions musculaires) et l'expression génique associée chez les souris mdx sédentaires (deuxième série d'expériences).....	105
Figure A1- 7 : Effet du transfert de <i>Prox1</i> sur la force maximale absolue (P0) et spécifique (sP0), le poids musculaire et l'expression génique de marqueurs d'atrophie chez des souris mdx sédentaires (deuxième série d'expériences).	106

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (AXE 2)

Figure A2- 1 : Schéma du protocole expérimental.	117
Figure A2- 2: L'exercice de course volontaire ne provoque pas de dommages histologiques musculaires chez des souris adultes D2-mdx	127
Figure A2- 3: L'exercice de course volontaire ne provoque pas de dommage fonctionnel chez des souris adultes D2-mdx.....	128

Figure A2- 4 : L'exercice de course volontaire induit une réduction de la masse musculaire chez des souris adultes D2-mdx	129
Figure A2- 5 : L'exercice de course volontaire induit un remodelage musculaire vers des fibres de type plus rapide chez des souris adultes D2-mdx	130
Figure A2- 6 : L'exercice de course volontaire diminue la réexpression de la dystrophine chez des souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23	132
Figure A2- 7 : La diminution de la restauration en dystrophine semble associée à une baisse de l'exclusion de l'exon 23	133
Figure A2- 8 : L'exercice de course volontaire ne provoque pas de dommages histologiques chez des souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23.	135
Figure A2- 9 : L'exercice de course volontaire ne provoque pas d'augmentation des transcrits Myh3 et Myh8 chez des souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23	136
Figure A2- 10 : L'exercice de course volontaire induit une réduction de la masse musculaire chez de souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23	137
Figure A2- 11 : L'exercice de course volontaire induit une réduction de la masse musculaire chez de souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23.	138
Figure A2- 12 : L'exercice de course volontaire induit un remodelage musculaire vers des fibres de type plus rapide chez des souris adultes D2-mdx D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23	139

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (AXE 3)

Figure A3- 1 : Schéma du protocole expérimental	150
Figure A3- 2 : L'overload améliore la fonction du muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx	155
Figure A3- 3 : L'overload provoque une hypertrophie du muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	156

Figure A3- 4 : L'hypertrophie du muscle plantaris n'est pas causée par une augmentation du nombre de fibres chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	157
Figure A3- 5 : L'hypertrophie du muscle plantaris est causée par une augmentation du diamètre des fibres musculaires chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	158
Figure A3- 6 : L'overload induit une augmentation du diamètre moyen des fibres musculaires exprimant la MHC-1, la MHC-2a et la MHC-2b chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	159
Figure A3- 7 : L'overload induit une augmentation du pourcentage de fibres exprimant MHC-2a dans le muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	161
Figure A3- 8 : L'overload induit une augmentation du pourcentage de fibres exprimant MHC-1 dans le muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	162
Figure A3- 9 : L'overload n'induit pas d'augmentation de la matrice extracellulaire dans le muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx	164
Figure A3- 10 : L'overload n'induit pas une augmentation du pourcentage de fibres centro-nuclées dans le muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx.	165
Figure A3- 11 : L'overload induit une diminution de la distribution du nombre de noyaux centraux par fibres musculaires seulement chez les souris D2-mdx.	166

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Figure Schéma Bilan 1 : Effet de l'exercice physique d'endurance combiné à une thérapie génique visant à améliorer la fonction musculaire d'un modèle murin modéré de DMD	176
Figure Schéma Bilan 2 : Effet de l'exercice physique d'endurance sur une thérapie génique utilisant le saut d'exon pour restaurer la dystrophine, d'un modèle murin sévère de DMD	178

Figure Schéma Bilan 3 : Comparaison des effets d'un exercice de résistance chronique sur les muscles plantaires d'un modèle murin sévère et modéré de DMD180

TABLES DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau I- 1 : Données de la littérature sur la masse musculaire et certains paramètres fonctionnels.....	59
Tableau I- 2 : Efficacité des différents sérotypes AAV dans les principaux tissus	63
Tableau I- 3 : Données de la littérature sur les effets d'U7dex23 sur la fonction musculaire de souris mdx.	68
Tableau I- 4 : Traitements secondaires de la myopathie de Duchenne visant à améliorer les symptômes musculaires.....	70
Tableau I- 5 : Données de la littérature sur les effets de la course volontaire sur la fonction et la masse musculaire de souris mdx	79
Tableau I- 6 : : Données de la littérature sur les effets de l'OVL sur la fonction et la masse musculaire de souris mdx.	81

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (AXE 1)

Tableau A1- 1 : Séquences des amorces utilisées	93
Tableau A1- 2 : Liste des anticorps utilisés	94

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (AXE 2)

Tableau A2- 1. Liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages.....	119
Tableau A2- 2. Liste des anticorps utilisés pour le western blot.....	121
Tableau A2- 3. Amorces et sondes utilisées pour le dosage du nombre de vg	122
Tableau A2- 4. Programmes utilisés sur le LightCycler	122
Tableau A2- 5. Amorces pour la détection de l'exon 23	123
Tableau A2- 6. Programme d'amplification de l'exon 23 (exon 20 à 26)	123
Tableau A2- 7. Programme qPCR.....	124
Tableau A2- 8. Séquences d'amorces utilisées pour les qPCR.....	124

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (AXE 3)

Tableau A3- 1 : Liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages152

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Tableau Bilan 1 : Effets des différents types d'exercices chroniques (endurance et résistance) sur la fonction musculaire, les dommages musculaires et le remodelage musculaire dans des modèles murins plus ou moins sévères de DMD.183

Tableau Bilan 2 : Effets de la combinaison des différents types d'exercices (endurance et résistance) à différentes thérapies géniques (Prox1 et U7dex23) sur la fonction musculaire, les dommages musculaires et le remodelage musculaire dans des modèles murins plus ou moins sévères de DMD.....184

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disease caused by mutations in the DMD gene encoding dystrophin, a protein essential for the integrity of the skeletal muscle fiber. Its absence causes increased muscle fragility during intense contractions, and extreme muscle weakness (loss of maximal strength...). Currently, there is no curative treatment, but the use of several combined therapeutic approaches seems promising. In this thesis, we tested the idea that regular physical activity could be a way to decrease dystrophic symptoms of skeletal muscle, especially those related to muscle function, in mice models of DMD.

First, we evaluated the effect of chronic endurance exercise when combined with overexpression of Prox1, a transcription factor known to promote slower fibers in healthy muscle, which are described as less affected in DMD. We demonstrated that this combination allowed to decrease muscle fragility in mdx mice, the classical mouse model of DMD, and thus had the potential to stop the progression of the disease, which was not the case with a symptomatic approach alone. Subsequently, we were interested in the effect of chronic endurance exercise when combined with gene therapy, which restores dystrophin expression, in D2-mdx mouse, a severe model of DMD. We showed that chronic endurance exercise decreased the efficiency of the gene therapy, by decreasing the restoration of dystrophin. Finally, we characterized the effects of chronic resistance exercise in D2-mdx mice. Our results indicate an incredibly significant improvement in muscle function in response to mechanical overload, without obvious muscle damage in this severe model.

In conclusion, the results of this thesis contribute to a better understanding of the varied and complex effects of different types of chronic physical exercise in different mice models of DMD, and should provide new options for improving DMD treatments, considering physical activity.

RÉSUMÉ

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie neuromusculaire causée par des mutations du gène DMD codant la dystrophine, une protéine essentielle à l'intégrité de la fibre du muscle squelettique. Son absence engendre une fragilité musculaire accrue lors de contractions intenses, ainsi qu'une faiblesse musculaire extrême (perte de force maximale...). À ce jour, il n'existe pas encore de traitement curatif, mais l'utilisation de plusieurs approches thérapeutiques combinées semble prometteuse. Dans cette thèse, nous avons testé l'idée que l'activité physique régulière pourrait être un moyen de diminuer les symptômes dystrophiques du muscle squelettique, notamment ceux en relation avec la fonction musculaire, dans des modèles murins de DMD.

Tout d'abord, nous avons évalué l'effet d'un exercice physique chronique d'endurance lorsqu'il est associé à la surexpression de Prox1, un facteur de transcription connu pour favoriser des fibres plus lentes dans un muscle sain, celles-ci étant décrites comme moins atteintes dans la DMD. Nous avons mis en évidence que cette combinaison permettait de diminuer la fragilité musculaire, chez la souris mdx, le modèle murin classique de la DMD, et avait donc le potentiel d'arrêter la progression de la pathologie, ce qui n'était pas le cas avec une approche symptomatique seule. Par la suite, nous avons regardé l'effet de l'exercice physique chronique d'endurance lorsqu'il est combiné à une thérapie génique, qui restaure l'expression de la dystrophine, chez la souris D2-mdx, un modèle sévère de DMD. Nous avons montré que l'exercice chronique d'endurance diminuait l'efficacité de la thérapie génique, en diminuant la restauration de la dystrophine. Enfin, nous avons caractérisé les effets de l'exercice physique chronique de résistance chez la souris D2-mdx. Nos résultats indiquent une amélioration très importante de la fonction musculaire en réponse à la surcharge mécanique, sans dommages musculaires évidents dans ce modèle sévère.

En conclusion, les résultats de cette thèse contribuent à une meilleure connaissance des effets variés et complexes des différents types d'exercice physiques chroniques dans différents modèles murins de DMD, et devraient donner des pistes pour améliorer les traitements de la DMD, en prenant en compte l'activité physique

ABBREVIATIONS

-A-

AAV - Adéno-associated virus
Ach - Acétylcholine
ABD - Actin Binding Domain
ADP - Adénosine Diphosphate
ADN - Acide Déoxyribonucléique
ADNc - Acide Déoxyribonucléique complémentaire
AMPK - AMP-activated Protein Kinase
AON - Oligonucléotides Antisens
ARNm - ARN messenger
ATP - Adénosine Triphosphate

-B-

BMD - Dystrophie musculaire de Becker
BSA – Bovin Serum Albumin

-C-

Ca²⁺ - Calcium
Cacna1 - Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 A
Chrna1 - Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 1 Subunit
CK - Creatine Kinase
CPAD - Complexe de protéines associées à la dystrophine
Cn - Calcineurine
CsA - Cyclosporine A
CT - Carboxy-terminal

Cv - Chimical Variant

-D-

DAPI - 4,6-diamidino-2-phénylindole
Des - Desmine
DGC - Dystroglycane complex
DHRP - Récepteur à la dihydropyridine
DKO - Double Knock-Out
DMD - Dystrophie musculaire de Duchenne

-E-

EDL - Extenseur des doigts longs
ERR γ - Estrogen-Related Receptor Gamma

-F-

Fst - Follistatine

Fn14 - Fibroblast growth factor-inducible-14

-G-

Gadd45 - Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha
GAS - Gastrocnémien
GRMD - Golden Retriever Muscular Dystrophy
GV - Génome vecteur

-H-

Hdac4 - *Histone Deacetylase 4*

Hmbs - Hydroxymethylbilane Synthase

-I-

IGF1 - Insulin-like Growth Factor 1

IP - Intrapéritonéale

iPSC - Cellules souches pluripotentes induites

ITR - *Inverted Terminal repeats*

-J-

JNM - Jonctions neuromusculaire

-L-

Lc3 – ou **MAP1LC3A** pour *Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha*

-M-

MEC - Matrice extracellulaire

MHC - *Myosin Heavy Chain*

MLC - *Myosin Light Chain*

MSTN – Myostatine

-N-

NADPH - Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NFAT - *Nuclear factor of activated T-cells*

NO - Oxyde nitrique

nNOS - Isoforme neuronale de la NO synthase

-O-

2'OMePS - 2'-O-methyl-phosphorothioate

ORF - *Open reading Frame*

OVL – *Overload*

-P-

P47phox – ou NCF1 pour Neutrophil Cytosolic Factor 1

P0 - Force maximale absolue

PrxII - *Glutathione-dependent peroxidase*

PGC1 - *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1*

PL - Plantaris

PMO - *Phosphorodiamidate Morpholino Oligo*

-R-

Rac1 - *Rac Family Small GTPase 1*

RACH - Récepteur à l'acétylcholine

Redd 1 et 2 - Regulated in development and DNA Damage responses 1 or 2

Rip0 – Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0

RS - Réticulum sarcoplasmique

RyR - Récepteur à la ryanodine

-S-

SCt – *Shawnn Cell Terminal*

Scn4a - *Sodium Voltage-Gated*

SDH - Succinate
déshydrogénase *Channel Alpha*
Subunit 4

Sdha - *Succinate*
Dehydrogenase Complex Flavoprotein
Subunit A

SERCA - *Sarcoplasmic or Endoplasmic*
Reticulum Ca²⁺ ATPase

SIRT1 - *Silent Information Regulator 1*

Slc8a1 - *Solute Carrier Family 8*
Member A1

Smox - *Spermine Oxidase*

SNC - *Système Nerveux Central*

snRNA - *small nuclear RNA*

snRNP - small nuclear
Ribonucleoprotein

sP0 - *Force maximale spécifique*

SOL - *Soléaire*

SVF - *Sérum de veau foetal*

-W-

WT - *Wild Type*

-T-

TA - *Tibial antérieur*

TGF-β - *Transforming growth factors β*

Tnni1 – *Troponine 1*

TRPC - *Transient receptor potential*
canonical

-U-

Utrn – *Utrophine*

INTRODUCTION

I. PRÉAMBULE

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou myopathie de Duchenne est une maladie génétique liée au chromosome X, provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme, et est à l'origine, notamment, d'une perte dramatique de la fonction musculaire du muscle squelettique. Son origine provient de mutations du gène DMD, responsable de la production de dystrophine, une protéine essentielle à l'intégrité de la fibre musculaire.

De nombreux traitements symptomatiques pour améliorer la fonction musculaire ainsi que thérapies géniques visant directement à restaurer la dystrophine paraissent très prometteurs. Malheureusement, aucune de ces approches n'a le potentiel à ce jour de guérir complètement les patients. C'est pourquoi, une approche thérapeutique combinatoire (deux traitements en même temps) semble inévitable dans la prise en charge de la DMD.

Depuis plusieurs années, l'idée d'utiliser l'exercice physique chronique comme traitement de la DMD progresse, bien qu'il reste encore quelques craintes que l'exercice exacerbe davantage la pathologie. Néanmoins, l'exercice est connu pour améliorer l'ensemble des fonctions de l'organisme chez le sujet sain, ce qui fait de lui une thérapie potentielle particulièrement intéressante dans le cadre d'une maladie multi-systémique comme la DMD.

On commence à mieux connaître les effets de l'exercice physique chronique dans la DMD, notamment dans le cas de l'exercice physique chronique d'endurance. Toutefois, les effets de l'association de l'exercice physique chronique aux différentes approches thérapeutiques développées en clinique et pré-clinique ne sont quasiment pas connus. Lors de ma thèse, j'ai donc entrepris d'étudier, sur la base de modèles murins de DMD, dans quelle mesure un exercice physique chronique d'endurance pouvait affecter, d'une part, les effets fonctionnels d'une thérapie génique visant à combattre les symptômes (axe 1), et d'autre part, une thérapie génique ciblant la restauration de la dystrophine (axe 2). Par ailleurs, dans une dernière étude (axe 3), je me suis intéressée aux effets de l'exercice physique chronique de résistance (musculature, force-vitesse...), afin de déterminer si cette modalité d'exercice intense pouvait être associée dans le futur à une thérapie génique visant soit à combattre les

INTRODUCTION - Préambule

symptômes soit à restaurer l'expression de la dystrophine. Dans le cadre de cette thèse, le travail expérimental correspond donc à trois séries d'études pré-cliniques qui se sont basées sur l'utilisation de modèles murins plus ou moins sévères de DMD. A ce titre, notre intérêt a été focalisé sur l'étude des effets de ces différents traitements (exercice chronique combiné ou non à une thérapie génique) sur la fonction musculaire du muscle squelettique.

Afin d'introduire le travail expérimental de cette thèse, ma revue de synthèse se divise en cinq parties, qui font un état de l'art sur le muscle squelettique, la dystrophie musculaire de Duchenne, ses modèles murins, les différents traitements thérapeutiques développés au stade pré-clinique dont l'exercice physique chronique.

Cette partie sera suivie de la présentation détaillée des objectifs expérimentaux.

II. LE MUSCLE SQUELETTIQUE

II.1. INTRODUCTION

Le tissu musculaire se divise en trois types de muscles : squelettique, cardiaque et lisse. Les muscles lisses, qui entourent par exemple les bronches, la vessie et les vaisseaux sanguins, se contractent lentement et indépendamment de la volonté, sous le contrôle du système nerveux autonome. Le muscle cardiaque est un muscle strié qui a la capacité de se contracter rythmiquement en absence d'innervation, bien qu'il puisse être modulé par le système nerveux autonome (Ganong and Jobin, 2012). Les muscles squelettiques (biceps, quadriceps, diaphragme etc...) possèdent aussi des stries transversales bien marquées et représentent 40% de la masse corporelle (Frontera and Ochala, 2015). Ils permettent d'assurer des fonctions respiratoires et locomotrices mais aussi de maintien de la posture. Contrairement au muscle lisse, leur activation est généralement placée sous le contrôle de la volonté (Ganong and Jobin, 2012). Le muscle squelettique est composé de cellules multinucléées (**Figure I-1**) appelées fibres musculaires.

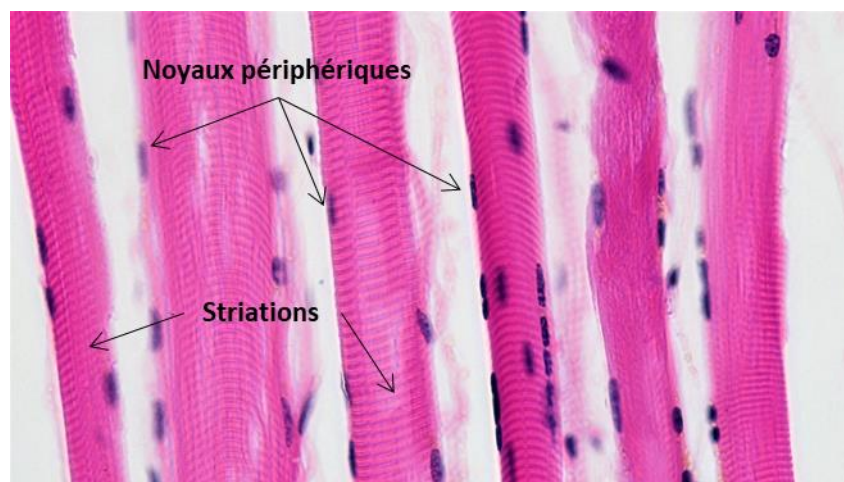


Figure I- 1. Photographie du muscle squelettique. (Image adaptée de Berkshire Community College Bioscience Image Library). Les cellules musculaires présentent des striations visibles en microscopie à contraste de phase, ainsi que des noyaux périphériques. Grossissement x200.

La fonction de ces fibres musculaires est de produire de la force au niveau du tendon du muscle qui permet de mobiliser un segment du corps, le maintenir dans une position statique ou encore de freiner le mouvement de ce segment. Dans certaines conditions, cette production de force par le muscle conduit à son propre raccourcissement ou à

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

celui du muscle antagoniste. Une autre caractéristique fonctionnelle importante des fibres musculaires est la résistance à la fatigue. L'activité physique chronique ou l'inactivité sont connues pour moduler ces différentes fonctions. Nous verrons par la suite que c'est également le cas des maladies neuromusculaires, comme la DMD.

II.2. ORGANISATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE

Les muscles squelettiques sont rattachés aux os grâce aux tendons présents à chaque extrémité des muscles. Lorsque les fibres musculaires génèrent des forces longitudinales et transversales, celles-ci sont transmises au tendon *via* la matrice extracellulaire (MEC). La MEC qui entoure chaque fibre musculaire forme l'endomysium, un tissu conjonctif liant les fibres adjacentes et soutenant le réseau capillaire du muscle. Le périmysium, un tissu conjonctif plus épais assemble les différentes fibres musculaires en faisceaux de fibres musculaires. L'ensemble de ces faisceaux sont maintenus et recouverts par un tissu conjonctif encore plus dense, l'épimysium, qui est en continuité avec la couche externe du tendon (**Figure I-2**) (Hopkins, 2006).

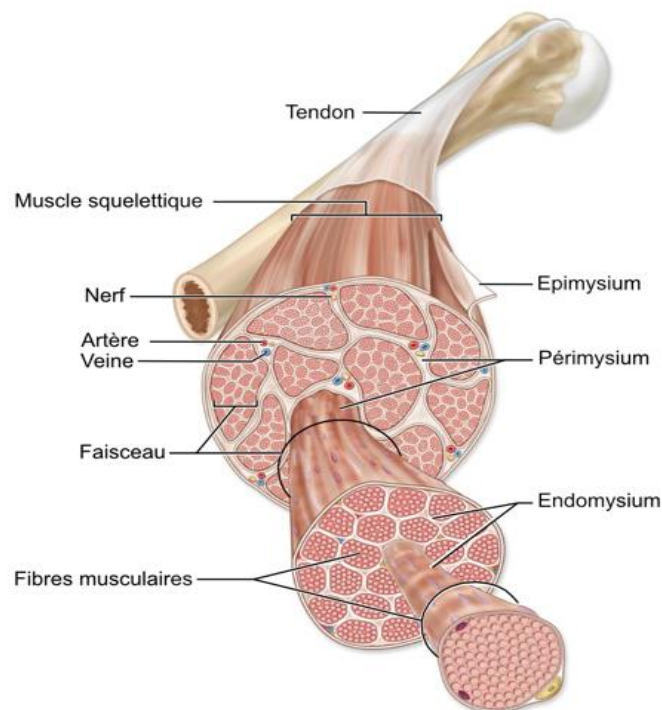


Figure I- 2: Représentation schématique de l'organisation structurale du muscle strié squelettique. (Adapté de Pearson Education)

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

Les muscles striés squelettiques sont composés de fibres musculaires dont il existe deux types. D'une part, les fibres de type I ou fibres rouges, sont des fibres oxydatives, qui possèdent un métabolisme oxydatif important, une vitesse de raccourcissement et une puissance maximale faibles, et qui sont résistantes à la fatigue. Ces fibres sont présentes majoritairement au sein des muscles posturaux. D'autre part, les fibres de type II ou fibres blanches, sont des fibres avec un métabolisme oxydatif moins important. Elles possèdent une vitesse de raccourcissement et une puissance maximale importantes, mais ont également une faible résistance à la fatigue. Les fibres II se subdivisent en fibres 2a, 2x et 2b. Chez l'homme, l'activité physique chronique, ou l'inactivité, module la proportion de chaque type de fibres. Si chez des muscles de sujets sédentaires la proportion de fibres de type I et II est similaire, chez le sportif d'endurance, la proportion de fibres de type I est plus importante (Wilson et al., 2012). L'entraînement en force-vitesse (musculature, résistance) module également la proportion des différents types de fibres (Ferry, 1999).

En outre, chaque fibre musculaire contient de nombreux noyaux généralement dispersés à la périphérie de la cellule. Les fibres musculaires sont entourées d'une membrane cellulaire, appelée le sarcolemme, et renferment dans leur cytoplasme (sarcoplasme) des myofibrilles.

II.3. LE SARCOMÈRE

L'élément constitutif de base des myofibrilles est le sarcomère. La répétition de cette structure filamentaire régulière, tout au long de la myofibrille, est responsable de cet aspect strié observable au microscope. Chaque sarcomère est délimité par deux stries (disques) Z et est composé de filaments fins d'actine, de filaments épais de myosine ainsi que de filaments élastiques de titine, dont l'ensemble forme la machinerie contractile du muscle squelettique (**Figure I-3**) (Ganong and Jobin, 2012; Rivas-Pardo et al., 2016).

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

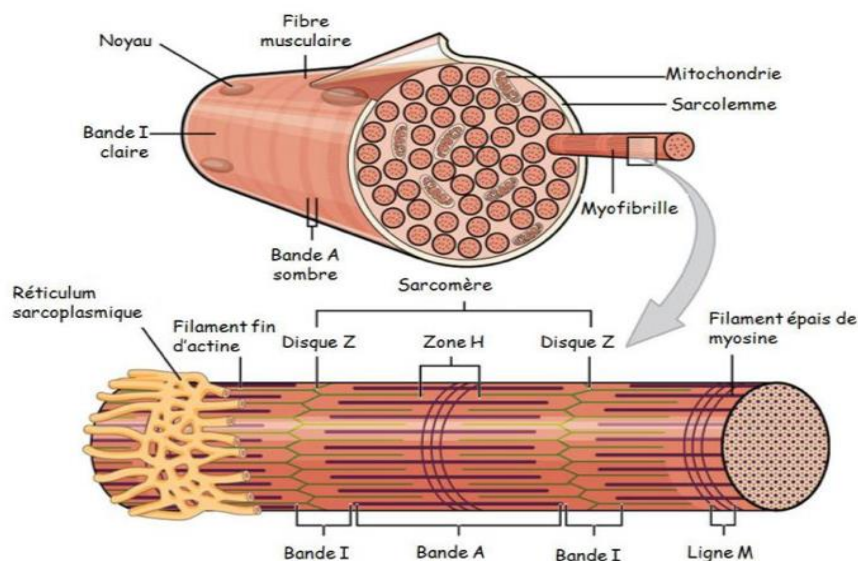


Figure I- 3 : Représentation schématique d'une myofibrille. (Adapté de open oregonstate education).

De nombreuses autres protéines telles la nébuline et l' α -actinine composent le disque Z (Faulkner et al., 2001). Les filaments fins d'actines s'étendent de part et d'autre des disques Z et forment des bandes claires aussi appelées bande I (pour isotropique). Une bande A (pour anisotropique) vient ensuite et est formée de filaments fins et épais. Au milieu de celle-ci se trouve une région appelée la zone H, qui possède en son centre une ligne M (**Figure I-3**). La ligne M a pour fonction d'ancrer les chaînes perpendiculaires de myosine, qui sont maintenues en faisceaux notamment grâce à la myoméline (Obermann and al., 1996).

La formation de ponts entre les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine, associée à l'action d'un troisième filament (Cf. II.I), est à l'origine de la contraction musculaire.

II.4. LA TRANSMISSION NEUROMUSCULAIRE

Pour permettre la contraction musculaire, la commande motrice est envoyée aux muscles depuis le cerveau par des motoneurones provenant de la corne antérieure de la moelle épinière (Slater, 2017). L'axone moteur se ramifie pour innover plusieurs fibres musculaires et former l'unité motrice (Hudson et al., 2019).

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

L'influx nerveux arrive au niveau de zones de contacts très spécialisées appelées jonctions neuromusculaires (JNM). La JNM est une synapse chimique qui se forme entre la terminaison d'un axone moteur et sa cible striée squelettique et est couverte par une cellule de Schwann terminale (SCt) (Li et al., 2018).

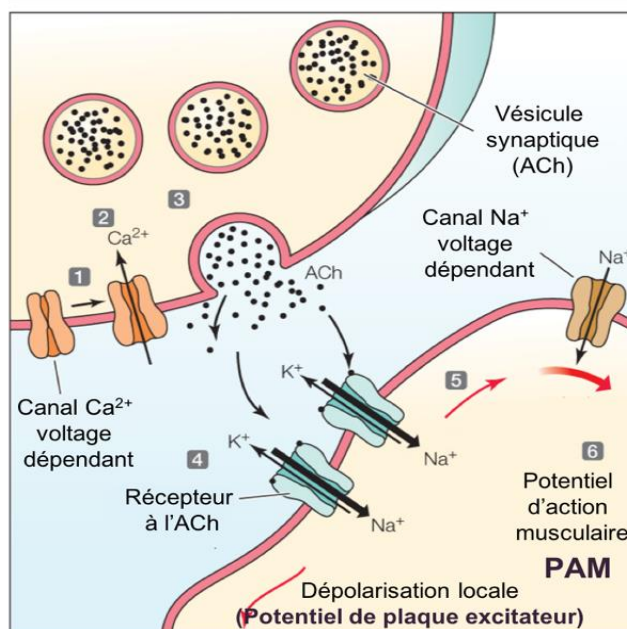


Figure I- 4 : La transmission neuromusculaire. (Adapté de open Pearson Education).

Lorsque le potentiel d'action nerveux arrive à l'extrémité du motoneurone, la membrane du motoneurone se dépolarise, induisant l'ouverture de canaux calciques voltages-dépendants (**Figure I-4 [1]**). Le flux de calcium à l'intérieur de la terminaison axonale déclenche une augmentation marquée de l'exocytose des vésicules contenant le neurotransmetteur acétylcholine (ACh) (**Figure I-4 [2-3]**). L'ACh diffuse alors dans la fente synaptique et se lie à des récepteurs spécifiques (récepteurs nicotiques à l'acétylcholine, RACH) situés au sommet des replis jonctionnels de la membrane post synaptique (**Figure I-4 [4]**). La conductance de la membrane pour le Na^+ et le K^+ est amplifiée lors de la liaison de l'acétylcholine à ses récepteurs. Le flux d'ions sodium entrant dans la fibre musculaire produit une dépolarisation locale de la membrane, appelé potentiel de plaque motrice (**Figure I-4 [5]**). Une fois que ce potentiel de plaque motrice atteint une valeur seuil, il induit l'ouverture de canaux sodium voltage-dépendants situés au fond des replis jonctionnels générant ainsi un potentiel d'action musculaire (PAM). (**Figure I-4 [6]**), qui se propage le long du sarcolemme dans les deux sens de la fibre musculaire (Ganong et al., 2012; Kuo and Ehrlich, 2015).

II.5. LE COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION

Le couplage excitation-contraction est le processus grâce auquel la dépolarisation de la fibre musculaire déclenche la formation de ponts d'actine-myosine (**Figure I-5A**) (Hopkins, 2006). Ce couplage se déroule au niveau de structures appelées « triades », composées de tubules T (fines invaginations tubulaires réparties le long du sarcolemme) accolés de chaque côté à une citerne terminale du réticulum sarcoplasmique (RS).

Lorsque le potentiel d'action musculaire se propage dans un tubule T, la dépolarisation de la membrane des tubules T induit une libération d'ions calcium du RS vers le sarcoplasme de la fibre musculaire. Cette libération d'ions calcium s'effectue grâce à l'intervention de deux types de canaux : (i) le récepteur à la dihydropyridine (DHRP), situé au niveau de la membrane du tubule T. (ii) le récepteur à la ryanodine (RyR), situé au niveau de la citerne terminale du RS.

Le récepteur à la dihydropyridine (DHRP) est un canal calcique voltage dépendant, présent en abondance au niveau des tubules-T des muscles striés cardiaques et squelettiques qui permet de réguler les flux de calcium à travers la membrane plasmique (Fosset et al., 1983). Le récepteur à la ryanodine (RyR) est, quant à lui, un canal calcique géant (Takeshima et al., 1994), possédant une haute affinité pour la ryanodine (Franzini-Armstrong and Protasi, 1997). Sa forte conductance permet des sorties rapides du calcium. Le récepteur à la ryanodine existe sous trois isoformes : RyR1, RyR2 et RyR3. RyR1 est la première isoforme décrite et celle exprimée majoritairement dans le muscle squelettique. Elle participe au couplage-excitation-contraction grâce à son association avec le DHRP (Franzini-Armstrong and Protasi, 1997).

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

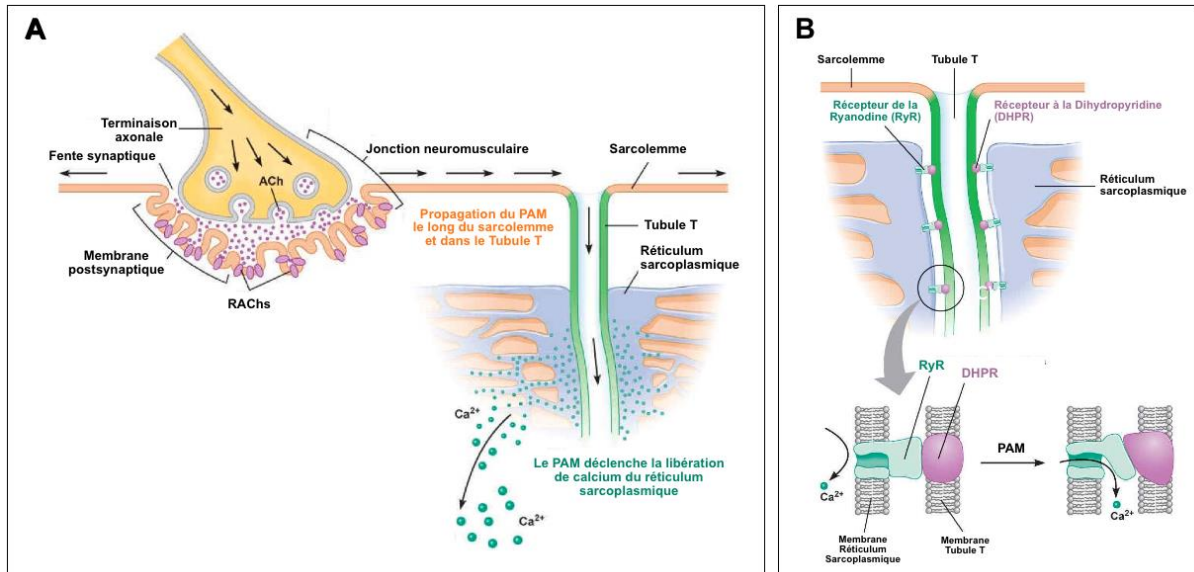


Figure I- 5 : Le couplage excitation-contraction. (Adapté de open Pearson Education). (A) La propagation du potentiel d'action musculaire (PAM) dans le tubule T déclenche une augmentation du calcium intracytosolique à l'origine de la contraction musculaire. (B) Le PAM induit un changement de conformation des récepteurs à la dihydropyridine (DHRP), qui vont permettre une libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol via les récepteurs à Ryanodine (RyR).

Lors de la dépolarisation de la membrane des tubules T, les récepteurs à la DHRP subissent une modification conformationnelle provoquant une libération de Ca^{2+} depuis le RS par le biais d'interactions physiques avec des RyR1 (**Figure I-5B**). Par ailleurs, des RyR1 non couplés à la DHRP auraient comme rôle d'amplifier le relâchement de calcium (Gao et al., 2000; Zalk et al., 2015), ou de constituer une réserve de canaux en cas de besoin de couplages excitation-contraction supplémentaires (Ríos et al., 2019).

L'augmentation de la concentration calcique à proximité des éléments contractiles de la cellule musculaire permet d'initier la formation des ponts d'actine-myosine. À la fin d'une contraction, le calcium est repompé activement via une pompe ATP (Adénosine Triphosphate) dépendante appelée SERCA (pour *sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*) (**Figure I-6**). Cette pompe utilise l'hydrolyse de l'ATP pour renvoyer le calcium dans les citernes terminales du RS, où il y est stocké jusqu'à la prochaine contraction (Hopkins, 2006).

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

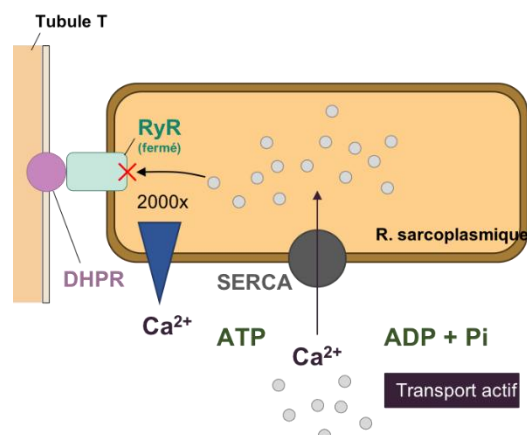


Figure I- 6 : Repompage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique. (Communication personnelle de J. Messéant, DU myologie).

II.1. LES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA CONTRACTION

De façon classique, la production de force et le raccourcissement du sarcomère repose sur la formation des ponts entre le filament fin d'actine et le filament épais de myosine. La fixation des têtes de myosines, qui se lient et se détachent successivement des sites du filament d'actine, en se couvant au niveau de la jonction de la tête et du col, donnent ainsi l'impression qu'elles « marchent » sur le filament d'actine. Ce déplacement de la tête de myosine sur l'actine dépend de l'hydrolyse simultanée d'ATP (Adénosine triphosphate).

Dans le muscle au repos, les sites de fixation des têtes de myosine à l'actine sont masquées par un complexe de protéines régulatrices associées aux filaments fins d'actine composé de la tropomyosine et de la troponine-I. Par ailleurs au repos, la tête de la myosine est étroitement associée à une molécule ADP (Adénosine diphosphate) (Hopkins, 2006). Lors de la libération de Ca²⁺ dans le cytosol à la suite d'un potentiel d'action musculaire, le Ca²⁺ libre s'associe à la troponine C, provoquant un affaiblissement de l'interaction entre la troponine-I et l'actine, et libérant ainsi le site de liaison de l'actine à la myosine pour permettre la formation de ponts transversaux actine-myosine. C'est étape correspond l'activation du filament fin par le calcium. La formation de ces ponts libère l'ADP et entraîne un changement conformationnel des têtes de myosine, qui permet le déplacement des filaments fins sur les filaments épais provoquant le raccourcissement du sarcomère et la production de force (Ganong and Jobin, 2012). Néanmoins, le raccourcissement du sarcomère nécessite de multiples cycles d'interaction actine-myosine, et pour y parvenir de l'ATP est nécessaire. Le

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

changement de conformation inhérent au pivotement de la tête de la myosine favorise la substitution de l'ATP à l'ADP sur la tête de la myosine, qui possède une activité ATPase portée par les chaînes lourdes de la myosine. L'énergie libérée par cette activité enzymatique est suffisante pour « casser » les liaisons actine-myosine, ramenant la myosine à sa forme de repos liée à l'ADP et au phosphate inorganique (Hopkins, 2006).

Les cycles d'interaction formation-rupture des ponts d'actine -myosine se poursuivent tant que la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} reste suffisamment élevée, et qu'il y a assez d'ATP disponible. La relaxation de la fibre musculaire se produit seulement lorsque le repompage du Ca^{2+} du sarcoplasme dans le RS dépasse la libération de Ca^{2+} dans celui-ci. Lorsque la concentration sarcoplasmique de Ca^{2+} diminue, le Ca^{2+} se dissocie de la troponine C, les sites de liaison de la myosine sur les chaînes d'actine sont de nouveau masqués par le complexe tropomyosine-troponine-I, permettant aux sarcomères de retrouver leur état de repos (**Figure I-7**) (Hopkins, 2006).

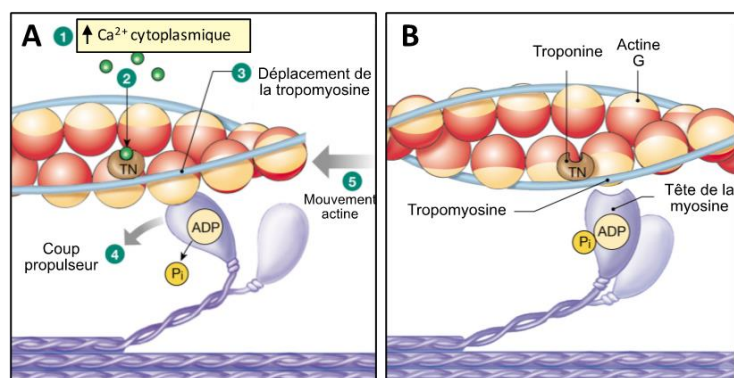


Figure I- 7 : Schéma des différentes phases de la contraction musculaire. (Communication personnelle de J. Mésseant, DU myologie). (A) Initiation de la contraction. (B) Relaxation musculaire.

L'existence de différentes isoformes de la myosine impliquée dans le cycle d'excitation-contraction-relaxation est à l'origine d'une partie des différences fonctionnelles entre les différents types de fibres (contraction rapide ou lente, puissance maximale importante ou faible). En effet, la myosine est composée de deux chaînes lourdes (MHC de l'anglais « *Myosin Heavy Chain* ») et de deux chaînes légères (MLC de l'anglais « *Myosin Light Chain* »), qui sont exprimées respectivement sous plusieurs isoformes plus ou moins rapides. La MHC est exprimée sous quatre isoformes : une lente appelée MHC-1 et trois rapides appelées MHC-2a, MHC-2x et MHC-2b. La MLC est, quant à elle exprimée, sous 3 isoformes : une lente appelée

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

MLC1 et deux rapides appelées MLC1f et MLC3f. La distribution différentielle des MHC définit quatre types de fibres majeurs (1, 2a, 2x et 2b) exprimant une seule isoforme et un certain nombre de populations intermédiaires de fibres hybrides exprimant à la fois des MHC rapides et lentes (MHC-1/2a, MHC-2a/2b et MHC-2x/2b) (Schiaffino and Reggiani, 1994). Ces différentes isoformes de MHC ont des activités ATPasiques différentes. En plus de ces différentes isoformes de MHC et MLC, il existe des isoformes de nombreuses autres protéines intervenant dans le cycle d'excitation-contraction-relaxation, qui contribuent aux différences fonctionnelles des différents types de fibres ou muscles.

Cette description classique, présentée ci-dessus, des événements moléculaires responsables de la production de force et du raccourcissement du sarcomère, est évidemment une version très simplifiée de la réalité telle qu'on la connaît maintenant, basée sur le fonctionnement et l'interaction des deux filaments fins d'actine et épais de myosine. En effet, les travaux de ces dernières années indiquent l'existence d'un troisième filament, constitué de titine. Ce dernier participerait non seulement à la production de force au repos (force passive), mais aussi lorsque le muscle est activé (Freundt and Linke, 2019; Herzog, 2017) (**Figure I-8**). En effet, l'hypothèse émise, est que lors de l'activation du muscle, le calcium se lierait à la titine au niveau des domaines PEVK et Ig (immunoglobuline), augmentant ainsi sa rigidité inhérente. De plus, la titine se lierait également à l'actine *via* son segment proximal, entraînant son raccourcissement, ce qui augmenterait encore plus sa rigidité et *in fine* la production de force (Herzog, 2017).

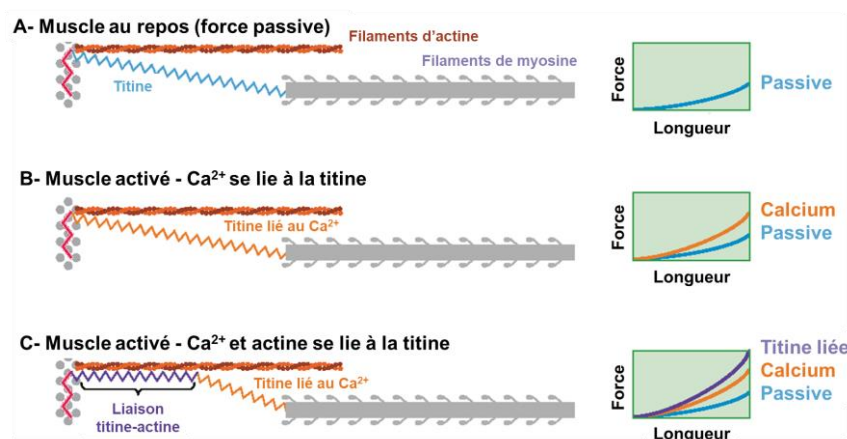


Figure I- 8 : Schéma du nouveau mécanisme proposé de contraction musculaire impliquant un sarcomère à trois filaments (impliquant la titine). (Schémas adaptés de Herzog, 2017). (A) Au repos,

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

la titine est étirée dans toute sa longueur avec une force passive. (B) La présence de calcium active le muscle, et le calcium se lie à des segments spécifiques de la titine ce qui augmente leur rigidité. Dans cette situation la force est plus élevée (tracé orange) par rapport à l'étirement purement passif montré en A (tracé bleu). (C) Scénario de contraction excentrique probable. Le calcium se lie à la titine, comme en B, et la titine se lie à l'actine d'une manière inconnue jusqu'à présent, ce qui raccourcit sa longueur augmentant ainsi sa rigidité et donc la force lorsque les muscles sont étirés. Dans cette situation, la force produite par la titine (tracé violet) serait encore plus élevée que la force de la titine en B (tracé orange), car la longueur de la titine libre est réduite ; la titine est donc plus rigide et produit une plus grande résistance (force) pour une longueur de sarcomère donnée.

Cette description classique repose également sur l'idée que l'activation de l'appareil contractile n'est conduite que par l'activation du filament fin d'actine par le calcium. Or, récemment, il a été avancé que le calcium participe également à l'activation du filament de titine, et que la charge mécanique (la force) est capable également de participer à l'activation complète du filament épais de myosine (**Figure I-8**) (Irving, 2017). En effet, les filaments épais peuvent être activés par un stress mécanique, qui dépend de la charge exercée sur les filaments. Plus la charge est élevée, plus il y a de tension et plus le nombre de têtes de myosine sont recrutées (Stade ON) (Irving, 2017).

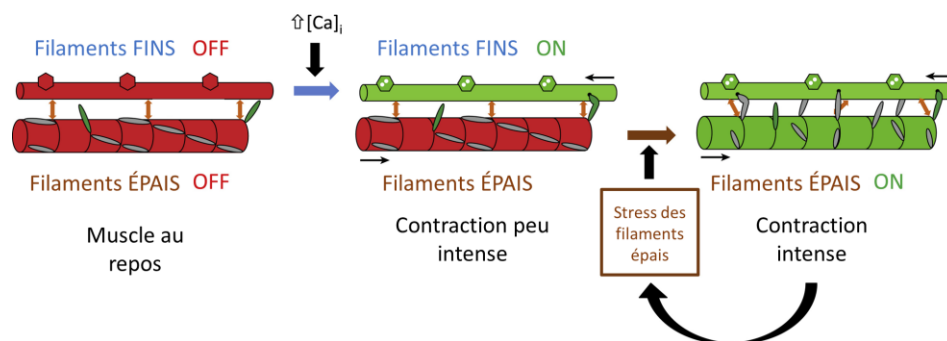


Figure I- 9 : Schéma montrant l'activation du filament épais de myosine par la contrainte mécanique (stress). (Schéma adapté de Irving, 2017). Le filament fin (en haut) est représenté comme un simple cylindre avec des hexagones symbolisant la troponine ; le filament fin est activé (i.e. que les sites de fixation à l'actine sont libérés) par la fixation du calcium (flèche bleue). Le filament épais (en bas) est représenté avec les têtes de myosine (gris ou vert) ; le filament épais peut être activé par une contrainte mécanique (flèche brune). Les états désactivé (OFF) et activé (ON) des deux filaments sont respectivement en rouge et en vert. Les têtes de myosine constitutivement activées sont vertes ; les têtes de myosine sous contrôle du filament épais sont grises. Les flèches orange à double tête symbolisent le couplage des états régulateurs des filaments fins et épais par la protéine de liaison de la myosine-C, qui peut avoir une conformation différente dans les états OFF et ON du filament épais.

II.2. LES DIFFÉRENTS MODES DE CONTRACTION MUSCULAIRE

Lors de la contraction musculaire celui-ci peut se contracter selon différentes modalités : concentrique, isométrique et excentrique.

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

Lors de l'initiation de la contraction isométrique, la longueur totale du muscle ne diminue pas de façon marquée, car la force développée par les ponts actine-myosine est égale à la résistance opposée au muscle (**Figure I-10**). Ce type de contraction est mis en jeu pour maintenir une posture.

Au cours de la contraction concentrique, le glissement des filaments fins d'actine sur la myosine provoque le raccourcissement du sarcomère, et par conséquent de l'ensemble muscle-tendon (**Figure I-10**). Le sarcomère se raccourcit car les têtes de myosine s'attachent sur l'actine et la tire en direction du centre du sarcomère. Ce type de contraction est provoquée notamment lors du mouvement de pédalage, où les chefs du quadriceps se contractent de façon concentrique.

A l'inverse, lors de la contraction excentrique, les sarcomères s'allongent, ainsi que l'ensemble muscle-tendon (**Figure I-10**). Les têtes de myosine s'attachent sur l'actine mais ne produisent pas assez de force pour résister à l'étirement du muscle qui est produit par le muscle antagoniste (le muscle agoniste s'allonge alors que le muscle antagoniste se raccourcit). Ce type de contraction intervient lors d'une décélération ou d'une descente en squat, où le muscle quadriceps et le tendon s'allongent sous l'effet de la force externe supérieure à la force musculaire.

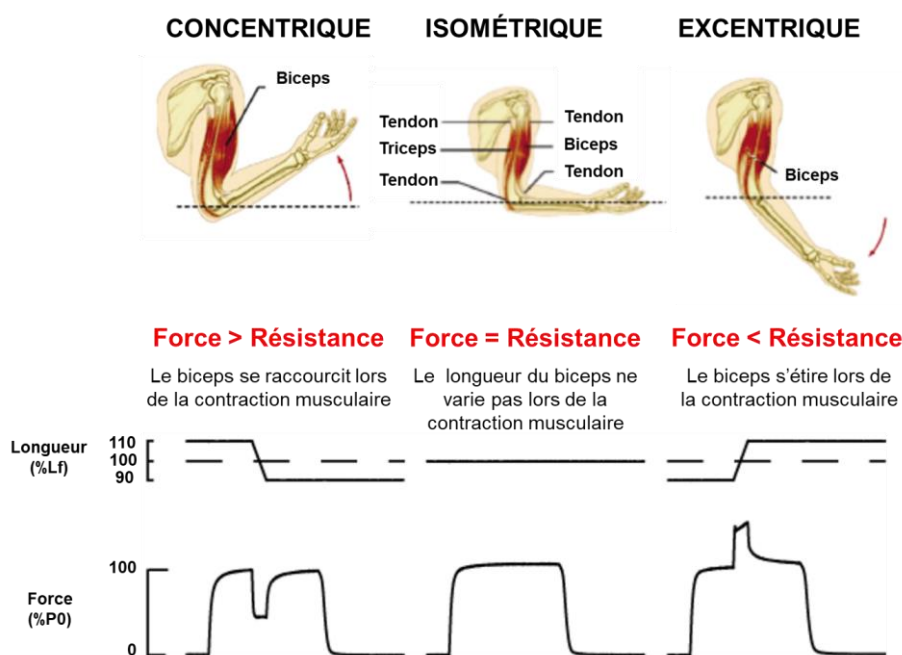


Figure I- 10 : Les différents modes de contraction musculaire. (Image adaptée de Faulkner et al., 2007). L_f : Longueur de la fibre, P₀ : force maximale absolue.

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

Évidemment, ces trois modes de contractions vont impacter la production de force, la vitesse de raccourcissement, et la puissance. Ainsi, par exemple, la force maximale isométrique est très largement supérieure à la force concentrique (qui diminue avec la vitesse de raccourcissement) et inférieure à la force excentrique.

II.3. LE COSTAMÈRE ET LA TRANSMISSION DE LA FORCE

La force produite par une fibre musculaire est transmise longitudinalement et transversalement. La transmission de la force transversale dépend de structures appelées costamères (**Figure I-11**), qui font office de point d'ancrage entre le cytosquelette des myofibrilles et la matrice extracellulaire (MEC). Ces structures participent au maintien des myofibrilles entre elles et agissent comme des coupleurs mécaniques, en transmettant latéralement les forces contractiles à travers le sarcolemme jusqu'à la lame basale.

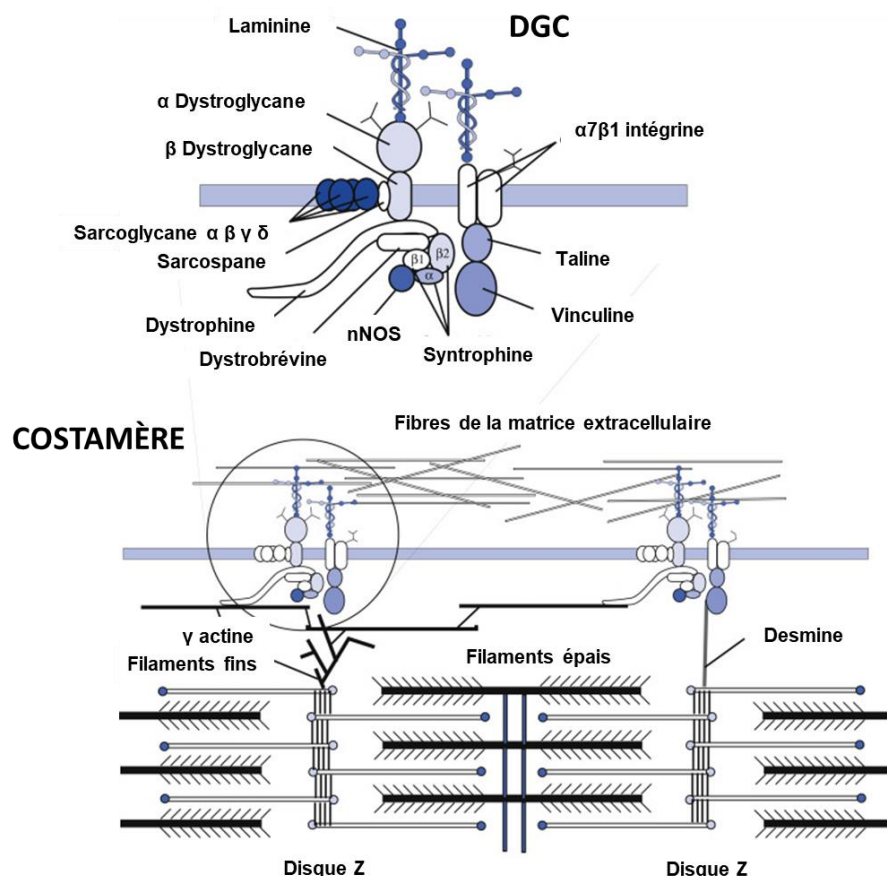


Figure I- 11 : Schéma des protéines qui composent les costamères du muscle squelettique. (Adapté de Feher, 2017). Deux grands complexes composent le costamère. Le complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC) est constitué de protéines cytosoliques, de protéines transmembranaires et de

INTRODUCTION - Le muscle squelettique

protéines extracellulaires qui relient les myofilaments à la matrice extracellulaire. Le DGC est relié aux disques Z grâce à la γ actine, qui est reliée la dystrophine. Le deuxième complexe composé de taline, vinculine et d'intégrine est relié aux disques Z par la desmine.

Le costamère est un réseaux protéique composé d'un complexe de protéines associées à la dystrophine (CPAD), autrement appelé complexe DGC (de l'anglais « *dystrophin-glycoprotein complex* ») associé à d'autres protéines (comme la vinculine, la desmine et la spectrine) (Deconinck and Dan, 2007). La dystrophine, une protéine sous-membranaire en forme de bâtonnet, relie les filaments d'actine au complexe des dystroglycanes (α - et β -dystroglycane). Ce complexe transmembranaire se lie à son tour à la lamine dans la MEC. Un ensemble de glycoprotéine (α -, β -, γ - et δ -sarcoglycane), le sarcophage, les dystrobrevines et les syntrophines sont tous associées au complexe des dystroglycanes (**Figure I-11**) (Ganong and Jobin, 2012). Le CPAD forme ainsi un pont structurel et fonctionnel crucial entre le cytosquelette intracellulaire (actine) et la matrice extracellulaire. Une perturbation de cet échafaudage finement organisé peut conduire à de multiples pathologies, telles que des dystrophies musculaires, et en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne, qui est au centre de cette thèse.

III. LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE (DMD)

III.1. GÉNÉRALITÉS

III.1.1. Quelques rappels historiques

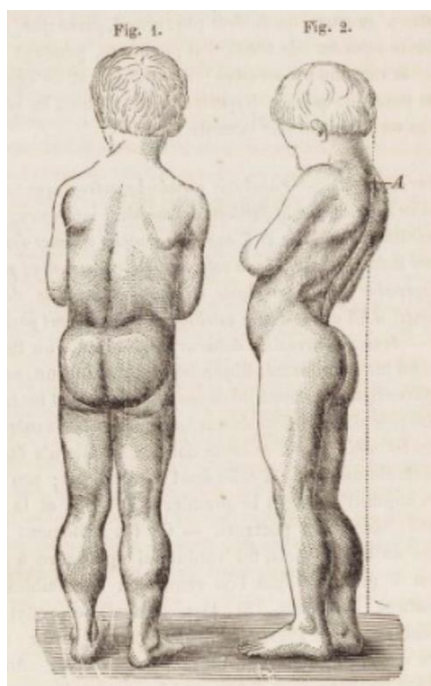


Figure I- 12 : Vue de dos et de profil d'un jeune garçon atteint de « pseudo-hypertrophie. (Duchenne, 1868).

trois sœurs (Emery et al., 2015).

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou myopathie de Duchenne est la forme de dystrophie musculaire la plus répandue chez l'enfant. Elle fut décrite dès le 19^{ème} siècle dans la littérature médicale par de nombreux scientifiques de l'époque. Edward Meryon, physicien anglais, fût le premier à constater le caractère familial de la maladie et sa prédilection à toucher les garçons. Dans une communication adressée à la *Royal Medical and Chirurgical society* en décembre 1851 (puis publier l'année suivante dans *Transactions of the Society*), il décrit le cas de huit garçons affectés dans trois familles, puis en 1864 dans son ouvrage *Practical and pathological researches on the various form of paralysis*, il détaille le cas d'une famille dans laquelle quatre cousins furent affectés et dont la transmission se fit par les

La DMD doit cependant son nom à Guillaume Duchenne de Boulogne, célèbre neurologue français et contemporain d'Edward Meryon, pour sa caractérisation de la maladie dans son ouvrage *De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique* (Duchenne, 1868). Il y décrit, à travers l'exposé de 11 cas de jeunes garçons, le phénotype musculaire de la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique, aujourd'hui appelée dystrophie musculaire de Duchenne (Emery et al., 2015). Il observe notamment une faiblesse musculaire progressive, affectant tout d'abord les membres inférieurs puis par la suite les membres supérieurs jusqu'à la paralysie totale, ainsi qu'une hypertrophie de certains muscles. Par ailleurs, afin d'étayer ses recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique, et non satisfait d'attendre les études post-mortem pour confirmer le diagnostic, Duchenne créât un système d'« emporte-

INTRODUCTION - La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

pièce histologique » à l'origine des premières biopsies musculaires . Cette technique permit de mettre en évidence une hyperplasie du tissu connectif interstitiel (à l'origine du terme pseudo-hypertrophique), associée à un remplacement du tissu musculaire par du tissu fibreux et adipeux chez des patients suspectés de DMD (Emery et al., 2015). Ces observations histologiques issues de biopsies permirent ainsi de poser un diagnostic plus précis du vivant des malades.

Quelques années plus tard, en 1884, le neurologue Wilhelm Heinrich Erb corrobora l'hypothèse de Duchenne selon laquelle la maladie affectait directement le muscle mais en mentionnant pour la première fois une dégénérescence progressive des muscles à l'origine du terme « dystrophie musculaire » (Erb, 1884).

Finalement, c'est au cours du 20^{ème} siècle qu'eurent lieu les dernières avancées dans la connaissance de la DMD. Émile Becker, identifiait en 1955, une forme peu sévère de la DMD, qui porte aujourd'hui son nom, et confirma le caractère récessif de la DMD lié au chromosome X (Emery et al., 2015). Cependant, la grande avancée majeure des connaissances est attribuable aux travaux de Kunkel publiés entre 1986 et 1988. Ils permirent d'identifier le gène dystrophine (*DMD*) responsable de la maladie et sa position chromosomiale précise sur le locus Xp21, reliant ainsi la cause de la DMD à une anomalie de la protéine dystrophine (Hoffman et al., 1987; Kunkel, 1986; Monaco et al., 1988). L'identification de mutation du gène *DMD* comme cause de la pathologie a révolutionné les capacités de diagnostic et a permis d'envisager de nouveaux traitements médicaux pour les dystrophinopathies (Sussman, 2002).

III.1.2. Description clinique

La maladie se manifeste généralement vers l'âge de 3 ans. Un retard psychomoteur, une difficulté à courir et monter les escaliers, ainsi que des chutes fréquentes avec des difficultés à se relever sont les symptômes les plus fréquents rapportés par les parents (Desguerre and Laugel, 2015). Un retard du langage ou un retard de développement global, et des niveaux élevés de créatine kinase sérique (CK) peuvent être également observés chez des petits garçons atteints de DMD (Yiu and Kornberg, 2015).

Bien que la plupart des garçons atteints de DMD acquièrent de la force et des habiletés motrices (mais dans une moindre mesure que leurs pairs) jusqu'à environ 6 ans, une

INTRODUCTION - La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

faiblesse musculaire (i.e. une diminution de la force maximale et de la force spécifique) gagne progressivement les membres inférieurs proximaux et du tronc, entraînant une fatigabilité à la marche puis des difficultés pour courir ainsi qu'à la montée et à la descente des escaliers (Darras et al., 2018). L'enfant commence à chuter de plus en plus fréquemment. Les mollets s'hypertrophient en raison du remplacement d'une partie du tissu musculaire par du tissu adipeux ("pseudo-hypertrophie"). De plus, la démarche devient dandinante avec une tendance à marcher sur la pointe des pieds et l'enfant présente de plus en plus de difficulté à se relever du sol. La perte de la marche est inexorable et survient habituellement vers 11 ans, rendant les malades dépendant d'un fauteuil roulant (Yiu and Kornberg, 2015). L'atteinte des membres supérieurs et des muscles distaux a lieu plus tardivement et se traduit par des difficultés à attraper des objets en hauteur et à lever les bras.

À ce stade, plusieurs complications commencent à survenir. Tout d'abord, des complications orthopédiques liées à la perte de force musculaire. L'affaiblissement des muscles du dos entraîne un effondrement du dos, suivi de l'apparition d'une scoliose qui s'accroît après la perte de la marche (Kurz et al., 1983; Yiu and Kornberg, 2015). Des rétractations musculaires et des désaxations des articulations, liées à l'immobilité et aux déséquilibres de force entre les muscles plus ou moins touchés, apparaissent et conduisent à des déformations orthopédiques (Skalsky and McDonald, 2012; Yiu and Kornberg, 2015). De plus, l'altération des muscles respiratoires et du tronc entraînent une perte de la capacité ventilatoire (Venugopal and Pavlakis, 2021). Cette atteinte respiratoire est d'autant plus dangereuse car elle augmente le risque d'infections broncho-pulmonaires, favorisées par une toux peu efficace pour dégager les voies respiratoires (McDonald et al., 2016). À cela s'ajoute des complications cardiaques, telle que la cardiomyopathie dilatée. Une faiblesse du ventricule (droit ou gauche), causée par une présence étendue de fibrose (excès de tissu conjonctif), est fréquemment observée chez les patients. La cavité cardiaque se dilate, ce qui amène une diminution de la force contractile du muscle cardiaque (Venugopal and Pavlakis, 2021). Bien que souvent latente en raison de l'inactivité physique, une cardiomyopathie est détectée chez un tiers des patients de 14 ans et chez tous les patients de plus de 18 ans (Nigro et al., 1990). Par ailleurs les patients présentent également des problèmes nutritionnels, liés aux difficultés à avaler et à déglutir, entraînant des carences alimentaires. Enfin, des altérations cognitives (retard

INTRODUCTION - La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

d'apprentissage de la lecture, troubles du langage, déficience intellectuelle, autisme), sont également constatés dans un certain nombre de cas, la dystrophine étant aussi exprimée dans le cerveau (Chaussonot, 2020).

La DMD est donc une maladie complexe, avec une atteinte clinique multi-systémique, provoquant souvent un décès prématuré des patients à partir de 30 ans, causé majoritairement par les atteintes cardiaques (30 %) et respiratoires (43,6 %) (van Essen and de Visser, 2004).

III.1.3. Pathophysiologie

Depuis la fin des années 80, il a été établi que la DMD est causée par une mutation du gène *DMD* (Hoffman et al., 1987). Le gène *DMD* code pour la dystrophine, une protéine sous membranaire qui assure un lien structurel entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, via un ensemble de protéines appelé « complexe des protéines associées à la dystrophine » (CPAD).

La déficience en dystrophine accompagnée d'une expression des protéines constitutives du CPAD également réduite, provoquerait une fragilisation de la membrane de la fibre musculaire. Les fibres musculaires seraient plus susceptibles de s'abîmer alors au cours d'un stress mécanique intense, telle que des contractions musculaires excentriques, et finiraient par se nécroser. Puis, avec le temps, l'épuisement de la capacité régénérative des fibres musculaires, accompagné d'une augmentation de l'inflammation, et d'un remplacement du tissu musculaire par du tissu fibro-adipeux, conduiraient à la perte progressive de la fonction musculaire (Péréon et al., 2015).

Bien que l'origine génétique de la DMD soit bien identifiée, les mécanismes qui sous-tendent les processus de nécrose, d'inflammation et de fibrose, menant à dégénérescence musculaire, ne sont qu'en partie expliqués. À ce jour, plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer cette dégénérescence musculaire chez les patients DMD et les modèles animaux (**Figure I-13**).

L'absence de dystrophine, assortie d'une diminution de l'expression des CPAD, provoquerait une instabilité sarcolemmique. En effet, dans le cadre de la DMD, les réseaux costamériques, supposés participer à la protection des membranes

INTRODUCTION - La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

musculaires lors des contractions, n'assureraient plus leur rôle (Danowski et al., 1992; Deconinck and Dan, 2007). La fragilité des membranes participerait à une augmentation de leur perméabilité, provoquée par des ruptures focales tout le long du sarcolemme (Péréon et al., 2015). Cette perméabilité de la membrane musculaire a été confirmée *in vivo* chez souris la mdx, un modèle murin de la DMD, par incorporation d'un colorant Bleu Evans, normalement imperméable aux membranes (Straub et al., 1997).

De nombreuses biopsies musculaires de patients atteints de DMD montrent une accumulation de calcium et la présence de fibres hypercontractées, suggérant un rôle de la dysrégulation de l'homéostasie calcique dans la physiopathologie de la DMD. L'augmentation prolongée de la concentration calcique intracellulaire provoque l'activation des calpaïnes, des protéases à l'origine de la nécrose cellulaire (Deconinck and Dan, 2007; Spencer et al., 1995) . D'ailleurs, il a été démontré que la surexpression de la calpastatine (inhibiteur endogène des calpaïnes) réduit la nécrose du muscle mdx (Spencer and Mellgren, 2002). L'augmentation de l'afflux de calcium se produirait majoritairement *via* la majoration de l'activité des canaux calciques mécano-sensibles (TRPC1 et TRPC4), ainsi que des canaux de fuite du calcium présents à la surface du sarcolemme. Les points de ruptures focaux, induits par les microlésions liées au stress mécanique, favoriseraient l'entrée massive de calcium (Péréon et al., 2015).

L'absence de dystrophine provoquerait également une perturbation de l'isoforme neuronale de la NO synthase (nNOS), normalement reliée au complexe CPAD. Privée de son ancrage sous sarcolemmique, la nNOS subirait une diminution de son activité (Deconinck and Dan, 2007). Or, la diffusion de NO en dehors des fibres musculaires est nécessaire à la vasodilatation survenant lors de la contraction, afin de permettre une bonne oxygénation du muscle. Une diminution de la production de NO serait à l'origine d'une vasoconstriction favorisant l'ischémie à l'exercice (Péréon et al., 2015; Sander et al., 2000).

Une augmentation du stress oxydatif est observée au cours de la DMD. Les mitochondries, sensibles à l'élévation du calcium intracellulaire, et l'augmentation de l'activité NADPH oxydase seraient à l'origine de la production excessive de radicaux libre ROS (de l'anglais « *reactive oxygen species* ») (Péréon et al., 2015; Whitehead

INTRODUCTION - La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

et al., 2010). Ces ROS participeraient à la perturbation de l'homéostasie calcique (via l'activation des TRP et de la calpaïne), entraînant un cercle vicieux conduisant à la nécrose cellulaire. Par ailleurs, les ROS auraient aussi un rôle dans le processus inflammatoire (Péréon et al., 2015).

Enfin, les patients DMD présentent un état pro-inflammatoire chronique, dû notamment à l'activation du facteur de transcription NF- κ B modulant la réponse immunitaire et inflammatoire, qui participe à l'aggravation de la maladie. À cet état pro-inflammatoire, s'ajoute une infiltration, en neutrophiles et macrophages, induite par les cycles successifs de dégénérescence-régénérescence musculaire (Rosenberg et al., 2015).

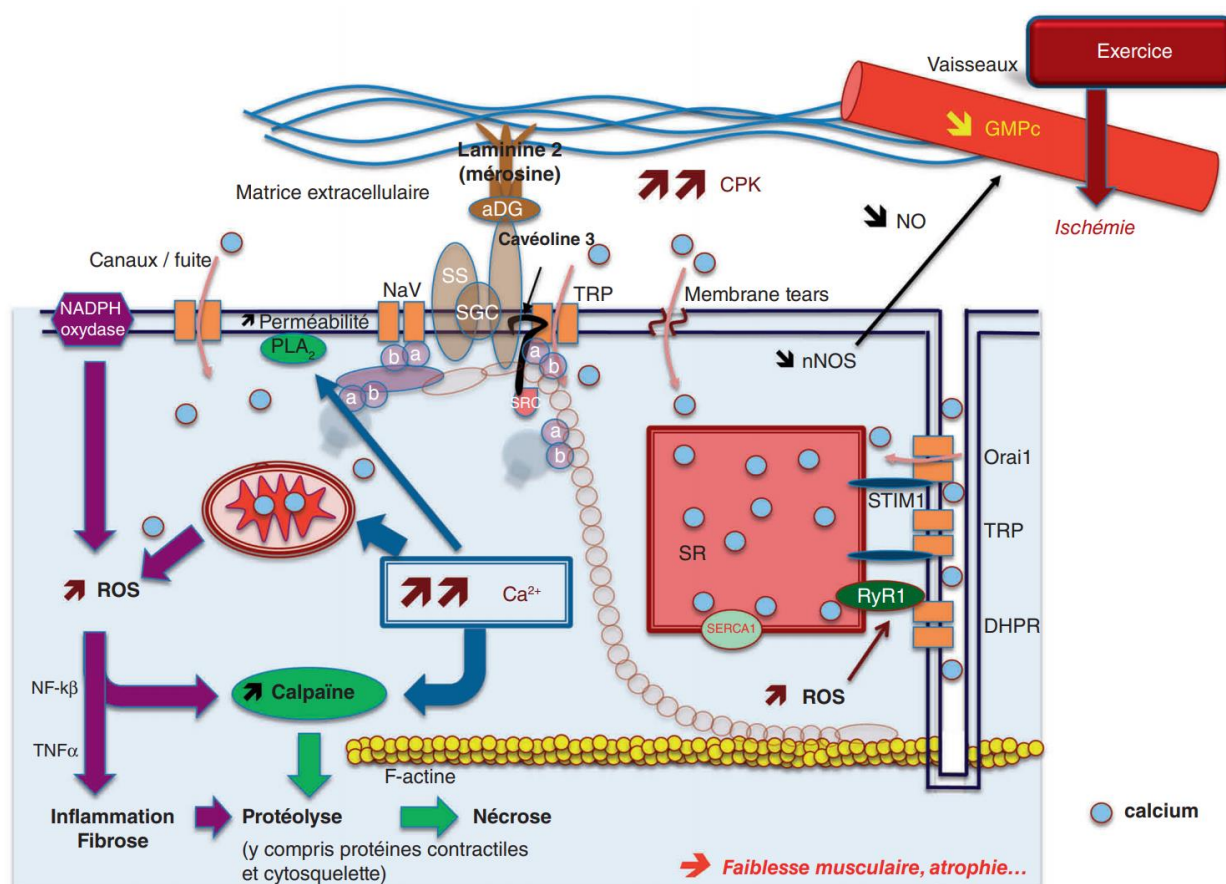


Figure I- 13 : Récapitulatif des principaux mécanismes physiopathologiques envisagés de la DMD. (Issu de la revue de Péréon et al., 2015).

III.2. LE GÈNE *DMD* ET LA DYSTROPHINE

III.2.1. Le gène *DMD*

Séquencé par Koenig et al., en 1988, le gène *DMD* est à ce jour le plus long gène humain totalement séquencé et dont la séquence génomique couvre plus de 2,2 Millions de paires de bases (Mb). La séquence codante comprend 79 exons et se traduit par un ARN-messager de 14 Kilo bases (kb). Par ailleurs, l'expression du gène est sous le contrôle de sept promoteurs internes tissu spécifiques, entraînant l'expression de plusieurs dystrophines de longueurs variables (**Figure I-14**).

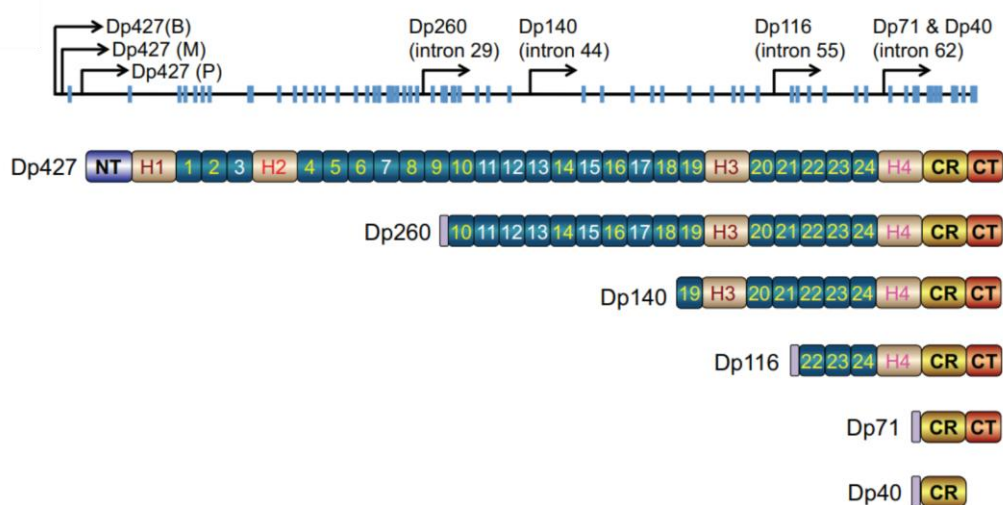


Figure I- 14 : Les différentes dystrophines issues du gène *DMD*. (Issu de McGreevy et al., 2015). Les barres bleues verticales correspondent aux exons. Les flèches représentent les promoteurs internes. Trois génèrent la forme longue, dite « complète » de la dystrophine (Dp427) et vont entraîner son expression dans différents tissus (B : brain, M : muscle, P : cellules de Purkinje), les quatre autres vont permettre l'expression de dystrophines plus courtes : Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp40.

L'énorme taille du gène *DMD* est probablement l'une des principales raisons pour lequel il présente une forte fréquence de mutations (Chamberlain and Chamberlain, 2017). La majorité des mutations de ce gène sont de grands réarrangements intra-géniques correspondant à des délétions ou des duplications d'un ou plusieurs exons. 65 à 70% de toutes les mutations sont des délétions, retrouvées préférentiellement dans deux régions du gène (points chauds délétionnels) autour des exons 2 à 20 (15 % des délétions) et des exons 45 à 55 (74 % des délétions) (Aartsma-Rus et al., 2006). Les mutations sont à l'origine de l'absence de dystrophine ou de la production d'une dystrophine tronquée, causant respectivement la DMD ou sa forme moins sévère, la

INTRODUCTION - La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

dystrophie musculaire de Becker (BMD). Les différences phénotypiques observées chez ces deux dystrophinopathies s'expliquent en grande partie par la conservation ou non d'un cadre de lecture ouvert. En effet, la perte du cadre de lecture conduit à une absence de dystrophine, à l'origine de la DMD, alors que son maintien permet la production d'une dystrophine tronquée mais partiellement fonctionnelle, causant la BMD (Aartsma-Rus et al., 2006).

III.2.2. Structure de la dystrophine Dp427

La dystrophine Dp427 est une grande protéine de 427 kDa en forme de bâtonnet, dont la partie carboxy-terminale non traduite (3'-UTR, qui participe à la régulation de l'expression de la protéine) est très bien conservée entre les espèces. En outre, à l'extrémité 5' du gène *Dmd*, il existe au moins 3 promoteurs différents qui régulent l'expression de la dystrophine en fonction du tissu (cerveau, muscle ou cellules de Purkinje du cervelet) (Ervasti, 2007).

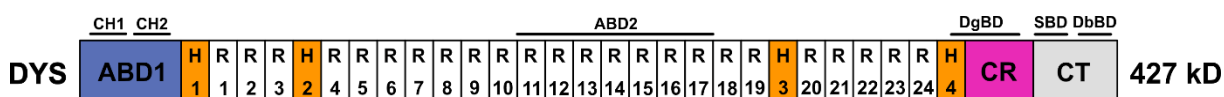


Figure I- 15 : Structure schématique de la dystrophine. (Adapté de Chamberlain and Chamberlain, 2017). Les domaines de la dystrophine sont abrégés comme suit : ABD, domaine de liaison à l'actine ; R, répétitions de type spectrine ; H, domaines charnières ; CR, domaine riche en cystéine ; CT, domaine carboxy-terminal.

La structure de la dystrophine se compose de quatre domaines fonctionnels principaux : un domaine amino-terminal se liant à l'actine, un domaine central en forme de bâtonnet, un domaine riche en cystéine et enfin, une extrémité carboxyle (Koenig et al., 1988) (**Figure I-15**). Le 1^{er} domaine amino-terminal contient deux motifs homologues à la calponine (CH1 et CH2) qui permettent de relier la dystrophine au réseau d'actine (Korenbaum and Rivero, 2002). Le second domaine, est grand domaine qui donne la forme en bâtonnet à la protéine. Il est formé d'une succession de 24 triples hélices, similaires aux domaines de répétition de la spectrine, entrecoupés par quatre régions charnières riches en proline, qui donnent à la dystrophine une forme flexible et allongée (Koenig and Kunkel, 1990). Il abrite également un deuxième motif de liaison à l'actine (ABD2) par interaction électrostatique (Amann et al., 1998). Le troisième domaine est un domaine riche en cystéine, composé de plusieurs motifs distincts. Deux motifs dits en « main EF » sont

INTRODUCTION - La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

capables de lier le calcium (Koenig et al., 1988). Un motif WW, présent au niveau de la charnière 4 (H4), est impliqué dans les interactions protéine-protéine (Ilsley et al., 2002). Ensemble les domaines WW et EF forment une zone qui se lie à l'extrémité carboxy du β -dystroglycane, permettant l'ancrage de la dystrophine au sarcolemme (Rentschler et al., 1999). Le dernier motif ZZ, en doigt de zinc, stabilise les motifs WW et EF, et renforce l'interaction entre la dystrophine et le β -dystroglycane (Ponting, 1996). Enfin, le domaine carboxy-terminal (CT) contient deux séquences polypeptidiques qui forment des hélices de type alpha, similaires à celles que l'on trouve dans la partie en bâtonnet de la dystrophine. Ces séquences fournissent des sites de liaison pour la dystrobrevine et les syntrophines, faisant du domaine CT, une zone primordiale à l'interaction de la dystrophine à son complexe associé (Suzuki et al., 1992).

IV. LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DE LA DMD

IV.1. INTRODUCTION

Il existe une grande diversité de modèles animaux, provenant de mutations spontanées ou bien issus du génie génétique, afin d'étudier la pathophysiologie de la DMD et tester de nouveaux traitements. À ce jour, près de 60 modèles animaux sont recensés, incluant des modèles non mammifères, tels que le ver *Caenorhabditis elegans*, la drosophile et le poisson zèbre et des modèles mammifères comme le chien, le chat et la souris, et plus récemment le rat ou le cochon (McGreevy et al., 2015).

Les modèles canins sont décrits dans la littérature depuis plus de 50 ans et concernent une vingtaine de races de chiens différentes. Les chiens atteints d'une déficience en dystrophine partagent une évolution clinique et des lésions histologiques (e.g. fibrose) semblables à celle des malades humains. Bien que le chien soit un bon modèle, grâce à ses nombreuses similitudes avec la pathologie humaine, c'est le modèle murin qui lui est préféré dans les études de thérapies géniques, en raison de son accessibilité et de son faible coût (McGreevy et al., 2015).

Le modèle murin historique et le plus fréquemment utilisé est la souris mdx. La mdx à l'avantage de posséder une seule mutation, comme chez les myopathes DMD, entraînant la perte totale de la dystrophine, mais présente un phénotype musculaire moins dégradé par rapport à la pathologie humaine (Bulfield et al., 1984). C'est pourquoi, une pléthore de modèles murins dits « double knock-out » (dKO) ont été générés afin d'établir un modèle murin de DMD plus sévère permettant ainsi de mieux étudier la physiopathologie de la DMD ainsi que pour tester l'efficacité de thérapies dans un contexte pathologique plus proche de la clinique humaine. Contrairement à la pathologie humaine, tous les dKO portent une mutation non seulement dans le gène de la dystrophine, mais également dans un autre gène, généralement un gène codant pour un paralogue susceptible de compenser la perte de dystrophine (e.g. l'utrophine) ou une protéine en interaction avec la dystrophine (e.g. les sarcoglycanes) (Deconinck et al., 1997; Li et al., 2009). Tout récemment, notre équipe vient d'en générer un nouveau, caractérisé par l'absence à la fois de dystrophine et de desmine (Ferry et al., 2020). L'inconvénient de ce type de modèle est qu'il est aussi difficile à générer qu'à

INTRODUCTION - Les modèles expérimentaux de la DMD

entretenir, les souris dKO mourant souvent prématurément (McGreevy et al., 2015). C'est pourquoi de nombreuses études ont eu l'idée d'aggraver le phénotype en soumettant la souris mdx à l'exercice musculaire, tel que celui décrit dans le protocole standardisé de TREAT-NMD (voir plus partie exercice physique VI.2.4).

De plus, en 1989, Chapman et al., publient quatre nouveaux variants chimiques (chemical variant, cv) : mdx^{2cv} , mdx^{3cv} , mdx^{4cv} et mdx^{5cv} . Ces souris sont générées sur le fond génétique de C57BL / 6, en utilisant le mutagène N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), pour induire de manière aléatoire de nouvelles mutations ponctuelles dans le gène *Dmd* (Cox et al., 1993). Le profil clinique globale de chacun de ces variants diffère très peu de celui des souris mdx. Toutefois, chaque lignée présente ses propres spécificités.

En outre, le modèle mdx a été soumis à plusieurs croisements avec des souris de fonds génétiques distincts (albinos, BALB/c, C3H, C57BL/6, FVB et DBA/2) afin d'observer l'effet des différentes souches sur le phénotype des mdx (McGreevy et al., 2015). Les souris D2-mdx, issues du croisement de souris C57BL/10-*mdx* et DBA/2, présentent, contrairement aux souris mdx classique plus de fibrose et moins de régénération, rendant *de facto* ce modèle plus proche de la DMD humaine (Fukada et al., 2010).

En conclusion, il existe tout un arsenal de modèles murins disponibles pour réaliser des études précliniques (les figures supplémentaires de McGreevy et al., 2015 reviennent en détail sur ces lignées). Dans le cadre de ce projet, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux modèles : (i) la souris mdx, le modèle classique de la DMD, et (ii) la souris D2-mdx, présentant un phénotype sévère de la DMD.

IV.2. LA SOURIS MDX : MODÈLE CLASSIQUE DE LA DMD

IV.2.1. Introduction

La souris mdx (C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J) est découverte par hasard en 1984. Bulfield et ses collaborateurs identifient plusieurs souris, au sein d'une lignée C57BL/10ScSn, présentant des taux sériques anormalement élevés de créatine kinase ainsi que des preuves histologiques, supposant l'existence d'une dystrophie

INTRODUCTION - Les modèles expérimentaux de la DMD

musculaire. Ce n'est que quelques années plus tard, que les études génétiques viendront définitivement confirmer la souris mdx comme modèle animal de la myopathie de Duchenne (Sicinski et al., 1989).

Dans ce modèle, c'est une mutation ponctuelle non-sens (cytosine en thymine), introduisant un codon stop dans l'exon 23, qui est responsable de l'absence de la forme complète de la dystrophine (Sicinski et al., 1989). Cependant, malgré une déficience en dystrophine, la souris mdx présente des symptômes cliniques minimes. En effet, les souris mdx adultes montrent peu de faiblesse et les signes dystrophiques caractéristiques (telles que la fonte musculaire et la cardiomyopathie dilatée) ne sont observées que chez les très vieilles souris mdx (≥ 20 mois) (Chamberlain et al., 2007). Par ailleurs, ce modèle présente une durée de vie très peu réduite (20% par rapport au type sauvage contre 75% dans la pathologie humaine) (Chamberlain et al., 2007). Ce phénotype moindre s'expliquerait par la présence de mécanismes compensatoires, comme la régulation à la hausse de l'utrophine et de l'intégrine, une régénération musculaire intensive et la présence de sarcoglycanes résiduels dans le sarcolemme des souris mdx (Li et al., 2009).

Malgré un phénotype musculaire moins sévère dans ce modèle, ces souris restent un bon modèle car elles sont des homologues génétiques et biochimiques de la DMD (Coley et al., 2016).

IV.2.2. Données histopathologiques

Dès la naissance, les muscles mdx présentent des fibres hypercontractées, reflet de la nécrose précoce dans ce modèle murin (Coulton et al., 1988). La nécrose s'associe à une réaction inflammatoire (**Figure I-16A**), observable dès 3 semaines, âge correspondant au sevrage des animaux, les obligeant à fournir une activité musculaire plus conséquente (Pastoret and Sebillé, 1993). Par la suite, un processus de régénération intensive se met en place. Le marqueur histologique le plus frappant pour déterminer la régénération des fibres musculaires est la présence d'un noyau en position centrale dans le cytoplasme (**Figure I-16B**), indice probable d'une régénération antérieure. À partir de 3 mois, un noyau central est observé dans 80 à 90 % des fibres musculaire de la souris mdx (Pastoret and Sebillé, 1993). Cependant cette régénération finit par s'épuiser progressivement chez les souris mdx âgés, en

INTRODUCTION - Les modèles expérimentaux de la DMD

raison de « l'épuisement » des cellules souches musculaires causé par les cycles répétitifs de dégénérescence et de régénération musculaire (Sacco et al., 2010). À noter, que les souris mdx présentent une augmentation de fibres « révertantes » (i.e. des fibres qui arrivent à exprimer la dystrophine) avec l'âge (**Figure I-16C**), qui est un autre marqueur d'une régénération importante (Rodrigues et al., 2016a).

En outre, lors des cycles successifs de dégénérescence et régénération musculaire, le tissu musculaire est progressivement remplacé par du tissu fibreux, qui participe à l'hypertrophie du muscle (**Figure I-16D**). La fibrose est une accumulation interstitielle de collagène. Elle apparaît dans les muscles squelettiques des souris mdx au bout de quelques semaines et ne cesse de proliférer avec l'âge, alors qu'aucune trace de fibrose n'est retrouvée dans le muscle sain, même âgé. Ce développement anormal du tissu conjonctif dans les muscles squelettiques s'observe chez les souris mdx de plus de 12 mois et serait la conséquence de la diminution du nombre ou des capacités prolifératives des cellules myogéniques (Pastoret and Sebillé, 1993).

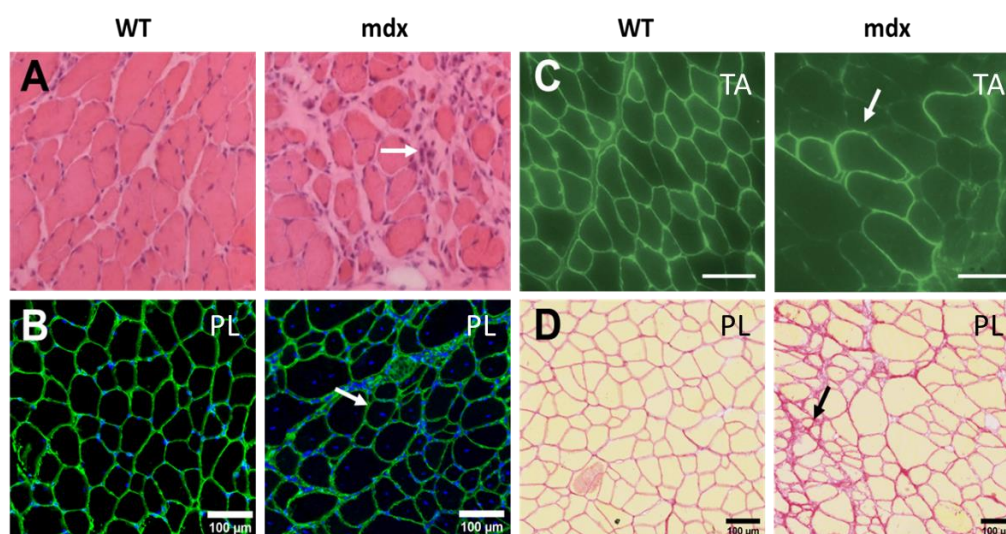


Figure I- 16 : Image représentatives de l'histopathologie musculaire de la souris mdx. (Panneau A - Images adaptées du site web de Charles river). Histologie d'un muscle sain. Image représentant un foyer nécrotique (flèche) dans un muscle de souris mdx. (Panneau B) Les fibres musculaires d'une souris saine de 2 mois présentent des noyaux positionnés à la périphérie, alors que des souris mdx du même âge présentent de nombreux noyaux centraux (flèche), marqueurs d'une régénération antérieure. (Panneau C – Images adaptées de Rodrigues et al., 2016b) Immunomarquage de la dystrophine chez une souris saine (Image de gauche), on note une présence de fibres révertantes (flèche) chez une souris mdx de 12 mois. (Panneau D) Coloration de la matrice extracellulaire (rose) chez une souris saine de 2 mois. Les souris mdx du même âge présentent une accumulation de collagène entre les fibres musculaire, caractéristique de la fibrose (flèche). Les muscles sont abrégés comme suit : TA, tibial antérieur ; PL, plantaris. Bar d'échelle : 100µm.

IV.2.3. Données cliniques et physiologiques

La souris mdx est largement plébiscitée dans les études pré-cliniques car elle partage, en plus de la perte totale de la dystrophine, de nombreuses caractéristiques cliniques similaires à celle des patients atteints de DMD, bien qu'elles soient moins sévères. Ce modèle développe notamment une cardiomyopathie dilatée, une cause majeure de la mortalité chez les malades. Celle-ci est associée à des anomalies contractiles qui se développent avec l'âge (40–42 semaines) (Quinlan et al., 2004). Ce modèle présente également une insuffisance respiratoire, semblable à la DMD, provoquée par une détérioration structurelle et fonctionnelle progressive (Ishizaki et al., 2008). Des altérations cognitives (déficit dans l'apprentissage spatial, troubles de mémoire, anxiété accrue) ont également été décrites (Comim et al., 2019; Vaillend et al., 2004).

Au niveau fonctionnel, la souris mdx présente une fragilité musculaire, i.e. qu'il est plus susceptible d'être lésé à la suite de contractions excentriques répétées. Cette caractéristique peut facilement être évaluée en mesurant la perte immédiate de force maximale produite à la suite d'un petit nombre de contractions excentriques (**Figure I-17**) (Head et al., 1992; Sacco et al., 1992). Il est à noter que cette fragilité accrue ne concerne que les muscles rapides de la souris mdx, pas ceux comportant davantage de fibres lentes ou intermédiaires. Cette différence n'est toujours pas clairement expliquée alors que cela fait près de 30 ans qu'elle a été découverte. La quantité d'utrophine, de gamma-cyto-actine (Lindsay et al., 2019a) ou de desmine (Ferry et al., 2020) ainsi que la proportion de fibres exprimant la MHC-2b (Head et al., 1992; Lindsay et al., 2019a) module la fragilité du muscle chez la souris mdx. Cette fragilité est expliquée par une perte d'excitabilité au fur et à mesure des contractions excentriques (Baumann et al., 2020; Roy et al., 2016), qui peut être en partie bloquée par une thérapie génique visant à exprimer la dystrophine (Roy et al., 2016).

INTRODUCTION - Les modèles expérimentaux de la DMD

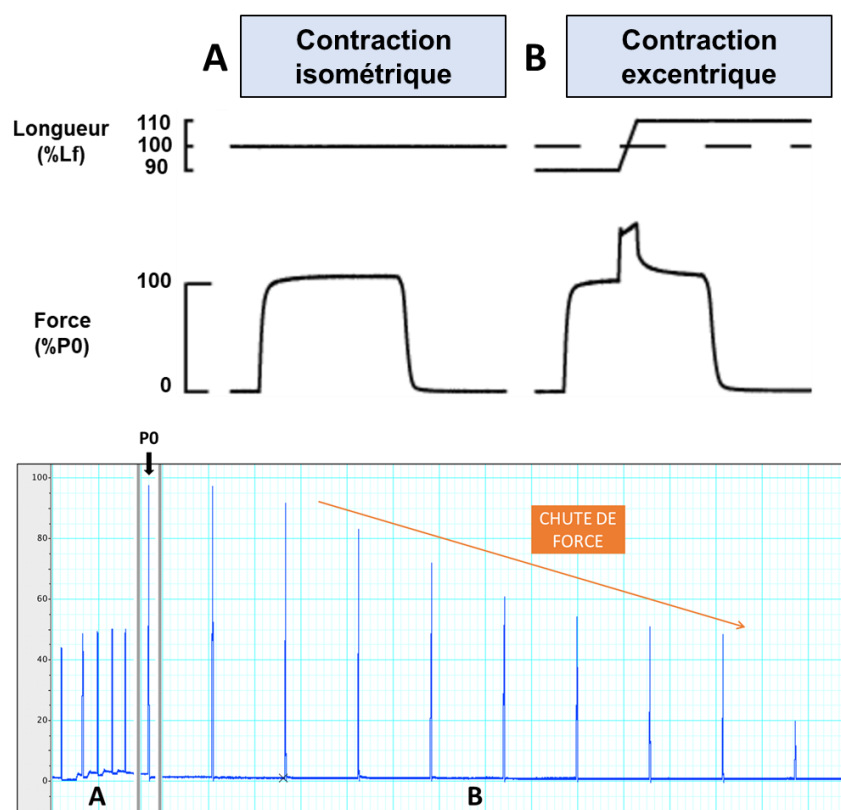


Figure I- 17 : Représentation d'un décrement de la force observé chez la souris mdx lors de neuf contractions excentriques à 100H. (En partie adaptée de Faulkner et al., 2007). Chaque pic correspond à une contraction musculaire. (A) Contraction isométrique. (B) Contraction excentrique. Lf : Longueur de la fibre, P0 : force maximale absolue.

En outre, les muscles de souris mdx ont une force maximal absolue (P_0) identique à celle observée dans le muscle C57BL/10 quel que soit l'âge, qui peut être expliqué par le fait que le muscle est hypertrophié (voir plus loin). Cependant, la force maximale spécifique (sP_0), i.e. la force maximale rapportée au poids du muscle (ou à la surface de la section transversale du muscle), est systématiquement inférieure (Coley et al., 2016; Lynch et al., 2001; Pastoret and Sebillé, 1993). Cette diminution de la sP_0 reflète probablement la présence croissante de fibres dégénératives et/ou nécrotiques (Watchko et al., 2002). En effet, si le muscle mdx est indifférenciable de celui des souris sauvages au cours des 2 premières semaines, une nécrose se met en place entre 3 à 6 semaines. Cette phase nécrotique est rapidement compensée par une régénération intensive des fibres musculaires, à l'origine d'un phénotype musculaire hypertrophique. En effet, le muscle squelettique des souris mdx a souvent un poids plus important que celui d'une souris sauvage (Pastoret and Sebillé, 1993; Sacco et al., 1992). Par ailleurs, il a été observé que les souris mdx présentent une plus grande

INTRODUCTION - Les modèles expérimentaux de la DMD

proportion de fibres hypertrophiques (Coley et al., 2016). L'augmentation de la surface musculaire sans augmentation de la force maximale absolue explique ainsi la diminution de la sPo. À partir de 12 mois, l'hypertrophie régresse pour aboutir vers 18 mois à une atrophie musculaire importante chez les muscles de souris mdx (Pastoret and Sebille, 1993).

IV.3. LA SOURIS D2-MDX : UN MODÈLE SÉVÈRE DE LA DMD

IV.3.1. Introduction

Une nouvelle lignée de souris, la souris DBA/2.B10- *Dmd*^{mdx} (D2-mdx), semble prometteuse afin d'étudier l'efficacité des traitements thérapeutiques de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ce modèle issu de cinq rétrocroisements, possède la même mutation non-sens (cytosine en thymine) au niveau de l'exon 23 mais sur le fond génétique de souris DBA/2.

Les D2-mdx présentent plusieurs aspects de la pathologie identiques à la pathologie humaines, tels qu'une hausse de la perméabilité du sarcolemme, une augmentation de la fibrose et de l'inflammation ainsi qu'une altération des cellules satellites, à l'origine d'une faible régénération (Coley et al., 2016).

Des polymorphismes, sur les gènes de la protéine latente de liaison au TGF- β 4 (*Ltbp4*) et l'annexine A6 (*Anxa6*), semblent être la cause de l'aggravation des caractéristiques dystrophiques dans le modèle D2-mdx (Heydemann et al., 2009; Swaggart et al., 2014). En effet, *Ltbp4* et *Anxa6* altèrent ensemble la réparation musculaire, et seraient à l'origine de l'augmentation du tissu fibreux et de la diminution de la régénération cellulaire (Gordish-Dressman et al., 2018; Quattrocelli et al., 2017).

Le fond génétique des souris DBA/2 offre donc de nets avantages par rapport au modèle classique, afin d'étudier le phénotype musculaire. Toutefois, il est important de noter que les DBA/2 de type sauvage ont souvent une fibrose et des calcifications cardiaques, ce qui peut poser problème pour étudier la pathologie cardiaque, puisqu'il devient difficile de différencier ce qui est lié à l'absence de dystrophine, ou causé par le fond génétique (Gordish-Dressman et al., 2018).

IV.3.2. Données histopathologiques

La souris D2-mdx se caractérise également par des marqueurs histopathologiques plus marqués, comparé à la souris mdx (**Figure I-18**). En effet, une plus grande augmentation de tissu fibreux a été observé dans différents muscles dans ce modèle D2-mdx (Fukada et al., 2010; Vohra et al., 2017). Par ailleurs, la fibrose est plus précoce et plus étendue dans le diaphragme et le tissu cardiaque que chez la souris mdx (Gordish-Dressman et al., 2018). En outre, la régénération musculaire amoindrie, à l'origine de l'atrophie, est corrélée au niveau histologique avec une diminution de fibres musculaires centro-nuclées et de fibres révertantes (Rodrigues et al., 2016a). Enfin, les souris D2-mdx développent une calcification importante des muscles squelettiques et du cœur à des degrés divers, mais tend à diminuer avec l'âge.

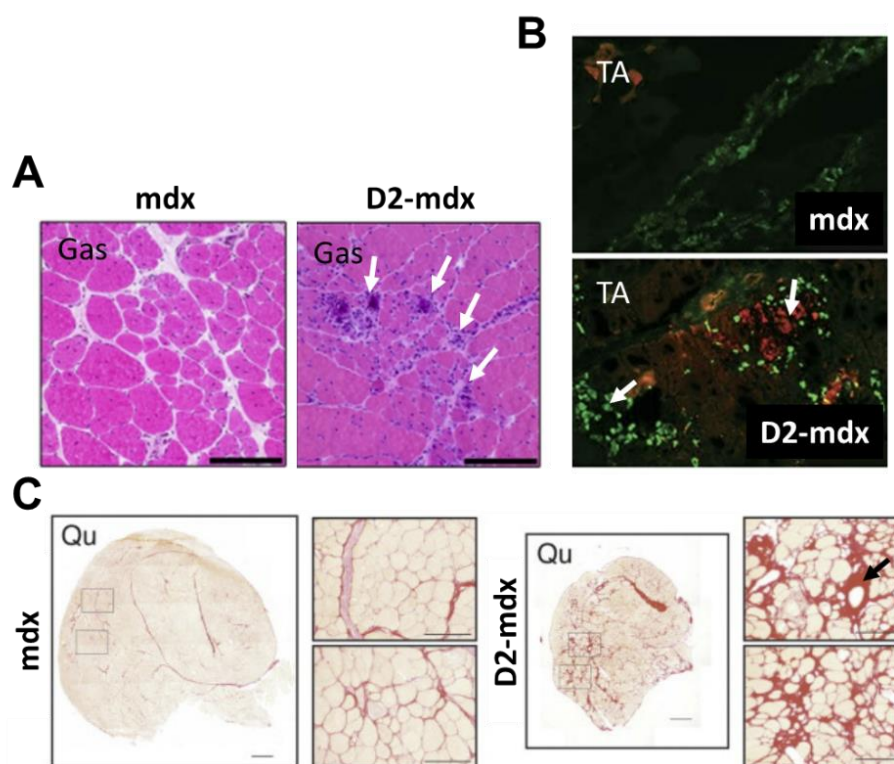


Figure I- 18 : Image représentatives de l'histopathologie musculaire de la souris mdx. (Panneau A - *Images adaptées de Hammers et al., 2020*) Marquage H&E (hématoxyline et éosine) chez des souris mdx et D2-mdx âgées de 12 semaines. La souris D2-mdx présente une forte présence de foyers nécrotiques (flèches). (Panneau B – *Images adaptées de Coley et al., 2016*) Les souris D2-mdx de 8 semaines présentent des niveaux accrus d'absorption d'EBD (Evan Blue Dye), un marqueur des dommages musculaires (rouge), ainsi que de myh3 (vert), un marqueur de régénération, par rapport aux souris mdx du même âge. (Panneau C – *Images adaptées de Fukada et al., 2010*) Les souris D2-mdx de 8 semaines présentent une accumulation de fibrose (flèche), par rapport à des souris mdx du même âge. Les muscles sont abrégés comme suit : Gas, gastrocnémien ; TA, tibial antérieur ; Qu, quadriceps. Bar d'échelle : 100µm.

IV.3.3. Données cliniques et physiologiques

Les souris D2-mdx ont un phénotype plus sévère que les souris mdx, du fait de la présence d'une atrophie musculaire, causée par une altération des cellules satellites, provoquant une baisse de la régénération cellulaire (Fukada et al., 2010). Les muscles squelettiques des membres inférieurs (quadriceps, tibial antérieur, gastrocnémiens, soléaire et l'extenseur des doigts longs) des souris D2-mdx présentent une perte musculaire autant chez les souris jeunes (7 semaines) que les souris âgées de 52 semaines, contrairement à la souris mdx dont les muscles sont hypertrophiés et ne développent qu'une atrophie tardive (Coley et al., 2016; Vohra et al., 2017). La diminution du nombre de fibres (Fukada et al., 2010), ainsi que la réduction de la surface transversale des fibres, mis en évidence dans les muscles des membres inférieurs (Coley et al., 2016; Fukada et al., 2010; Vohra et al., 2017) sont à l'origine de l'atrophie musculaire observée (**Tableau I-1**). Pareillement, les souris D2-mdx ont une masse corporelle nettement inférieure aux souris mdx mais aussi aux souris contrôles (DBA/2) (Coley et al., 2016; Fukada et al., 2010; Gordish-Dressman et al., 2018). Cette perte de masse corporelle s'explique également par une présence moindre de graisse et une diminution de la masse maigre (Gordish-Dressman et al., 2018).

Paramètre	Muscle	Âge (semaines)	Effet (%/mdx)*	Référence
Masse	EDL	4	55%	(Hammers et al., 2020)
		6	37%	
		8	55%	
		12	41%	
		28	53%	(Vohra et al., 2017)
			44%	(Coley et al., 2016)
	TA	28	44%	(Vohra et al., 2017)
	GAS	28	37.5%	(Vohra et al., 2017)
	SOL	28	57%	(Vohra et al., 2017)
P0	EDL	4	43%	(Hammers et al., 2020)
		6	47%	
		8	50%	
		12	42%	
		28	45%	(Coley et al., 2016)

INTRODUCTION - Les modèles expérimentaux de la DMD

sP0	EDL	4	98%	(Hammers et al., 2020)
		6	113%	
		8	96%	
		12	94%	
		28	30%	(Coley et al., 2016)
Fragilité	EDL	12	50%	(Hakim et al., 2017)
	TA	12	45%	

Tableau I- 1 : Données de la littérature sur la masse musculaire et certains paramètres fonctionnels. * Les données sont présentées en pourcentage par rapport au souris, excepté pour la fragilité où les données sont rapportées à des souris DBA2/J. Les muscles sont abrégés comme suit : EDL, long extenseur des orteils ; TA, tibial antérieur ; GAS, gastrocnémien ; SOL, soléaire. P0 : force maximale absolue ; sP0 : force maximale absolue.

En outre, au niveau fonctionnel, la souris D2-mdx présente une fragilité musculaire (Kennedy et al., 2018) encore plus marquée que chez la souris mdx (données de l'équipe non publiées). Contrairement aux souris mdx, qui ne présentent qu'une diminution de la force spécifique (sP0), les souris D2-mdx montrent une réduction significative de la sP0 mais aussi de la force maximale absolue (P0) à 28 semaines (Coley et al., 2016). Des données de la littérature concernant les paramètres étudiés dans cette thèse chez la souris D2-mdx sont présentées dans le **Tableau I-1**.

V. LES TRAITEMENTS DE LA DMD

V.1. INTRODUCTION

À ce jour, il n'existe pas de traitement curatif pour soigner les patients atteints de DMD, même si des essais thérapeutiques visant à restaurer l'expression de la dystrophine dans le muscle squelettique sont à l'étude depuis des années. La prise en charge est multidisciplinaire et vise essentiellement à prévenir les complications, notamment orthopédiques, cardiaques et respiratoires, afin d'améliorer le confort et la durée de vie des patients. Les glucocorticoïdes sont les seuls traitements disponibles pour ralentir le déclin de la force musculaire et de la fonction pulmonaire, prolonger la capacité du patient à rester mobile et retarder l'apparition de la cardiomyopathie et de la scoliose (Bushby et al., 2010). Néanmoins, les glucocorticoïdes engendrent fréquemment une ostéoporose à l'origine de nombreuses fractures chez les garçons atteints de DMD et ne font guère plus que ralentir modestement la progression de la pathologie (Larson and Henderson, 2000). En conséquence, d'autres approches thérapeutiques sont indispensables. Le développement de thérapies géniques pour traiter directement la cause de la pathologie est en cours. Malheureusement, cette approche thérapeutique ne sera probablement pas suffisante, pour récupérer un muscle doué d'une fonction normale. Ainsi, le développement d'autres thérapies complémentaires visant à améliorer la fonction musculaire est devenu un enjeu primordial afin d'améliorer de façon plus notable les conditions de vie des patients.

V.2. LA THÉRAPIE GÉNIQUE POUR RESTAURER LA DYSTROPHINE

V.2.1. Les thérapies en cours de développement

Un certain nombre d'approches précliniques sont développées afin de traiter directement la cause de la DMD, en restaurant la dystrophine. Ce type de traitement ciblant le défaut primaire comprends la thérapie cellulaire, l'édition génique, la thérapie reposant sur la translecture du codon stop, la thérapie génique par transfert de gène (micro-dystrophine) et enfin la thérapie utilisant le saut d'exon (Cordova et al., 2018), que nous utiliserons dans le cadre du travail expérimental de l'axe 2 de cette thèse.

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

V.2.2. La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire repose sur la transplantation de cellules capables de produire de la dystrophine fonctionnelle chez des patients atteints de DMD. Les cellules peuvent être soit des cellules génétiquement non modifiées provenant de donneurs sains, soit des cellules autologues génétiquement corrigées (Shimizu-Motohashi et al., 2019). Pour ce faire, plusieurs types de cellules sont considérés comme candidats, notamment les cellules satellites, les myoblastes ainsi que des cellules souches. Néanmoins, l'efficacité de la thérapie par cellules souches est faible, car celles-ci ont une capacité de prolifération limitée dans des conditions de culture et les cellules souches transplantées ne sont pas absorbées par le muscle squelettique (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). De plus, bien que l'utilisation de myoblaste ait permis de restaurer localement la dystrophine chez des patients atteints de DMD, l'efficacité de ce traitement est également très faible, car elle nécessite des conditions de culture optimales pour éviter la différenciation des cellules *in vitro* pendant le processus de production, et peut entraîner des effets indésirables graves tels que la thrombose et l'accident vasculaire cérébral (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). En outre, ce type de traitement présente dans certains cas des risques de réactions immunitaires (Barthélémy and Wein, 2018).

V.2.3. L'édition génique

L'édition génique est une thérapie qui repose sur la technologie CRISPR-Cas9, qui permet d'induire des cassures d'ADN double brin à des endroits spécifiques du génome. Cette technique permet de modifier directement le gène DMD mutant pour permettre la production de la protéine dystrophine. L'édition du génome a été utilisée avec succès pour restaurer l'expression d'une dystrophine tronquée dans des myoblastes dérivés de patients, des cellules musculaires dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ainsi que chez la souris mdx (Bengtsson et al., 2017; Long et al., 2014, 2016; Nelson et al., 2016; Tabebordbar et al., 2016).

Un des intérêts majeurs de cette approche est qu'elle permet de supprimer plusieurs exons à la fois, ce qui permettrait de soigner un grand nombre de mutations. Néanmoins, à ce jour, pour de grandes délétions, l'édition ne permettrait que la production de dystrophines plus petites. En outre, bien que l'édition du génome offre

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

la possibilité théorique qu'un seul traitement puisse être efficace, des traitements répétés pourraient toujours être nécessaires pour les patients atteints de DMD, car il y a un risque de diminution progressive des niveaux de dystrophine partiellement fonctionnelle au fil du temps (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). À cela s'ajoute que la Cas9 est connu pour induire des ruptures d'ADN à des endroits autres que les sites cibles, et pourrait produire des modifications permanentes de l'ADN indésirables et dangereuses. Des études à long terme sur des modèles animaux sont nécessaires pour élucider la longévité et les risques liés à l'édition du génome dans la DMD.

V.2.4. La translecture des codons stop

La thérapie par translecture du codon stop est une approche applicable aux patients porteurs de mutations non-sens, c'est-à-dire une mutation ponctuelle qui transforme un codon d'acide aminé en un codon stop. Ce type de mutation concerne environ 13% de tous les patients atteints de DMD (Aartsma-Rus et al., 2016). La particularité des mutations non-sens est qu'elles n'entraînent pas de décalage du cadre de lecture, cependant l'arrêt prématuré de la traduction est à l'origine d'une dystrophine plus courte et non fonctionnelle.

Certains composés, comme la gentamicine, ont la capacité de s'associer à ces codons d'arrêt prématurés permettant ainsi de forcer la machinerie traductionnelle à incorporer un acide aminé dans la protéine plutôt que d'arrêter la traduction (Malik et al., 2010). Toutefois, l'utilisation chronique de la gentamicine est interdite en raison d'une toxicité rénale et d'ototoxicité. Un autre composé, l'alaturen, a été identifié et présente un meilleur profil d'innocuité que la gentamicine (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). Ce traitement a été associé à une amélioration fonctionnelle chez la souris mdx (Welch et al., 2007). Chez l'homme, bien qu'il n'ait permis qu'une production minimale de dystrophine il semble prolonger la phase ambulatoire des patients jusqu'à 5 ans (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019).

V.2.5. Le transfert de gène de mini- ou micro-dystrophine

Le transfert de gène est un des traitements potentiels pour restaurer la dystrophine. Il consiste à injecter un transgène codant pour une dystrophine fonctionnelle *via* un vecteur viral. Pour ce faire, des virus adéno-associé (AAV) sont utilisés, car la plupart des sérotypes possèdent un tropisme musculaire (Duan, 2018).

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

Les virus adéno-associés (AAV) sont de petits virus, d'environ 25 nm, découverts en 1964 par l'équipe d'Atchison dans une préparation d'adénovirus (Atchison et al., 1965). Ces virus appartiennent au genre *Dependoparvovirus*, dont les membres nécessitent un virus auxiliaire pour se répliquer. En l'absence de virus auxiliaire, l'AAV reste en phase de latence sous forme épisomale ou intègre son génome dans certains sites spécifiques du génome de l'hôte (Wu et al., 2006).

Le génome de l'AAV est une molécule d'ADN simple brin linéaire de 4,7 kb de longueur qui se compose de deux grands cadres de lecture ouverts (ORF, de l'anglais « *Open reading Frame* »), qui codent pour les protéines Rep et Cap, et sont entourées de séquences palindromiques appelées ITR (de l'anglais « *Inverted Terminal repeats* »). Les ITR sont les seuls éléments *cis* nécessaires à la réplication du génome et à son encapsidation. Le gène *rep* code 4 protéines non structurales nécessaires à la réplication du virus et nommées en fonction de leur poids moléculaire : Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40. Le gène *cap*, code quant à lui, pour des protéines structurales virales, VP1, VP2 et VP3, qui donnent à la capsid virale sa forme icosaédrique (Wu et al., 2006).

Tissu	Sérotype(s) optimal(s)
Foie	AAV8, AAV9
Muscle squelettique	AAV1, AAV7, AAV6, AAV8, AAV9
SNC	AAV5, AAV1, AAV4
Epithélium pigmentaire de la rétine	AAV5
Cellules photoréceptrices	AAV5, AAV4
Poumon	AAV9
Cœur	AAV8
Pancréas	AAV8
Rein	AAV2

Tableau I- 2 : Efficacité des différents sérotypes AAV dans les principaux tissus. (Issu de Wu et al., 2006). SNC : système nerveux central.

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

À ce jour une dizaine de sérotypes d'AAV d'origine humaine et primate ont été identifiés, chacun avec un profil de transduction et un tropisme spécifique (**Tableau I-2**). Dans le muscle squelettique, les sérotypes AAV 1, 6, 7, 8 et 9 ont montré une transduction efficace dans la plupart des modèles animaux (Muraine et al., 2020).

Cependant, la capacité d'encapsidation maximale d'un vecteur AAV est d'un peu moins de 5 kb, alors que les transcrits du gène *DMD* et de l'ARNm de la dystrophine pleine longueur sont très grands (2,2 Mb et 14 kb, respectivement). Cette limitation des AAV ont conduit au développement de gènes codant pour des mini- et micro-dystrophine, qui sont des variantes de la dystrophine plus courtes avec des délétions internes qui permettent une production d'une protéine partiellement fonctionnelle, associée à un phénotype de type Becker (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). À ce jour, plus de 30 configurations différentes de micro-dystrophines synthétiques ont été rapportées (Duan, 2018).

Chez la souris D2-mdx l'injection d'un AAV-micro-dystrophine a réduit considérablement les caractéristiques histopathologiques dans le muscle squelettique, et à améliorer la fonction musculaire (Hakim et al., 2017). Des résultats similaires ont été observé chez la golden retriever (GRMD), le modèle canin de la DMD (Duan, 2018). Chez l'homme, plusieurs essais cliniques sont en cours. Un des essais a notamment révélé une restauration de la dystrophine dans au moins 80 % des fibres musculaires, ainsi qu'une amélioration de la fonction musculaire chez les patients traités (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019).

Néanmoins, plusieurs questions et limitations restent en suspens. En effet, bien que les micro-dystrophines soient fonctionnelles, elles sont 40 % plus courtes que la plus petite dystrophine naturelle signalée chez un patient atteint de BMD, ce qui interroge sur l'efficacité de ce traitement chez l'homme (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). Par ailleurs, les effets positifs de micro-dystrophines chez les modèles animaux ne sont pas directement transposable à l'homme. Le phénotype de la souris mdx est amoindri par rapport à la pathologie humaine et il existe une grande variabilité de symptômes dans le modèle canin. Par conséquent, il est difficile de prédire dans quelle mesure les micro-dystrophines seront autant fonctionnelles chez l'homme sur la base de données provenant de modèles animaux (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). En outre, l'AAV est un virus épisomal et, en tant que tel, le renouvellement musculaire entraîne la perte

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

progressive des transgènes, et par conséquent de l'expression de la micro-dystrophine, au fil du temps (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). Enfin, une des grandes limitations de l'utilisation de cette approche thérapeutique est qu'elle provoque une réponse immunitaire chez les patients, à l'encontre de la capsid virale mais aussi de la micro-dystrophine elle-même (Mendell et al., 2010). Cependant, des recherches récentes ont montré des résultats prometteurs d'un traitement utilisant un vaccin à ADN amortissant la réponse immunitaire contre la micro-dystrophine ainsi que la capsid virale (Ho et al., 2018).

V.2.6. Le saut d'exon

V.2.6.1. Administration d'oligonucléotides antisens (AON)

Le saut d'exon est une approche thérapeutique qui permet de corriger le cadre de lecture perturbé chez les patients atteints de DMD. Une première façon de faire consiste à administrer des petits ARN modifiés, appelés oligonucléotides antisens (AON), qui se lient à une séquence spécifique de l'exon muté dans le transcrit pré-ARNm de la dystrophine, empêchant sa reconnaissance par le spliceosome, ce qui entraîne son élimination lors de l'épissage (**Figure I-19**). Comme le cadre de lecture est maintenu en l'absence de l'exon muté, une dystrophine plus courte mais fonctionnelle est générée, ce qui convertit le phénotype DMD sévère en un phénotype DMD plus modéré (BMD) (Shimizu-Motohashi et al., 2019).

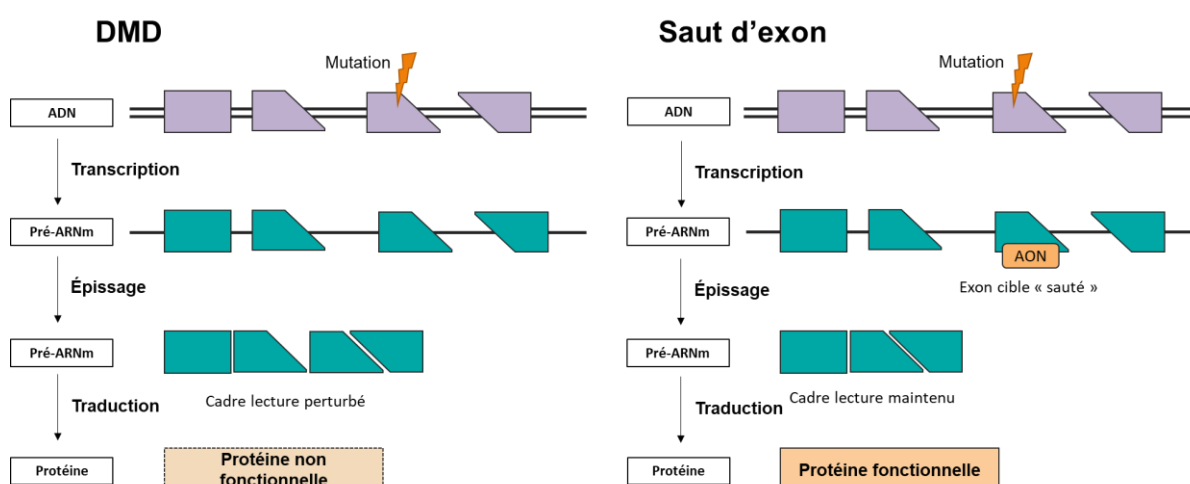


Figure I- 19 : Principe du saut d'exon. (Adapté de Verhaart and Aartsma-Rus, 2019). À gauche : Mécanisme conduisant à la production d'une protéine non fonctionnelle dans la DMD. À droite : Le saut d'exon permet de restaurer le cadre de lecture dans la DMD et permet ainsi d'obtenir une protéine plus courte mais fonctionnelle. AON : oligonucléotide antisens.

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

Théoriquement, le saut d'exon est applicable à environ 80% des mutations dans la DMD (Aartsma-Rus et al., 2009), ce qui en fait une approche particulièrement intéressante.

Les deux principaux oligonucléotides antisens (AON) développés pour sauter l'exon 51 (13 à 14% de tous les patients atteints de DMD) sont l'eteplirsén (développé par Sarepta Therapeutics) qui utilise un Oligomère morpholino phosphorodiamidate (PMO) et le drisapersén (développé par Prosensa), utilise quant à lui le 2'-O-méthyl-phosphorothioate (2'OMePS). Cependant, ces deux traitements n'ont pas été approuvés par l'Agence Européenne de Médecine, car ils n'ont pas montré de bénéfice fonctionnel suffisant et ont été associés à deux nombreux effets indésirables (réaction allergique, protéinurie, thrombocytopenie) (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019).

Si le développement de nouveaux AONs plus efficaces et moins toxiques sont toujours en cours, quelques obstacles majeurs persistent. D'une part, leur efficacité est extrêmement faible dans le muscle cardiaque. D'autre part, les AONs ont une faible absorption cellulaire et une clairance dans la circulation sanguine relativement rapide, ce qui signifie que des administrations répétées sont nécessaires pour obtenir une certaine efficacité thérapeutique (Goyenvallé et al., 2012).

V.2.6.2. Administration d'AAV-U7-dex23

Dans le travail expérimental de thèse (Axe 2), nous nous sommes intéressés, à une thérapie génique AAV-U7 reposant sur cette stratégie de saut d'exon. Cette thérapie est particulièrement intéressante car elle utilise de petits ARN nucléaires (snRNA) liés à la séquence antisens qui va cibler le pré-ARNm, ce qui améliore considérablement l'efficacité du saut d'exon (Goyenvallé et al., 2004a).

Goyenvallé et ses collaborateurs ont modifié un U7 snRNA, normalement impliqué dans la maturation des histones, avec une séquence consensus de liaison Sm dérivée des principaux snRNP (de l'anglais « *small nuclear ribonucleoprotein* ») spliceosomale (SmOPT), afin d'être redirigé vers le spliceosome et utilisé pour délivrer une séquence antisens ciblant la mutation de l'exon 23. La séquence antisens utilisée est composée d'une séquence de 24 nucléotides, située au niveau du point de ramification d'épissage dans l'intron 22 (BP22), et d'une séquence de 20 nucléotides dans l'intron

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

23 qui correspond à la région de liaison du snRNP U1 sur le site donneur (SD23) (**Figure I-20**) (Goyenvalle et al., 2004a).

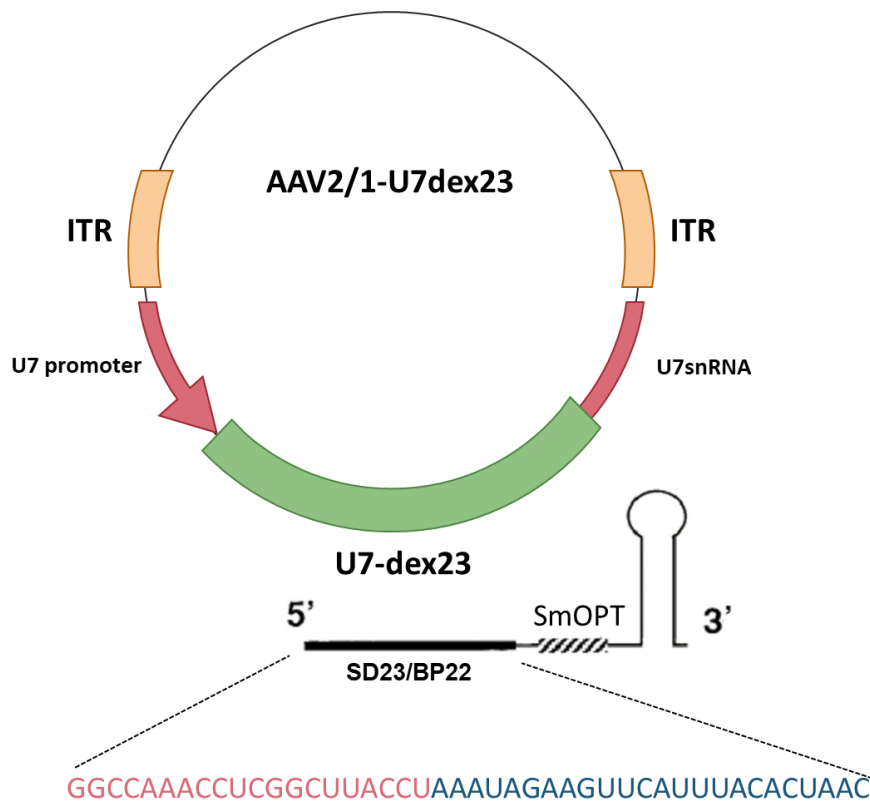


Figure I- 20 : Construction de l'AAV-U7dex23. (Adapté de Goyenvalle et al., 2004b). Le U7snARN transformé en U7-dex23 spécifique de l'exon 23 du gène de la dystrophine murine est cloné entre les deux ITR d'un vecteur AAV2, encapsidé ensuite dans un vecteur AAV de type 1. Ce U7snARN est inséré sous le contrôle de son propre promoteur et de ses régions 3' régulatrices, permettant l'expression d'un petit ARN modifié U7-dex23.

Chez la souris mdx, l'U7dex23 a permis une expression de la dystrophine dans près de 60 à 80% des fibres musculaires (Goyenvalle et al., 2004a; Roy et al., 2016). En plus d'une très bonne restauration de la dystrophine plusieurs études ont montré les effets bénéfiques de cette thérapie génique sur la fonction musculaire des souris mdx (**Tableau I-3**). À notre connaissance, il n'y a pas encore d'études décrivant l'effet de cette thérapie génique chez la souris D2-mdx.

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

Paramètre	Muscle	Âge (semaines)	Effet (%)	Référence
P0	TA	6	+14%	(Hoogaars et al., 2012)
		6	+16%	(Dumonceaux et al., 2010)
sP0	TA	6	+20%	(Hoogaars et al., 2012)
		6	+14%	(Dumonceaux et al., 2010)
		12-24	+19%	(Roy et al., 2016)
Fragilité	EDL	6	Equivalente à une souris sauvage	(Goyenvalle et al., 2004a)
	TA	12-24	+10% de force	(Roy et al., 2016)
		6	+190% de force après 9 contractions	(Hoogaars et al., 2012)

Tableau I- 3 : Données de la littérature sur les effets d'U7dex23 sur la fonction musculaire de souris mdx. Les données sont présentées en pourcentage de perte ou de gain par rapport à une souris sédentaire. Les muscles sont abrégés comme suit : EDL, long extenseur des orteils ; TA, tibial antérieur. P0 : force maximale absolue ; sP0 : force maximale absolue.

V.3. LES TRAITEMENTS POUR DIMINUER LES SYMPTÔMES CLINIQUES

V.3.1. Les principaux traitements symptomatiques à l'étude

Un certain nombre de stratégies pharmacologiques et géniques sont développées afin d'améliorer les symptômes de la DMD. Ces traitements ont pour objectif de diminuer l'inflammation, améliorer l'homéostasie calcique, réguler à la hausse les protéines compensatrices telle que l'utrophine, augmenter la prolifération ou l'engagement de progéniteurs musculaires, diminuer la fibrose. Une partie de ces traitements en essais cliniques sont décrits ci-dessous (**Tableau I-4**). Les stratégies pharmacologiques offrent l'avantage d'être faciles à appliquer par voie systémique et de contourner bon nombre des problèmes immunologiques et/ou de toxicité liés aux vecteurs AAV (Khurana and Davies, 2003).

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

Composé	Mécanisme d'action	Phase d'essai
Fibrose		
Coenzyme Q10	Accepteur d'électrons pour NADH et succinate déshydrogénase	Phase II/III
Halofuginone	Inhibiteur de la chaîne α 1(I) du collagène et de la MMP2	Phase I/II (terminée)
Tamoxifène	Modulateur des récepteurs aux œstrogènes	Phase III
Pamrevlumab	Anticorps anti-CTGF	Phase II
Fibrose et régénération		
Givinostat	Inhibiteur de l'histone désacétylase	Phase II/III
Inflammation		
Prednisone, prednisolone et déflazacort (corticostéroïdes)	Immunosuppresseurs	Phase III
Vamorolone	Inhibiteur de NF- κ B	Phase II et phase III (prévues)
Edasalonexent	Inhibiteur de NF- κ B	Phase III
Cosyntropine	Activateur des récepteurs de la mélanocortine	Phase II
Flavocoxyde	Inhibiteur de NF- κ B	Phase I
TAS-205	Inhibiteur hématopoïétique de la prostaglandine D synthase	Phase IIa
Croissance et régénération musculaire		
Domagrozumab	Anticorps ciblé sur la myostatine	Phase II (terminée)
Talditercept alfa	Adnectine anti-myostatine	Phase II/III
rAAV1.CMV.huFollistatine344	Inhibiteur de la myostatine	Phase I/II
Homéostasie calcique		
Idébénone	Antioxydant	Phase III
Riméporide	Inhibiteur de l'échangeur sodium-hydrogène 1	Phase I
Régulation positive de l'utrophine		
rAAVrh74.MCK. GALGT2	GALGT2 surexpression	Phase I/II
Ezutromid	Modulation de l'utrophine	Phase II (terminée)

Tableau I- 4 : Traitements secondaires de la myopathie de Duchenne visant à améliorer les symptômes musculaires. (*Adapté de Verhaart and Aartsma-Rus, 2019*). CTGF, facteur de croissance du tissu conjonctif ; GALGT2, le gène codant pour la 1,4 N- acétylgalactosaminyltransférase 2 ; MMP2, métalloprotéinase matricielle 2 ; NF-κB, facteur nucléaire-κB.

Une approche thérapeutique très importante, testée au stade préclinique, vise à réguler à la hausse l'utrophine dans le muscle dystrophique. En effet, l'utrophine a 80 % d'homologie avec la dystrophine (Deconinck et al., 1997). La présence d'utrophine est beaucoup plus élevée dans les muscles à contraction lente que dans les muscles à contraction rapide, dans les muscles sains (Chakkalakal et al., 2004). L'idée sur laquelle se base cette approche thérapeutique est que l'utrophine aurait la capacité de compenser fonctionnellement la dystrophine (**Tableau I-4**). D'ailleurs, la surexpression constitutive d'une utrophine tronquée chez des souris mdx a amélioré considérablement les caractéristiques dystrophiques, dont la résistance mécanique et la stabilité du sarcolemme (Deconinck et al., 1997). Plus récemment, en 2018, Kennedy et al., ont montré qu'une thérapie génique visant à surexprimer la micro-utrophine pouvait atténuer la pathologie du muscle squelettique et cardiaque chez les souris D2-mdx.

V.3.2. Traitements visant à promouvoir des fibres plus lentes et plus oxydatives

V.3.2.1. *Introduction*

Ces dernières années, l'activation de voies de signalisation favorisant un phénotype musculaire plus lent et/ou oxydatif, est une stratégie pré-clinique qui a été très étudiée. En effet, plusieurs études indiquent que l'activation de voies de signalisation favorisant des fibres plus lentes et/ou plus oxydatives atténue certaines des caractéristiques dystrophiques du muscle mdx. Parmi elles, on retrouve les voies de signalisation impliquant l'AMPK (Al-Rewashdy et al., 2015; Ljubicic et al., 2011), ERRγ (Matsakas et al., 2013), IGF1 (Gehrig et al., 2010), SIRT1 (Chalkiadaki et al., 2014), PGC1 (Selsby et al., 2012) et calcineurine/NFAT (Chakkalakal et al., 2004; Stupka et al., 2006).

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés au transfert du gène *Prox1* sensé activer la voie calcineurine. En effet, bien qu'elle puisse aggraver la faiblesse musculaire, l'activation génétique de cette voie diminue la fragilité du muscle de la

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

souris mdx (Stupka et al., 2006) et semble donc particulièrement intéressante pour stopper la progression de la DMD.

V.3.2.2. *La voie calcineurine et la spécialisation des types de fibres dans le muscle squelettique*

La signalisation de la calcineurine a été caractérisée pour la première fois dans le système immunitaire (Flanagan et al., 1991; Mattila et al., 1990). Depuis, il est connu que cette voie est impliquée dans le processus de développement de nombreux systèmes (musculaire, cardiaque, immunitaire etc...) (Olson and Williams, 2000). La calcineurine est une sérine/thréonine phosphatase dépendante du calcium, également connue sous le nom de protéine phosphatase 2B (PP2B). Il s'agit d'un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique et de liaison à la calmoduline de 58 à 64 kDa, la calcineurine A (CnA), et d'une sous-unité régulatrice de liaison au Ca^{2+} de 19 kDa, la calcineurine B (CnB) (Dupont-Versteegden et al., 2002). Elle forme un complexe avec la calmoduline, une protéine de liaison du calcium. Les principaux substrats de l'activité de la calcineurine phosphatase comprennent la plupart des membres de la famille des facteurs nucléaires des lymphocytes T activés (NFAT) ; une famille de facteurs de transcription jouant un rôle central dans la réponse immunitaire. Il existe quatre membres de la famille NFAT sensibles au Ca^{2+} : NFATc1, NFATc2, NFATc3 et NFATc4 (Rao et al., 1997). Dans des conditions basales, les NFAT sont localisés dans le cytoplasme à l'état phosphorylé. Lors d'une augmentation du calcium intra-cellulaire, la liaison du calcium au complexe calmoduline-calcineurine stimule l'activité phosphatase de la calcineurine, et déphosphoryle les NFAT, favorisant leur translocation dans le noyau, où ils se lient à une séquence d'ADN consensus et stimulent la transcription de leurs gènes cibles (**Figure I-22**) (Rao et al., 1997). Plusieurs études ont mis en évidence que parmi ces gènes cibles se trouvent les gènes contrôlant la spécialisation des fibres. En effet, une étude a montré, que l'expression d'une forme activée de la calcineurine dans des cellules en cultures C2C12 entraîne l'activation du promoteur de plusieurs gènes codant pour des protéines contractiles de types lentes comme la troponine 1 (Delling et al., 2000). En outre, une l'injection de cyclosporine A (Csa), un inhibiteur de la calcineurine, a entraîné un remodelage musculaire prononcé vers des fibres de types rapides dans les muscles soléaires de rats (Chin et al., 1998a). Notre équipe a également montré que l'administration de Csa

INTRODUCTION - Les traitements de la DMD

bloquait le programme contractile lent induit par l'exercice physique chronique volontaire chez des souris mdx (Delacroix et al., 2018).

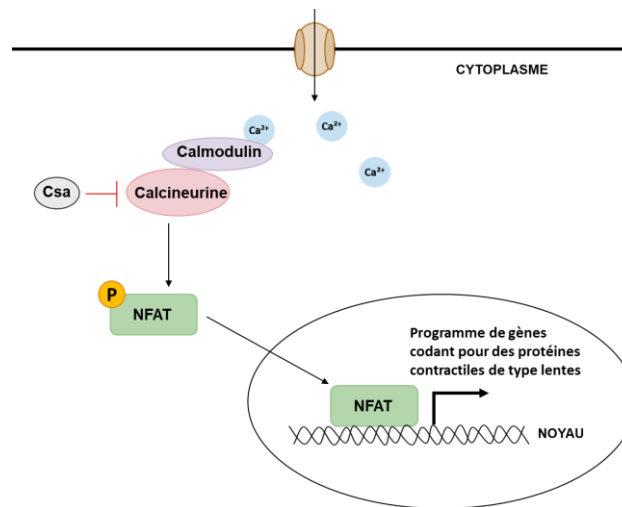


Figure I- 21 : Schéma de la voie calcineurine/NFAT. (Adapté de *phymedexp.edu.umontpellier.fr*). NFAT : facteur nucléaire des lymphocytes T activés ; P : phosphate.

V.3.2.3. *Prox1* : un activateur de la voie calcineurine/NFAT

Dans l'axe 2 de cette thèse, nous avons voulu surexprimer le facteur *Prospero*-homéobox 1 (*Prox1*) dans le muscle d'un modèle murin de DMD. Ce facteur de transcription hautement conservé chez les vertébrés est essentiel au développement de nombreux organes. En effet, les souris déficientes en *Prox1* meurent avant la naissance en raison de multiples défauts de développement (Wigle and Oliver, 1999). Récemment, plusieurs études ont mis en évidence que *Prox1* était impliqué dans l'activation de la voie NFAT/calcineurine et dans la spécialisation des types de fibres (Kivelä et al., 2016; Petchey et al., 2014; Roy et al., 2001). Chez le poisson zèbre, le gène *U-boot* (*Ubo*), qui régule les voies de différenciation lentes et rapides des fibres, active *Prox1* dans les myoblastes lents. De plus, une étude de Kivelä et al., a révélé que *Prox1* est plus exprimé dans les fibres lentes et que la surexpression de *Prox1* a régulé à la baisse les gènes contractiles rapides (*Myh2* et *Myh4*), alors qu'il a inversement régulé à la hausse la transcription de gènes contractiles lents tels que *Myh7*, *Myh1* et *Tnni1*. En outre, dans cette dernière étude, les auteurs ont mis en évidence que *Prox1* était un facteur de transcription essentiel requis pour la différenciation des myoblastes *via* une interaction bidirectionnelle avec *Notch1*.

VI. L'EXERCICE PHYSIQUE DANS LA DMD

VI.1. VERS UNE PRESCRIPTION DE L'EXERCICE PHYSIQUE CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE DMD ?

A l'heure actuelle, il n'existe pas encore de thérapies pour soigner de façon satisfaisante les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne. Comme nous l'avons vu précédemment, la prise en charge des patients repose essentiellement sur un traitement symptomatique dans lequel la physiothérapie tient une place importante (Ansved, 2001). L'exercice physique étant connu pour améliorer la fonction musculaire chez des individus en bonne santé, il semble être une alternative thérapeutique non invasive intéressante afin d'améliorer, maintenir ou retarder le déclin fonctionnel du muscle dystrophique (Call et al., 2010). Par ailleurs, l'exercice est aussi connu pour contrecarrer bon nombre des effets négatifs associés à la DMD (comme la dépression, l'anxiété, l'obésité...) chez des individus sains (Spaulding and Selsby, 2018). En outre, il améliore également la fonction cardiorespiratoire et augmente la masse musculaire chez les personnes en bonne santé, offrant ainsi le potentiel de combattre deux problèmes majeurs rencontrés par les patients DMD (Spaulding and Selsby, 2018).

Malheureusement, il y a encore très peu d'essais randomisés ou contrôlés chez les patients atteints de DMD et les populations de patients sont souvent hétérogènes (Eagle, 2002). D'après une méta-analyse de Gianola et al., en 2013, seulement cinq essais cliniques ont essayé de déterminer si l'exercice physique chronique améliorerait la force musculaire chez des patients DMD. Bien que les résultats de leur méta-analyse ne montrent pas de différences significatives de force musculaire et d'endurance entre les patients exercés et sédentaires, l'ensemble des études semblent rapporter une tendance pour des effets bénéfiques de l'exercice physique. Néanmoins, l'exercice apparaît avoir peu ou pas d'effets chez les enfants ayant déjà perdu la marche (Eagle, 2002), hormis pour les exercices inspiratoires qui semblent permettre d'améliorer efficacement la fonction respiratoires des patients (Aldrich and Uhrlass, 1987). En outre, le muscle dystrophique apparaît capable de s'adapter à l'exercice, avec l'apparition de fibres de types lentes lors d'exercices physiques chroniques (Eagle, 2002), suggérant la possibilité d'utiliser l'exercice pour améliorer les capacités fonctionnels des muscles de patients DMD.

INTRODUCTION - L'exercice physique dans la DMD

Si la prescription d'exercice physique pour la DMD reste encore difficile, c'est car de nombreuses incertitudes demeurent sur le choix du type, de la fréquence et de l'intensité de l'exercice pour ne pas endommager davantage le muscle. En effet, la grande crainte est que l'exercice physique engendre un stress mécanique excessif pour le muscle, entraînant des lésions supplémentaires du muscle dystrophique, particulièrement lors de contractions excentriques. Cette conviction, largement répandue, est basée sur des études chez la souris mdx, montrant une nécrose et une dégénérescence musculaire exacerbées suite à une séance de contractions excentriques (Mokhtarian et al., 1995; Petrof, 1998; Weller et al., 1990). Ces effets aigus de l'exercice sont également observables chez des sujets sains, mais dans une moindre mesure à contractions égales. Ces dommages musculaires induits plus facilement par une seule séance de contractions témoigne de la fragilité des muscles des souris mdx. Néanmoins, depuis plusieurs années des études démontrant les effets bénéfiques de l'exercice chronique sur le système locomoteur se multiplient chez des modèles murins de DMD (Delacroix et al., 2018; Dupont-Versteegden et al., 1994; Ferry et al., 2015a; Hyzewicz et al., 2015; Joanne et al., 2012; Lindsay et al., 2019a). Elles mettent en évidence que l'exercice physique chronique, sous différentes formes, induit non seulement des adaptations bénéfiques améliorant les performances musculaires, mais permet aussi de protéger le muscle dystrophique du stress mécanique lors de contractions intenses. Étudier et disséquer, en pré-clinique, les effets des différentes modalités d'exercice sur la fonction musculaire, mais également les autres fonctions (cardio-respiratoire et cognitive) est donc aujourd'hui un enjeu majeur pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients.

VI.2. LES DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX D'EXERCICE CHRONIQUES

VI.2.1. Introduction

Il existe de nombreux protocoles d'exercice qui peuvent être utilisés en préclinique afin de déterminer les effets de l'exercice ou encore pour aggraver le phénotype du muscle dystrophique chez la souris. Chacun d'eux varie en termes de type d'exercice (volontaire ou forcé, par exemple), de muscles recrutés par l'exercice, de fréquence de séances d'exercice et d'intensité des contractions musculaires.

INTRODUCTION - L'exercice physique dans la DMD

Plusieurs revues (Hyzewicz et al., 2015; Spaulding and Selsby, 2018) reviennent plus en détail sur les effets des différentes modalités d'exercices décrites ici sur les systèmes locomoteur et cardio-respiratoire. Ci-dessous sont décrits seulement les effets des principaux types d'exercices chroniques dans les modèles murins de DMD retrouvés dans la littérature.

VI.2.2. La course volontaire



Figure I- 22 : Photo d'une cage avec roue d'activité. (Issu de bio-equip.com)

Ce type d'exercice est considéré comme un exercice d'endurance de faible intensité, ce qui n'est pas aussi clair que cela car la souris peut être amenée à réaliser des « sprints » de courte durée. L'exercice de course volontaire consiste à laisser une roue à disposition dans la cage de la souris afin qu'elle puisse courir quand elle le souhaite. Cette modalité d'exercice est particulièrement intéressante pour réaliser un « entraînement » adapté à la souris, qui peut s'arrêter quand elle le souhaite. En effet, il n'est pas facile chez la souris de prescrire une intensité et une durée d'exercice adaptées aux capacités physiques de l'animal, dans la mesure où ces dernières ne sont pas évaluées comme on le fait classiquement chez l'homme (mesure de la consommation maximale d'oxygène...). Les effets bénéfiques de la course volontaire sont décrits dans la suite de ce chapitre (Cf. VI.3.1.1) car c'est un modèle d'exercice chronique dont nous allons étudier les effets (axes 1 et 2).

VI.2.3. La natation

La natation est aussi un exercice d'endurance. Toutefois, il est difficile d'évaluer le niveau d'intensité et de stress engendré lors d'un tel exercice pour la souris. Bien que la natation permette d'améliorer la fonction musculaire des membres postérieurs chez la souris mdx, de nombreux dommages musculaires ont été constatés seulement après une séance de 20 minutes (Spaulding and Selsby, 2018), ce qui suggère la difficulté d'établir des protocoles de natation adaptés, sans évaluation préalable des capacités physiques de l'animal.

VI.2.4. Le tapis roulant et le rotarod

Contrairement à la course volontaire sur roue, la course sur tapis roulant et la course rotative sont des exercices forcés. Les effets bénéfiques ou délétères de ce type d'exercice chronique dépendraient de la fréquence et de l'intensité des séances d'exercices imposées par l'expérimentateur. Une majorité d'études ont rapporté des effets néfastes sur la fonction musculaire et l'histopathologie des membres postérieurs avec cette modalité d'exercice lorsqu'il est réalisé avec le protocole standardisé TREAT-NMD (12m/min lors de séance de 30min 2 à 3 fois par semaine, pendant plusieurs semaines) (Hyzewicz et al., 2015; Spaulding and Selsby, 2018). D'ailleurs, c'était l'idée même de ce protocole TREAT-NMD recommandé pendant des années par la communauté scientifique pour empirer le phénotype modéré de la souris mdx. Toutefois, il existe aussi plusieurs études qui ont signalé que ce protocole de course forcée chronique sur tapis roulant ne réduisait pas la force maximale dans les muscles des membres postérieurs (Capogrosso et al., 2017; Gordon et al., 2014; Hovhannisyan et al., 2019; Kosir et al., 2015). En outre, une étude récente sur la souris D2-mdx a mis en évidence que l'exercice sur tapis de faible et moyenne intensité améliorerait la fonction des muscles postérieurs des souris sans exacerber les dommages musculaires (Zelikovich et al., 2019).

VI.2.5. La surcharge mécanique ou « overload » (OVL)

La surcharge mécanique ou « *overload* » (OVL) est un modèle non physiologique, largement utilisé depuis des décennies (Binkhorst and 't Hof MA van, 1973; Booth and Thomason, 1991; Michel et al., 1989; Roy and Edgerton, 1995), qui permet de reproduire un exercice de résistance chronique mimant un entraînement de musculation ou en force-vitesse. L'OVL consiste à retirer une partie des muscles des pattes postérieurs (souvent les muscles gastrocnémiens et le soleaire) et à ne laisser qu'un seul muscle de la loge postérieure de la jambe afin qu'il soit le seul à travailler (souvent le muscle plantaire) (**Figure I-24**). Ce modèle d'exercice supra-physiologique oblige le muscle restant à travailler intensément et à s'hypertrophier pour compenser la perte des autres muscles. Il est très utilisé car il est plus que difficile de demander à une souris de soulever une charge avec les membres inférieurs, comme on pourrait le demander à un sujet humain (qui réalise des squats avec une barre chargée sur les épaules). Il existe à ce jour très peu d'études qui se sont intéressées aux bienfaits d'un

INTRODUCTION - L'exercice physique dans la DMD

tel exercice chez des modèles murins de DMD, ceux-ci sont décrits dans la suite de ce chapitre (Cf. VI.3.1.2) car c'est un modèle d'exercice chronique dont nous allons étudier les effets (axe 3).

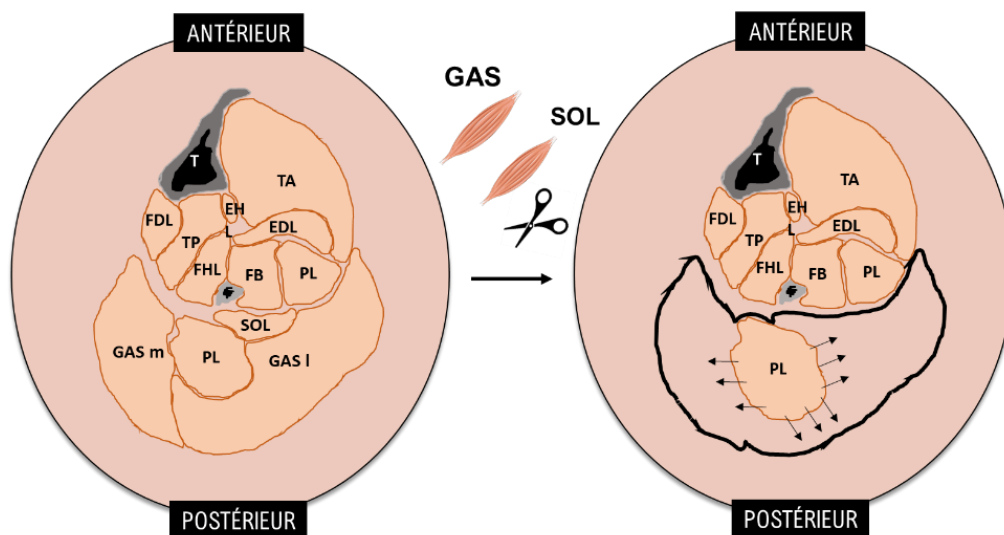


Figure I- 23 : Schéma représentatif d'une surcharge mécanique. Les muscles d'intérêt sont abrégés comme suit : PL, plantaris ; GAS m, gastrocnémien médial ; GAS l, gastrocnémien latéral ; SOL, soléaire.

VI.2.6. L'électrostimulation

L'électrostimulation est une autre technique pour mimer un exercice de résistance chronique. Les contractions isométriques génèrent une force sans modification de la longueur du muscle. Dans le muscle dystrophique de la souris mdx, il a été décrit que les contractions isométriques hypertrophient le muscle, réduisent la fibrose et améliorent la force maximale, sans engendrer aucun dommage musculaire (Lindsay et al., 2019a).

VI.3. EFFET DE LA COURSE VOLONTAIRE ET DE LA SURCHARGE MÉCANIQUE SUR LE MUSCLE STRIÉ SQUELETTIQUE

VI.3.1. Les bienfaits de l'exercice physique chronique chez la souris mdx

VI.3.1.1. *Effets de la course volontaire*

Bien que les souris mdx courent volontairement moins que des souris C57 contrôles (5,5km vs 7,5km par jour) (Hayes and Williams, 1996; Landisch et al., 2008),

INTRODUCTION - L'exercice physique dans la DMD

l'exercice de course volontaire montre des effets bénéfiques sur les muscles squelettiques des membres postérieurs, quel que soit l'âge de la souris, et le temps de l'entraînement (Spaulding and Selsby, 2018). Chez une souris saine, cet entraînement de faible intensité n'apporte que peu ou pas d'effet sur la fonction musculaire (Delacroix et al., 2018; Hourdé et al., 2013), même si le muscle semble parfois s'adapter à l'exercice avec un changement de fibres exprimant la MHC-2b au profit de fibres exprimant la MHC-2a et une augmentation de sa capacité oxydative mitochondriale (Landisch et al., 2008). *A contrario*, plusieurs études révèlent une amélioration significative de la fonction musculaire chez la souris mdx à la suite d'un exercice de course volontaire (**Tableau I-5**). La fragilité, i.e. la chute de force lors de contractions excentriques répétées, a diminué où ne s'est pas aggravée dans les muscles soléaire, TA et EDL de souris jeunes et adultes (Call et al., 2010; Delacroix et al., 2018; Ferry et al., 2015b; Hourdé et al., 2013). En outre, la force maximale absolue et spécifique des membres postérieurs augmentent (Call et al., 2010; Ferry et al., 2015b; Selsby et al., 2013) ou restent inchangées (Delacroix et al., 2018; Ferry et al., 2015b; Hourdé et al., 2013) et une légère hypertrophie semble apparaître (Call et al., 2008, 2010; Carter et al., 1995; Ferry et al., 2015b; Hourdé et al., 2013). Il en est de même pour la résistance à la fatigue, qui est augmentée de près de moitié dans le TA et l'EDL de jeunes souris de 4 semaines (Hayes and Williams, 1996; Hourdé et al., 2013).

Paramètre	Muscle	Âge (mois)	Protocole (semaines)	Effet (%)	Références
Fragilité	TA	2-4	1	-20%	(Delacroix et al., 2018)
		5	4	-48%	(Hourdé et al., 2013)
		7	12	=	(Ferry et al., 2015b)
	EDL	2-4	1	-10%	(Delacroix et al., 2018)
	SOL	1	12	=	(Call et al., 2010)
P0	TA	2-4	1	=	(Delacroix et al., 2018)
		5	4	+20%	(Hourdé et al., 2013)
		7	12	=	(Ferry et al., 2015b)
	EDL	2-4	1	=	(Delacroix et al., 2018)
		14	48	=	(Selsby et al., 2013)
	SOL	14	48	+36%	(Selsby et al., 2013)
	PL	1	12	+12%	(Baltgalvis et al., 2012)
M.A	1	12	+22%	(Call et al., 2010)	

INTRODUCTION - L'exercice physique dans la DMD

sP0	TA	2-4	1	=	(Delacroix et al., 2018)
		5	4	=	(Hourdé et al., 2013)
		7	12	+20%	(Ferry et al., 2015b)
	SOL	1	12	+26%	(Call et al., 2010)
Résistance à la fatigue	TA	5	4	+48%	(Hourdé et al., 2013)
	EDL	4	16	+45%	(Hayes and Williams, 1996)
		6	48	-9%	(Wineinger et al., 1998)
Masse	TA	1	12	+15%	(Call et al., 2010)
		2-4	1	=	(Delacroix et al., 2018)
		5	4	+9%	(Hourdé et al., 2013)
		7	12	+20%	(Ferry et al., 2015b)
		14	48	-10%	(Selsby et al., 2013)
	EDL	1	2,5	+14%	(Call et al., 2008)
		14	48	-10%	(Selsby et al., 2013)
	SOL	1	12	+23%	(Call et al., 2010)
	GAS	1	2,5	+15%	(Call et al., 2008)
QUA	14	48	-10%	(Selsby et al., 2013)	

Tableau I- 5 : Données de la littérature sur les effets de la course volontaire sur la fonction et la masse musculaire de souris mdx. Les données sont présentées en pourcentage de perte ou de gain par rapport à une souris sédentaire. Les muscles sont abrégés comme suit : EDL, long extenseur des orteils ; TA, tibial antérieur ; GAS, gastrocnémien ; SOL, soléaire ; QUA, quadriceps ; M.A, muscles des pattes antérieures. P0 : force maximale absolue ; sP0 : force maximale absolue.

Comme pour le muscle sain, le muscle de la souris mdx est capable de s'adapter et présente un changement dans la répartition des types de fibres, avec une diminution des fibres exprimant la MHC-2b et davantage de fibres exprimant la MHC-2a dans l'EDL (Landisch et al., 2008) et le soléaire (Hayes and Williams, 1996). Ce profil de fibres plus lente/oxydatif semble associé à une hausse de l'activité mitochondriale. En effet, une augmentation de la β -oxydation a été rapportée dans les quadriceps des souris mdx après une course volontaire de 20 jours (Call et al., 2008). En outre, les effets de ce type d'exercice sur la taille des fibres restent contradictoires Landisch et al., ont observé une réduction du nombre de fibres hypertrophiques dans les muscles soléaire et EDL, alors qu'une autre étude indique une augmentation de la CSA des fibres du soléaire de 20% (Selsby et al., 2013).

INTRODUCTION - L'exercice physique dans la DMD

Par ailleurs, la course volontaire ne paraît pas affecter la dégénérescence/régénération des fibres. Les fibres musculaires du soléaire ou de l'EDL de souris mdx qui ont couru ne sont pas plus nombreuses à présenter des noyaux centraux que celles des souris sédentaires (Landisch et al., 2008), ce qui suggère qu'il n'y a pas eu de dommages musculaires induits par l'exercice. En revanche, l'impact de la course volontaire sur la fibrose, autre marqueur utilisé pour évaluer les dommages musculaires, n'est pas encore clair. Il a été montré que la course n'avait pas d'effet sur la fibrose dans les TA de souris adultes (Hourdé et al., 2013) mais que celle-ci augmentait dans les muscles érecteurs du rachis chez des jeunes souris (10 à 12 semaines) (Brereton et al., 2012).

VI.3.1.2. *Effet de l'OVL*

La faiblesse musculaire étant généralement le problème majeur chez les patients atteints de DMD, l'emploi de la musculation pour contrer la perte de tissu musculaire ainsi que la perte de force, semble être une piste intéressante.

Chez la souris, l'exercice de résistance chronique est connu pour augmenter considérablement la force maximale absolue dans le muscle sain, notamment en réponse à une surcharge mécanique (OVL) (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012) qui permet de mimer un entraînement de musculation. Ce gain de force est expliqué par une hypertrophie des fibres qui implique les cellules satellites (Fukada et al., 2020). Cependant, il existe peu d'études qui se sont intéressées à l'effet de l'exercice de haute intensité et encore moins au modèle de surcharge mécanique dans des modèles expérimentaux de DMD (**Tableau 1-6**). Une des grandes craintes de ce modèle est qu'il exacerbe les dommages musculaires du fait de la fragilité des muscles des souris mdx. Cependant, les résultats obtenus après un OVL de 1 à 6 mois indiquent, au contraire, une baisse de la fragilité musculaire, avec 5 à 10% de force supplémentaire du plantaris ayant subi l'OVL (Ferry et al., 2015a), ainsi qu'une augmentation de la résistance à la fatigue après OVL du plantaris et de l'EDL (Dick and Vrbová, 1993; Joanne et al., 2012). De la même manière, la force maximale absolue du plantaris a augmenté de près de moitié (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012) ou n'a pas changée chez l'EDL de jeunes souris mdx après OVL (Dick and Vrbová, 1993). La force maximale spécifique est restée, quant à elle, inchangée (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012), alors qu'elle a largement augmenté dans le muscle sain (Dick

INTRODUCTION - L'exercice physique dans la DMD

and Vrbová, 1993; Joanne et al., 2012). De plus, la masse du plantaris a augmenté de près d'un tiers après 1 ou 6 mois d'OVL (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012).

Paramètre	Muscle	Âge (mois)	Protocole (mois)	Effet (%)	Références
Fragilité	PL	3	1	-10%	(Ferry et al., 2015a)
		3	6	-5%	(Ferry et al., 2015a)
P0	PL	3	1	+60%	(Ferry et al., 2015a)
		5	1.5	+40%	(Joanne et al., 2012)
		3	6	+50%	(Ferry et al., 2015a)
sP0	PL	3	1	=	(Ferry et al., 2015a)
		5	1.5	=	(Joanne et al., 2012)
		3	6	=	(Ferry et al., 2015a)
Résistance à la fatigue	PL	5	1.5	+36%	(Joanne et al., 2012)
Masse	PL	3	1	+40%	(Ferry et al., 2015a)
		5	1.5	+24%	(Joanne et al., 2012)
		3	6	+30%	(Ferry et al., 2015a)

Tableau I- 6 : : Données de la littérature sur les effets de l'OVL sur la fonction et la masse musculaire de souris mdx. Les données sont présentées en pourcentage de perte ou de gain par rapport à une souris non OVL. PL : plantaris. P0 : force maximale absolue ; sP0 : force maximale absolue.

L'hypertrophie musculaire s'explique au niveau histologique principalement par une augmentation du nombre de fibres (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012). L'impact de la taille des fibres sur l'augmentation de la masse semble dépendre de la durée de l'OVL, en effet, il a été rapporté que la taille des fibres ne changeait pas ou diminuait après 1 ou 2 mois d'OVL, mais augmentait en revanche au bout de 6 mois (Ferry et al., 2015a). Par ailleurs, tout comme l'exercice de course volontaire, il a été montré que l'OVL induisait une adaptation du type de fibres avec une réduction de fibres exprimant la MHC-2b au profit de fibres exprimant la MHC-2a ainsi qu'une augmentation du métabolisme oxydatif (Ferry et al., 2015a).

Enfin, les effets de ce type d'exercice sur les marqueurs de dommages musculaires semblent être plutôt bénéfiques. Une réduction des noyaux centraux a été observée après 1 mois d'OVL, suggérant que l'entraînement de résistance à court terme a des effets protecteurs, bien que la régénération ait légèrement augmenté après une

INTRODUCTION - L'exercice physique dans la DMD

surcharge à long-terme, et la fibrose est restée stable quel que soit le temps de l'exercice (Ferry et al., 2015a) ou a un peu augmenté dans une autre étude (Joanne et al., 2012).

VI.3.2. Les bienfaits de l'exercice physique chronique chez la souris D2-mdx

Contrairement à la souris mdx, l'effet de l'exercice physique chronique n'a pratiquement pas été étudié dans ce modèle sévère de la DMD. À ce jour, il n'existe qu'une étude publiée en 2019 de Zelikovitch et al., qui s'est intéressée à l'effet d'exercice de faible et de moyenne intensité sur tapis roulant chez la D2-mdx.

Les résultats de cette étude de Zelikovitch et al., indiquent des effets bénéfiques de l'exercice chronique. En effet, la course chronique modérée sur tapis roulant pendant 6 mois a permis d'augmenter la force maximale absolue du TA de 84%, d'améliorer la force maximale spécifique, et d'augmenter également la résistance à la fatigue lors du protocole d'exercice de faible intensité. En outre, même dans un modèle drastique de la pathologie, l'exercice ne semble pas causer davantage de dommages musculaires, la fibrose n'ayant pas augmenté, à la suite des protocoles d'entraînement de faible ou moyenne intensité. À noter, Zelikovitch et al., ont aussi étudié la fonction pulmonaire et la fonction cardiaque, et ont noté une amélioration de la capacité ventilatoire et un déclin cardiaque atténué après exercice. Ainsi, l'exercice physique ne semble pas préjudiciable chez la souris D2-mdx et serait même bénéfique, bien que d'autres études soient nécessaires pour confirmer ces résultats.

VII. OBJECTIFS EXPÉRIMENTAUX

L'objectif général de cette thèse consistait à étudier l'effet de l'exercice physique chronique d'endurance et de résistance, combiné ou non à une thérapie génique visant à restaurer la dystrophine ou améliorer les symptômes musculaires, dans une étude préclinique. Ceci, notamment, afin de déterminer si l'exercice chronique pouvait avoir un effet additif ou potentialiser les effets bénéfiques d'une thérapie génique, en utilisant des modèles murins plus ou moins sévères de DMD. Notre attention s'est focalisée sur la fonction musculaire du muscle dystrophique, notamment sa production de force maximale lors d'une contraction isométrique. Nous avons complété l'étude de la fonction musculaire par l'évaluation de marqueurs cellulaires et moléculaires.

Dans un premier axe (Axe 1), nous nous sommes donc intéressés au facteur de transcription Prox1, qui permet de stimuler la voie calcineurine afin d'engendrer un remodelage musculaire vers des fibres contractiles plus lentes, pour améliorer la fonction musculaire de souris mdx. En effet, les fibres plus lentes sont décrites comme étant moins atteintes dans les modèles expérimentaux de DMD. Plus précisément, nous avons voulu regarder l'effet d'un exercice physique chronique d'endurance lorsqu'il est associé à ce traitement symptomatique, et voir s'il permettait de mieux restaurer la fonction musculaire de souris mdx. Pour ce faire, nous avons surexprimé Prox1 dans le muscle à l'aide d'un transfert de gène *via* un vecteur viral, puis les souris ont réalisé une course volontaire dans une roue pendant 1 mois. Nous avons ainsi eu l'occasion de montrer que la combinaison de l'exercice chronique d'endurance à la surexpression de Prox1 permettait de diminuer la fragilité dans un modèle murin peu sévère de DMD et avait donc le potentiel d'arrêter la progression de la DMD, ce qui n'est pas le cas avec une approche symptomatique seule par thérapie génique.

Dans un deuxième axe (Axe 2), nous nous sommes cette fois intéressés à l'effet de l'exercice physique chronique d'endurance (course volontaire dans une roue pendant 1 mois) lorsqu'il est combiné à une thérapie génique visant à restaurer l'expression de la dystrophine en utilisant la thérapie AAV-U7dex23 chez la souris D2-mdx. À la suite de cette étude, nous avons mis en évidence que l'exercice physique chronique d'endurance pouvait diminuer l'efficacité de la thérapie génique dans un

INTRODUCTION - Objectifs expérimentaux

modèle murin sévère de DMD, suggérant la mise en place de protocole où l'exercice chronique n'est pas réalisé en même temps que la thérapie, mais par exemple, après.

Enfin, dans un troisième axe (Axe 3), nous avons voulu caractériser l'effet de l'exercice physique chronique de résistance (musculature) sur la fonction musculaire d'un modèle murin sévère de DMD, en utilisant comme modèle d'exercice de résistance, la surcharge mécanique pendant 1 mois (OVL). En effet, il existe très peu d'études qui se sont intéressés à l'effet de cette modalité d'exercice chronique chez la souris dystrophique, et à chaque fois des modèles murins peu sévères de la DMD ont été utilisés. En raison du caractère supra-physiologique de ce modèle d'exercice chronique, notre objectif était plus précisément de vérifier si l'on arrivait à obtenir les mêmes effets bénéfiques chez un modèle murin sévère de DMD (souris D2-mdx) par rapport à un modèle murin modéré (souris mdx), ce qui a été le cas. Cette étude est donc très encourageante en vue d'une éventuelle prescription d'exercice chronique de résistance (musculature) chez les patients atteints de DMD. Il restera à déterminer l'effet de l'exercice chronique de résistance combiné à une thérapie génique visant, par exemple, à restaurer l'expression de la dystrophine dans un modèle murin de DMD, ce que nous n'avons pu faire dans le cadre de cette thèse.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1)

**Effet de l'exercice physique d'endurance chronique,
combiné à la surexpression de Prox1, sur la fonction
musculaire de souris mdx**

En révision à PlosOne

I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie génétique liée au chromosome X la plus fréquente. Elle est causée par des mutations du gène DMD, entraînant une déficience en dystrophine. La dystrophine est une protéine costamérique qui joue un rôle important dans la transmission de la force et la stabilité du sarcolemme dans le muscle squelettique (Hughes et al., 2015). La souris mdx est le modèle animal "classique" de la DMD. Le muscle de la souris mdx, déficient en dystrophine, présente deux caractéristiques dystrophiques fonctionnelles importantes. Tout d'abord, une faiblesse musculaire, c'est-à-dire une diminution de la force maximale spécifique (force maximale absolue générée par rapport à la surface de section transversale ou au poids du muscle), la force maximale absolue restant inchangée ou maintenue en raison de l'hypertrophie musculaire (Dellorusso et al., 2001). Deuxièmement, une fragilité musculaire engendrée par une susceptibilité accrue aux dommages musculaires dans le muscle rapide et peu oxydatif de la souris mdx, conduisant à une baisse immédiate et marquée de la force (Dellorusso et al., 2001).

Il est intéressant de noter que l'exercice musculaire chronique peut améliorer ces caractéristiques dystrophiques fonctionnelles chez les souris mdx (Hyzewicz et al., 2015; Spaulding and Selsby, 2018). En particulier, la course volontaire sur roue (1 semaine à 1 an) peut augmenter les forces maximales spécifiques ou absolues dans les muscles des membres postérieurs des souris mdx (Hyzewicz et al., 2015; Spaulding and Selsby, 2018). Il a également été rapporté que la course volontaire diminue la fragilité (i.e. réduit la chute de force après des contractions excentriques) dans le muscle rapide de souris mdx (Delacroix et al., 2018; Hourdé et al., 2013), alors que l'inactivité physique l'aggrave (Hourdé et al., 2013). Récemment, il a été découvert que la diminution de la fragilité induite par la course volontaire chez les souris mdx était liée à l'activation de la voie de la calcineurine et à des changements dans le programme de gènes impliqués dans les caractéristiques contractiles plus lentes de la fibre musculaire et codant pour des canaux ioniques membranaires (Delacroix et al., 2018). La fragilité chez les souris mdx est liée à l'excitabilité musculaire (Baumann et al., 2020; Call et al., 2013; Delacroix et al., 2018; Roy et al., 2016). Plusieurs gènes codant pour des canaux ioniques membranaires interagissant avec la dystrophine sont

impliqués dans l'excitabilité musculaire, tels que *Scn4a*, *Cacna1s*, *Slc8a1*, *Trpc1* et *chrna1* (Allard, 2018; Leyva-Leyva et al., 2018). La fragilité est également liée à l'activité de la NADPH oxydase 2 (NOX2) (Khairallah et al., 2012; Olthoff et al., 2018; Whitehead et al., 2010) ainsi qu'à la l'expression de l'utrophine et de la desmine (Deconinck et al., 1997; Ferry et al., 2020) chez les souris mdx. Cependant, l'exercice volontaire ne réduit que partiellement la susceptibilité aux lésions musculaires induites par l'exercice (Delacroix et al., 2018; Hourdé et al., 2013), il serait donc intéressant de combiner les effets de l'exercice avec ceux d'un autre traitement.

Si l'exercice volontaire offre un bénéfice thérapeutique potentiel, des thérapies complémentaires pourraient encore améliorer les caractéristiques fonctionnelles de la DMD. Ces dernières années, des traitements génétiques ou pharmacologiques favorisant des fibres plus lentes et plus oxydatives se sont avérés bénéfiques chez les souris mdx. En fait, plusieurs études soutiennent l'idée que l'activation des voies de signalisation AMPK, calcineurine, E2F1, ERR γ , IGF1, SIRT1 et PGC1 atténue certaines des caractéristiques dystrophiques du muscle mdx (Al-Rewashdy et al., 2015; Chakkalakal et al., 2004; Chalkiadaki et al., 2014; Gehrig et al., 2008, 2010; Ljubicic et al., 2011; Matsakas et al., 2013; Schertzer et al., 2006; Selsby et al., 2012; Stupka et al., 2006). Par exemple, l'activation génétique de la voie de la calcineurine améliore la fragilité du muscle rapide de la souris mdx, mais diminue la production de force maximale, aggravant ainsi la faiblesse musculaire (Stupka et al., 2006). Récemment, dans le muscle rapide sain, il a été démontré que la perte du facteur homéobox 1 (*Prox1*), un facteur de transcription essentiel au développement de plusieurs organes et hautement conservé chez les vertébrés, réprime l'expression des gènes contractiles lents, alors que sa surexpression *via* le transfert de *Prox1* a l'effet inverse et régule à la baisse les gènes contractiles rapides (Kivelä et al., 2016; Petchey et al., 2014). En particulier, l'inactivation de *Prox1* réduit l'expression de la chaîne lourde de myosine la plus lente, *Myh7*, dans le muscle sain rapide, sans affecter la capacité oxydative et la force maximale absolue (Petchey et al., 2014). De plus, *Prox1*, qui est plus exprimé dans les fibres lentes, est impliqué dans l'activation de la voie NFAT/calcineurine, et favorise le programme génétique contractile lent dans le muscle sain (Kivelä et al., 2016).

Le principal objectif de ce premier axe était de déterminer si le transfert de *Prox1*, c'est-à-dire la surexpression de *Prox1*, réduisait la fragilité musculaire chez les souris mdx

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Contexte de l'étude

soumises à un exercice volontaire. Pour ce faire nous avons réalisé des mesures électrophysiologiques afin d'évaluer la fonction musculaire, puis nous avons complété notre étude par des analyses cellulaires et moléculaires. Dans une première série d'expériences, comme nous avons constaté que la course volontaire et le transfert de *Prox1* ont eu des effets bénéfiques et additifs sur la fragilité, nous avons réalisé une deuxième série d'expériences cette fois pour comparer l'effet du transfert de *Prox1* sur la fragilité entre les souris mdx exercées et sédentaires.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. PROTOCOLE EXPÉRIMENTALE

L'ensemble des procédures ont été effectuées conformément aux législations nationales et européennes et ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel « Charles Darwin » (projet n ° 01362.02). Des souris mdx (n=20) mâles (fond hybride C57Bl / 6 x C57Bl / 10) âgées de 2,5 mois ont été réparties aléatoirement en différents groupes témoins et expérimentaux lors de deux séries d'expériences.

Afin d'étudier l'effet du transfert de *Prox1* chez des souris mdx soumises à un exercice volontaire mimant un exercice physique chronique d'endurance, dans une première série d'expériences, des souris mdx ont reçu une injection de *Prox1* (mdx+W+P, n=8) ou de solution saline (PBS) (mdx+W, n=8) dans les muscles tibiaux antérieurs (TA). Trois jours après, ces souris ont été placées dans des cages séparées contenant une roue (**Figure A1-1**), pour qu'elles puissent courir un peu moins d'un mois (27 jours) *ad libitum* (la distance de course quotidienne était de $4,2 \pm 0,1$ km / jour). Un groupe de souris contrôles non injectées (mdx ; n=5) est resté un mois dans des cages sans roue.

Comme nous avons trouvé un effet du transfert de *Prox1* sur la fragilité du muscle Mdx+W+P, nous avons réalisé une deuxième série d'expériences pour comparer l'effet du transfert de *Prox1* sur la fragilité entre le muscle exercé et le muscle sédentaire. Dans la seconde série d'expériences, les muscles TA des souris mdx sédentaires ont été injecté avec *Prox1* (mdx+P ; n=7) ou avec du PBS (mdx ; n=7) (**Figure A1-1**).

Quatre semaines après le transfert de *Prox1* les mesures de force ont été réalisées, puis les souris ont été euthanasiées et les muscles prélevés.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Matériel et méthodes

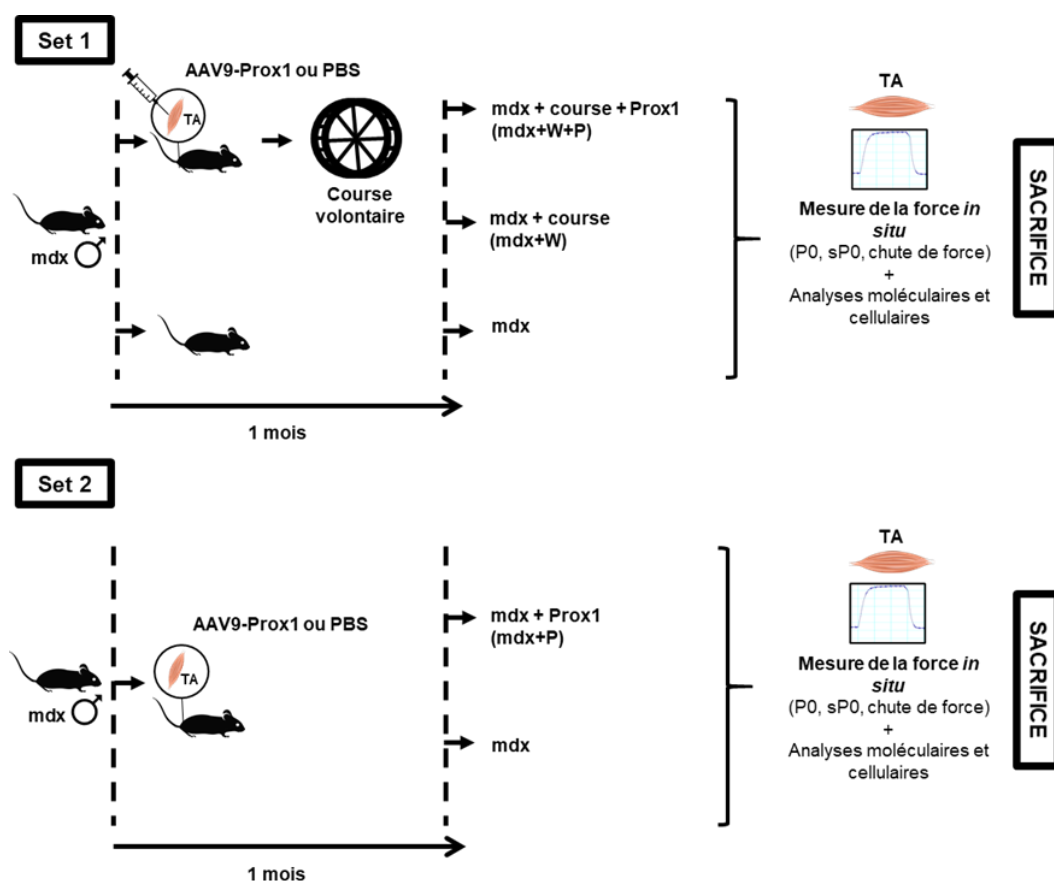


Figure A1- 1 : Schéma du protocole expérimental. Set 1 : 1^{ère} expérience pour évaluer l'effet du transfert de *Prox1* chez des souris mdx soumises à un exercice volontaire mimant un exercice physique chronique d'endurance. Set 2 : 2^{ème} expérience pour évaluer l'effet du transfert de *Prox1* sur le muscle sédentaire. TA : Tibial antérieur ; P0 : force maximale absolue ; sP0 : force maximale spécifique.

II.2. TRANSFERT DE PROX1

Pour surexprimer *Prox1*, des souris mdx ont été anesthésiées (3% d'isoflurane) et des vecteurs adéno-associés (AAV9) codant pour *Prox1* ont été injectés dans les muscles TA (AAV9-*Prox1*, 30 μ l, 2,13x10¹¹gv). Les muscles controlatéraux ont été injectés uniquement avec une solution saline (PBS). La construction AAV9-*Prox1* a été réalisée sur la base d'un plasmide donné par le laboratoire du Wihuri Research Institute and Translational Cancer Biology Program de l'Université d'Helsinki, Finlande (Kivelä et al., 2016). En collaboration avec la plateforme MyoVector, les ADNc de hProx1 ont été clonés dans le plasmide psub (promoteur CMV) (Baltgalvis et al., 2011). Le plasmide a été purifié en utilisant le système Plasmid Maxiprep sans endotoxine PureYield™ (Promega, Lyon, France) puis vérifié par digestion par enzyme de restriction et par séquençage (Eurofins MWF Operon, Ebersberg, Allemagne). L'AAV-*Prox1* a été produit dans des cellules 293 de rein embryonnaire humain par une

méthode de triple transfection utilisant la technique de précipitation au phosphate de calcium. Le virus a ensuite été purifié par 2 cycles de centrifugation en gradient de chlorure de césium et concentré par dialyse. Les préparations virales finales ont été conservées dans une solution de PBS à -80 ° C. Le nombre de génomes viraux a été déterminé par une PCR quantitative.

II.3. MESURE DE LA FORCE MAXIMALE

La fragilité musculaire (susceptibilité aux lésions induites lors de contractions intenses) a été évaluée en mesurant les propriétés de contraction *in situ* du muscle TA en réponse à une stimulation du nerf, comme décrit précédemment (Roy et al., 2016). La fragilité a été estimée à partir de la chute de force résultant de contractions excentriques répétées.

En bref, les souris ont été anesthésiées à l'aide de pentobarbital (60 mg/kg, ip). La température corporelle a été maintenue à 37°C. Le genou et le pied ont été fixés à l'aide de broches et de pinces et le tendon distal du muscle a été attaché au bras de levier d'un système de servomoteur (305B, Dual-Mode Lever, Aurora Scientific) à l'aide d'une ligature en soie. Le nerf sciatique a été écrasé au niveau proximal et stimulé au niveau distal par une électrode bipolaire en argent utilisant des impulsions supramaximales à onde carrée d'une durée de 0,1 ms. Nous avons d'abord déterminé la longueur optimale (L0, longueur à laquelle une force isométrique maximale a été obtenue pendant le téтанos) du muscle TA. Une fois la L0 obtenue, une contraction isométrique maximale a été initiée pendant les 500 premières ms. Ensuite, un allongement du muscle (10% de L0) à une vitesse de 5,5 mm/s (0,85 longueur de fibre/s) a été imposé pendant les 200 dernières ms. Neuf contractions excentriques ont été réalisées chez les souris mdx, chacune étant séparée par une période de repos de 60 secondes.

La force isométrique maximale absolue a été mesurée 1 minute après chaque contraction excentrique et exprimée en pourcentage de la force maximale initiale (chute de force). La force isométrique maximale absolue (P0) mesurée avant la première contraction excentrique a également été normalisée par rapport à la masse musculaire afin de calculer la force isométrique maximale spécifique (sP0), un indice de faiblesse musculaire.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Matériel et méthodes

En outre, nous avons mesuré la force excentrique maximale absolue pendant la première contraction excentrique, un indice du « stress » musculaire, c'est à dire des contraintes mécaniques qui s'exercent sur le muscle. Après les mesures contractiles, les animaux ont été tués par dislocation cervicale.

II.4. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS RÉEL (RÉACTION EN CHAÎNE PAR POLYMÉRISE)

Les muscles (TA) ont été congelés instantanément dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les muscles ont été broyés dans du TriReagent (Sigma-Aldrich) à l'aide du système Fastprep et de tubes Lysing Matrix D (MPbiomedicals). Les ARNs totaux ont été isolés en utilisant le TriReagent selon le protocole du fabricant. L'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN total à l'aide du kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis avec des hexamères aléatoires, conformément aux instructions du fabricant (Thermo Scientific).

La qPCR a été réalisée sur un système LightCycler 480 à la plateforme iGenSeq de l'Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, en utilisant le Master Mix LightCycler 480 SYBR Green I (Roche, Basel, Suisse). L'expression de *Hmbs* a été utilisée comme transcrite de référence car son expression ne différait pas entre les groupes. La méthode $2^{-\Delta\Delta C_P}$ a été utilisée comme stratégie de quantification relative pour l'analyse des données de la réaction en chaîne de la polymérase (qPCR) quantitative en temps réel. Toutes les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le **tableau A1-1**.

Gènes	Séquences sens	Séquences anti-sens
Gène de référence		
<i>Hmbs</i>	5'- AGGTCCTGTTTCAGCAAGAA -3'	5'- TGGGCTCCTCTTGAATGTT -3'
Gènes d'intérêts		
<i>Cacna1</i>	5'-CCTCATCAGCAAGAAGCAGG-3'	5'-TATGACAGACAGACCCTGGC-3'
<i>Chrna1</i>	5'- TGGTCTTTGTTCATTGCGTCC -3'	5'- GATAAAAACCTTCCGCACCCA -3'
<i>Des</i>	5'- GTCCTCACTGCCTCCTGAAG-3'	5'- AGCATGAAGACCACAAAGGG-3'
<i>Fn14</i>	5'- AGGGGCTATAATGCCACTCC -3'	5'- GGGAGATGGTTGTTTCCGTG -3'
<i>Fst</i>	5'- CGAGTGTGCCATGAAGGAAG -3'	5'- GGTCTTCCTCCTCCTCCTCT -3'
<i>Gadd45</i>	5'- GGTGACGAACCCACATTCAT -3'	5'- GATTAATCACGGGCACCCAC -3'
<i>Gp91phox</i>	5'-TCACATCCTCTACCAAAACC-3'	5'-CCTTTATTTTTCCCCATTCT-3'

<i>Hdac4</i>	5'- AAGTAGCTGAGAGACGGAGC -3'	5'- GCATGCGGAGTCTGTAACAT -3'
<i>Igf1</i>	5'-ACAAGCCCACAGGCTATGGCTC -3'	5'-AGTCTCCTCAGATCACAGCTCCG -3'
<i>Lc3</i>	5'- CATGAGCGAGTTGGTCAAGA -3'	5'- CCATGCTGTGCTGGTTGA -3'
<i>Mafbox</i>	5'-TCACAGCTCACATCCCTGAG-3'	5'- TCAGCCTCTGCATGATGTTTC-3'
<i>Mstn</i>	5'- GCTACCACGGAAACAATCAT-3'	5'-CAATACTCTGCCAAATACCA-3'
<i>Murf1</i>	5'-TGAGGTGCCTACTTGCTCCT-3'	5'-GTGGACTTTTCCAGCTGCTC-3'
<i>Myh2</i>	5'-AAGCGAAGAGTAAGGCTGTC-3'	5'-GTGATTGCTTGCAAAGGAAC-3'
<i>Myh4</i>	5'-ACAAGCTGCGGGTGAAGAGC-3'	5'-CAGGACAGTGACAAAGAACG-3'
<i>Myh7</i>	5'-AGGTGTGCTCTCCAGAATGG-3'	5'-CAGCGGCTTGATCTTGAAGT-3'
<i>P47phox</i>	5'-AGAACAGAGTCATCCCACAC-3'	5'-GCTACGTTATTCTTGCCATC-3'
<i>PrxII</i>	5'-GGTTTGGGCCACGCATAAAA-3'	5'-GCCATGACTGCGTGAGCAAG-3'
<i>Prox1</i>	5'-GCTACCCCAGCTCCAACATGCT-3'	5'-TGATGGCTTGACGCGCATACTTCT-3'
<i>Rac1</i>	5'-GTA AACCTGCCTGCTCATCA-3'	5'-GAGAGGGGACGCAATCTGT-3'
<i>Redd1</i>	5'- ACTACTGACCTGTTTCGAGGC -3'	5'- TCAAGTGTCGAAGATCCCGA -3'
<i>Redd2</i>	5'- GTGCAGCCCCATCAAAACATA -3'	5'- GAAGCCATGCTCTTGTCACTG -3'
<i>Sdha</i>	5'-TTACAAAGTGCGGGTTCGATG-3'	5'-GTGTGCTTCCCTCCAGTGTTTC-3'
<i>Scn4a</i>	5'-GCAACCTGGTGGTCTGAAT-3'	5'-CAGCCCCAAGAGGAAGGTTT-3'
<i>Slc8a1</i>	5'- GGAGACTGCTCGTGTGTCTA -3'	5'- TGTTGGTTGGCCTGAGAGAT -3'
<i>Smox</i>	5'-AAGTTGTGAATCCAGTGGCG-3'	5'-GTCTCCAAGCCTCACACTCT-3'
<i>Tnni1</i>	5'-ATGGAGGAGGTGGATCTGC-3'	5'-TTCAAATTTGGCCCGGCAC-3'
<i>Trpc1</i>	5'- TCTATAGATGTCTGGCCAGTCC-3'	5'- CATTTCGACTGACGGGCTA-3'
<i>Utrn</i>	5'- CACTATGACCCCTCCAGTC -3'	5'- CGCTTCCTGTTGTAGAGCTG -3'

Tableau A1- 1 : Séquences des amorces utilisées.

II.5. HISTOLOGIE

Des coupes transversales (8 µm) ont été obtenues à l'aide d'un cryostat, dans le milieu du muscle TA (endroit le plus large). Une partie des coupes a été utilisée pour réaliser une analyse histologique de la capacité oxydative du muscle selon un protocole standard de coloration de la succinate déshydrogénase (SDH).

L'autre partie des coupes a été utilisées pour l'immunohistochimie. Pour la détermination du diamètre des fibres musculaires, des coupes congelées non fixées exprimant la chaîne lourde de la myosine (MHC) ont été bloquées pendant 1h dans une solution saline tampon phosphate plus 2% d'albumine de sérum bovin (BSA), 2% de sérum de veau foetal (SVF). Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit avec des anticorps primaires dirigés contre la laminine (Sigma, France), la MHC-2a

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Matériel et méthodes

(clone SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, Université de l'Iowa), la MHC-2b (clone BF-F3, Developmental Studies Hybridoma Bank), et la MHC-1 (clone BA-D5, Developmental Studies Hybridoma Bank). Après des lavages dans du PBS, les coupes ont été incubées 1 h avec des anticorps secondaires (Alexa Fluor, Invitrogen) (**Tableau A1-2**). Les lames ont finalement été montées dans du Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen).

Les images ont été capturées à l'aide d'une caméra numérique (Hamamatsu ORCA-AG) attachée à un microscope à fluorescence motorisé (Zeiss AxioImager.Z1), et les analyses morphométriques ont été réalisées à l'aide du logiciel Fiji. Le grossissement utilisé pour la quantification des images histologiques était de 20x. Les fibres MHC-2x ont été identifiées comme des fibres qui n'expriment pas la MHC-2b, la MHC-2a et la MHC-1. Le nombre de fibres exprimant la MHC-1, la MHC-2x et la MHC-2a par coupe transversale de muscle a été compté manuellement.

Nous avons essayé d'analyser toutes les fibres des coupes musculaires, mais certaines fibres ont été exclues de l'analyse car le marquage était mauvais. Les données présentées correspondent aux fibres exprimant purement la MHC-1, la MHC-2x et la MHC-2a (sans co-expression mixte des MHC).

Types de fibres	Anticorps primaires	Concentration	Anticorps secondaires	Concentration
MHC-2a	Mouse SC-71	1 :10	Goat anti-mouse IgG1 Alexa 555	1 :400
MHC-2b	Mouse BF-F3	1 :10	Goat anti-mouse IgM Alexa 647	1 :400
MHC-1	Mouse BA-D5	1 :10	Goat anti-mouse IgG2b Alexa 350	1 :400
Laminine	Polyclonal Rabbit Laminin	1 :400	Goat anti-rabbit Alexa 488	1 :400

Tableau A1- 2 : Liste des anticorps utilisés.

II.6. ÉLECTROPHORÈSE SDS-PAGE DES ISOFORMES DE LA CHAÎNE LOURDE DE LA MYOSINE (EN COLLABORATION AVEC L'INSTITUT BIOLOGIE PARIS SEINE)

Les muscles ont été extraits sur glace pendant 60 min dans quatre volumes de tampon d'extraction contenant 0,3 M NaCl, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,05 M Na₂HPO₄, 0,01 M Na₄P₂O₇, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA et 1,4 mM 2-mercaptoéthanol (pH 6,5). Après centrifugation, les surnageants ont été dilués à 1:1 (vol/vol) avec du glycérol et conservés à -20°C. Les isoformes MHC (protéines) ont été séparées sur des gels de polyacrylamide à 8 %, qui ont été réalisés dans le système Bio-Rad mini-Protean II Dual slab cell. Les gels ont été passés pendant 31 h à une tension constante de 72 V à 4°C (Agbulut et al., 1996). Après la migration, les gels ont été colorés à l'argent. Les gels ont été scannés à l'aide d'un système d'acquisition vidéo. Le niveau relatif des différentes isoformes de la MHC a été déterminé par analyse densitométrique à l'aide du logiciel Fiji.

II.7. ANALYSES STATISTIQUES

Les groupes ont été comparés statistiquement à l'aide du logiciel Prism v8 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). L'homogénéité de variance des données a été testée à l'aide du test de Brown-Forsythe.

Pour la première série d'expériences, une ANOVA à un facteur a été utilisée pour analyser les variables suivantes : niveau d'ARNm, pourcentage de fibres exprimant MHC-1, MHC2a ou MHC-2b, pourcentage de coloration SDH de faible intensité, force maximale absolue et spécifique, force excentrique maximale absolue, rapport de la force excentrique maximale absolue sur la force isométrique maximale absolue, poids du muscle, diamètre des fibres. La fragilité a été analysée par ANOVA à deux facteurs, pour les groupes (mdx, mdx+W, mdx+W+P) à chaque contractions excentriques (0, 3, 6, 9) avec mesures répétées pour ce facteur. Le test t non apparié avec correction de Welch a été utilisé pour analyser le pourcentage de MHC-2x et de MHC-2a (électrophorèse).

Pour la deuxième série d'expériences, un t-test non apparié avec correction de Welch a été utilisé pour les variables suivantes : expression de l'ARNm, pourcentage de fibres

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Matériel et méthodes

exprimant la MHC-1, la MHC2a ou la MHC-2b, force maximale absolue et spécifique, force excentrique maximale absolue, poids du muscle et diamètre des fibres. La fragilité a été analysée par ANOVA à deux facteurs, pour les groupes (mdx, mdx+P) à chaque contraction excentrique (0, 3, 6, 9), avec mesures répétées pour ce facteur.

Lorsqu'un effet significatif (ANOVA) a été observé, des comparaisons multiples ont été effectuées avec le test de Tukeys. Enfin, lorsqu'une interaction significative a été observée (ANOVA), les différences ont été testées avec le test de Holm-Sidak. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM.

III. RÉSULTATS

III.1. EFFET DU TRANSFERT DE PROX1 DANS LE MUSCLE MDX SOUMIS À UN EXERCICE VOLONTAIRE

III.1.1. Le transfert de Prox1 dans le muscle mdx exercé volontairement favorise des caractéristiques contractiles plus lentes

Dans la première série d'expériences, nous avons d'abord déterminé si le transfert de *Prox1* augmentait les caractéristiques contractiles plus lentes chez les souris mdx soumises à un exercice de course volontaire. Nous avons observé par qPCR que le transfert de *Prox1* dans le muscle TA a considérablement augmenté l'expression de *Prox1* (x 37,0) dans le muscle TA de souris mdx exercées volontairement (mdx+W+P) par rapport au muscle TA mdx exercé volontairement qui n'ont pas reçu l'injection (mdx+W) (**Figure A1-2A**). Nous avons également constaté que l'expression de *Myh7* codant pour la MHC-1 (x 15,1) était accrue dans le muscle mdx+W+P par rapport au muscle mdx+W, tandis que celle de *Myh4* codant pour la MHC-2b était réduite (x 0,6) (**Figure A1-2B**). De même, en utilisant une technique d'électrophorèse sur gel, nous avons constaté que la quantité relative (pourcentage du total) de la protéine MHC-2b était réduite (x 0,8) alors que celle de la protéine MHC-2x était augmentée (x 1,6) dans le muscle mdx+W+P par rapport au muscle mdx+W (**Figures A1-2C**). Les analyses immunohistologiques ont révélé que ces changements n'étaient pas associés à la modification des pourcentages de fibres exprimant la MHC-1, la MHC-2a et la MHC-2x car ils n'étaient pas différents entre le muscle mdx+W+P et le muscle mdx+W (**Figures A1-2D et A1-2E**).

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Résultats

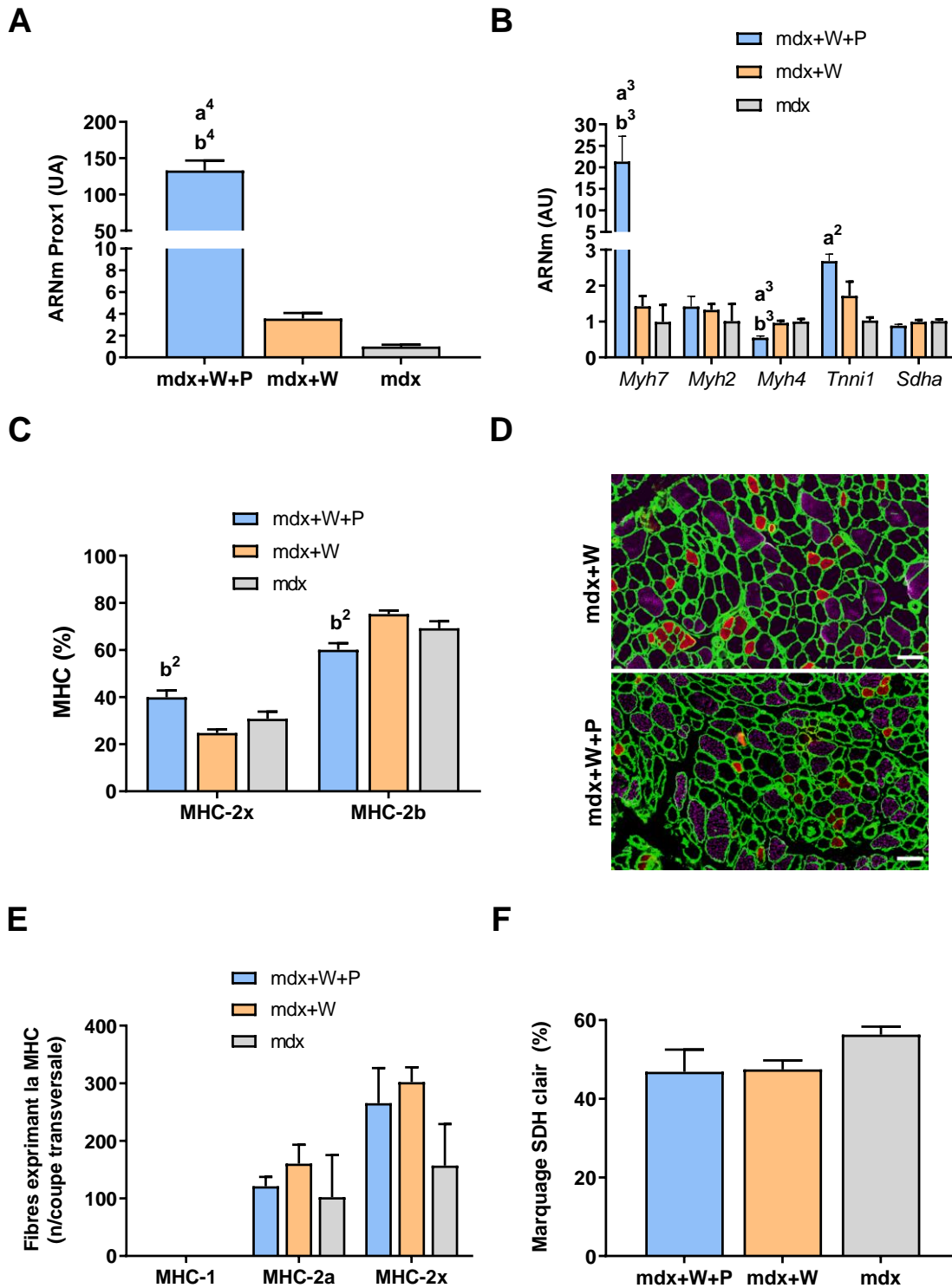


Figure A1- 2: Effet du transfert de Prox1 sur l'expression de Prox1 et de marqueurs de la spécification du type de fibre chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire (première série d'expériences). (A) Expression de Prox1, n = 6-8 par groupe. (B) Expression des gènes codant pour des protéines contractiles spécifiques du type de fibre, n = 6-8 par groupe. (C) Quantité relative de protéine MHC-2x et MHC-2b, n = 3 par groupe. (D) Images représentatives d'un immunomarquage de la MHC-2a (rouge), la MHC2b (violet), et de la laminine (vert) (MHC-2x, non marquées) dans des coupes transversales de TA. Moins de 10 fibres exprimant la MHC-1 par coupe transversale ont été observées.

(E) Nombre de fibres exprimant la MHC-1, la MHC-2a et la MHC-2x par sections transversales de TA, n = 3-5 par groupe. (F) Pourcentage de la surface du muscle occupée par une faible coloration de la succinate déshydrogénase (SDH) dans des coupes transversales de muscle, n = 5-8 par groupe. mdx+W+P : muscle mdx exercé volontairement et qui a reçu le transfert de Prox1 ; mdx+W : muscle mdx exercé volontairement ; mdx : muscle mdx. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent de mdx. b : significativement différent de mdx+W. 2 : p < 0.01, 3 : p < 0.001, 4 : p < 0.0001 (Test ANOVA à un facteur et T-test). Bar d'échelle 100 μ m.

De plus, il n'y a pas de différence entre les muscles mdx+W+P et mdx+W dans l'expression d'un marqueur de la capacité oxydative, *Sdha*, un gène codant pour un complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale (**Figure A1-2B**). En accord avec ces résultats, les analyses histologiques ont révélé que le pourcentage de la surface transversale du muscle occupé par une faible coloration de la succinate déshydrogénase (SDH) n'était pas différent entre le muscle mdx+W+P et le muscle mdx+W (**Figure A1-2F**).

Ces données indiquent que l'administration intramusculaire d'AAV-Prox1 a induit une transition des caractéristiques contractiles, rapides à lentes, substantielles dans le muscle TA de souris mdx ayant fait de l'exercice volontaire.

III.1.2. Le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx exercé volontairement diminue encore plus la fragilité musculaire

La première série d'expériences a révélé que la chute de force immédiate après des contractions excentriques dans le muscle mdx+W était réduite par rapport au muscle mdx (**Figure A1-3A**). Il est intéressant de noter que le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx exercé volontairement a réduit encore plus la chute de force après les contractions excentrique (**Figure A1-3A**). En effet, la chute de force après les 6ème et 9ème contractions excentriques étaient plus faibles dans le muscle mdx+W+P que dans le muscle mdx+W (**Figure A1-3A**), ce qui indique que le transfert de *Prox1* a amélioré (réduit) la fragilité du muscle mdx soumis à un exercice volontaire.

La conversion contractile rapide à plus lente décrite ci-dessus peut expliquer, au moins en partie, l'amélioration de la fragilité dans le muscle mdx+W+P. De plus, nous avons testé la possibilité que le transfert de *Prox1* améliore également la fragilité *via* des modifications de l'expression de gènes codant pour des canaux ioniques membranaires. L'expression de *Trpc1*, était augmentée (x 2.1) dans le muscle mdx+W+P par rapport au muscle mdx+W (**Figure A1-3B**). Aucune différence entre les

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Résultats

muscles mdx+W+P et mdx+W n'a été observée concernant l'expression de *Scn4a*, *Cacna1s*, *Slc8a1* et *Chrna1* (**Figure A1-3B**). Ensuite, nous avons déterminé si la diminution de la chute de force causée par le transfert de *Prox1* était associée à un changement (diminution) de la voie NOX2. Nous n'avons trouvé aucun changement dans l'expression de *PrxII*, *Gp91phox*, *P47phox* et *Rac1* dans le muscle mdx+W+P par rapport au muscle mdx+W (**Figure A1-3C**). Nous avons également déterminé si le transfert de *Prox1* augmentait l'expression d'*Utrn* et de *Des*. L'expression d'*Utrn* n'a pas été augmentée dans le muscle mdx+W+P par rapport au muscle mdx+W, alors que celle de *Des* a augmenté (x 1,2) dans le muscle mdx+W, bien que de façon non significative ($p = 0,052$) (**Figure A1-3D**).

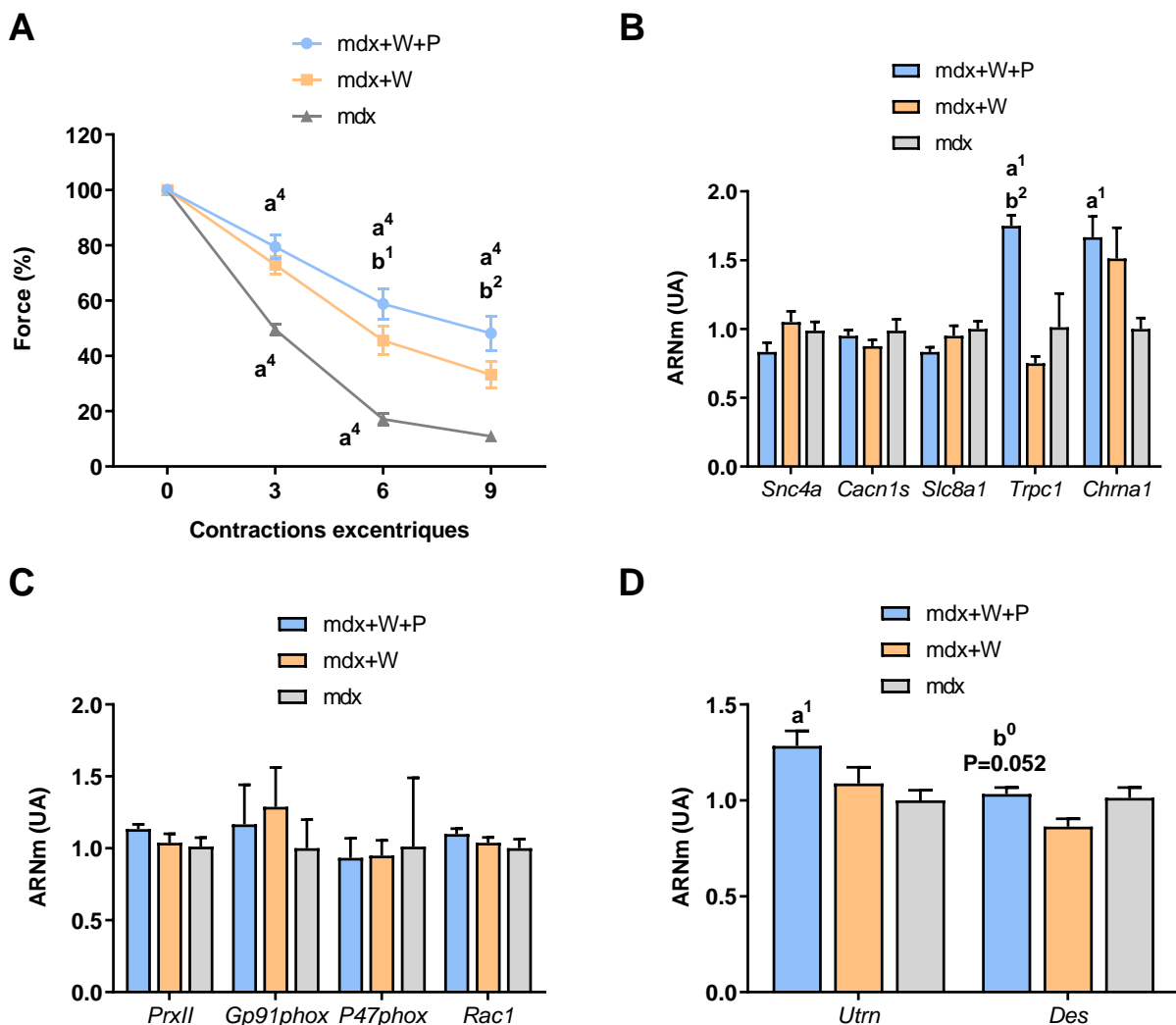


Figure A1- 3 : Effet du transfert de Prox1 sur la fragilité (susceptibilité aux lésions musculaires) et sur l'expression des gènes qui y sont associés chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire (première série d'expériences). (A) Chute de force après des contractions excentriques (Fragilité), n=6-8 par groupe. (B) Expression des gènes codant pour des canaux ioniques, liés à

l'excitabilité, n=6-8 par groupe. (C) Expression des gènes liés à la NADPH oxydase 2 (NOX2), n=6-8 par groupe. (D) Expression des gènes codant pour l'utrophine (Utrn) et la desmine (Des), n=6-8 par groupe. mdx+W+P : muscle mdx exercé volontairement et qui a reçu le transfert de *Prox1* ; mdx+W : muscle mdx exercé volontairement ; mdx : muscle mdx. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent de mdx. b : significativement différent de mdx+W. 1 : $p < 0.05$, 2 : $p < 0.01$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à un facteur et ANOVA à deux facteurs).

Ainsi, nous avons mis en évidence que l'amélioration de la fragilité dans le TA, causée par le transfert de *Prox1* chez des souris exercées volontairement, est associée à la modification de l'expression des protéines MHC-2b et MHC-2x ainsi que celle de plusieurs gènes impliqués dans différents aspects de la fonction et de la structure musculaire (*Myh7*, *Myh4*, *Trpc1*).

III.1.3. Le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx exercé volontairement réduit la force maximale isométrique absolue et induit une atrophie musculaire

La première série d'expériences a révélé que le transfert de *Prox1* combiné à la course volontaire et la course volontaire seule n'ont pas affecté la force isométrique maximale spécifique avant les contractions excentriques (**Figure A1-4A**). Cependant, la force isométrique maximale absolue est réduite dans le muscle mdx+W+P ($\times 0,6$) par rapport au muscle mdx+W (**Figure A1-4B**), ce qui indique que le transfert de *Prox1* a induit une faiblesse musculaire dans le muscle mdx exercé volontairement. De même, la force excentrique maximale absolue était inférieure ($\times 0,6$) dans le muscle mdx+W+P ($157,2 \text{ g} \pm 7,5$) par rapport au muscle mdx+W ($240,0 \text{ g} \pm 10,8$). En outre, le rapport entre la force excentrique maximale absolue et la force isométrique maximale absolue n'est pas différent entre le muscle mdx+W+P ($1,9 \pm 0,1$) et le muscle mdx+W ($1,8 \pm 0,1$).

La force isométrique maximale absolue réduite est liée à un poids musculaire plus faible ($\times 0,7$) dans le muscle mdx+W+P par rapport au muscle mdx+W (**figure A1-3C**). Le poids inférieur du muscle n'est pas associé à un diamètre réduit des différents types de fibres (**Figure A1-4D**).

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Résultats

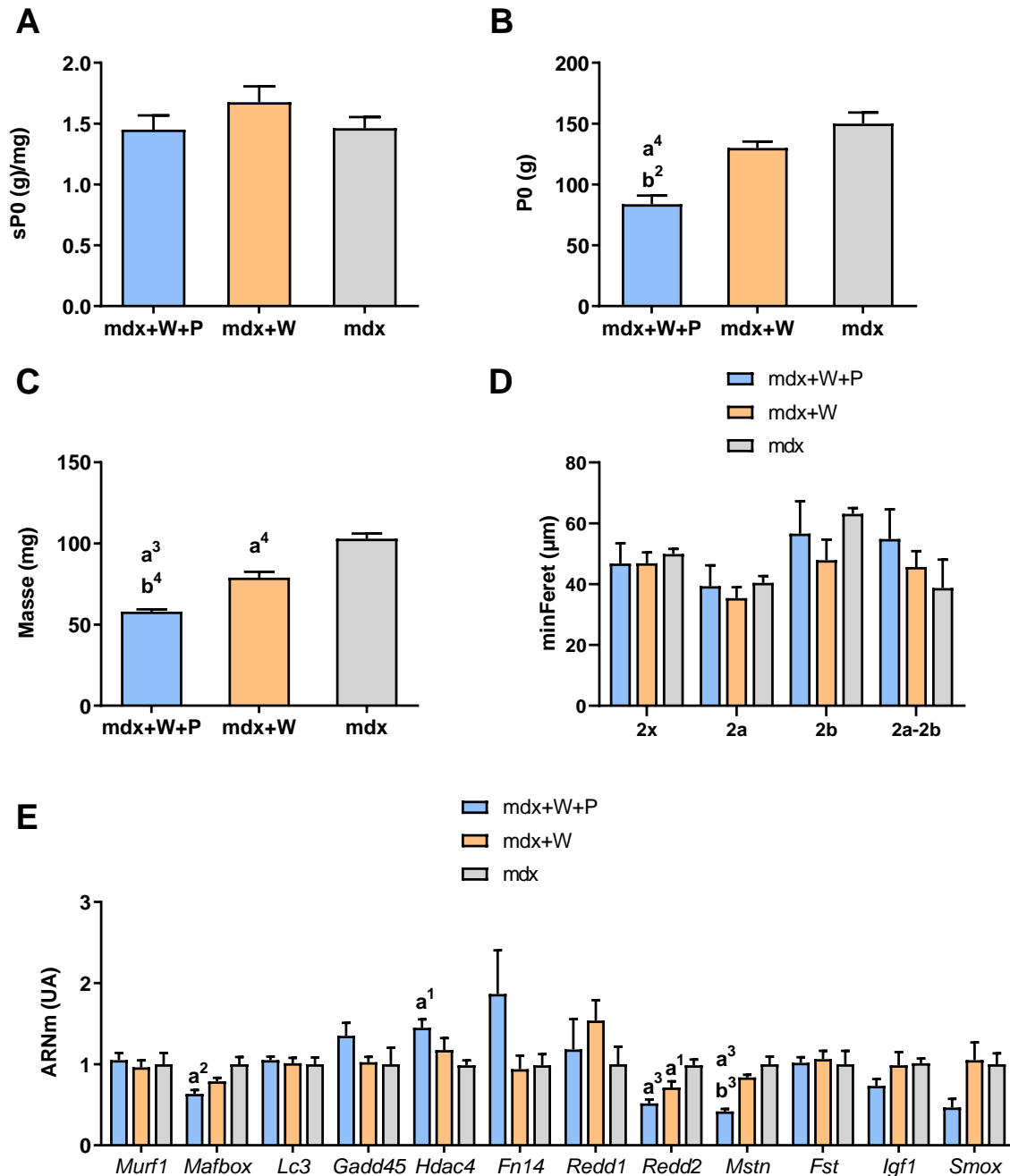


Figure A1- 4 : Effet du transfert de Prox1 sur la force maximale absolue (P0) et spécifique (sP0), le poids musculaire et l'expression génétique de marqueurs d'atrophie chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire (première série d'expériences). (A) Force maximale spécifique, n=6-8 par groupe. (B) Force maximale absolue, n=6-8 par groupe. (C) Poids musculaire, n=6-8 par groupe. (D) Diamètre (min ferret) des fibres exprimant la MHC-2b, la MHC-2a et la MHC-2x, n = 4-5 par groupe. (E) Expression des gènes liés à l'atrophie, n=6-8 par groupe. mdx+W+P : muscle mdx exercé volontairement et qui a reçu le transfert de Prox1 ; mdx+W : muscle mdx exercé volontairement ; mdx : muscle mdx. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. a : significativement différent de mdx. b : significativement différent de mdx+W. 1 : p < 0.05 , 2 : p < 0.01, 3 : p < 0.001, 4 : p < 0.0001 (Test ANOVA à un facteur).

De nombreux gènes codant pour des protéines sont impliqués dans la croissance et l'entretien des muscles (Gao et al., 2018; Rüegg and Glass, 2011). Le système ubiquitine-protéasome joue un rôle clé dans le déclenchement de l'atrophie musculaire lorsque les expressions de *Murf1* et *Mafbox* sont augmentées. La PCR quantitative en temps réel a révélé que les expressions de ces gènes n'étaient pas augmentées dans le muscle mdx+W+P par rapport au muscle mdx+W (**Figure A1-4E**). Nous avons ensuite analysé un autre mécanisme atrophique, l'autophagie, qui implique une batterie de gènes dont *Lc3* qui pourrait contribuer à la dégradation des protéines musculaires (Bonaldo and Sandri, 2013). Nous n'avons pas trouvé de changement dans l'expression de *Lc3* dans le muscle mdx+W+P (**Figure A1-4E**). De même, les gènes *Gadd45*, *Hdac4*, *Fn14*, *Redd1*, *Redd2*, *Mstn*, *Fst*, *Igf1*, et *Smox* ne semblent pas participer à l'état atrophique du muscle mdx+W+P (**Figure A1-4E**). Par exemple, *Mstn*, un régulateur négatif de la croissance musculaire, est régulé à la baisse dans le muscle mdx+W+P par rapport au muscle mdx+W (**Figure A1-4E**).

Ainsi, la réduction de la force isométrique maximale induite par le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx exercé volontairement est liée à une diminution du poids du muscle sans réduction du diamètre des fibres, et est associée à l'expression accrue de *Mstn*.

III.2. EFFET DU TRANSFERT DE PROX1 DANS LE MUSCLE MDX SÉDENTAIRE

III.2.1. Le transfert de Prox1 dans le muscle mdx sédentaire favorise des caractéristiques contractiles plus lentes mais ne réduit pas la fragilité

Une deuxième série d'expériences a été réalisée pour comparer l'effet du transfert de *Prox1* entre les souris mdx exercées volontairement et les souris mdx sédentaires. De la même manière que pour le muscle mdx soumis à l'exercice volontaire, le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx sédentaire (muscle mdx+P) a augmenté les expressions de *Prox1* (x 27,3) (**Figure A1-5A**), *Myh7* (x 6,2) (**Figure A1-5B**), réduit celle de *Myh4* (x 0,7) (**Figure A1-5B**), et n'a pas modifié les pourcentages de fibres exprimant MHC-1, MHC-2a et MHC-2x (**Figures A1-5C**). Contrairement au muscle mdx exercé volontairement, le transfert de *Prox1* a augmenté l'expression de *Tnni1* (x 2,4), réduit l'expression de *Sdha* (x 0,8) (**Figure A1-5B**) et n'a pas modifié les

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 1) - Résultats

quantités relatives de protéines MHC-2b et MHC-2x (**Figures A1-5D**) dans le muscle mdx+P par rapport au muscle mdx. Globalement, l'administration intramusculaire d'AAV-Prox1 a également induit une conversion contractile rapide à lente dans le muscle TA de souris mdx sédentaires, mais dans une moindre mesure.

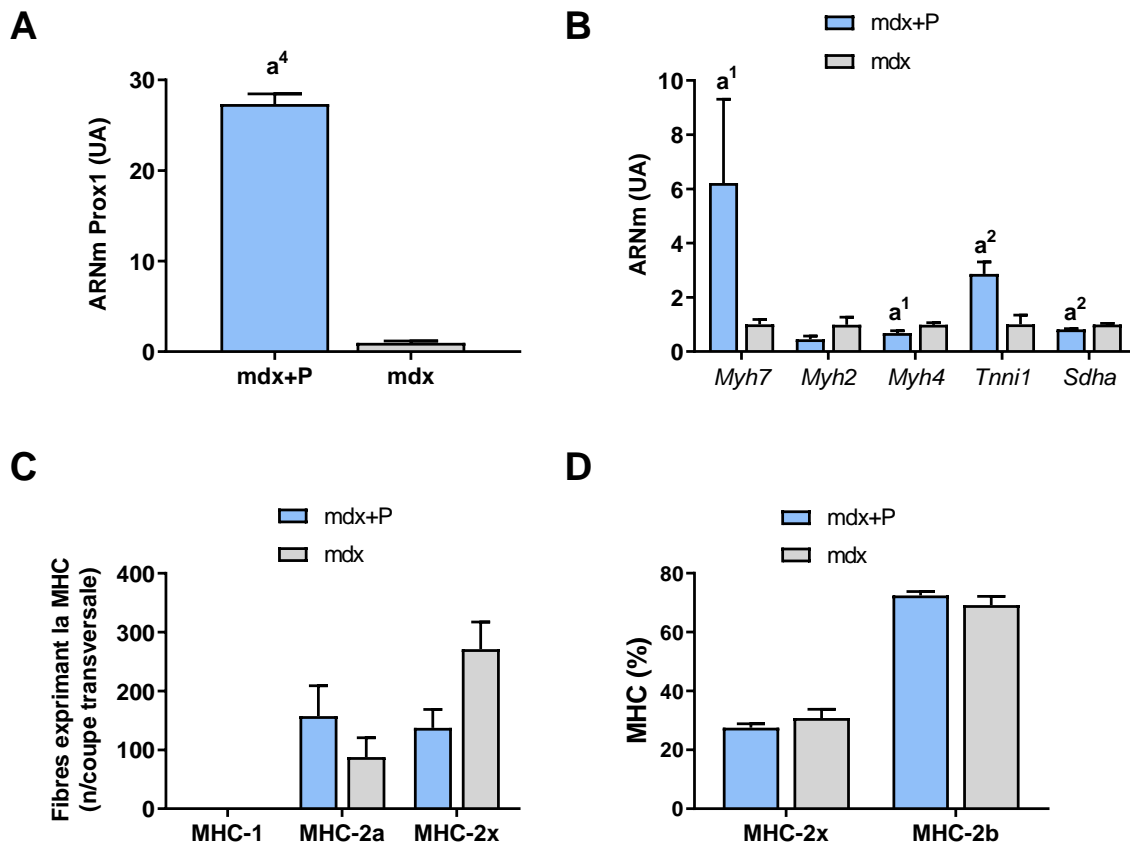


Figure A1- 5 : Effet du transfert de *Prox1* sur l'expression de *Prox1* et des marqueurs de la spécification du type de fibre chez les souris mdx sédentaires (deuxième série d'expériences). (A) Expression de *Prox1*, n = 6-11 par groupe. (B) Expression des gènes codant pour des protéines contractiles spécifiques du type de fibre, n = 6-11 par groupe. (C) Nombre de fibres exprimant la MHC-1, la MHC-2a et la MHC-2x par section transversale de muscle, n = 3-5 par groupe. (D) Quantités relatives de protéines MHC-2x et MHC-2b, n = 3 par groupe. mdx+P : muscle mdx ayant reçu le transfert de *Prox1* ; mdx : muscle mdx. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent de mdx. 1 : p < 0.05 ,2 : p < 0.01, 4 : p < 0.0001 (T-test).

Contrairement au muscle mdx soumis à un exercice volontaire, nous avons constaté dans la deuxième série d'expériences que la chute de force après des contractions excentriques n'était pas significativement réduite par le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx sédentaire car il n'y avait pas de différence significative entre le muscle mdx+P et le muscle mdx (**Figure A1-6A**). De même que pour le muscle mdx exercé volontairement, le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx+P a augmenté l'expression

de *Trpc1* (**Figure A1-6B**), mais dans une moindre mesure ($\times 1,4$). En outre, il n'a pas modifié l'expression de *PrxII*, *Gp91phox*, *P47phox* et *Rac1* (**Figure A1-6C**), et a augmenté de manière non significative l'expression de *Des* (**Figure A1-6D**). Contrairement au muscle mdx exercé volontairement, l'expression de *Cacn1s* et *Chrna1* était augmentée dans le muscle mdx+P par rapport au muscle mdx (**Figure A1-5B**).

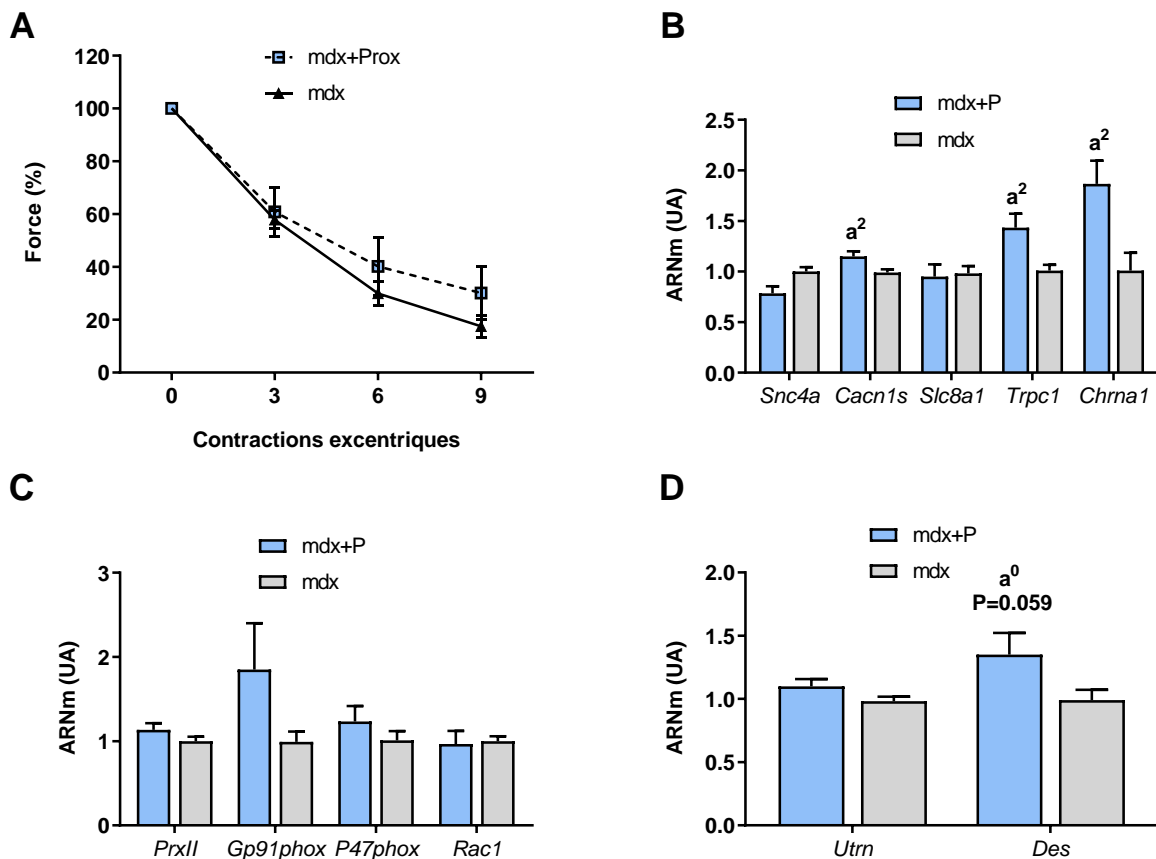


Figure A1- 6 : Effet du transfert de Prox1 sur la fragilité (susceptibilité aux lésions musculaires) et l'expression génique associée chez les souris mdx sédentaires (deuxième série d'expériences). (A) Chute de force après des contractions excentriques, n=5-8 par groupe. (B) Expression des gènes codant pour des canaux ioniques, liés à l'excitabilité, n=6-11 par groupe. (C) Expression des gènes liés à la NADPH oxydase 2 (NOX2), n=6-11 par groupe. (D) Expression des gènes codant pour l'utrophine (*Utrn*) et la desmine (*Des*), n=6-11 par groupe. mdx+P : muscle mdx ayant reçu le transfert de *Prox1* ; mdx : muscle mdx. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent de mdx. 2 : $p < 0.01$ (Test ANOVA à deux facteurs et T-Test).

Ainsi, le transfert de *Prox1* dans le muscle sédentaire mdx ne réduit pas la fragilité, ne change pas l'expression du MHC-2b et du MHC-2x, alors qu'il modifie l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différents aspects de la fonction musculaire (*Myh7*, *Myh4*, *Tnni1*, *Sdha*, *Trpc1*, *Cacn1s* et *Chrna1*).

III.2.2. Le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx sédentaire réduit également la force maximale isométrique absolue

De la même manière que pour le muscle mdx volontairement exercé, nous avons constaté dans la deuxième série d'expériences que le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx+P n'a pas modifié la force isométrique maximale spécifique (**Figure A1-7A**), a réduit la force isométrique maximale absolue (x 0,7) (**Figure A1-7B**), a réduit le poids du muscle (x 0,8) bien que de manière non significative ($p = 0,08$) (**Figure A1-7C**), n'a pas modifié le diamètre des fibres (**Figure A1-7D**) et a diminué l'expression de *Mstn* (**Figure A1-7E**).

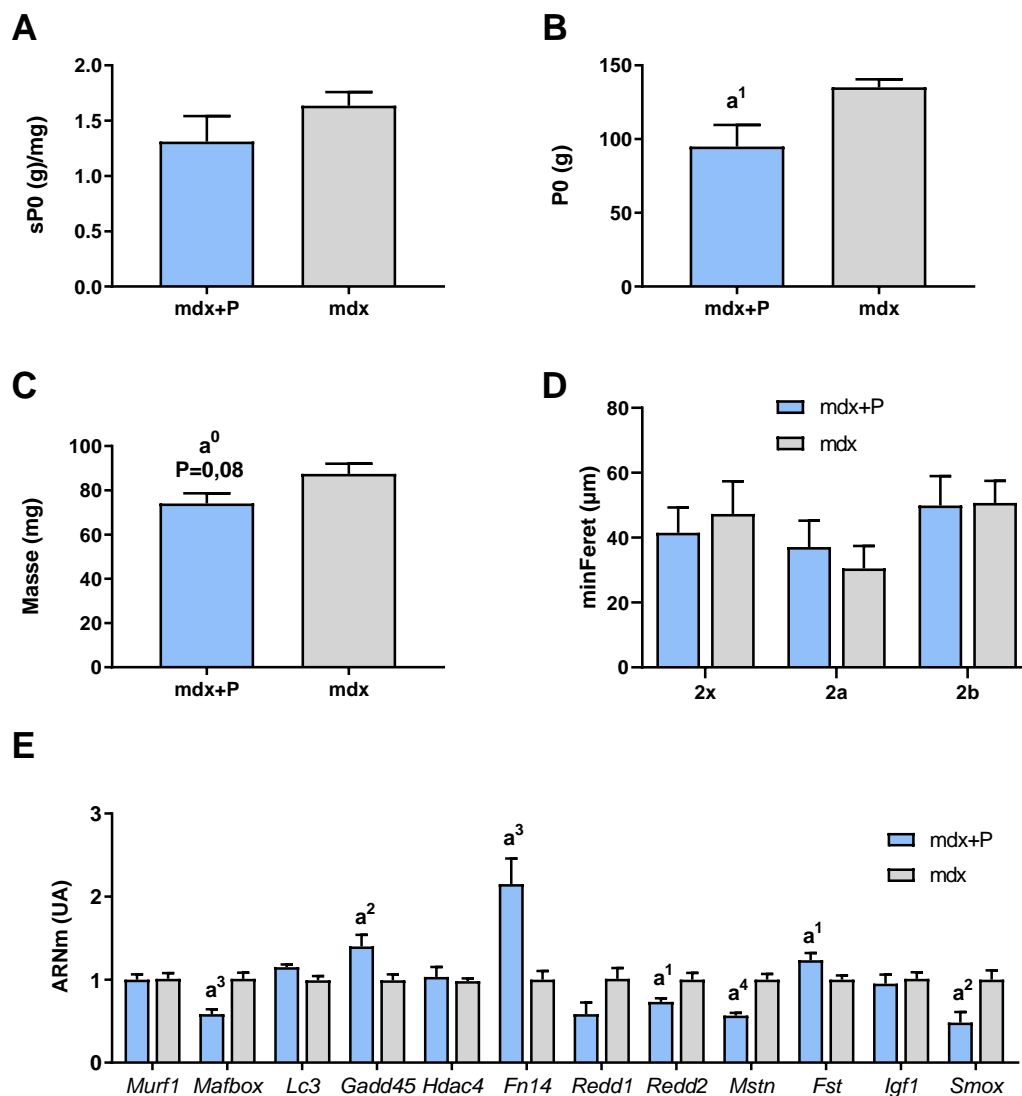


Figure A1- 7 : Effet du transfert de *Prox1* sur la force maximale absolue (P0) et spécifique (sP0), le poids musculaire et l'expression génique de marqueurs d'atrophie chez des souris mdx

sédentaires (deuxième série d'expériences). (A) Force maximale spécifique, n=5-8 par groupe. (B) Force maximale absolue, n=5-8 par groupe. (C) Poids musculaire, n=5-9 par groupe (D) Diamètre (min ferret) des fibres exprimant la MHC-2b, la MHC-2a et la MHC-2x, n= 4 par groupe. (E) Expression des gènes liés à l'atrophie, n=6-11 par groupe. mdx+P : muscle mdx ayant reçu le transfert de *Prox1* ; mdx : muscle mdx. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent de mdx. 1 : $p < 0.05$, 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$, 4 : $p < 0.0001$ (T-Test).

Contrairement au muscle mdx exercé volontairement, le transfert de *Prox1* n'a pas diminué de manière significative ($p = 0,07$) la force excentrique maximale absolue dans le muscle mdx+P (205,9 g \pm 18,8) par rapport au muscle mdx (257,0 g \pm 15,3). De plus, il a diminué l'expression de *Mafbox*, *Reed2* et *Smox*, alors qu'il a augmenté l'expression de *Gadd45*, *Fn14* et *Fst* dans le muscle mdx+P (**Figure A1-7E**).

Ainsi, le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx sédentaire a également réduit la production de force isométrique maximale, réduit le poids du muscle sans réduction du diamètre des fibres, et ces effets étaient associés aux modifications des expressions de *Mstn*, *Mafbox*, *Reed2*, *Smox*, *Gadd45*, *FN14* et *Fst*.

IV. DISCUSSION

IV.1. LE TRANSFERT DE PROX1 N'AMÉLIORE QUE LA FRAGILITÉ CHEZ LES SOURIS MDX SOUMISES À UN EXERCICE VOLONTAIRE

Cette étude confirme les résultats d'études antérieures (Delacroix et al., 2018; Hourdé et al., 2013) montrant que l'exercice volontaire atténue la susceptibilité de causer des lésions dans les muscles cruraux antérieurs rapides (TA et EDL) de souris mdx, lors de contractions musculaires, comme le font des thérapies géniques visant à restaurer la dystrophine (Roy et al., 2016). Pour la première fois, nous démontrons que le transfert de *Prox1* améliore encore plus la fragilité chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire. Fait important, le muscle a été protégé des contractions musculaires dommageables, grâce au transfert de *Prox1* uniquement lorsque les souris mdx ont effectué un exercice volontaire. Cette amélioration de la fragilité observée chez les souris mdx traitées par transfert de *Prox1* pourrait être très intéressante si l'on suppose que la fragilité est due à l'épuisement des cellules souches musculaires au cours des cycles successifs de dégénération/réparation (Sacco et al., 2010). Le transfert de *Prox1* pourrait ainsi réduire la fonte musculaire progressive dans le muscle dystrophique exercé en raison de la promotion de fibres moins fragiles.

Cet effet bénéfique du transfert de *Prox1* chez les souris mdx exercées pourrait s'expliquer par un travail et un stress plus faible pendant l'étirement du muscle (Lindsay et al., 2020) car la force excentrique maximale absolue est réduite chez les souris mdx exercées, proportionnellement à la force isométrique maximale absolue. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'association forte entre la fragilité et la force excentrique chez les souris mdx, lorsque le muscle est activé au maximum et pour un étirement constant (Hourdé et al., 2013). En effet, la fragilité était augmentée par l'inactivité et réduite par l'exercice volontaire chez les souris mdx alors que la force excentrique maximale absolue était respectivement réduite et inchangée (Hourdé et al., 2013).

La réduction de la fragilité causée par le transfert de *Prox1* chez les souris mdx exercées est associée à la promotion de caractéristiques contractiles plus lentes (expression accrue de *Myh7* et augmentation de la quantité relative de MHC-2x, alors que l'expression de *Myh4* est réduite ainsi que la quantité relative de MHC-2b). Cette

relation entre une meilleure fragilité et des caractéristiques contractiles plus lentes est en accord avec les deux points suivants. Premièrement, le muscle lent est moins fragile que le muscle rapide chez les souris mdx (Consolino and Brooks, 2004; Lindsay et al., 2019b). Deuxièmement, l'exercice et l'activation pharmacologique ou génétique de voies de signalisation, telles que la calcineurine, PPAR- β , PGC1- α et AMPK, qui favorisent un programme génétique plus lent et plus oxydatif, améliorent la fragilité chez les souris mdx (Al-Rewashdy et al., 2015; Delacroix et al., 2018; Ferry et al., 2015a; Gehrig et al., 2010; Hourdé et al., 2013; Miura et al., 2009; Selsby et al., 2012; Stupka et al., 2006). Par ailleurs, il a été démontré précédemment que *Prox1* favorise des caractéristiques musculaires plus lentes, et active la voie calcineurine/NFAT (Kivelä et al., 2016), une voie de signalisation connue pour jouer un rôle important dans la spécification des types de fibre (Chin et al., 1998b).

Il est également possible que le transfert de *Prox1* améliore la fragilité chez les souris mdx soumises à l'exercice volontaire en préservant l'excitabilité musculaire, comme le font l'exercice volontaire seul et d'autres thérapies sur la mdx (Delacroix et al., 2018; Roy et al., 2016). Dans nos expériences, une excitabilité réduite, c'est-à-dire un dysfonctionnement électrique de la membrane plasmique, conduisant à une génération et une propagation défectueuse du potentiel d'action musculaire, contribue largement à la chute de force immédiate après des contractions excentrique chez les souris mdx (Delacroix et al., 2018; Roy et al., 2016), en accord avec des études précédentes (Baumann et al., 2020; Call et al., 2013). Les canaux ioniques membranaires sont probablement endommagés après des contractions excentriques et le transfert de *Prox1* pourrait interférer avec ce processus. Il reste à déterminer si la régulation à la hausse de *Trpc1*, induite par le transfert de *Prox1* chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire, contribue à cette amélioration de l'excitabilité. Cependant, un niveau plus élevé de TRPC1 ou d'activité de canaux activés par l'étirement est généralement associé à un phénotype dystrophique et à une fragilité plus importante (Baltgalvis et al., 2011; Matsumura et al., 2011). En accord avec la présente étude, il a été précédemment rapporté que dans des muscles TA de souris mdx, l'amélioration de l'excitabilité et de la fragilité induite par l'exercice volontaire et l'activation de la voie de la calcineurine était également liée aux changements d'expression des gènes codant pour des canaux ioniques membranaires (Delacroix et al., 2018).

Des données de la littérature suggèrent qu'une activité accrue de NOX2 est liée à la fragilité chez les souris mdx (Olthoff et al., 2018; Whitehead et al., 2010). Cependant, nos résultats montrent que le transfert de *Prox1* dans le muscle mdx exercé ne réduit pas l'expression des sous-unités de Nox2 (*Gp91phox*, *P47phox* et *Rac1*), dont on sait qu'elles produisent un niveau élevé de ROS chez les souris mdx (Whitehead et al., 2010). De plus, nous n'avons trouvé aucune augmentation de l'expression du gène codant pour l'enzyme antioxydante PrxII, dont la surexpression améliore la fragilité chez les souris mdx (Olthoff et al., 2018). Enfin, nous avons constaté que l'amélioration de la fragilité suite au transfert de *Prox1* n'est pas associée à une augmentation significative de l'expression de *Utrn* et *Des* chez les souris mdx exercées, deux gènes dont l'augmentation de l'expression est associée à la fragilité chez les souris mdx (Deconinck et al., 1997; Ferry et al., 2020).

Il est à noter que le transfert de *Prox1* seul n'améliore pas significativement la fragilité chez les souris mdx sédentaires. Cette différence ne peut être attribuée au fait que *Prox1* n'était pas fortement surexprimé chez les souris mdx sédentaires traitées par le transgène. Cependant, certains changements induits par le transfert de *Prox1* sont notablement différents entre les souris mdx exercées et sédentaires : force excentrique maximale absolue (x 0,6 contre aucun changement significatif), MHC-2b (x 0,8 contre aucun), MHC-2x (x 1,6 contre aucun), *Myh7* (x 15,1 contre x 6,2) et *Trpc1* (x 2,1 contre x 1,4). Ainsi, notre étude indique de manière intéressante que l'exercice volontaire potentialise une éventuelle thérapie génique, du moins dans le domaine préclinique.

IV.2. LE TRANSFERT DE PROX1 RÉDUIT LA PRODUCTION DE FORCE MAXIMALE CHEZ LES SOURIS MDX

Bien que le transfert de *Prox1* améliore la fragilité des muscles mdx soumis à un exercice volontaire, nous avons constaté qu'il a un effet néfaste sur la force isométrique maximale absolue (et la force excentrique maximale). La réduction de la force maximale est liée à une réduction du poids du muscle mais pas à une réduction du diamètre des différents types de fibres ni à un nombre plus élevé de fibres de petit diamètre (pas d'augmentation des pourcentages de fibres exprimant MHC-1 et MHC-2a qui sont plus petites que les fibres exprimant MHC-2b). De manière inattendue, nous avons constaté que l'état atrophique en réponse au transfert de *Prox1* est associé

à la régulation négative de *Mstn*, un régulateur négatif de la croissance musculaire dans le muscle mdx (Dumonceaux et al., 2010), sans autres changements transcriptionnels concernant plusieurs processus atrophiques bien connus, du moins chez les souris mdx soumises à un exercice volontaire. Comme la quantité relative de MHC-2b est réduite, nous supposons que *Prox1* réduit spécifiquement la synthèse de MHC-2b chez les souris mdx en exercice. En accord avec la réduction du poids musculaire induite par le transfert de *Prox1*, plusieurs traitements génétiques ou pharmacologiques, favorisant des fibres plus lentes et plus oxydatives, sont connus pour induire une atrophie musculaire/une réduction du poids chez les souris mdx (Chalkiadaki et al., 2014; Selsby et al., 2012; Stupka et al., 2006), pour des raisons encore largement inconnues.

V. CONCLUSION

Combiné à l'exercice volontaire, le transfert de *Prox1* n'induit qu'une transition très modeste des fibres rapides à lentes mais améliore (réduit) néanmoins encore plus la fragilité, alors que l'approche unique de transfert de *Prox1* chez les souris mdx sédentaires n'a pas réussi à induire un effet significatif sur la susceptibilité aux lésions musculaires induites lors de contractions intenses. Il est intéressant de noter que l'exercice volontaire potentialise une éventuelle thérapie génique. Cet effet bénéfique sur la fragilité chez les souris mdx exercées est associé à la réduction de la force excentrique maximale, à la promotion de caractéristiques contractiles plus lentes et à la modification de l'expression de *Trpc1*. Cependant, la surexpression de *Prox1* réduit également la production de force maximale absolue en relation avec un poids musculaire réduit, malgré une diminution de l'expression de *Mstn*. Ainsi, bien que le transfert de *Prox1* aggrave à première vue la faiblesse musculaire, il peut avoir le potentiel de réduire l'occurrence des cycles de dégénération-régénération et par conséquent de ralentir la progression de la maladie à long terme dans le muscle dystrophique exercé.

Travail expérimentale (Axe 2)

Effet de l'exercice physique d'endurance sur une thérapie génique qui restaure l'expression de la dystrophine

I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

De nombreuses thérapies géniques (micro-dystrophine, saut d'exon...), visant à restaurer la dystrophine, sont développées depuis longtemps dans le cas de la DMD (Chamberlain and Chamberlain, 2017). Toutefois l'enjeu majeur reste d'améliorer l'efficacité de ce type de thérapie, c'est pourquoi beaucoup d'études sont initiées afin de tester différents vecteurs pour améliorer la délivrance du transgène (Gregorevic et al., 2004; Wang et al., 2000; Xiao et al., 1999; Yang et al., 1996). À notre connaissance, très peu d'études ont cherché à déterminer si l'exercice physique était susceptible de moduler l'efficacité d'une thérapie génique, au stade préclinique, ce qui peut avoir son importance dans le cadre d'une mise au point de stratégie thérapeutique de la DMD. Une étude récente a montré qu'un exercice de course volontaire dans une roue réalisé pendant plusieurs mois chez la souris mdx augmentait la quantité de dystrophine dans le muscle locomoteur de souris mdx, après une injection d'un AAV véhiculant un gène codant une micro-dystrophine (Hamm et al., 2021). Ces données sont encourageantes. Toutefois, il n'est pas certain que ces résultats puissent être transposés dans le cas d'un modèle murin plus sévère de DMD. Par ailleurs, l'exercice volontaire durant des mois dans l'étude de Hamm et al, il n'était pas possible de déterminer si l'effet bénéfique de l'exercice volontaire sur la restauration de la dystrophine chez les souris mdx pouvait s'exercer sur les premières semaines de l'installation de la production de dystrophine, ni s'il pouvait être imputé à des phénomènes systémiques (bio délivrance du vecteur, réponse immunitaire...).

Depuis quelques temps a été généré un modèle murin plus sévère de DMD. La souris D2-mdx possède la même mutation non-sens de l'exon 23 que la souris mdx, mais le fond génétique DBA/2J lui confère plus de fibrose et moins de régénération que la souris mdx (Fukada et al., 2010). Ainsi, les souris D2-mdx auraient des caractéristiques dystrophiques plus sévères et plus proches de la pathologie humaine. Dans ce modèle, il a été montré qu'un exercice de faible et moyenne intensité sur tapis roulant n'avait pas d'effets délétères (Zelikovich et al., 2019), suggérant que l'exercice volontaire ne cause pas de dommages musculaires chez la souris D2-mdx, comme chez la souris mdx (Delacroix et al., 2018; Ferry et al., 2015b; Hayes and Williams, 1996; Hourdé et al., 2013; Spaulding et al., 2020), qui pourraient compromettre l'utilisation d'une thérapie génique.

Travail expérimentale (Axe 2) - Contexte de l'étude

Dans ce deuxième axe de cette thèse, l'objectif principal était de déterminer si l'exercice physique était capable de moduler l'efficacité d'une thérapie génique visant à restaurer la dystrophine dans le muscle d'un modèle sévère murin de DMD, la souris D2-mdx. Plus précisément, nous voulions savoir si l'exercice volontaire réalisé pendant les 4 premières semaines de la thérapie génique était susceptible de modifier la quantité de dystrophine dans le muscle locomoteur chez la souris D2-mdx. Dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé une thérapie génique, reposant sur une stratégie de saut d'exon, qui consiste à cibler l'exon 23 muté du gène de la dystrophine avec un petit ARN nucléaire modifié (U7dex23) exprimé grâce à un vecteur de type AAV2/1. L'U7dex23 permet de restaurer des niveaux presque normaux d'expression de la dystrophine chez la souris à double knockout (DKO) utrophine / dystrophine (un modèle de souris très sévère et progressif de DMD), après seulement une injection (Goyenvalle et al., 2012). Pour réaliser cet objectif général, nous avons mis en place 2 séries d'expérimentation. La première série d'expérimentation avait pour but de caractériser les effets de l'exercice de course volontaire chez la souris D2-mdx afin de confirmer qu'il n'induisait pas de dommages musculaires, au niveau histologique et fonctionnel, ce qui pourrait compromettre une éventuelle thérapie génique. La seconde série d'expérimentation avait pour but de déterminer si ce même exercice volontaire pouvait altérer l'efficacité de la thérapie génique utilisant l'U7dex23 pour restaurer l'expression de la dystrophine.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODE

II.1. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

L'ensemble des procédures ont été effectuées conformément aux législations nationales et européennes et ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel « Charles Darwin » (projet n ° 01362.02). Des souris D2-mdx (n=24) femelles (fond DBA2/J) âgées de 5 mois ont été réparties aléatoirement en différents groupes témoins et expérimentaux lors de deux séries d'expériences.

Afin d'évaluer l'effet d'un protocole de course volontaire, mimant un exercice physique d'endurance, dans un modèle sévère de DMD, dans une première série d'expériences, une partie des souris D2-mdx ont été réparties dans des cages séparées contenant une roue (Wheel, n=8) (**Figure A2-1**), pour qu'elles puissent courir un mois *ad libitum* (la distance de course quotidienne était de $0.9 \pm 0,2$ km / jour). Un groupe de souris contrôles sédentaires (Sed, n=8) est resté un mois dans des cages sans roue.

Comme nous n'avons pas observé de dommages musculaires en réponse à l'exercice physique chronique qui auraient pu contre-indiquer l'utilisation d'une thérapie génique, nous avons réalisé une deuxième série d'expériences pour évaluer l'effet de l'exercice sur la thérapie génique. Dans la seconde série d'expériences, les muscles tibiaux antérieurs (TA) des souris D2-mdx ont été injectés avec un AAV2/1-U7dex23 et trois jours plus tard une partie des souris a été réparties dans des cages séparées contenant une roue (U7dex23+Wheel, n=6), pour qu'elles puissent courir un mois *ad libitum* (la distance de course quotidienne était de $0.8 \pm 0,2$ km / jour), tandis que les autres sont restées dans des cages sans roue (U7dex23, n=5) (**Figure A2-1**). Un groupe de souris contrôles injectées avec un AAV2/1-Scramble (U7Scr, n=8) est resté un mois dans des cages sans roue.

Quatre semaines après l'injection les mesures de force ont été réalisées, puis les souris ont été euthanasiées et les muscles prélevés.

Travail expérimentale (Axe 2) - Matériel et méthode

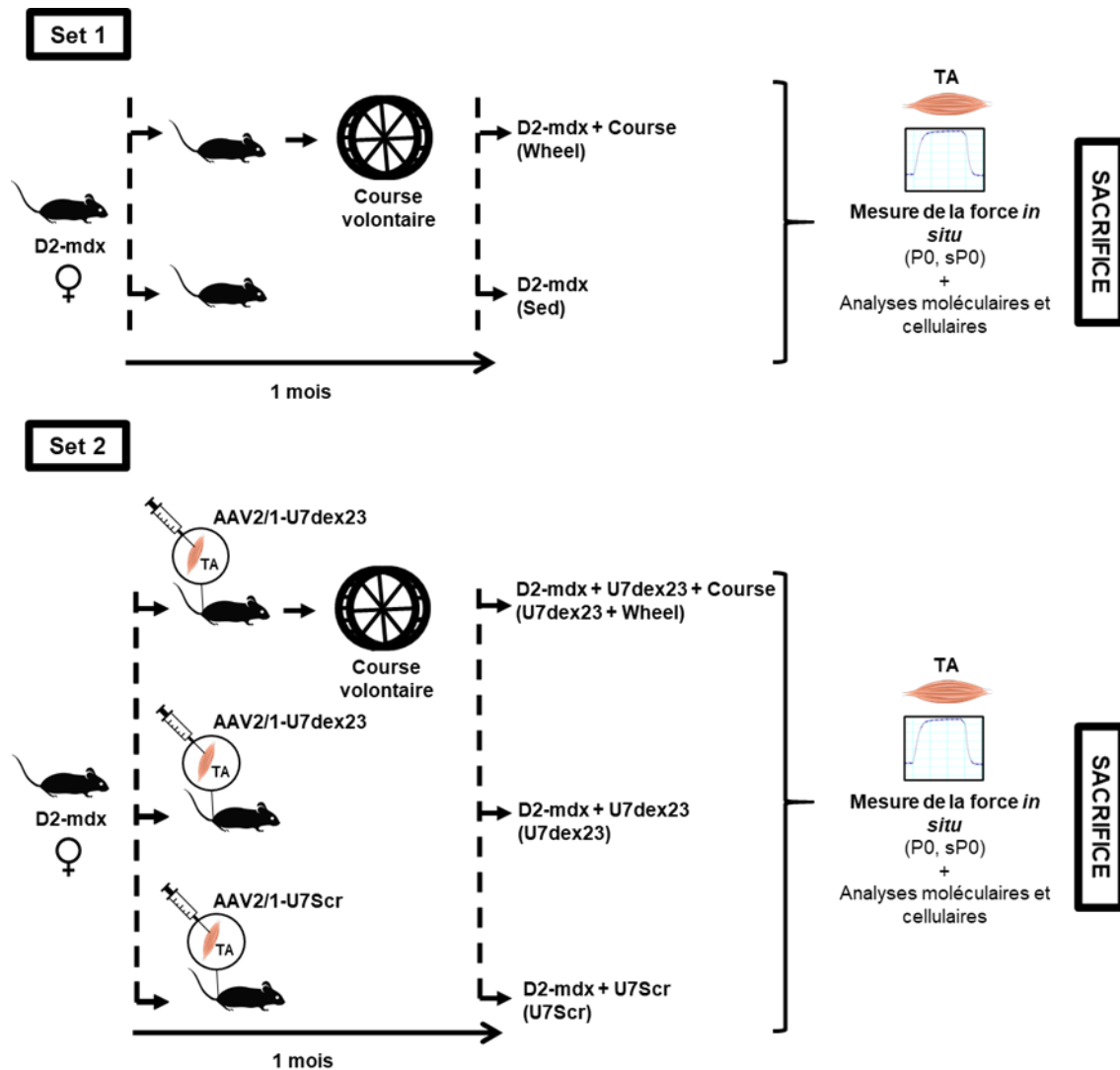


Figure A2- 1 : Schéma du protocole expérimental. Set 1 : 1^{ère} expérience pour évaluer l'effet d'un protocole de course volontaire, mimant un exercice physique d'endurance, dans un modèle sévère de DMD. Set 2 : 2^{ème} expérience pour évaluer l'effet de l'exercice sur une thérapie génique par saut d'exon médié par un AAV (AA2/1-U7dex23). TA : Tibial antérieur ; P0 : force maximale absolue ; sP0 : force maximale spécifique.

II.2. RESTAURATION DE LA DYSTROPHINE PAR THÉRAPIE DE SAUT D'EXON (EN COLLABORATION AVEC LA PLATEFORME MYOVECTOR)

La restauration de l'expression de la dystrophine a été réalisée par une stratégie de saut de l'exon 23, en utilisant une séquence anti-sens d'un petit ARN nucléaire (snRNA) optimisée (U7dex23) et décrite précédemment (Goyenvallé et al., 2004a). Des vecteurs adéno-associés (AAV1) portant les constructions U7dex23 ont été injectés dans les muscles TA des souris D2-mdx. Brièvement, les souris D2-mdx ont été anesthésiées (3% d'isoflurane), puis les muscles TA ont été injectés avec un

Travail expérimentale (Axe 2) - Matériel et méthode

AAV2/1-U7dex23 (55µl, 1×10^{11} gv). Les muscles contrôles ont été injectés avec un AAV2/1-Scr (55µl, 1×10^{11} gv). Les constructions AAV2/1-U7dex23 et AAV2/1-Scr ont été réalisés en collaboration avec la plateforme MyoVector, sur la base de plasmides fournis respectivement par Aurélie Goyenvalle de l'équipe de Luis Garcia et France Pietri-Rouxel (Centre de Recherche en myologie). Les plasmides ont été purifiés en utilisant le système Plasmid Maxiprep sans endotoxine PureYield™ (Promega, Lyon, France) puis vérifiés par digestion par enzyme de restriction et par séquençage (Eurofins MWF Operon, Ebersberg, Allemagne). Les constructions AAV2/1-U7dex23 et AAV2/1-Scr ont été produites dans des cellules 293 de rein embryonnaire humain par une méthode de triple transfection utilisant la technique de précipitation au phosphate de calcium. Le virus a ensuite été purifié par 2 cycles de centrifugation en gradient de chlorure de césium et concentré par dialyse. Les préparations virales finales ont été conservées dans une solution de PBS à -80 ° C. Le nombre de génomes viraux a été déterminé par une PCR quantitative.

II.3. MESURE DE FORCE

En collaboration avec UMS28, la force isométrique tétanique maximale a été évaluée en mesurant la contraction *in situ* du muscle tibialis anterior (TA) en réponse à une stimulation nerveuse, afin de déterminer si l'exercice chronique induisait des dommages fonctionnels. Les souris ont été anesthésiées à l'aide de pentobarbital (60 mg/kg, ip). La température corporelle a été maintenue à 37°C. Le genou et le pied ont été fixés à l'aide de broches et de pinces et le tendon distal du muscle a été attaché au bras de levier d'un système de servomoteur (305B, Dual-Mode Lever, Aurora Scientific) à l'aide d'une ligature en soie. Le nerf sciatique a été écrasé au niveau proximal et stimulé au niveau distal par une électrode bipolaire en argent utilisant des impulsions supra maximales à onde carrée d'une durée de 0,1 ms. Nous avons mesuré la force maximale absolue générée pendant les contractions tétaniques isométriques en réponse à une stimulation électrique (125 Hz, 500 ms). La force maximale absolue a été déterminée à la L0 (longueur à laquelle la tension maximale a été obtenue pendant le tétanos). La force maximale absolue (P0) a été normalisée par rapport au poids du muscle pour estimer la force maximale spécifique (sP0).

II.4. HISTOLOGIE & IMMUNOHISTOCHEMIE

Des coupes transversales (8 μm) ont été obtenues à l'aide d'un cryostat, dans le milieu du muscle TA. Une partie des coupes ont été utilisées pour une analyse histologique de la fibrose selon un protocole standard pour la coloration Rouge Sirius.

L'autre partie des coupes ont été utilisées pour l'immunohistochimie. Pour la détermination du diamètre et de la composition des fibres musculaires, des coupes congelées non fixées exprimant la chaîne lourde de la myosine (MHC) ont été bloquées pendant 1h dans une solution saline tampon phosphate supplémentée avec 2% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 2% de sérum de veau fœtal (SVF). Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit avec des anticorps primaires dirigés contre la laminine (Sigma, France), la MHC-2a (clone SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, Université de l'Iowa), la MHC-2b (clone BF-F3, Developmental Studies Hybridoma Bank), et la MHC-1 (clone BA-D5, Developmental Studies Hybridoma Bank). Après des lavages dans du PBS, les coupes ont été incubées 1 h avec des anticorps secondaires (Alexa Fluor, Invitrogen) (**Tableau A2-1**), puis 5 minutes avec une coloration Hoechst (33342, Invitrogen), pour révéler les noyaux centraux. Les lames ont finalement été montées dans du Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen).

Types de fibres	Anticorps primaires	Concentration	Anticorps secondaires	Concentration
MHC-2a	Mouse SC-71	1 :10	Goat anti-mouse IgG1 Alexa 555	1 :400
MHC-2b	Mouse BF-F3	1 :10	Goat anti-mouse IgM Alexa 647	1 :400
MHC-1	Mouse BA-D5	1 :10	Goat anti-mouse IgG2b Alexa 350	1 :400
Laminine	Polyclonal Rabbit Laminin	1 :400	Goat anti-rabbit Alexa 488	1 :400
Dystrophine	NCL-DYS2	1/200	Goat anti-mouse IgG1 Alexa 555	1 :400

Tableau A2- 1. Liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages.

Pour la détermination du pourcentage d'aire de fibres exprimant la dystrophine, des coupes congelées non fixées ont été bloquées pendant 1h dans une solution saline tampon phosphate plus 2% d'albumine de sérum bovin (BSA), 2% de sérum de veau

Travail expérimentale (Axe 2) - Matériel et méthode

foetal (SVF) et une goutte de M.O.M (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit avec un anticorps murin monoclonal NCL-DYS2 (Novocastra, UK). Après plusieurs lavages dans du PBS, les coupes ont été incubées 1 h avec l'anticorps secondaire (Alexa Fluor, Invitrogen) (**Tableau A2-1**).

L'ensemble des images ont été capturées à l'aide d'une caméra numérique (Hamamatsu digital camera C11440) attachée à un microscope à fluorescence inversé (Axio observer, Zeiss), et les analyses morphométriques ont été réalisées à l'aide du logiciel Fiji. Le grossissement utilisé pour la quantification des images histologiques était de 20x. Les fibres MHC-2x ont été identifiées comme des fibres qui n'expriment pas MHC-2b, MHC-2a et MHC-1.

L'identification du contour des fibres a été réalisé en utilisant l'algorithme Cellpose et le plugin LabelsToROIs de Fiji (Waisman et al., 2021). Par la suite, le nombre et le diamètre des fibres exprimant la MHC-1, la MHC-2x et la MHC-2a par coupe transversale de muscle a été déterminé grâce à des seuillages d'images. De la même manière, le pourcentage d'aire de fibres exprimant de la dystrophine a été estimé grâce à des seuillages d'image, en rapportant l'aire des fibres exprimant de la dystrophine par rapport à l'aire totale de la coupe. Pour compter le nombre de fibres centro-nuclées et réaliser une étude de distribution du nombre de noyaux centraux par fibre, la macro MuscleJ sur Fiji a été utilisée (Mayeuf-Louchart et al., 2018).

II.5. WESTERN BLOT DYSTROPHINE

Des Western blots ont été réalisés pour évaluer la quantité de protéine dystrophine. Pour ce faire, les protéines totales ont été extraites avec un tampon de lyse RIPA [25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % de sodium déoxycholate, 0,1 % (ref. 89901, Thermo Scientific Pierce) SDS et complété avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase (1mM AEBSF, 800nm Aprotinin, 50µM Bestatin, 15µM E64, 20µM Leupeptin, 10µM Pepstatin A ; ref. 78429, Thermo Scientific Halt) et glycérophosphate ; ref. 78426, Thermo Scientific Halt]] et quantifiées à l'aide du kit de dosage des protéines BCA (ref. 23225, Thermo Scientific Pierce). Après une étape de dénaturation pendant 10 min à 70 °C, 2.5 µg d'extrait protéique total ont été chargés dans des gels NuPage 3-8 % Tri-Acetate (Invitrogen) et transférés sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les blots ont été bloqués pendant 2 h à température ambiante avec un

Travail expérimentale (Axe 2) - Matériel et méthode

tampon de blocage (lait 5% + TBS-Tween20). Par la suite, les membranes ont été hybridées pendant la nuit à 4°C avec des anticorps primaires monoclonal dirigés contre la dystrophine (MANDRA 1(7A10), DSHB) et l'alpha-actinine sarcomérique ACTN2 (EA-53, ab9465, Abcam) (**Tableau A2-2**). Une incubation d'1 heure, à l'abri de la lumière, avec un anticorps secondaire de mouton anti-souris, conjugué à la peroxydase de raifort (515-035-062, Jackson ImmunoResearch), a permis la détection et la quantification des protéines, en utilisant le substrat HRP (Substrat HRP Immobilon Western, Millipore), (**Tableau A2-2**). L'intensité des bandes a été analysée à l'aide du logiciel Image Studio Lite.

Protéine	Anticorps primaires	Concentration	Anticorps secondaires	Concentration
Dystrophine	MANDRA 1	1 :1000	Sheep anti-mouse	1 :1000
Alpha-actinine 2	ACTN2	1 :2000		

Tableau A2- 2. Liste des anticorps utilisés pour le western blot.

II.6. QUANTIFICATION DU NOMBRE DE GÉNOMES VECTEURS (GV)

Une quantification des génomes vecteurs dans les muscles injectés a été réalisé afin d'évaluer l'efficacité de la transduction et la persistance des GV 1 mois après l'injection. Le protocole de quantification et les réactifs ont été aimablement fournis par la plateforme MyoVector et Delphine Trochet (Centre de Recherche en myologie). L'ADN génomique a été extrait des muscles de souris à l'aide d'une solution de lyse (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM EDTA pH 8, 200 mM NaCl, 0,2 % de SDS) contenant de la protéine kinase (1 :100, Invitrogen).

Le nombre de copies du génome AAV a été mesuré sur 40 ng d'ADN génomique par PCR quantitative absolue en temps réel sur un Lightcycler 480 (Roche) en utilisant des sondes TaqMan MGB (**Tableau A2-3**) et le TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems).

Travail expérimentale (Axe 2) - Matériel et méthode

Noms des amorces	Séquences	Sondes MGB
AAV-F (sens)	5'-CTCCATCACTAGGGGTTTCCTTG-3'	6FAM-TAGTTAATGATTAACCC
AAV-R (anti-sens)	5'-GTAGATAAGTAGCATGGC	
Titine-F (sens)	5'-AAAACGAGCAGTGACCTGAGC-3'	FAM-TGCACG GAAGCGTCTCGT CTCAGTC
Titine-R (anti-sens)	5'-TTCAGTCATGCTGCTACGGC-3'	

Tableau A2- 3. Amorces et sondes utilisées pour le dosage du nombre de vg.

Des amorces ciblant les séquences ITR de l'AAV ont été utilisés pour amplifier spécifiquement la séquence du génome viral (**Tableau A2-3**) à l'aide de programme spécifique (**Tableau A2-4**). Un plasmide pAAV contrôle a été dilué 10 fois en série et utilisé comme témoin pour établir la courbe standard de quantification absolue. Tous les échantillons d'ADN génomique ont été analysés en double. Les valeurs ont été normalisées en utilisant le gène titine comme référence.

Programme	AAV			Titine		
	Cycle	Temps (min)	Température (C°)	Cycle	Temps (min)	Température (C°)
Dénaturation	1	15 :00	95	1	15 :00	95
Dénaturation	40	0 :15	95	40	0 :15	95
Hybridation		1 :00	59		1 :00	54

Tableau A2- 4. Programmes utilisés sur le LightCycler.

II.7. EXTRACTION D'ARN ET QUANTIFICATION DU SAUT D'EXON 23

Afin d'évaluer le niveau de saut d'exon 23, une analyse RT-PCR a été effectuée. L'ARN total a été isolé, à partir d'échantillons de muscle TA, avec du Tri Reagent (Sigma-Aldrich), à l'aide du système Fastprep et de tubes Lysing Matrix D (MPbiomedicals), selon le protocole du fabricant. L'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN total à l'aide du kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis avec des hexamères aléatoires, conformément aux instructions du fabricant (Thermo Scientific).

Une analyse PCR semi-quantitative a ensuite été réalisé avec un microlitre d'ADNc selon un protocole standard (ReddyMix, Thermo Scientific). L'amplification par PCR a été réalisé avec les amorces (**Tableau A2-5**) et le programme ci-dessous (**Tableau A2-6**). Par la suite les produits de PCR ont été déposé sur des gels d'agarose à 1%,

Travail expérimentale (Axe 2) - Matériel et méthode

colorés au bromure d'éthidium. L'intensité des bandes (formes exon inclus ou exclus) a été quantifiée à l'aide du logiciel Fiji. Le pourcentage d'exclusion de l'exon 23 correspond au rapport de l'intensité de la bande avec l'exon 23 exclus sur l'intensité totale (somme des intensités des bandes exon 23 inclus et exon 23 exclus).

Noms des amorces	Séquences
Exon 20-F (sens)	5'-CCCAGTCTACCACCCTATCAGAGC-3'
Exon 26-R (anti-sens)	5'-CCTGCCTTTAAGGCTTCCTT-3'

Tableau A2- 5. Amorces pour la détection de l'exon 23.

Programme			
Etape	Cycle	Temps (min)	Température (C°)
Dénaturation	1	15 :00	95
Dénaturation	33	0 :30	95
Hybridation		1 :00	58
Élongation		2 :00	72

Tableau A2- 6. Programme d'amplification de l'exon 23 (exon 20 à 26).

II.8. PCR QUANTITATIVE

Les analyses qPCR ont été réalisées à l'aide d'un Lightcycler 480 (Roche) et du kit SYBR Green (Roche) selon les instructions du fabricant. Le même programme a été utilisé pour toutes les qPCR (**Tableau A2-7**). Le niveau d'ARN messager (ARNm) de la dystrophine (*Dmd*), de l'U7dex23, de la MHC néonatal (*mhy8*) et embryonnaire (*mhy3*), ainsi que la myostatine (*Mstn*) ont été quantifiés à l'aide de amorces spécifiques (**Tableau A2-8**). Les données ont été analysées avec le logiciel d'analyse Lightcycler 480. Les valeurs ont été normalisées à *Rlp0*, un gène de référence exprimé de manière équivalente dans toutes les conditions.

Travail expérimentale (Axe 2) - Matériel et méthode

Programme			
Etape	Cycle	Temps (min)	Température (C°)
Dénaturation	1	15 :00	95
Dénaturation	45	0 :10	95
Hybridation		1 :15	58
Élongation		2 :20	72

Tableau A2- 7. Programme qPCR.

Gènes	Séquences sens	Séquences anti-sens
Gène de référence		
<i>Rlp0</i>	5'- GAGGACCTCACTGAGATTCGG -3'	5'- TTCTGAGCTGGCACAGTGAC -3'
Gènes d'intérêts		
<i>Dmd</i>	5'-TCATCTGCCATGTGGAAAAG-3'	5'-TGGTTGGCAGTCAAACCTTCA-3'
<i>U7dex23</i>	5'-AAGGCCAAACCTCGGCTTAC-3'	5'-AGGGGTTTTCCGACCGAAG-3'
<i>Myh3</i>	5'-CCTCACCTCTAGCCGGATGGT	5'-AATTGTCAGCCACGAAAAT-3'
<i>Myh8</i>	5'-CAGGAGCAGGAATGATGCTCTGAG-3'	5'-AGTTCCTCAAACCTTTCAGCAGCCAA-3'
<i>Mstn</i>	5'-CACTCTACAAAGTACGAGTCTCTCT-3'	5'-CTAGAGTTGACTGAAAGTTGACCT-3'

Tableau A2- 8. Séquences d'amorces utilisées pour les qPCR.

II.9. ANALYSES STATISTIQUES

Les groupes ont été comparés statistiquement à l'aide du logiciel Prism v8 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). L'homogénéité de variance des données a été testée à l'aide du test de Brown-Forsythe.

Pour la première série d'expériences, un test t non apparié avec correction de Welch a été utilisé pour analyser les variables suivantes : pourcentage de MEC, pourcentage de fibres centro-nuclées, niveau d'expression relative de *Myh3* et *Myh8*, sP0, P0, masse, nombre de fibres et min feret. Le pourcentage de noyaux centraux par fibres centro-nuclées, de fibres par classe de diamètre, de fibres par MHC et le diamètre des fibres par MHC ont été analysés grâce à un test ANOVA à deux facteurs.

Pour la deuxième série d'expériences, un test ANOVA à un facteur a été utilisé pour analyser les variables suivantes : pourcentage d'aire de fibre exprimant la dystrophine, ratio dystrophine/alpha-actinine 2, nombre de copie de gv, pourcentage d'exclusion de l'exon 23, niveau d'expression de l'ARNm *Dmd* et de *Mstn*, sP0, P0, masse, nombre

Travail expérimentale (Axe 2) - Matériel et méthode

de fibres et min feret. Le pourcentage de noyaux par fibres centro-nuclées, de fibres par classe de diamètre, de fibres par MHC et le diamètre des fibres par MHC ont été analysé grâce à un test ANOVA à deux facteurs. Le niveau d'expression d'*U7dex23* a été analysé avec un test t non apparié avec correction de Welch.

Lorsqu'un effet significatif (ANOVA) a été observé, des comparaisons multiples ont été effectuées avec le test de Tukeys. Enfin, lorsqu'une interaction significative a été observée (ANOVA), les différences ont été testées avec le test de Holm-Sidak. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM.

III. RÉSULTATS

III.1. L'EXERCICE DE COURSE VOLONTAIRE N'INDUIT PAS DE DOMMAGES MUSCULAIRES CHEZ LES SOURIS D2-MDX ADULTES

Afin de déterminer si l'exercice de course volontaire d'un mois pouvait être délétère pour les muscles de souris D2-mdx adultes, notamment en détruisant les fibres musculaires, nous avons réalisé une première série d'expérimentation afin d'évaluer les dommages histologiques musculaires. Classiquement, ces dommages se traduisent par une augmentation de la matrice extracellulaire (MEC). Nous avons donc réalisé une coloration au Rouge Sirius du collagène de la MEC pour quantifier le pourcentage de surface musculaire occupée par la MEC au sein de coupes transversales de tibial antérieur (TA) de souris D2-mdx (**Figure A2-2A, 1^{ère} rangée**).

Aucune différence entre les souris Sed et Wheel n'a été constaté au niveau de la MEC (**Figure A2-2B**). Par ailleurs, pour évaluer la dégénérescence des fibres musculaires, nous avons réalisé un marquage des noyaux centraux au DAPI (bleu) et de la laminine (vert) afin de quantifier le nombre de fibres régénérées (**Figure A2-2A, 2^{ème} et 3^{ème} rangée**). Le pourcentage de fibres centro-nuclées chez les souris Wheel est similaire au groupe contrôle Sed (**Figure A2-2C**). De la même manière, la distribution du nombre de noyaux centraux par fibre musculaire n'a pas révélé de différence entre les souris Wheel et Sed (**Figure A2-2D**). En accord avec ces résultats, le niveau d'expression des transcrits *Myh3* et *Myh8* codant respectivement pour la chaîne lourde de la myosine embryonnaire et néonatal n'a pas augmenté significativement en réponse à l'exercice (**Figure A2-2E et A2-2F**). Ces résultats suggèrent que l'exercice de course volontaire n'induit pas de dommages musculaires.

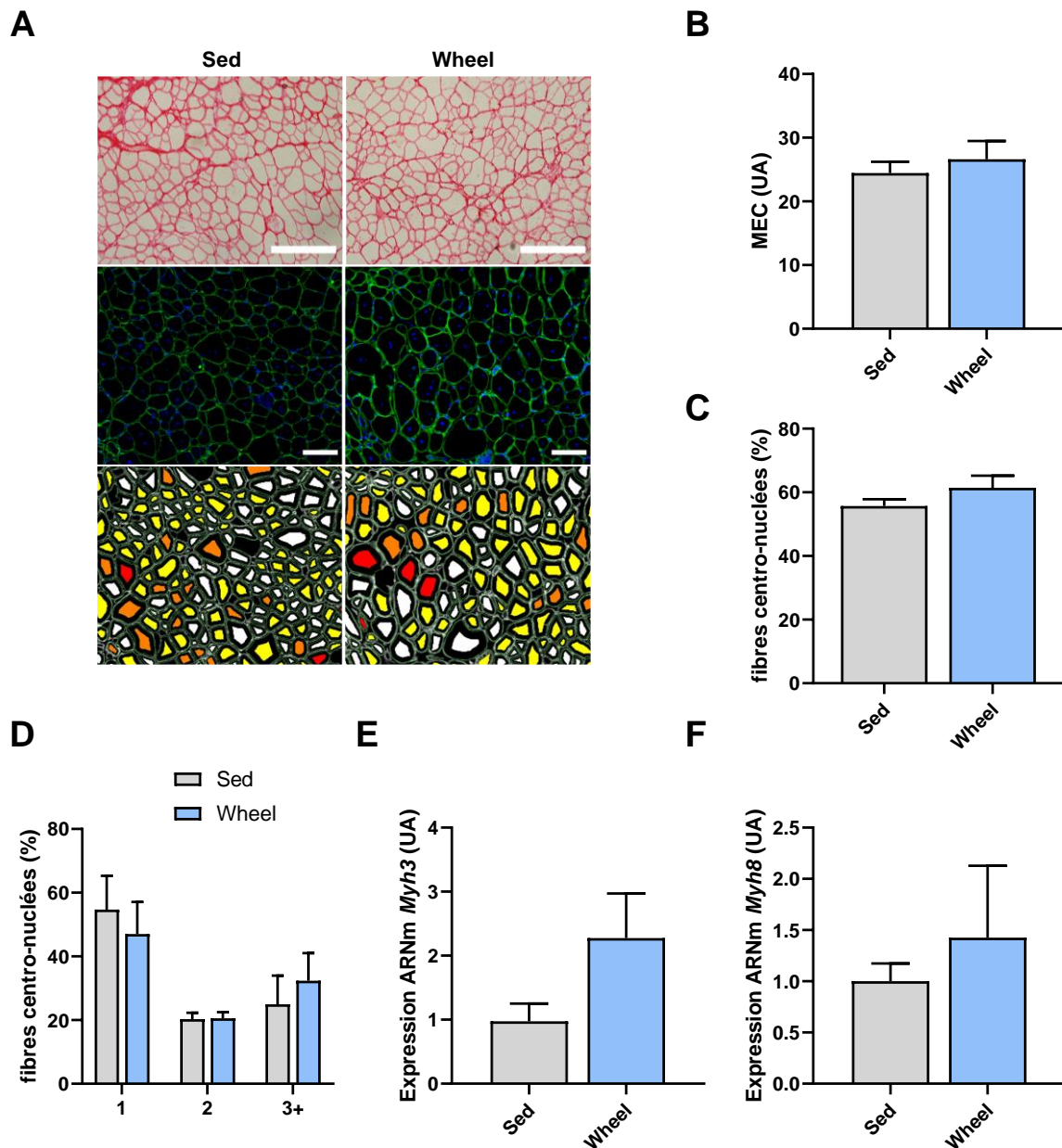


Figure A2- 2: L'exercice de course volontaire ne provoque pas de dommages histologiques musculaires chez des souris adultes D2-mdx. (A) Images représentatives de coupes transversales de TA de souris D2-mdx. 1 ère rangée : coloration au Rouge Sirius du collagène de la matrice extracellulaire (MEC). 2ème rangée : immunomarquage des noyaux centraux (bleu) et de la laminine (vert). 3ème rangée : cartographie du nombre de noyaux par fibres. Blanc : 0, jaune : 1, orange : 2 ; rouge : 3. (B) Pourcentage de la surface occupée par la MEC dans une coupe transversale de TA, n=10 par groupe. (C) Pourcentage de fibres centro-nuclées en fonction du nombre de noyaux centraux par fibre dans une coupe transversale de TA, n=4-5 par groupe. (D) Pourcentage de fibres centraux-nuclées en fonction du nombre de noyaux centraux par fibre dans une coupe transversale de TA, n=4-5 par groupe. (E) Quantification relative du niveau d'expression de *Myh3* (chaîne lourde de la myosine embryonnaire), n=4 par groupe. (F) Quantification relative du niveau d'expression de *Myh8* (chaîne lourde de la myosine néonatale), n=4 par groupe. Sed : sédentaire ; Wheel : roue. UA = unité arbitraire. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. (T-Test ou test ANOVA à deux facteurs). Bar d'échelle 100 μ m.

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

Pour vérifier que l'exercice de course volontaire n'induisait pas de dommages fonctionnels, nous avons mesuré, *in situ*, la force maximale absolue (P0) et spécifique (sP0) des TA de souris D2-mdx à la fin du protocole de course. Les souris Wheel ont présenté une P0 équivalente (**Figure A2-3A**) et une sP0 améliorée (x 1.19) (**Figure A2-3B**) par rapport à celles des souris Sed, indiquant ainsi que l'exercice de course volontaire ne provoquait pas de dommages fonctionnels chez les souris D2-mdx adultes, et améliorait au contraire la fonction musculaire.

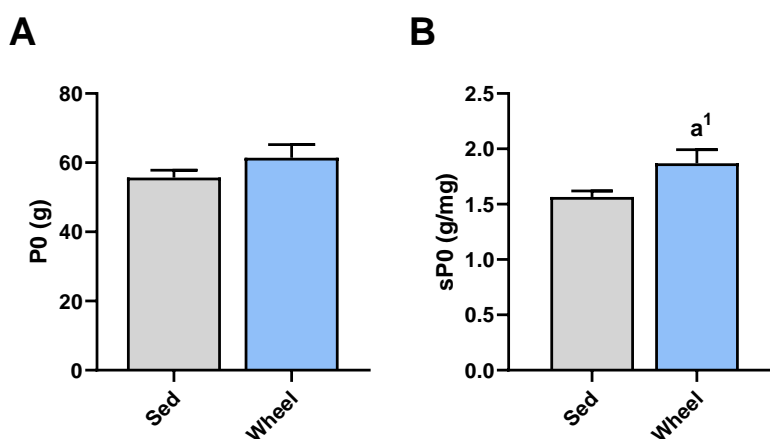


Figure A2- 3: L'exercice de course volontaire ne provoque pas de dommages fonctionnels chez des souris adultes D2-mdx. Évaluation chez des TA de souris D2-mdx à la suite d'un exercice de course volontaire (A) de la force maximale absolue (P0), n=14 par groupe, et (B) de la force maximale spécifique (sP0), n=12-13 par groupe. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. Sed : sédentaire ; Wheel : roue. A : significativement différent du contrôle (Sed). 1 : p<0.05 (T-test).

Le fait que la P0 n'est pas augmentée chez les souris Wheel, bien que la sP0 le soit, est expliqué par une diminution de la masse musculaire. Cette diminution de la masse musculaire des souris Wheel (x 0.91) par rapport aux souris Sed (**Figure A2-4A**) n'est pas associée à une diminution du nombre de fibres, car nous avons observé une tendance à la hausse du nombre de fibres musculaires par coupes transversales de TA à la suite de l'exercice (**Figure A2-4B**). Elle est liée à une réduction du diamètre minimum (min feret) moyen des fibres musculaires (x 0.88) (**Figure A2-4C**) avec une réduction du pourcentage de fibres de 30 à 50 μ m au profit du pourcentage de fibres de 10 à 30 μ m chez les souris Wheel (**Figure A2-4D**).

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

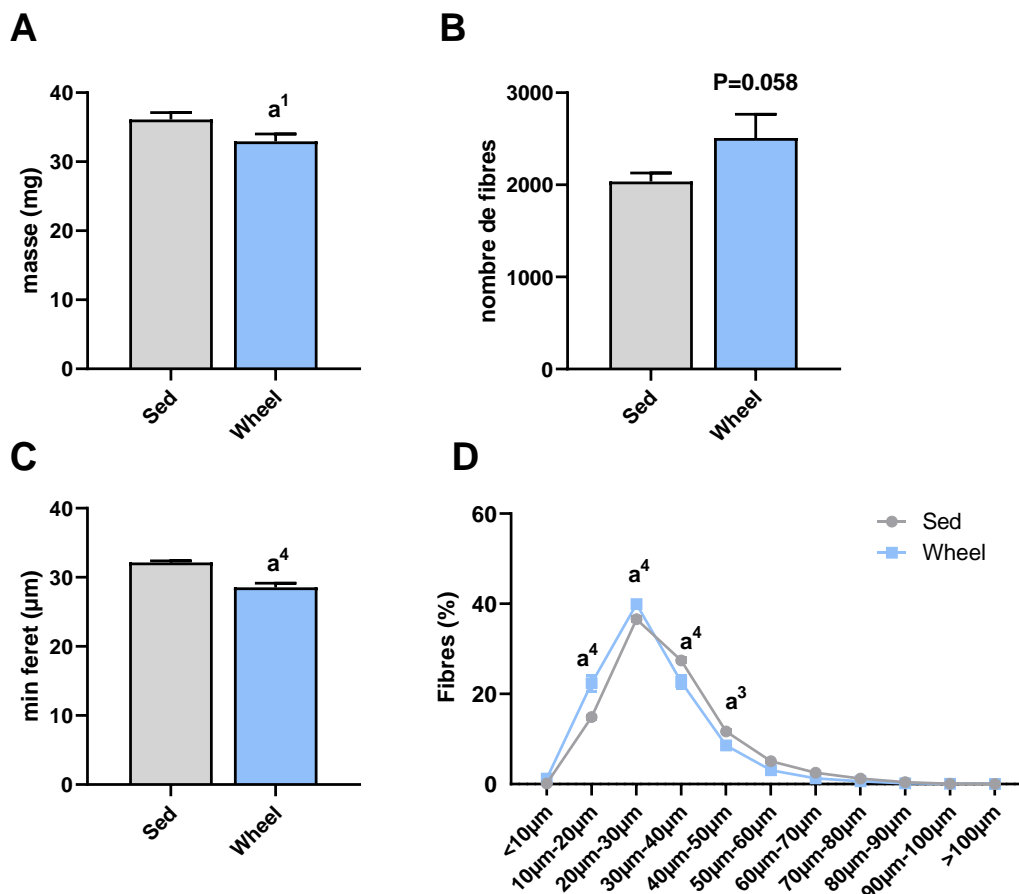


Figure A2- 4 : L'exercice de course volontaire induit une réduction de la masse musculaire chez des souris adultes D2-mdx. Évaluation chez des TA de souris D2-mdx à la suite d'un exercice de course volontaire (A) de la masse musculaire, n=12-14 par groupe (B) du nombre de fibres par coupes transversales, n=6-10 par groupe, et (C) du diamètre minimum des fibres (min feret) par coupes transversales, n=6-10 par groupe et (D) du pourcentage de fibres en fonction de classe de diamètre minimum des fibres, n=7-10 par groupe. Sed : sédentaire ; Wheel : roue. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM. a : significativement différent du contrôle (Sed ou U7Scr). 1 : p<0.05, 4 : p<0.0001 (T-test ou test ANOVA à deux facteurs).

Comme les fibres de types rapides, telles que les fibres exprimant la MHC-2b, sont de plus gros diamètre, nous avons émis l'hypothèse que l'exercice pourrait avoir induit une conversion des fibres rapides vers des fibres plus lentes qui sont plus petites, expliquant ainsi la réduction de la masse musculaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un immunomarquage de la laminine et des différentes chaînes lourdes de la myosine (MHC-2b, MHC-2a, MHC-1) (**Figure A2-5A**). De manière intéressante, nous avons observé au contraire une diminution du pourcentage des fibres exprimant la MHC-2a (x 0.72) au profit de fibres plus rapides exprimant la MHC-2x (x 1.5) chez les souris Wheel (**Figure A2-5B**). Ainsi la diminution du diamètre moyen des fibres des souris Wheel n'est pas liée à une augmentation du pourcentage

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

de fibres d'un diamètre plus petit (exprimant MHC-2a). Par ailleurs, nous avons observé que la diminution du diamètre des fibres musculaires provenait d'une réduction du min feret des fibres exprimant la MHC-2b chez les souris Wheel (x 0.84) (**Figure A2-5C**), expliquant ainsi la perte de masse musculaire.

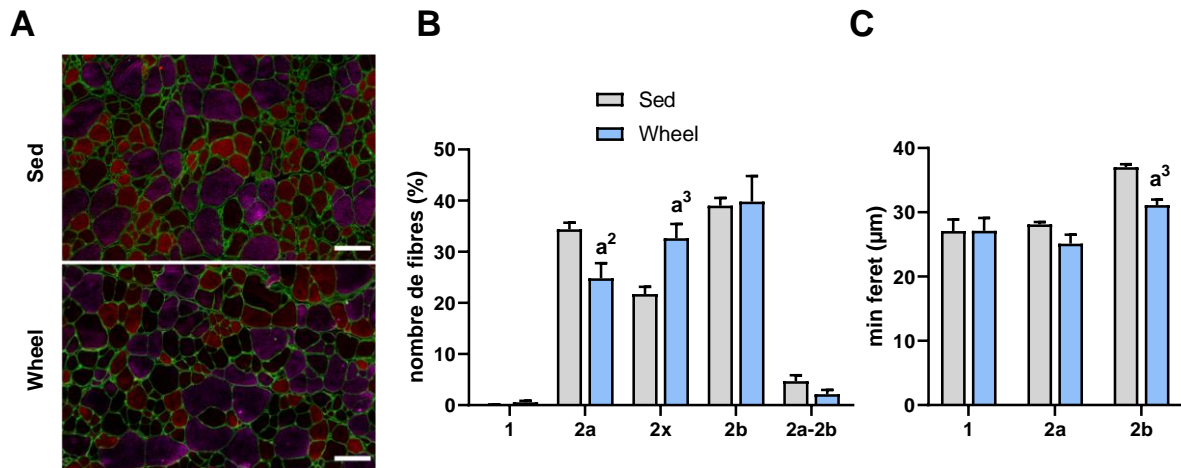


Figure A2- 5 : L'exercice de course volontaire induit un remodelage musculaire vers des fibres de type plus rapide chez des souris adultes D2-mdx. (A) Images représentatives d'un immunomarquage de la MHC1 (bleu), la MHC2a (rouge), la MHC2b (violet), et de la laminine (vert) (MHC 2x, non marquée) dans des coupes transversales de TA de souris D2-mdx. (B) Pourcentage de fibres par section transversale de TA exprimant MHC-1, MHC-2a, MHC-2x, MHC2b et MHC2a-2b chez des souris D2-mdx à la suite d'un exercice de course volontaire, n=5-11 par groupe. (C) Diamètre minimum (min feret) des fibres en fonction du type de fibres, n=6-10 par groupe. Sed : sédentaire ; Wheel : roue. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent du contrôle (Sed). 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$, (Test ANOVA à deux facteurs). Bar d'échelle 100µm

En résumé, l'exercice de course volontaire n'induit aucun dommage histologique et fonctionnel chez les souris D2-mdx Wheel, bien qu'il induise un remodelage musculaire. Au contraire, la qualité fonctionnelle du muscle (sP0) est améliorée. Ces résultats suggèrent que l'exercice de course n'accélère pas les cycles de dégénérescence/régénération, c'est à dire le « turnover » des fibres, qui pourrait potentiellement compromettre l'idée d'une thérapie génique.

III.2. L'EXERCICE DE COURSE VOLONTAIRE DIMINUE L'EFFICACITÉ DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE CHEZ LES SOURIS D2-MDX ADULTES

Nous avons vu précédemment que l'exercice physique d'endurance ne provoquait pas de dommages musculaires chez la souris D2-mdx, c'est à dire une dégénérescence des fibres musculaires. Ainsi, il a été possible d'envisager une

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

seconde série d'expérimentation visant à déterminer si l'exercice physique d'endurance était susceptible de moduler l'efficacité de la thérapie génique. Pour ce faire, des souris D2-mdx adultes ont reçu une injection intramusculaire dans le TA d'AAV1-U7dex23 (U7dex23) ou d'AAV1-U7Scramble (U7Scr). Une partie des souris a ensuite été placées dans une cage avec une roue à disposition pendant 1 mois. Pour évaluer l'efficacité de la thérapie génique, nous avons mesuré l'expression de la dystrophine au niveau protéique, grâce à un immunomarquage de la dystrophine (**Figure A2-6A**). Nos résultats indiquent que la thérapie génique a permis de restaurer près de 80% de l'aire du muscle occupé par des fibres exprimant la dystrophine chez les souris U7dex23 par rapport au souris U7Scr. Toutefois, cette restauration de la dystrophine a été amoindrie par l'exercice physique de course chez les souris U7dex23+Wheel par rapport aux souris U7dex23 ($\times 0.78$) (**Figure A2-6B**). Le niveau protéique en dystrophine a également été apprécié par western-blot. La quantification de la teneur en dystrophine normalisée à l'alpha-actinine a mis en évidence une augmentation protéique de la dystrophine chez les souris U7dex23 par rapport aux souris U7Scr ($\times 51.3$). Cependant, cette quantité de dystrophine a été diminuée chez les souris U7dex23+Wheel par rapport aux souris U7dex23 ($\times 0.58$) (**Figure A2-6C**), ce qui corrobore les résultats de l'immunomarquage. De plus, nous avons quantifié le niveau d'expression du gène codant pour la myostatine (*Mstn*), qui est, indépendamment de son rôle d'inhibiteur de la croissance musculaire, un biomarqueur de la restauration de la dystrophine suite à une thérapie (Mariot et al., 2020). En accord avec les résultats précédent, le niveau d'expression de l'ARNm de *Mstn* chez les souris U7dex23 a augmenté ($\times 4.2$), confirmant l'efficacité de la thérapie (**Figure A2-6D**). De plus, il est diminué chez les souris U7dex23+Wheel par rapport aux souris U7dex23.

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

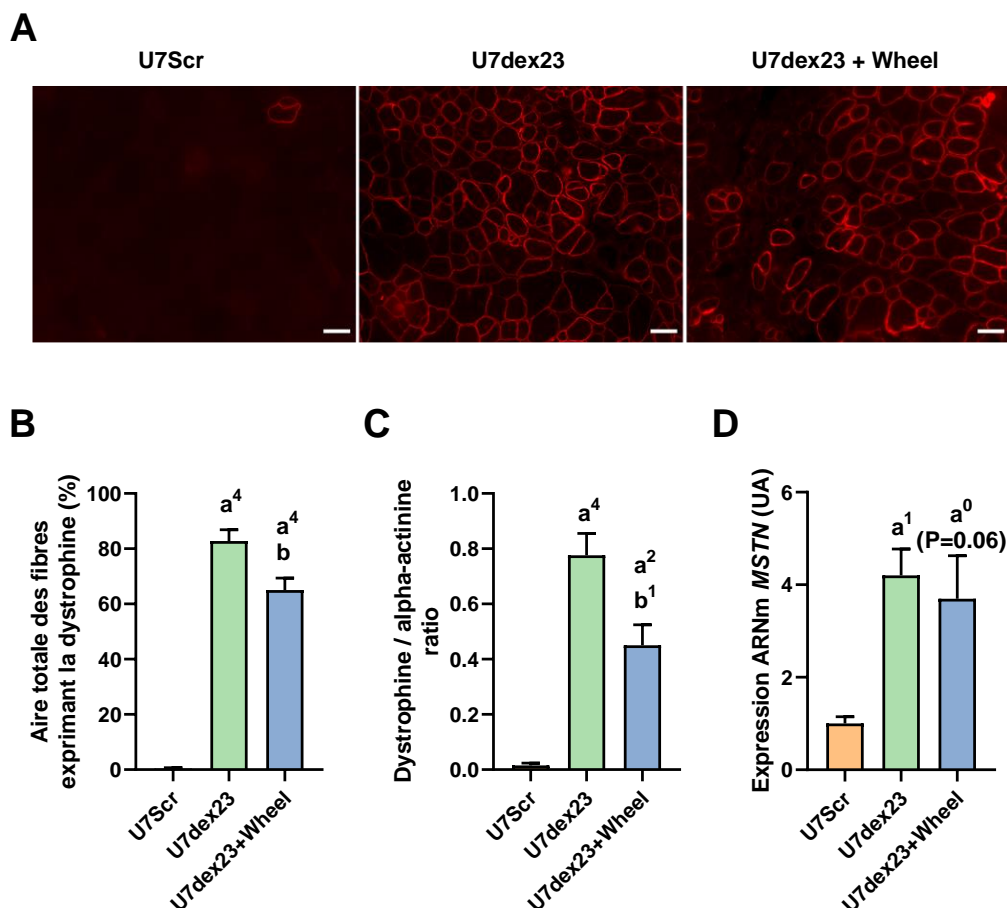


Figure A2- 6 : L'exercice de course volontaire diminue la réexpression de la dystrophine chez des souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23. (A) Immunomarquage de coupes transversale de TA pour détecter la dystrophine (rouge). (B) Analyse quantitative du pourcentage d'aire totale de fibres exprimant la dystrophine, n=4-6 par groupe. (C) Analyse quantitative par Western-Blot du niveau protéique de la dystrophine, correspondant au ratio dystrophine/alpha-actinine, n=4-6 par groupe. (D) Quantification relative du niveau de *MSTN* (myostatine), n=4 par groupe. U7Scr : injectées avec AAV1-U7Scramble ; U7dex23 : injectées avec AAV1-U7dex23 ; U7dex23+Wheel : combinaison AAV1-U7dex23 et roue. UA = unité arbitraire. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent du contrôle (U7Scr) ; b : significativement différent d'U7dex23. 1 : $p < 0.05$, 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à un facteur). Bar d'échelle 100 μ m.

Nous avons cherché à comprendre l'origine de cette baisse d'expression de la dystrophine à la suite de l'exercice physique. Pour ce faire, nous avons tout d'abord quantifié le nombre de copie de vecteur viral (GV) par noyau afin de vérifier s'il y avait eu une perte de vecteur viral causée par l'exercice. Toutefois, nous n'avons pas observé de différence dans le nombre de copie de GV entre les différentes conditions (**Figure A2-7A**), indiquant que l'exercice n'a pas provoqué de perte de fibres préalablement transduites. Ensuite, nous avons mis en évidence par une analyse RT-PCR que cette diminution de la restauration en dystrophine chez les souris ayant

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

réalisé la course volontaire semblait associée à une réduction, bien que non significative ($P=0,08$) de l'exclusion de l'exon 23 chez les souris U7dex23+Wheel par rapport au souris U7dex23 ($\times 0.86$) (**Figure A2-7B et A2-7C**).

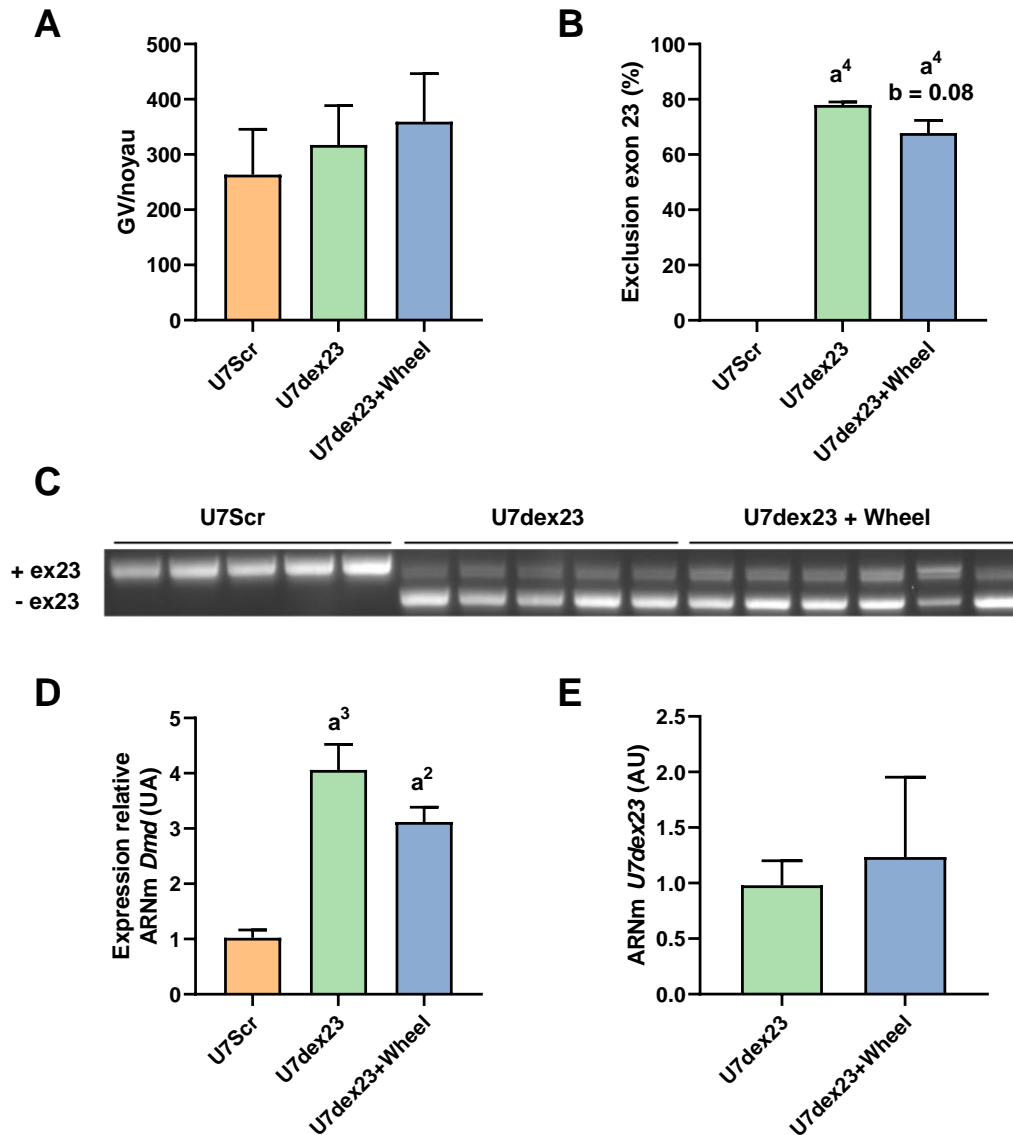


Figure A2- 7 : La diminution de la restauration en dystrophine semble associée à une baisse de l'exclusion de l'exon 23. (A) Quantification du nombre de copie de génome vecteur par noyau (B) Analyse RT-PCR de l'exclusion de l'exon 23 du gène *Dmd* dans des souris D2-mdx injectées avec un AAV1-U7Scr ou un AAV1-U7dex23. (C) Pourcentage d'exclusion de l'exon 23, n=4-6 par groupe. (D) Quantification relative de dystrophine au niveau transcriptionnel par qPCR. La dystrophine est mesurée par le niveau d'expression des exons 78-79 après normalisation à un gène endogène. L'expression des exons 78-79 est rapportée à la moyenne obtenue dans le groupe U7Scr, n=4-6 par groupe. (E) Quantification relative du transcrit U7dex23, n = 5-6 par groupe. U7Scr : injectées avec AAV1-U7Scramble ; U7dex23 : injectées avec AAV1-U7dex23 ; U7dex23+Wheel : combinaison AAV1-U7dex23 et roue. UA = unité arbitraire. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent du contrôle (U7Scr). 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à un facteur ou T-test).

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

De manière intéressante, nous n'avons pas constaté que la course volontaire induisait une diminution significative de la dystrophine du fait d'une baisse de l'expression de *Dmd* chez les souris U7dex23+Wheel (**Figure A2-7D**). En effet, la quantité d'ARNm *Dmd* codant pour la dystrophine n'était pas significativement diminuée chez les souris U7dex23+Wheel par rapport aux souris U7dex23 (**Figure A2-7D**). En outre, nous avons vérifié si l'exercice n'avait pas diminué le niveau d'expression de l'U7dex23. Nous n'avons pas observé de diminution du transgène *U7dex23*, la quantité de transcrit étant similaire chez les souris U7dex23+Wheel par rapport aux souris U7dex23 (**Figure A2-7D**).

Par la suite, nous avons cherché à confirmer que la diminution de l'efficacité de la thérapie génique chez les souris U7dex23+Wheel ne provenait pas de dommages musculaires causés par l'exercice. Dans un premier temps, nous avons évalué les dommages musculaires histologiques. L'analyse du pourcentage de surface musculaire occupée par la MEC n'a révélé aucune différence entre les groupes U7dex23+Wheel, U7dex23 et U7Scr (**Figures A2-8A, 1^{ère} rangée et A2-8B**). De la même manière, nous n'avons pas observé d'augmentation du pourcentage de fibres centro-nuclées (**Figures A2-8A, 2^{ème} rangée et A2-8C**), un marqueur d'une dégénérescence antérieure des fibres, ni de changement dans le pourcentage de fibres exprimant un nombre variable de noyaux centraux par fibre musculaire (**Figures A2-8A, 3^{ème} rangée et A2-8D**) chez les souris U7dex23+Wheel par rapport au souris U7dex23.

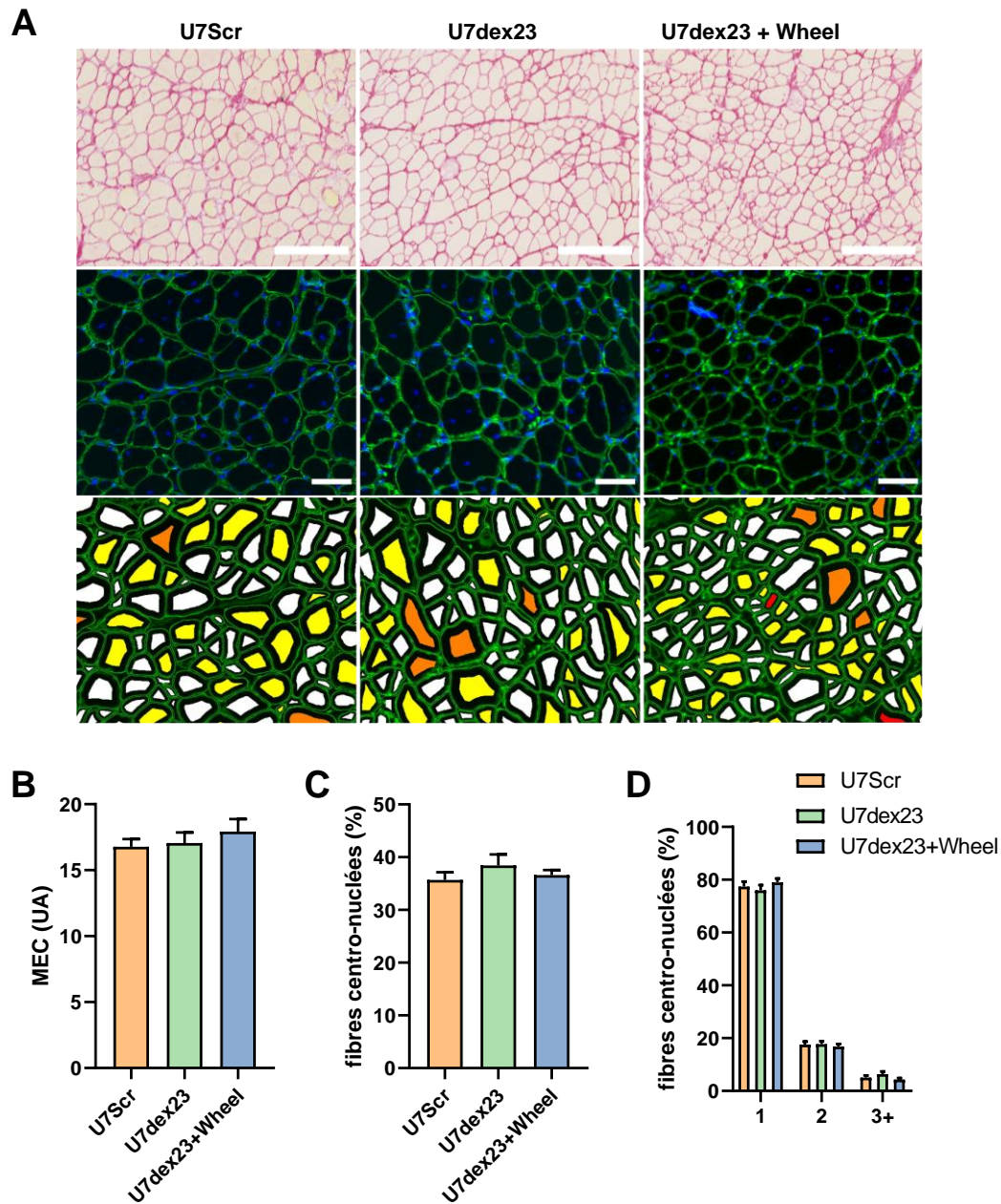


Figure A2- 8 : L'exercice de course volontaire ne provoque pas de dommages histologiques chez des souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23. (A) Images représentatives de coupes transversales de TA de souris D2-mdx. 1 ère rangée : coloration au rouge sirius du collagène de la matrice extracellulaire (MEC). 2^{ème} rangée : immunomarquage des noyaux centraux (bleu) et de la laminine (vert). 3^{ème} rangée : cartographie du nombre de noyaux par fibres. Blanc : 0, jaune : 1, orange : 2 ; rouge : 3. (B) Pourcentage de la surface occupée par la MEC dans une coupe transversale de TA, n=4-6 par groupe. (C) Pourcentage de fibres centraux-nuclées dans une coupe transversale de TA, n=4-6 par groupe. (D) Pourcentage de fibres centraux-nuclées en fonction du nombre de noyaux centraux par fibre dans une coupe transversale de TA, n=4-6 par groupe. U7Scr : injectées avec AAV1-U7Scramble ; U7dex23 : injectées avec AAV1-U7dex23 ; U7dex23+Wheel : combinaison AAV1-U7dex23 et roue. UA = unité arbitraire. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. (Test ANOVA à un facteur ou test ANOVA 2 facteurs). Bar d'échelle 100 μ m.

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

En accord avec ces résultats, aucune augmentation du niveau d'expression des gènes codant pour la chaîne lourde de la myosine embryonnaire (*Myh3*) (**Figure A2-9A**) et néonatale (*Myh8*) (**Figure A2-9B**) n'a été constaté chez les souris U7dex23+Wheel par rapport au souris U7dex23.

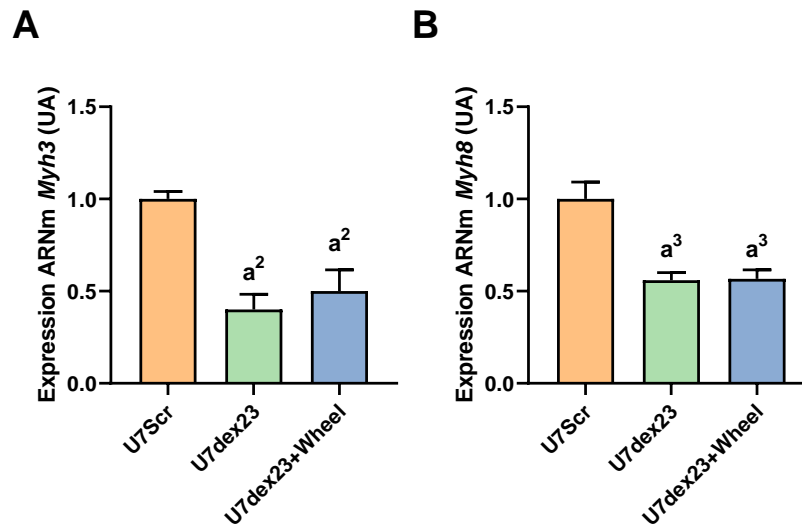


Figure A2- 9 : L'exercice de course volontaire ne provoque pas d'augmentation des transcrits Myh3 et Myh8 chez des souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23. (A) Quantification relative du niveau de Myh3 (chaîne lourde de la myosine embryonnaire), n=4 par groupe. (B) Quantification relative du niveau de Myh8 (chaîne lourde de la myosine néonatale), n=4 par groupe. UA = unité arbitraire. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent du contrôle (U7Scr). 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$ (Test ANOVA à un facteur).

Dans un second temps, nous avons évalué les dommages musculaires fonctionnels par des mesures, *in situ*, de la force maximale absolue (P0) et spécifique (sP0) des TA de souris D2-mdx à la fin du protocole de course. Nous avons noté que l'exercice de course volontaire, chez les souris traitées avec la thérapie génique, n'avait pas diminué la fonction musculaire des souris D2-mdx, car la P0 (**Figure A2-10A**) et la sP0 (**Figure A2-10B**) étaient identiques chez les souris U7dex23+Wheel et U7dex23. Ces résultats confirment le fait que l'exercice volontaire de course n'est pas dommageable pour les souris U7dex23+Wheel.

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

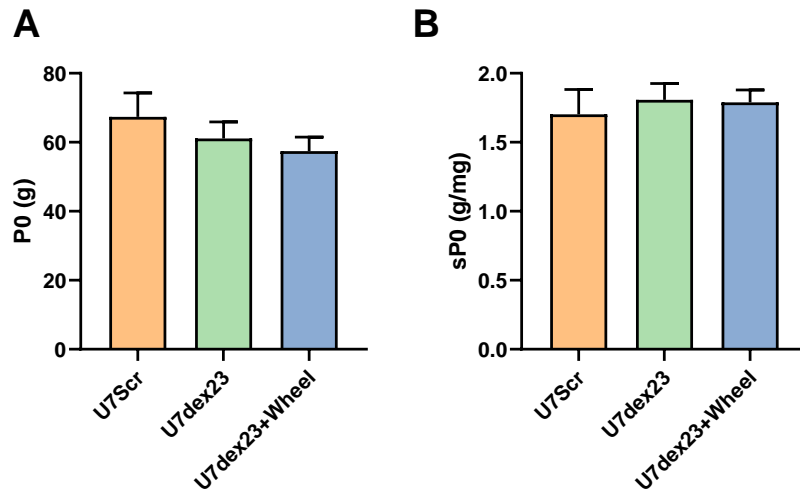


Figure A2- 10 : L'exercice de course volontaire ne provoque pas de dommage fonctionnel chez des souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23. Evaluation chez des TA de souris D2-mdx suite à un exercice de course volontaire combiné à une thérapie génique (U7dex23) (A) de la force maximale absolue (P0), n=4-6 par groupe, et (B) de la force maximale spécifique (sP0), n=4-6 par groupe. U7Scr : injectées avec AAV1-U7Scramble ; U7dex23 : injectées avec AAV1-U7dex23 ; U7dex23+Wheel : combinaison AAV1-U7dex23 et roue. U7Scr : injectées avec AAV1-U7Scramble ; U7dex23 : injectées avec AAV1-U7dex23 ; U7dex23+Wheel : combinaison AAV1-U7dex23 et roue. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent du contrôle (U7Scr). (Test ANOVA à un facteur).

Par ailleurs, contrairement aux souris Wheel, nous avons constaté que les souris U7dex23+Wheel ne présentaient pas de réduction de la masse musculaire par rapport aux souris U7dex23 (**Figure A2-11A**). En accord, nous n'avons pas observé de diminution du nombre de fibres (**Figure A2-11B**), du diamètre minimum (min feret) moyen des fibres musculaires (**Figure A2-11C**), ni du pourcentage de fibres musculaires plus petites en diamètre (**Figure A2-11D**) chez les souris U7dex23+Wheel par rapport au souris U7dex23.

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

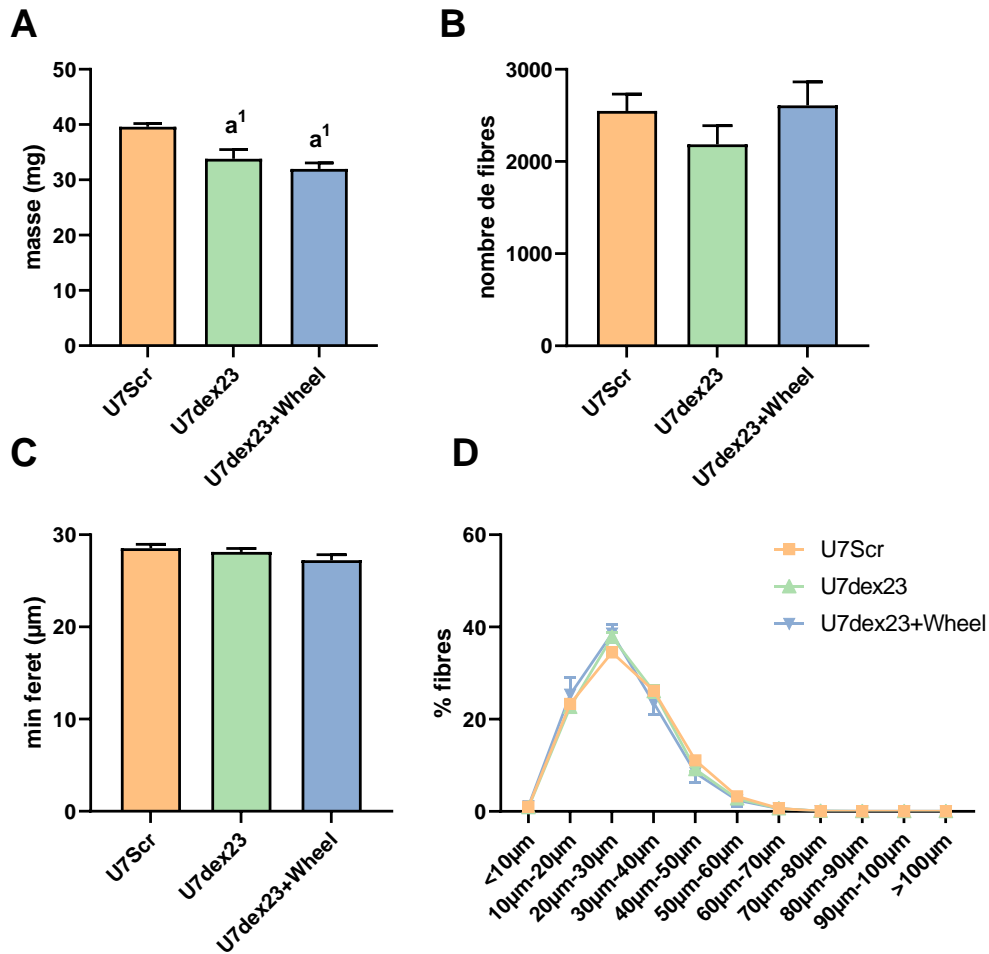


Figure A2- 11 : L'exercice de course volontaire induit une réduction de la masse musculaire chez de souris adultes D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23. Évaluation chez des TA de souris D2-mdx à la suite d'un exercice de course volontaire combiné à une thérapie génique (U7dex23) (A) de la masse musculaire, n=4-6 par groupe (B) du nombre de fibres, n=4-6 par groupe, (C) du diamètre minimum des fibres (min feret), n=4-6 par groupe et (D) du pourcentage de fibres en fonction de classe de diamètre minimum des fibres, n=4-6 par groupe. U7Scr : injectées avec AAV1-U7Scramble ; U7dex23 : injectées avec AAV1-U7dex23 ; U7dex23+Wheel : combinaison AAV1-U7dex23 et roue. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent du contrôle (U7Scr). 2 : $p < 0.01$. (Test ANOVA à un facteur ou test ANOVA à deux facteurs).

Comme pour les souris Wheel, nous avons constaté que l'exercice de course a induit une conversion des fibres vers des fibres plus rapides chez les souris U7dex23+Wheel (**Figure A2-12A et A2-12B**). En effet, il a été constaté une diminution du pourcentage des fibres exprimant la MHC-2a au profit de fibres plus rapides MHC-2b chez les souris U7dex23+Wheel par rapport aux souris U7dex23 (**Figure A2-12B**). Par ailleurs, nous n'avons pas constaté de variations du diamètre des différents types de fibres (**Figure A2-12C**).

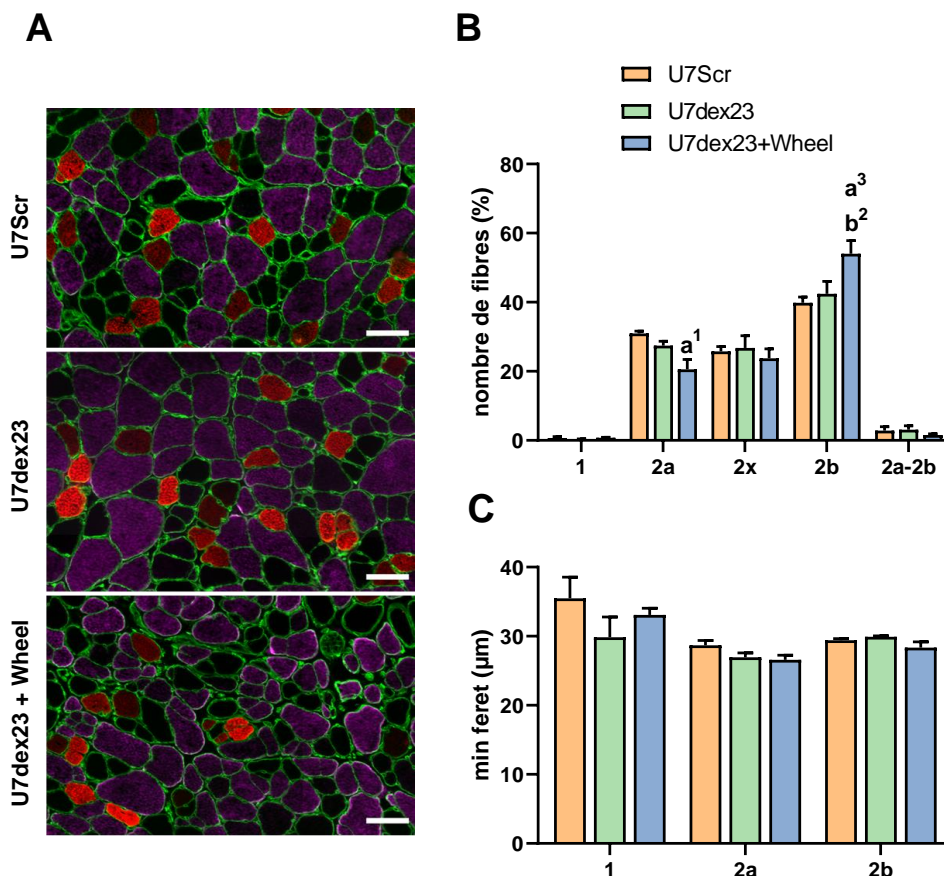


Figure A2- 12 : L'exercice de course volontaire induit un remodelage musculaire vers des fibres de type plus rapide chez des souris adultes D2-mdx D2-mdx injectées avec un AAV1-U7dex23. (A) Images représentatives d'un immunomarquage de la MHC1 (bleu), la MHC2a (rouge), la MHC2b (violet), et de la laminine (vert) (MHC 2x, non marquée) dans des coupes transversales de TA de souris D2-mdx. (B) Pourcentage de fibres par section transversale de TA exprimant MHC-1, MHC-2a, MHC-2x, MHC2b et MHC2a-2b chez des souris D2-mdx à la suite d'un exercice de course volontaire combiné à une thérapie génique (U7dex23), n=4-6 par groupe. (C) Diamètre minimum (min feret) des fibres en fonction du type de fibres, n=4-6 par groupe. U7Scr : injectées avec AAV1-U7Scramble ; U7dex23 : injectées avec AAV1-U7dex23 ; U7dex23+Wheel : combinaison AAV1-U7dex23 et roue. U7Scr : injectées avec AAV1-U7Scramble ; U7dex23 : injectées avec AAV1-U7dex23 ; U7dex23+Wheel : combinaison AAV1-U7dex23 et roue. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. a : significativement différent du contrôle (U7Scr). 1 : $p < 0.05$, 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$, (Test ANOVA à deux facteurs). Bar d'échelle 100µm.

Ainsi, nous avons montré que l'exercice d'endurance volontaire diminuait l'efficacité de la thérapie génique, en réduisant la restauration de la dystrophine. Ce résultat ne résulte apparemment pas de dommages musculaires induits par l'exercice, qui conduiraient à la destruction de fibres venant d'être transduites par le vecteur viral. En accord avec ceci, nous avons trouvé que le nombre de GV n'était pas diminué par l'exercice d'endurance. La diminution de la quantité de dystrophine ne semble pas non plus liée à une diminution de l'expression de *Dmd*. Toutefois, il est possible que la

Travail expérimentale (Axe 2) - Résultats

réduction de la quantité de la dystrophine soit liée au processus d'exclusion de l'exon 23 par l'U7dex23, puisque le pourcentage d'exclusion a tendance à être diminué par l'exercice d'endurance. En addition, nous avons observé que l'effet de l'exercice concernant la masse et sP0 est quelque peu différent chez les souris U7dex23+Wheel et Wheel.

IV. DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de déterminer si un exercice d'endurance chronique pouvait modifier l'efficacité d'une thérapie génique, c'est à dire la restauration de l'expression de la dystrophine dans le muscle de souris D2-mdx. La thérapie génique par saut d'exon médié par un AAV est une thérapie largement connue qui consiste à cibler l'exon 23 muté du gène de la dystrophine avec un petit ARN nucléaire modifié (U7snRNA) exprimé grâce à un vecteur de type AAV2/1. Ce U7snRNA modifié met deux semaines pour commencer à être fortement exprimé dans le muscle (Goyenville et al., 2004a). Nos résultats indiquent un niveau satisfaisant de restauration de la dystrophine à la suite de l'administration de l'U7dex23 chez les souris sédentaires. C'est pourquoi nous avons choisi de faire réaliser aux souris un protocole de course volontaire d'un mois débuté trois jours après l'injection intramusculaire d'AAV1-U7dex23. Nos résultats ont mis en évidence que l'exercice d'endurance volontaire réduisait la restauration de la dystrophine, suggérant ainsi que l'exercice induisait une diminution de l'efficacité de cette thérapie génique dans un modèle murin sévère de DMD.

De manière originale, nous montrons que l'exercice d'endurance volontaire diminue l'expression de la dystrophine de 42% en western-blot et de 19% en immunomarquage chez la souris D2-mdx. Des résultats qui vont dans le même sens que la diminution, bien que non-significative de l'expression de *MSTN*, un biomarqueur de la restauration de dystrophine. À notre connaissance, aucune étude n'avait encore jamais analysé l'effet de l'exercice pendant les premières semaines d'une thérapie génique, phase durant laquelle l'expression de la dystrophine s'installe et atteint son état stable. En effet, dans la littérature, une seule étude s'est intéressée à l'effet de l'exercice physique d'endurance de 5,5 mois (22 semaines) combiné à une thérapie génique par injection systémique d'un AAV permettant l'expression d'une micro-dystrophine chez la souris mdx (Hamm et al., 2021). Dans cette étude de Hamm et al, l'exercice de course volontaire de 5,5 mois a permis d'augmenter de 63 % la restauration en dystrophine dans les muscles quadriceps de souris mdx. Toutefois, une réduction d'expression de la micro-dystrophine dans le diaphragme des souris a été observé, suggérant un effet différentiel de l'exercice suivant le muscle étudié (muscle locomoteur ou respiratoire, différents en composition de fibres...). Nos résultats concernant l'effet de l'exercice

Travail expérimentale (Axe 2) - Discussion

d'endurance sur l'expression de la dystrophine dans le muscle locomoteur diffèrent donc de ceux de Hamm et al. Cependant, il est important de noter les différences de méthodologie entre ces deux études. Tout d'abord, le mode d'injection systémique permet une distribution des vecteurs viraux plus uniforme que lors d'une injection locale, mais elle nécessite en revanche des doses de vecteurs bien plus élevées et il est connu que l'administration d'AAV a un impact sur la réponse immunitaire de l'hôte, c'est pourquoi nous avons privilégié une administration intra-musculaire (Bowles et al., 2011). De plus, notre protocole d'exercice a été conçu afin d'évaluer l'impact de l'exercice sur la thérapie lorsque les deux sont réalisés en parallèle, alors que le protocole d'Hamm et al., de 5,5 mois ne permet pas de différencier l'impact de l'exercice lors de la phase d'installation de la production de dystrophine de celui correspondant à la phase où la dystrophine est restaurée à un niveau notable. En outre, le muscle quadriceps, un extenseur de la jambe, et le tibial antérieur, un fléchisseur plantaire, sont sollicités de façon différente lors d'un exercice de course, ce qui peut aussi expliquer ces résultats contradictoires sur ces muscles locomoteurs. Enfin, U7dex23 est sous le contrôle de son propre promoteur (Goyenvallée et al., 2012) alors que la microdystrophine est sous le contrôle d'un promoteur synthétique du gène de la créatine kinase à restriction musculaire striée (Himeda et al., 2011). L'éventuel impact différentiel de l'exercice sur ces deux promoteurs dans des muscles différents est possible bien qu'il reste encore largement à déterminer.

Par la suite, nous avons cherché à comprendre à quoi était due la diminution de la restauration de la dystrophine chez les souris D2-mdx exercé volontairement. Celle-ci ne s'explique pas par le fait que l'exercice physique d'endurance ait accéléré les cycles de dégénérescence/régénération musculaire. En effet, nous n'avons observé aucune augmentation du nombre de fibres centro-nuclées, ni du pourcentage de MEC, ni de diminution de la fonction musculaire chez les souris dans les deux expérimentations, qui aurait pu suggérer une dégénérescence des fibres transduites ou sur le point de l'être par des vecteurs viraux. De plus, le nombre de copie de vecteur viral est identique chez les souris U7dex23+Wheel et U7dex23, ce qui confirme que l'exercice n'a pas entraîné une perte de fibres qui n'exprimaient pas encore un niveau de dystrophine suffisant pour les protéger des dommages musculaires potentiels. En addition, si on émet l'hypothèse que l'exercice avait induit une nécrose massive des fibres fragiles (i.e. sans dystrophine à un niveau suffisant) au début du protocole, alors il ne serait

Travail expérimentale (Axe 2) - Discussion

resté que des fibres transduites (i.e. avec de la dystrophine) et donc le pourcentage d'exclusion de l'exon 23 aurait dû augmenter chez les souris Udex23+Wheel. Or, au contraire nous avons observé une diminution de ce pourcentage d'exclusion de l'exon 23 chez ces souris, suggérant également qu'il n'y a pas eu de nécrose accrue des fibres musculaires avec l'exercice. Enfin, le fait que l'expression de Prox1 (cf. Axe 1), en utilisant une méthodologie équivalente à celle de la présente étude, est similaire dans les muscles de souris mdx ayant réalisés ou non un exercice d'endurance, indique également que l'exercice volontaire ne provoque pas de nécrose de fibres transduites ou sur le point de l'être. En accord avec ces résultats, d'autres études ont montré qu'un exercice de course volontaire de plusieurs semaines ne provoquaient pas de dommages musculaires dans les muscles soléaire, EDL et tibial antérieur de la souris mdx (Hourdé et al., 2013; Landisch et al., 2008). De la même manière, des exercices de tapis roulant de faible et moyenne intensité de 6 mois n'ont pas aggravé la fibrose dans le gastrocnémien de souris D2-mdx adultes (Zelikovich et al., 2019). L'ensemble de ces résultats nous suggère fortement que l'exercice d'endurance chronique n'induit pas de dommages musculaires à l'origine de la baisse d'efficacité de la thérapie génique.

Si l'absence de dommages musculaires ne permet pas de comprendre la diminution de l'expression de la dystrophine, une diminution de l'expression du gène *Dmd* chez les souris U7dex23+Wheel aurait pu l'expliquer. Toutefois, nous montrons que l'expression du gène *Dmd* chez les souris n'est pas diminuée par l'exercice volontaire. De la même manière, nous n'avons pas observé une diminution du niveau d'expression du transgène qui aurait pu expliquer la baisse d'efficacité de la thérapie, alors que le pourcentage d'exclusion de l'exon 23 lui a baissé. S'il n'y a pas de variations au niveau transcriptionnel, on peut supposer que la diminution de l'expression de la dystrophine provient soit d'une altération de la traduction, soit d'une dégradation des protéines à la hausse. En effet, il est bien établi que l'exercice active le système ubiquitine-protéasome, un des principaux mécanismes protéolytiques intracellulaires (Cunha et al., 2012; Murton et al., 2008; Reid, 2005; Taillandier et al., 2004). Ce système ubiquitine-protéasome est notamment responsable de la majeure partie de la dégradation des protéines intracellulaires (>80%), dont les protéines sarcomériques (Cunha et al., 2012).

Travail expérimentale (Axe 2) - Discussion

Quel que soient les mécanismes, l'impact attendu de la diminution de la dystrophine, serait une augmentation de la fragilité du muscle induite par l'exercice volontaire. Ceci reste à être confirmé dans le futur. Néanmoins, nous ne constatons pas que l'exercice musculaire diminue la fonction musculaire puisque la force maximale spécifique n'est pas modifiée chez les souris traitées par l'U7dex23. Il est donc possible que le niveau de restauration de dystrophine, bien que diminué, soit suffisant pour assurer une protection satisfaisante du muscle dystrophique. Il reste aussi à déterminer si cette diminution de la restauration de la dystrophine induite par l'exercice volontaire est durable, c'est-à-dire observable au-delà de notre période d'observation d'1 mois.

En addition, nous avons constaté que l'exercice volontaire ne diminuait pas la masse musculaire ni le diamètre des fibres, et n'augmentait pas la force maximale chez les souris D2-mdx traitées par U7dex23, contrairement à ce qui a été observé chez les souris D2-mdx non injectée. Toutefois, l'exercice volontaire induit la même conversion des types de fibres que les souris soient ou non traitées par U7dex23. Ces résultats suggèrent que les effets de l'exercice volontaire ne sont pas facilement transposables d'un muscle dystrophique à un muscle dystrophique traités par une thérapie visant à restaurer la dystrophine.

V. CONCLUSION

Dans ce deuxième axe, nous avons mis en évidence que l'exercice d'endurance volontaire réduisait la restauration de la dystrophine dans un modèle murin sévère de DMD, lorsque le protocole d'exercice est réalisé en même temps que la transduction des fibres musculaire par U7dex23. Cette réduction de la quantité de dystrophine pourrait être associée à une diminution du pourcentage d'exclusion de l'exon 23, mais cela ne s'explique pas par une diminution du niveau d'expression du transgène. Une activation du système ubiquitine-protéasome pourrait peut-être fournir une explication et nécessiterait d'être davantage étudié. Par ailleurs, de manière intéressante nous avons observé un remodelage musculaire à la suite de l'exercice vers des fibres plus rapide.

Nos résultats suggèrent donc, de façon originale, qu'une thérapie génique visant à restaurer la dystrophine peut diminuer d'efficacité en cas d'exercice musculaire. Si cela était confirmé dans le cadre d'un transfert de gène visant la restauration de dystrophine par injection d'un AAV en systémique, ceci pourrait être très utile pour la mise au point de stratégie thérapeutique chez les patients DMD. Actuellement, la thérapie génique seule ne semble pas suffisante, invitant donc à combiner plusieurs traitements. Ainsi, il nous semble intéressant de déterminer l'effet de l'exercice volontaire, une fois la restauration de la dystrophine faite (par exemple, un mois après l'injection de l'U7dex23), afin de déterminer l'éventuel effet bénéfique de l'exercice sur la fonction musculaire chez un muscle dystrophique présentant un niveau de dystrophine satisfaisant.

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 3)

Effet de l'exercice physique chronique mimant un entraînement de résistance sur la fonction musculaire d'un modèle murin sévère de DMD

I. CONTEXTE DE L'ÉTUDE

Depuis longtemps des thérapies géniques visant à restaurer la dystrophine sont testées dans le cas de la DMD (Chamberlain and Chamberlain, 2017), au stade préclinique. Toutefois, il est peu probable qu'elles puissent restaurer complètement la fonction du muscle dystrophique. Par exemple, un muscle dystrophique faible et atrophié n'aura pas une fonction musculaire normale, même si dans le meilleur des cas, toutes les fibres expriment de la dystrophine à la suite d'une thérapie génique. C'est pourquoi, il faut envisager des traitements complémentaires qui vont viser à diminuer la gravité des symptômes, notamment la faiblesse musculaire. Par exemple, beaucoup d'études ces dernières années ont testé un traitement conduisant à l'inhibition de la myostatine, un régulateur négatif de la croissance musculaire, dans le muscle dystrophique. Toutefois, les résultats obtenus sont peu encourageant (Hoogaars et al., 2012).

Dans le cas du muscle sain, il est bien établi que l'entraînement en force-vitesse améliore la performance musculaire car il induit un gain de force maximal conséquent. En théorie, l'exercice de résistance chronique dans le cas de la DMD pourrait donc permettre de lutter contre la faiblesse musculaire, à condition qu'il n'exacerbe pas le processus dystrophique. Seules quelques études ont déterminé l'impact de l'exercice chronique en résistance, impliquant des contractions musculaires de haute intensité, sur la fonction musculaire de modèles murins de DMD, et à notre connaissance, toutes ont utilisé des souris mdx comme modèle murin de DMD (Dick and Vrbová, 1993; Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012; Lindsay et al., 2019a). Chez la souris mdx, malgré le fait que le muscle soit fragile, plusieurs études ont montré que des exercices en résistance chronique amélioreraient, parfois considérablement, la fonction musculaire des muscles des pattes postérieurs (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012; Lindsay et al., 2019a) et pouvait même diminuer la fragilité musculaire (Ferry et al., 2015a; Lindsay et al., 2019a). Néanmoins, l'effet de l'exercice de résistance chronique sur la fonction musculaire dans un modèle murin sévère de DMD, qui présente une faiblesse et une fragilité encore plus importante, reste encore à déterminer.

Dans ce dernier axe, nous avons donc décidé de déterminer l'effet de l'exercice de résistance chronique sur la fonction musculaire chez la souris D2-mdx afin de vérifier

qu'il puisse améliorer la fonction musculaire. Pour ce faire, nous avons utilisé la surcharge mécanique (« overload », OVL), un modèle non physiologique d'entraînement de résistance chronique (Binkhorst and 't Hof MA van, 1973; Booth and Thomason, 1991; Michel et al., 1989), connu pour améliorer la fonction musculaire des pattes postérieures chez la souris mdx (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012). Avec ce modèle, nous avons ainsi pu mimer un exercice de « musculation » d'un mois sur les muscles plantaires de souris D2-mdx et mdx, afin de comparer ses effets dans des modèles murins sévère et modéré de DMD.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

L'ensemble des procédures ont été effectuées conformément aux législations nationales et européennes et ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel « Charles Darwin » (projet n ° 01362.02). Des souris mâles D2-mdx (Dbal2/J x C57BL/10ScSn- *Dmd*^{mdx}) (n=8), Dbal2/J (n=16), mdx (fond hybride C57Bl / 6 x C57Bl / 10) (n=19) et C57Bl / 6 (n=14) mâles âgées de 2-3 mois ont été réparties aléatoirement en différents groupes témoins et expérimentaux.

Des souris D2-mdx, D2-WT, mdx (fond hybride C57Bl / 6 x C57Bl / 10) et C57Bl / 10 ont été utilisés afin de comparer l'effet d'un exercice de résistance chronique dans un modèle murin sévère de DMD par rapport à un modèle modéré. Une surcharge mécanique du muscle plantaire a été réalisée sur des souris D2-mdx (OVL, n=10, Ctrl, n=8) et mdx (OVL, n=18, Ctrl, n=20) pendant 1 mois. Des muscles de souris WT ont aussi subi ou non une surcharge mécanique (D2-WT : OVL, n=18, Ctrl, n=14 et C7-WT : OVL, n=16, Ctrl, n=12). En bref, les animaux ont été anesthésiés avec du pentobarbital (ip, 50 mg/kg du poids corporel). Les muscles plantaires des deux pattes de chaque souris ont été surchargés mécaniquement (OVL) par ablation chirurgicale des muscles soléaires et des muscles gastrocnémiens (**Figure A3-1**).

Un mois après la surcharge mécanique les mesures de force ont été réalisées, puis les souris ont été euthanasiées et les muscles prélevés.

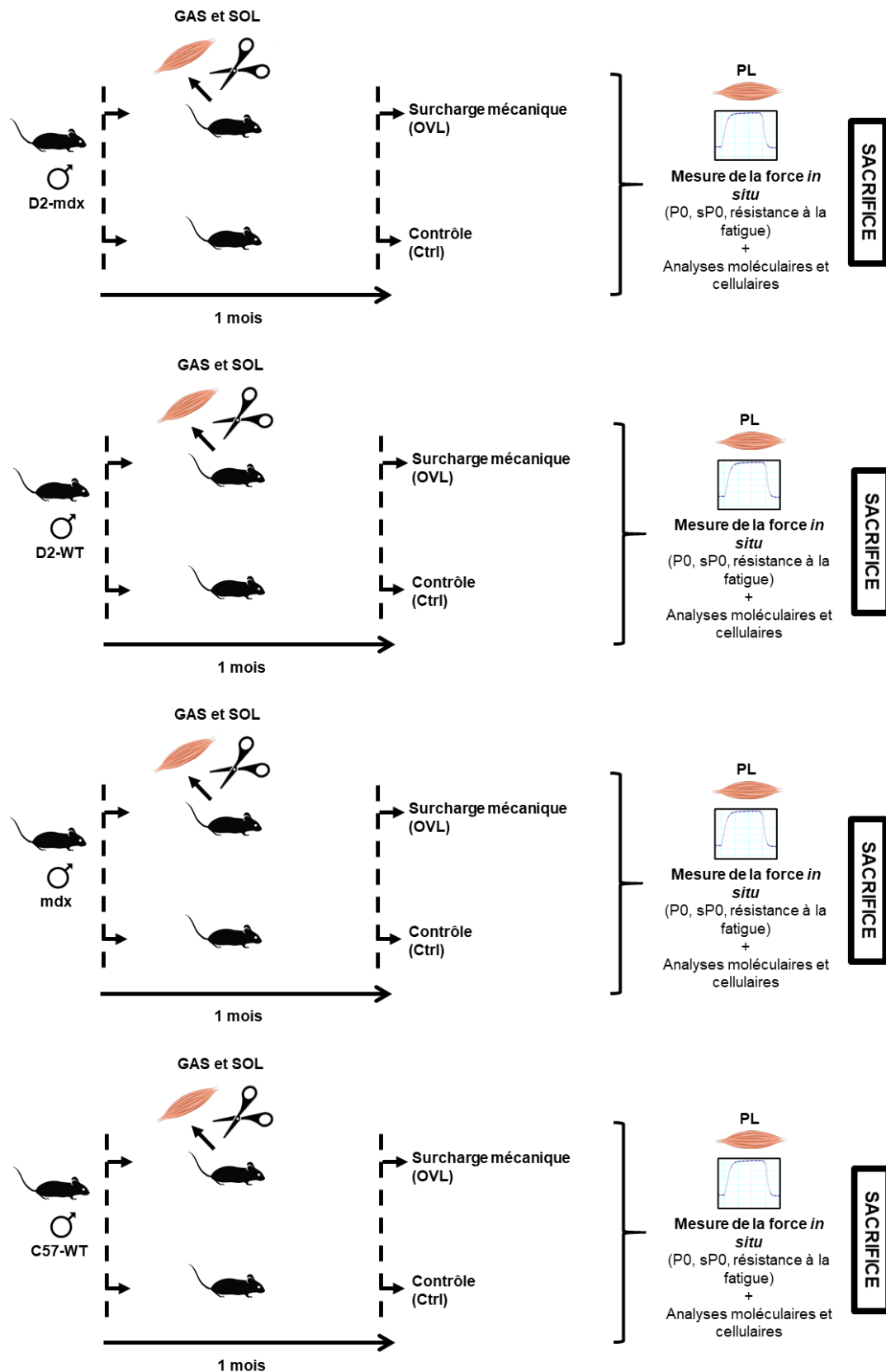


Figure A3- 1 : Schéma du protocole expérimental. Surcharge mécanique d'un mois pour comparer l'effet d'un exercice de résistance chronique dans des souris D2-mdx par rapport à des souris mdx. GAS : gastrocnémien ; SOL : soléaire ; PL : plantaris ; P0 : force maximale absolue ; sP0 : force maximale spécifique.

II.2. MESURE DE FORCE

En collaboration avec l'UMS28, la fonction musculaire des muscles plantaires a été évaluée au bout d'1 mois en mesurant la contraction musculaire *in situ*. En bref, les souris ont été anesthésiées à l'aide de pentobarbital (60 mg/kg, ip). La température corporelle a été maintenue à 37°C. Le genou et le pied ont été fixés à l'aide de broches et de pinces et le tendon distal du muscle plantaris a été attaché au bras de levier d'un système de servomoteur (305B, Dual-Mode Lever, Aurora Scientific) à l'aide d'une ligature en soie. Le nerf sciatique a été écrasé au niveau proximal et stimulé au niveau distal par une électrode bipolaire en argent utilisant des impulsions supra maximales à onde carrée d'une durée de 0,1 ms. Les réponses à la stimulation tétanique (fréquence d'impulsion 50-143 Hz) ont été successivement enregistrées. Une période de repos d'1 minute a été accordée entre les contractions. La force isométrique maximale absolue (P0) a été déterminée à la longueur optimale (longueur à laquelle la tension maximale a été obtenue pendant le téтанos). La force a ensuite été normalisée par rapport à la masse musculaire (m) pour estimer la force isométrique maximale spécifique (sP0). La résistance à la fatigue a ensuite été évaluée après une période de repos de 5 minutes. Pour ce faire, le muscle a été stimulé en continu à 50 Hz pendant 2 min (téтанos continu sous-maximal). La durée correspondant à une diminution de 40% de la force a été relevé.

II.3. HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE

Des coupes transversales (8 μ m) ont été obtenues à l'aide d'un cryostat, dans le milieu du muscle TA. Une partie des coupes ont été utilisées pour une analyse histologique de la fibrose selon un protocole standard pour la coloration Rouge Sirius.

L'autre partie des coupes ont été utilisées pour l'immunohistochimie. Pour la détermination de la composition en fibres musculaires, un marquage séparé de la MHC-1 a été réalisé. Des coupes congelées non fixées exprimant la chaîne lourde de la myosine (MHC) ont été bloquées pendant 1h dans une solution saline tampon phosphate supplémentée avec 2% d'albumine de sérum bovin (BSA) et 2% de sérum de veau foetal (SVF). Les coupes ont ensuite été incubées pendant une nuit soit avec des anticorps primaires dirigés contre la laminine (Sigma, France), la MHC-2a (clone SC-71, Developmental Studies Hybridoma Bank, Université de l'Iowa), et la MHC-2b

(clone BF-F3, Developmental Studies Hybridoma Bank), soit avec des anticorps primaires dirigés contre la laminine (Sigma, France) et la MHC-1 (clone BA-D5, Developmental Studies Hybridoma Bank). Après des lavages dans du PBS, les coupes ont été incubées 1 h avec des anticorps secondaires (Alexa Fluor, Invitrogen) (**Tableau A3-1**), puis 5 minutes avec une coloration Hoechst (33342, Invitrogen), pour révéler les noyaux centraux. Les lames ont finalement été montées dans du Prolong Gold antifade reagent (Invitrogen).

L'ensemble des images ont été capturées à l'aide d'une caméra numérique (Hamamatsu digital camera C11440) attachée à un microscope à fluorescence inversé (Axio observer, Zeiss), et les analyses morphométriques ont été réalisées à l'aide du logiciel Fiji. Le grossissement utilisé pour la quantification des images histologiques était de 20x. Les fibres non2a-non2b correspondent aux fibres qui expriment la MHC-1 et la MHC-2x. Les typages de la MHC-2a, MHC-2b et MHC-1 ont été réalisé séparément afin d'améliorer la qualité des immunomarquages (moins de bruit de fond). Les MHC-2x n'ont pas été marqué directement car notre anticorps ne fonctionne pas bien.

La segmentation des fibres a été réalisé en utilisant l'algorithme Cellpose et le plugin LabelsToROIs de Fiji (Waisman et al., 2021). Par la suite, le nombre et le diamètre des fibres exprimant la MHC-1, la MHC-2x et la MHC-2a par coupe transversale de muscle a été déterminé grâce à des seuillages d'images. Pour compter le nombre de fibres centro-nuclées et réaliser une cartographie du nombre de noyaux centraux par fibre la macro MuscleJ sur Fiji a été utilisée (Mayeuf-Louchart et al., 2018).

Types de fibres	Anticorps primaires	Concentration	Anticorps secondaires	Concentration
MHC-2a	Mouse SC-71	1 :10	Goat anti-mouse IgG1 Alexa 555	1 :400
MHC-2b	Mouse BF-F3	1 :10	Goat anti-mouse IgM Alexa 647	1 :400
MHC-1	Mouse BA-D5	1 :10	Goat anti-mouse IgG2b Alexa 350	1 :400
Laminine	Polyclonal Rabbit Laminin	1 :400	Goat anti-rabbit Alexa 488	1 :400

Tableau A3- 1 : Liste des anticorps utilisés pour les immunomarquages.

II.4. ANALYSES STATISTIQUES

Les groupes ont été comparés statistiquement à l'aide du logiciel Prism v8 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). L'homogénéité de variance des données a été testée à l'aide du test de Brown-Forsythe.

Pour analyser l'ensemble des variables des test ANOVA à deux facteurs ont été utilisé. Lorsqu'un effet significatif (ANOVA) a été observé, des comparaisons multiples ont été effectuées avec le test de Tukeys. Enfin, lorsqu'une interaction significative a été observée (ANOVA), les différences ont été testées avec le test de Holm-Sidak. Les valeurs sont des moyennes \pm SEM.

III. RÉSULTATS

III.1. L'OVL AUGMENTE LA FONCTION MUSCULAIRE CHEZ LES SOURIS D2-MDX COMME CHEZ LES SOURIS MDX.

Afin de déterminer l'effet d'un exercice de résistance chronique chez un modèle sévère de DMD, une surcharge mécanique (« overload », OVL) du muscle plantaris a été réalisé sur des souris D2-mdx et D2-WT. Après un mois de protocole la fonction musculaire des souris a été évaluée. Nous avons également étudié l'effet du même OVL chez la souris mdx et C57-WT, afin de comparer l'effet de l'OVL dans des modèles murins sévère et modéré de DMD.

III.1.1. Force maximale absolue (P0)

Comme chez la souris D2-WT (x 1.97), la force maximale absolue (P0) suite à une stimulation du nerf est augmentée par l'OVL chez la souris D2-mdx (x 3.9) (**Figure A3-2A**). Également, comme chez la souris C57-WT (x 3.2), la P0 est augmentée par l'OVL chez la souris mdx (x 3.5) (**Figure A3-2B**).

III.1.2. Force maximale spécifique (sP0)

La force maximale spécifique (sP0) est augmentée suite à l'OVL chez la souris D2-mdx (x 2.11) mais pas chez les souris D2-WT (**Figure A3-2C**). Chez la souris mdx, la sP0 est augmentée (x 1.9) comme chez la souris C57-WT (x 1.6) (**Figure A3-2D**).

III.1.3. Résistance à la fatigue

Chez la souris D2-mdx, la résistance à la fatigue est augmentée (x 1.3) par l'OVL tout comme chez la souris D2-WT (x 1.6) (**Figure A3-2E**). De plus, comme chez la souris C57-WT (x 1.4), la résistance à la fatigue est aussi augmentée par l'OVL chez la souris mdx (x 1.1) (**Figure A3-2F**).

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 3) - Résultats

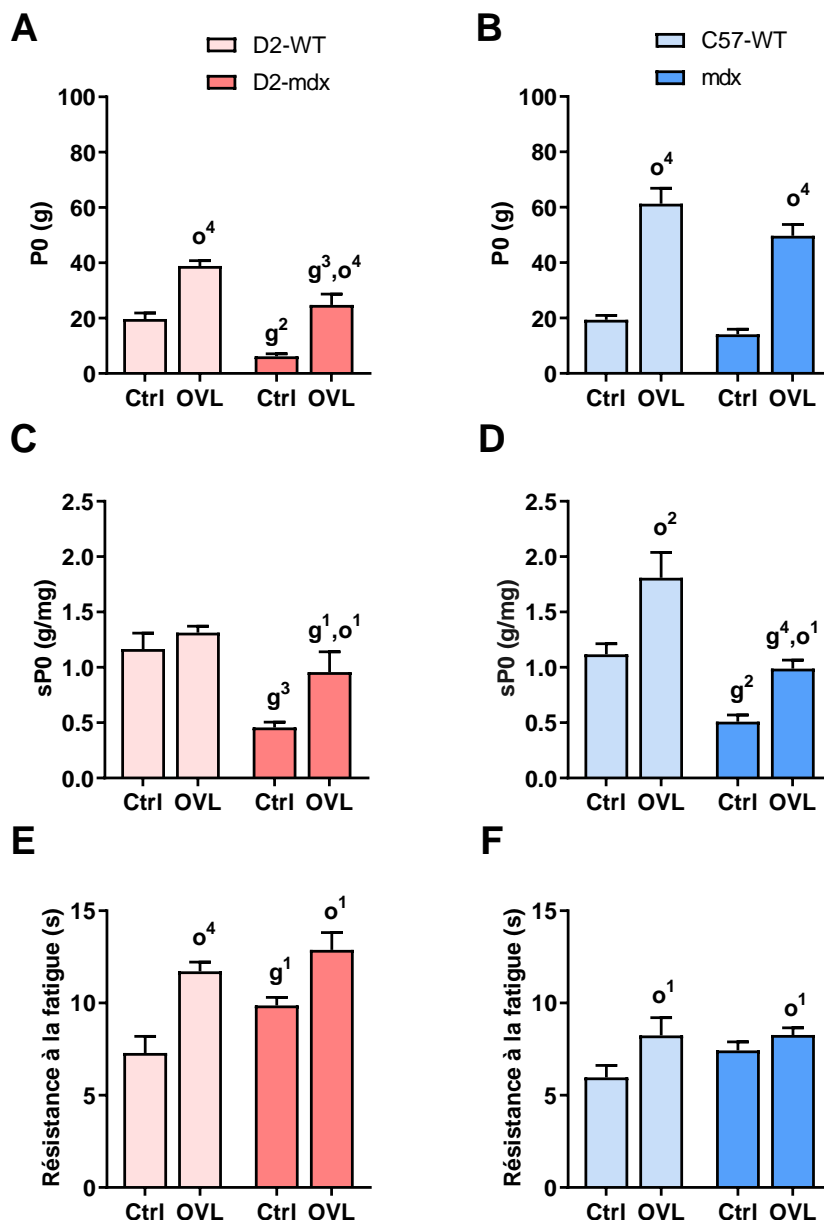


Figure A3- 2 : L'overload améliore la fonction du muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. (A-B) Force maximale absolue (P0), D2-WT, n=9-16 par groupe ; D2-mdx : n=8-7 par groupe ; C57-WT, n=10-15 par groupe ; mdx, n=17-18 par groupe ; (C-D) Force maximale spécifique (sP0), D2-WT, n=8-16 par groupe ; D2-mdx, n=7 par groupe ; C57-WT, n=10-15 par groupe ; mdx, n=17 par groupe. (E-F) Résistance à la fatigue, D2-WT, n=7 par groupe ; D2-mdx, n=8-16 par groupe ; C57-WT, n=10-15 par groupe ; mdx, n=16-18 par groupe. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. g : significativement du WT ; o : significativement différent de Ctrl. 1 : $p < 0.05$, 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à deux facteurs).

En conclusion, la fonction (P0, sP0, résistance à la fatigue) du muscle plantaris des souris D2-mdx est augmentée par l'OVL, comme chez la souris D2-WT et la souris mdx, suggérant que le gain de performance musculaire induit par l'OVL ne varie pas avec la sévérité du modèle de DMD (pas de différence entre D2-mdx et mdx) et ni avec

l'absence de dystrophine (pas de différence entre D2-mdx ou mdx et D2 et C57, respectivement).

III.2. L'EXERCICE DE RÉSISTANCE CHRONIQUE INDUIT UNE HYPERTROPHIE MUSCULAIRE CHEZ LES SOURIS D2-MDX COMME CHEZ LES SOURIS MDX

III.2.1. Masse musculaire

Nous avons observé une augmentation en réponse à l'OVL de la masse musculaire chez les souris D2-mdx (x 1.7) comme chez les souris D2-WT (x 1.7) (**Figure A3-3A**). De la même manière, chez les souris mdx et C57-WT, la masse musculaire a augmenté en réponse à l'OVL (respectivement x 2.05 et x 1.5) (**Figure A3-3B**).

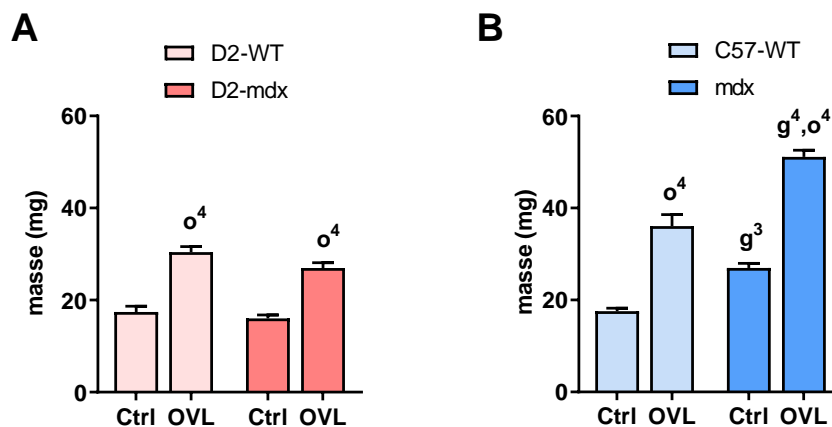


Figure A3- 3 : L'overload provoque une hypertrophie du muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. (A) Masse musculaire des souris D2-WT, n=8-20 par groupe, et D2-mdx, n=8-9 par groupe. (B) Masse musculaire des souris, C57-WT, n=12-16 par groupe, et mdx, n=18-17 par groupe. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. g : significativement du WT ; o : significativement différent de Ctrl. 3 : $p < 0.001$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à deux facteurs).

III.2.2. Nombre de fibres

Afin de déterminer l'origine de l'hypertrophie musculaire en réponse à l'OVL observée chez les souris D2-mdx, D2-WT, mdx, et C57-WT, le nombre de fibres par section transversale, à l'endroit le plus épais du muscle plantaris, a été quantifié suite à un immunomarquage de la laminine pour identifier le contour des fibres. Nos

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 3) - Résultats

résultats ne montrent aucun effet de l'OVL sur le nombre de fibres chez les souris D2-mdx, D2-WT, mdx et C57-WT (**Figure A3-4A et A3-4B**), suggérant que ce paramètre n'est pas impliqué dans l'hypertrophie musculaire.

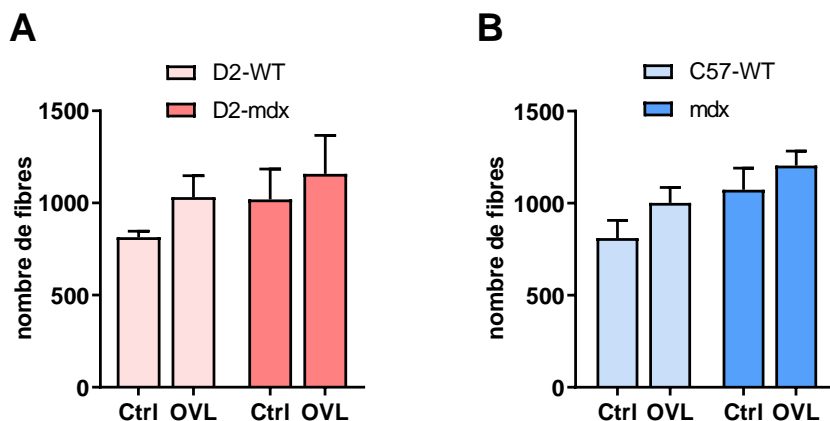


Figure A3- 4 : L'hypertrophie du muscle plantaris n'est pas causée par une augmentation du nombre de fibres chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. (A) Nombre de fibres musculaires par coupes transversales chez des muscles plantaris de souris D2-WT, n=5-7 par groupe, et D2-mdx, n=4 par groupe. (B) Nombre de fibres musculaires par coupes transversales chez des muscle plantaris de souris C57-WT, n=5-4 par groupe, et mdx, n=5 par groupe. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. (Test ANOVA à deux facteurs).

III.2.3. Diamètre minimum des fibres (min feret)

Les souris D2-mdx présentent une augmentation du diamètre minimum (min feret) moyen de leurs fibres musculaire ($\times 1.27$) en réponse à l'OVL, contrairement aux souris D2-WT qui ne présentent aucune variation du min feret (**Figure A3-5A**). Pareillement, les souris mdx ($\times 1.21$) présentent une augmentation du min feret en réponse à l'OVL, alors que celui-ci est resté inchangé chez les souris C57-WT (**Figure A3-5B**). L'augmentation du min feret moyen chez les souris D2-mdx et mdx est associée à une baisse du pourcentage de fibres de min feret de 5 à 20 μm au profit du pourcentage de fibres de min feret de 30 à 50 μm chez les souris D2-mdx (**Figure A3-5C**) et d'une baisse du pourcentage de fibres de min feret de 10 à 20 μm chez les souris mdx (**Figure A3-5D**).

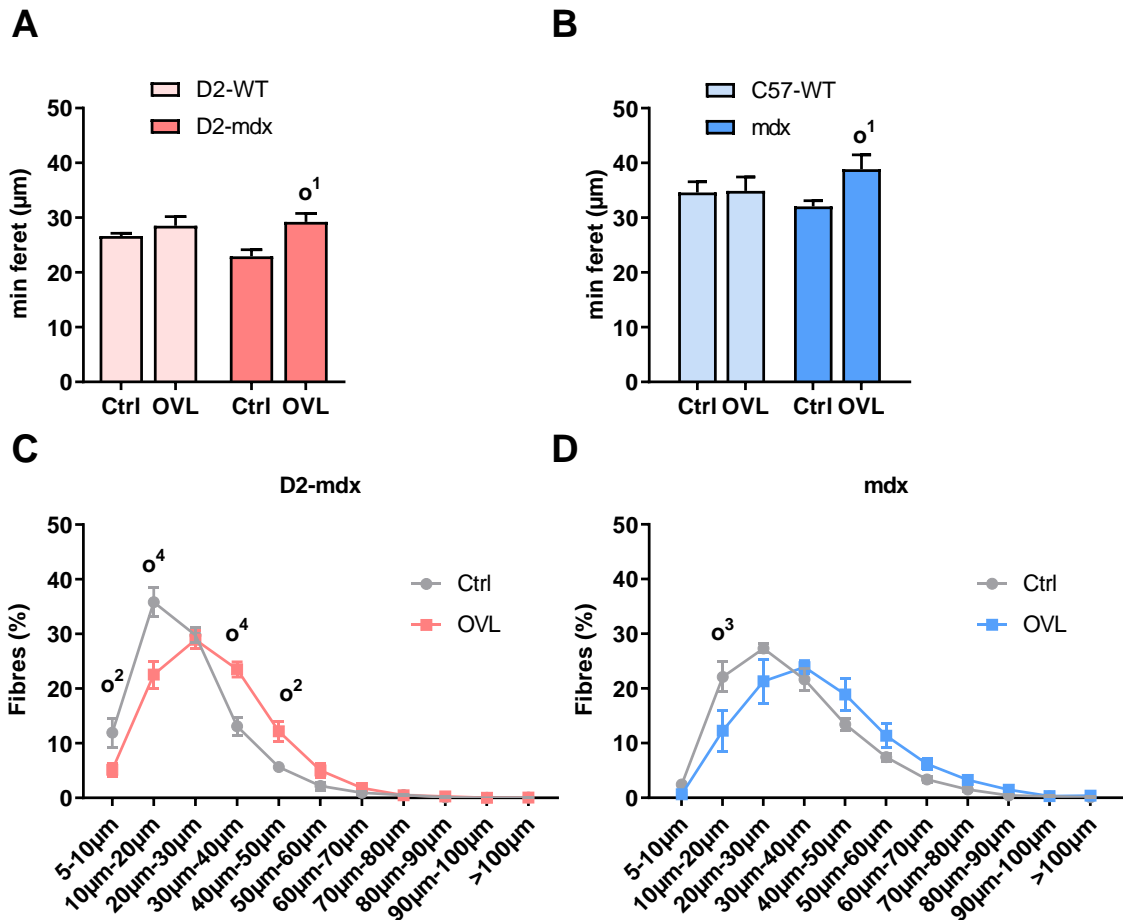


Figure A3- 5 : L’hypertrophie du muscle plantaris est causée par une augmentation du diamètre des fibres musculaires chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. (A-B) Diamètre moyen minimum des fibres (min feret), (A) chez des souris D2-WT, n=5-7 par groupe, et D2-mdx, n=5- par groupe ; (B) chez des souris C57-WT, n=5-6 par groupe, et mdx, n=5 par groupe. (C-D) Pourcentage de fibres en fonction de la classe de diamètre minimum des fibres (C) chez des souris D2-WT, n=5-7 par groupe, et D2-mdx, n=5- par groupe ; (D) chez des souris C57-WT, n=5-6 par groupe, et mdx, n=5 par groupe. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. o : significativement différent de Ctrl. 1 : $p < 0.05$, 3 : $p < 0.001$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à deux facteurs).

En outre, nous avons constaté une augmentation du min feret des fibres exprimant la MHC-1 (x 1.26), la MHC-2a (x 1.28) ou la MHC-2b (x 1.27) chez la souris D2-mdx (**Figure A3-6A**) et une augmentation du min feret seulement des fibres exprimant MHC-2a (x 1.38) ou MHC-2b (x 1.21) chez la souris mdx (**Figure A3-6B**). Par ailleurs, nous n’avons pas constaté de variation du min feret des différents types de fibres chez les souris D2-WT et C57-WT (**Figures A3-6C et 6D**).

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 3) - Résultats

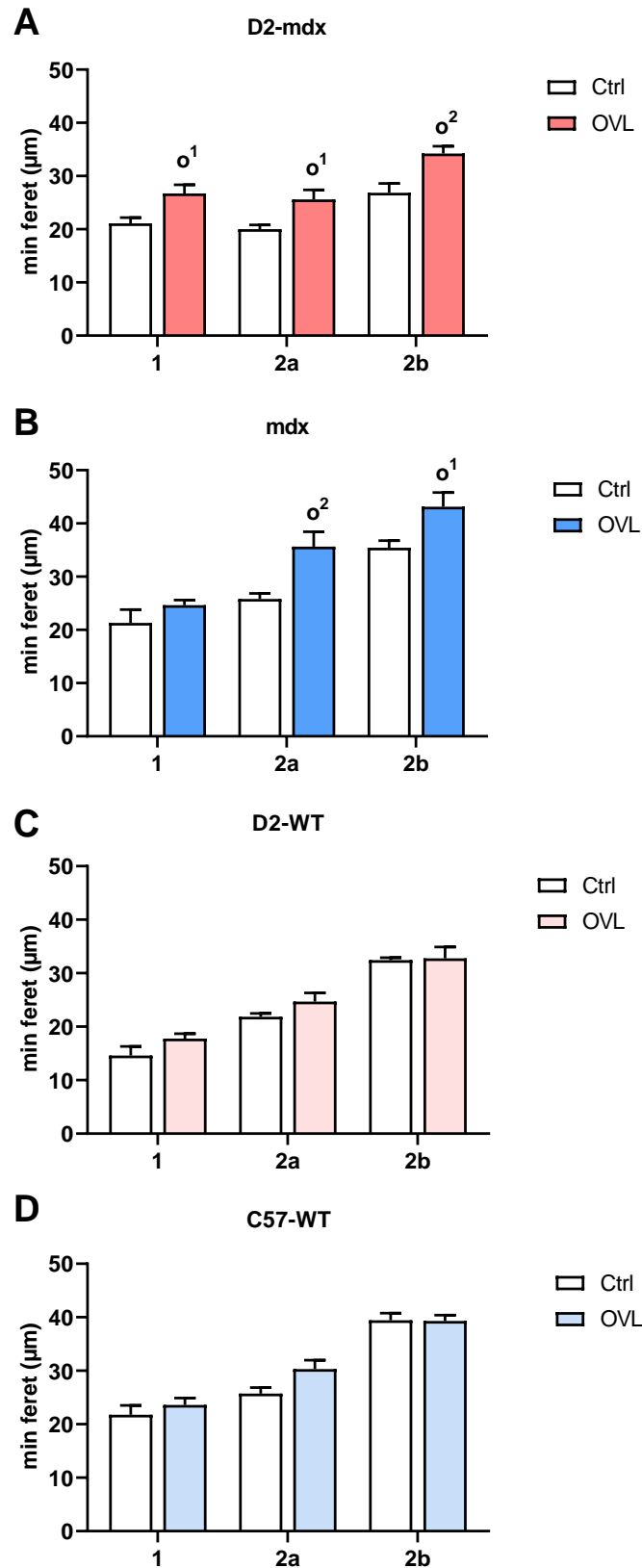


Figure A3- 6 : L'overload induit une augmentation du diamètre moyen des fibres musculaires exprimant la MHC-1, la MHC-2a et la MHC-2b chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. Diamètre minimum moyen (min feret) des fibres exprimant la MHC-1, la MHC2a et la MHC-2b

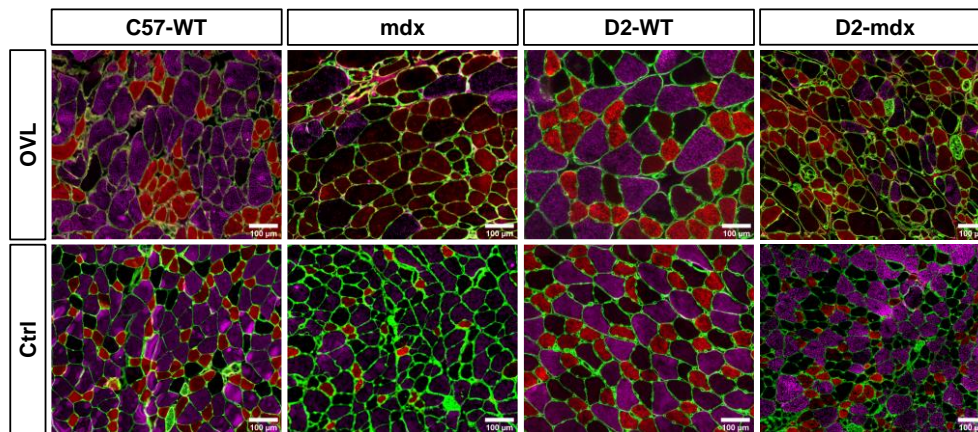
chez des souris (A) C57-WT, n=5-7 par groupe ; (B) mdx, n=5 par groupe ; (C) D2-WT, n=5 par groupe ; (D) D2-mdx, n=5-6 par groupe. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. o : significativement différent de Ctrl. 1 : $p < 0.05$, 2 : $p < 0.01$, (Test ANOVA à deux facteurs).

En conclusion, l'OVL induit une hypertrophie du muscle plantaris des souris D2-mdx, ce qui indique que l'OVL augmente la masse musculaire même dans un modèle sévère de DMD. En outre, cette hypertrophie chez les souris D2-mdx est associée à une augmentation du diamètre moyen des fibres, à une diminution du pourcentage de fibres de petit diamètre et à une augmentation du min feret des différents types de fibres. Ces résultats sont similaires à ceux observés chez la souris mdx. En revanche, ils diffèrent un peu de ceux observés chez les souris WT qui ne présentent pas d'augmentation du diamètre des fibres en réponse à l'OVL.

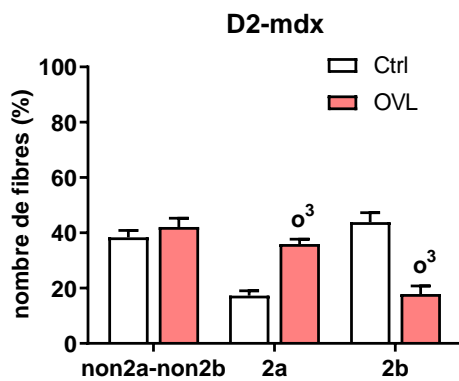
III.3. L'OVL PROVOQUE UN REMODELAGE MUSCULAIRE VERS DES FIBRES PLUS LENTES CHEZ LES SOURIS D2-MDX COMME CHEZ LES SOURIS MDX.

Pour évaluer l'effet de l'OVL sur la composition en types de fibres du muscle plantaris, nous avons réalisé un immunomarquage de la laminine et des chaînes lourdes de la myosine MHC-2b et MHC-2a (**Figure A3-7A**). En réponse à l'OVL, nous avons observé une diminution du pourcentage des fibres exprimant la MHC-2b (x 0.40) au profit de fibres plus lentes exprimant la MHC-2a (x 2.07) chez les souris D2-mdx (**Figure A3-7B**), contrairement au souris D2-WT, où la distribution en type de fibres est restée la même (**Figure A3-7D**). Similairement, les souris mdx ont présenté la même diminution du pourcentage des fibres exprimant la MHC-2b (x 0.31) au profit de fibres exprimant la MHC-2a (x 2.54) en réponse à l'OVL (**Figure A3-7C**), alors que l'OVL n'a pas affecté la distribution en différents types de fibres chez les souris C57-WT (**Figure A3-7E**).

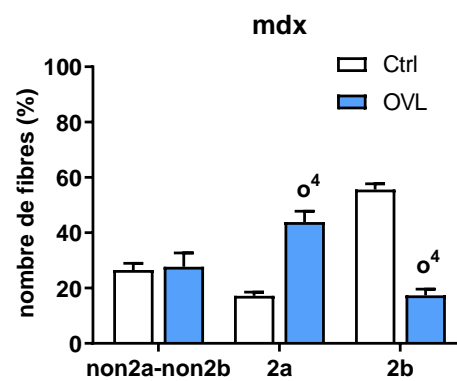
A



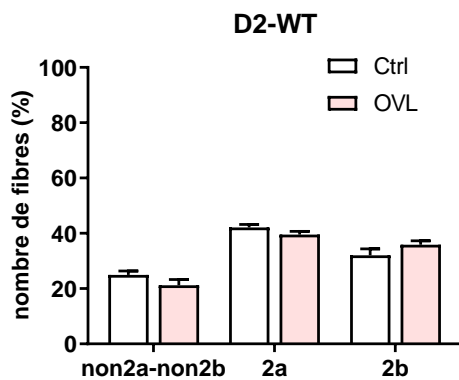
B



C



D



E

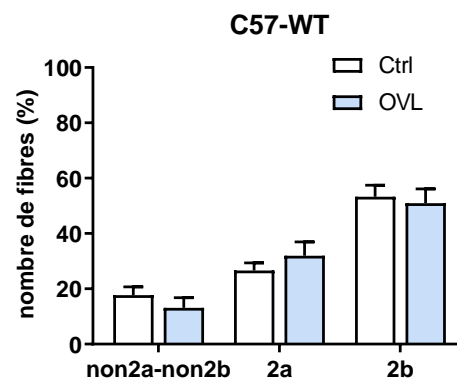


Figure A3- 7 : L'overload induit une augmentation du pourcentage de fibres exprimant MHC-2a dans le muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. (A) Images représentatives d'un immunomarquage de la MHC-2a (rouge), la MHC2b (violet), et de la laminine (vert) (MHC 1 et 2x, non marquées) dans des coupes transversales. (B-C-D-E) Pourcentage de fibres par section transversale de plantaris exprimant la MHC-2a, la MHC2b et la MHC-non2a-non2b (comprend les fibres exprimant la MHC1 et 2x) (B) D2-mdx, n=7 par groupe (C) mdx, n=5 par groupe, (D) C57-WT, n=5 par groupe et (E) D2-WT, n=5 par groupe. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. o : significativement différent de Ctrl. 3 : $p < 0.001$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à deux facteurs). Bar d'échelle 100 μ m.

De plus, l'immunomarquage de la MHC-1 (**Figure A3-8A**) a révélé une augmentation de la MHC-1 chez les souris D2-mdx (x 11.3), D2-WT (x 4.57), mdx (x 5.1), et C57-WT (x 11.9) (**Figures A3-8B et A3-8C**).

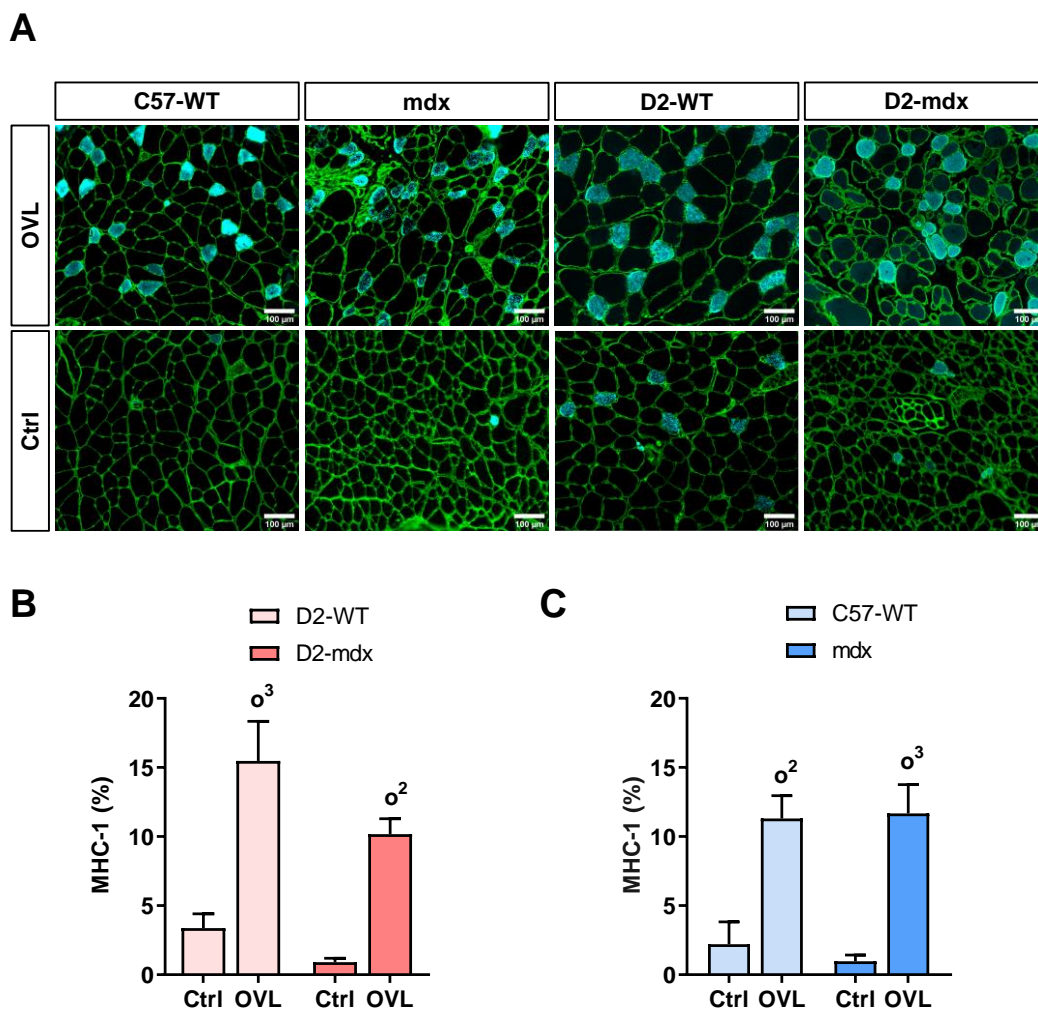


Figure A3- 8 : L'overload induit une augmentation du pourcentage de fibres exprimant MHC-1 dans le muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. (A) Images représentatives d'un immunomarquage de la MHC-1 (bleu) et de la laminine (vert) dans des coupes transversales de plantaris. (B-C) Pourcentage de fibres par section transversale de plantaris exprimant la MHC-1 chez des souris (B) D2-WT, n=5 par groupe, et D2-mdx, n=5-6 par groupe ; (C) C57-WT, n=5-7 par groupe, et mdx, n=5 par groupe. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. o : significativement différent de Ctrl. 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$ (Test ANOVA à deux facteurs). Bar d'échelle 100 μ m.

En conclusion, l'OVL a provoqué un remodelage musculaire vers des fibres plus lentes dans le muscle plantaris des souris D2-mdx comme des souris mdx, indiquant que l'adaptation musculaire à l'OVL ne varie pas avec la sévérité du modèle de DMD. De

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 3) - Résultats

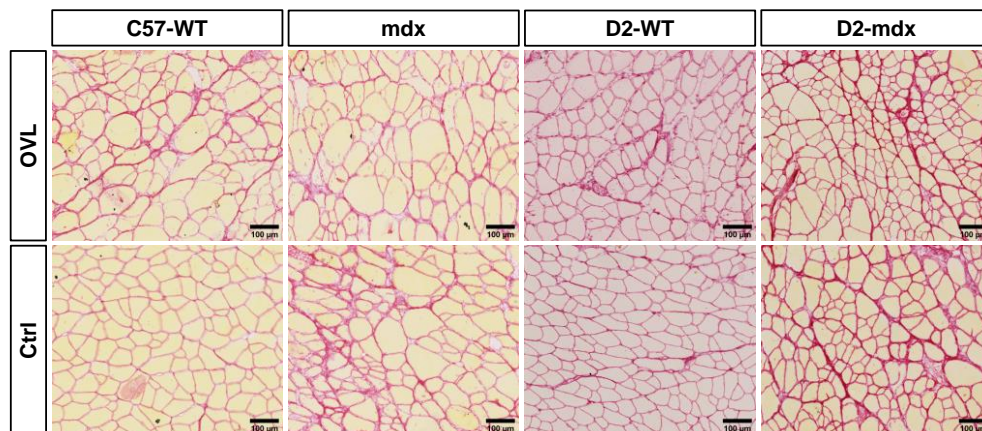
plus, cette conversion vers des fibres plus lentes est plus marquée chez les souris D2-mdx et mdx que chez leur souris WT respectives.

III.4. L'OVL N'AUGMENTE PAS LA MEC NI LE POURCENTAGE DE FIBRES CENTRO-NUCLÉÉS CHEZ LES SOURIS D2-MDX COMME CHEZ LES SOURIS MDX.

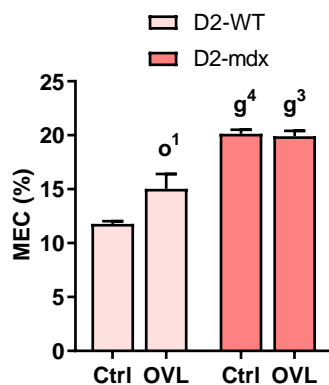
III.4.1. Matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire (MEC) est connue pour remplacer progressivement le tissu musculaire dans la DMD, et être utilisé comme un marqueur histologique de dommages musculaires. Nous avons donc réalisé une coloration au Rouge Sirius du collagène de la MEC pour quantifier le pourcentage de surface musculaire occupée par la MEC au sein de coupes transversales des muscles plantaris chez des souris D2-mdx, D2-WT, mdx, et C57-WT (**Figure A3-9A**).

A



B



C

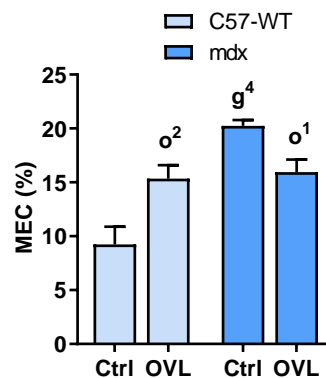


Figure A3- 9 : L'overload n'induit pas d'augmentation de la matrice extracellulaire dans le muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. (A) Images représentatives d'une coloration au Rouge Sirius du collagène de la matrice extracellulaire (MEC) dans des coupes transversales de plantaris. (B-C) Pourcentage de la surface occupée par la MEC dans une coupe transversale de plantaris de souris (B) D2-WT, n=5 par groupe, et D2-mdx, n=5-7 par groupe ; (C) C57-WT, n=9-13 par groupe et mdx, n=14-12. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. g : significativement du WT ; o : significativement différent de Ctrl. 1 : $p < 0.05$, 2 : $p < 0.01$, 3 : $p < 0.001$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à deux facteurs). Bar d'échelle 100 μ m.

Chez les souris D2-mdx, nous n'avons pas observé d'effet de l'OVL, contrairement aux souris D2-WT qui présentent une augmentation du pourcentage de MEC (x 1.27) à la suite de l'OVL (**Figure A3-9B**). En revanche, les souris mdx présentent une diminution de la MEC (x 0.78) à la suite de l'OVL, alors que les souris C57-WT (x 1.66) montrent une augmentation du pourcentage de MEC (**Figure A3-9C**).

III.4.2. Fibres centro-nuclées

Pour évaluer la dégénérescence des fibres musculaires, nous avons réalisé un marquage des noyaux centraux au DAPI (bleu) et de la laminine (vert) afin de quantifier le nombre de fibres régénérées (**Figure A3-10A**). Nos résultats révèlent que chez les souris D2-mdx, le pourcentage de fibres centro-nuclées a diminué (x 0.81) en réponse à l'OVL, alors que chez les souris D2-WT, l'OVL a induit une augmentation du pourcentage de fibres régénérées (x 8.1) (**Figure A3-10B**). En ce qui concerne les souris mdx, l'OVL n'a pas eu d'effet sur le pourcentage de fibres centro-nuclées, alors qu'il a augmenté chez les souris C57-WT (x 3.5) (**Figure A3-10C**).

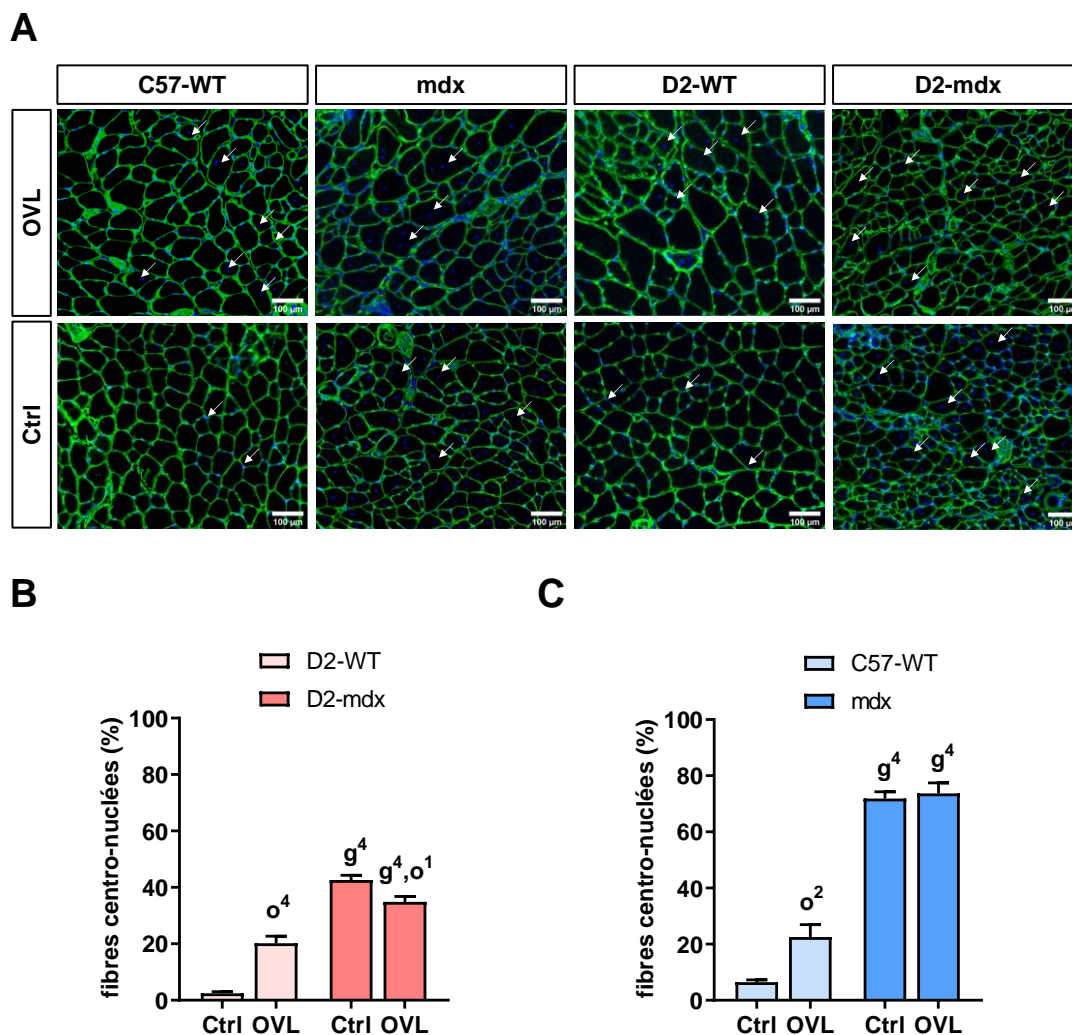


Figure A3- 10 : L'overload n'induit pas une augmentation du pourcentage de fibres centro-nuclées dans le muscle plantaris chez les souris D2-mdx comme chez les souris mdx. (A) Images représentatives de coupes transversales de plantaris avec un marquage des noyaux centraux (bleu) et de la laminine (vert). (B-C) Pourcentage de fibres centro-nuclées dans une coupe transversale de plantaris de souris (B) D2-WT, n=5-4 par groupe, et D2-mdx, n=6-4 par groupe ; (C) C57-WT, n=9-10 par groupe, et mdx, n=13-11 par groupe. Flèche : Noyaux centraux. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. g : significativement du WT ; o : significativement différent de Ctrl. 1 : $p < 0.05$, 2 : $p < 0.01$, 4 : $p < 0.0001$ (Test ANOVA à deux facteurs). Bar d'échelle 100 μ m.

En outre, nous avons regardé l'impact de l'OVL sur la distribution du nombre de noyaux centraux par fibre (**Figure A3-11A**). Nous avons trouvé que l'OVL a eu un effet chez les souris D2-mdx, car il a diminué le pourcentage de fibres possédant 3 noyaux centraux ou plus (x 0.48) et augmenté le pourcentage de fibres possédant 1 seul noyau central (x 1.13) (**Figure A3-11B**). Il n'y a pas eu de tels changements en réponse à l'OVL chez la souris D2-WT, mdx et C57-WT (**Figure A3-11B, A3-11D et A3-11E**).

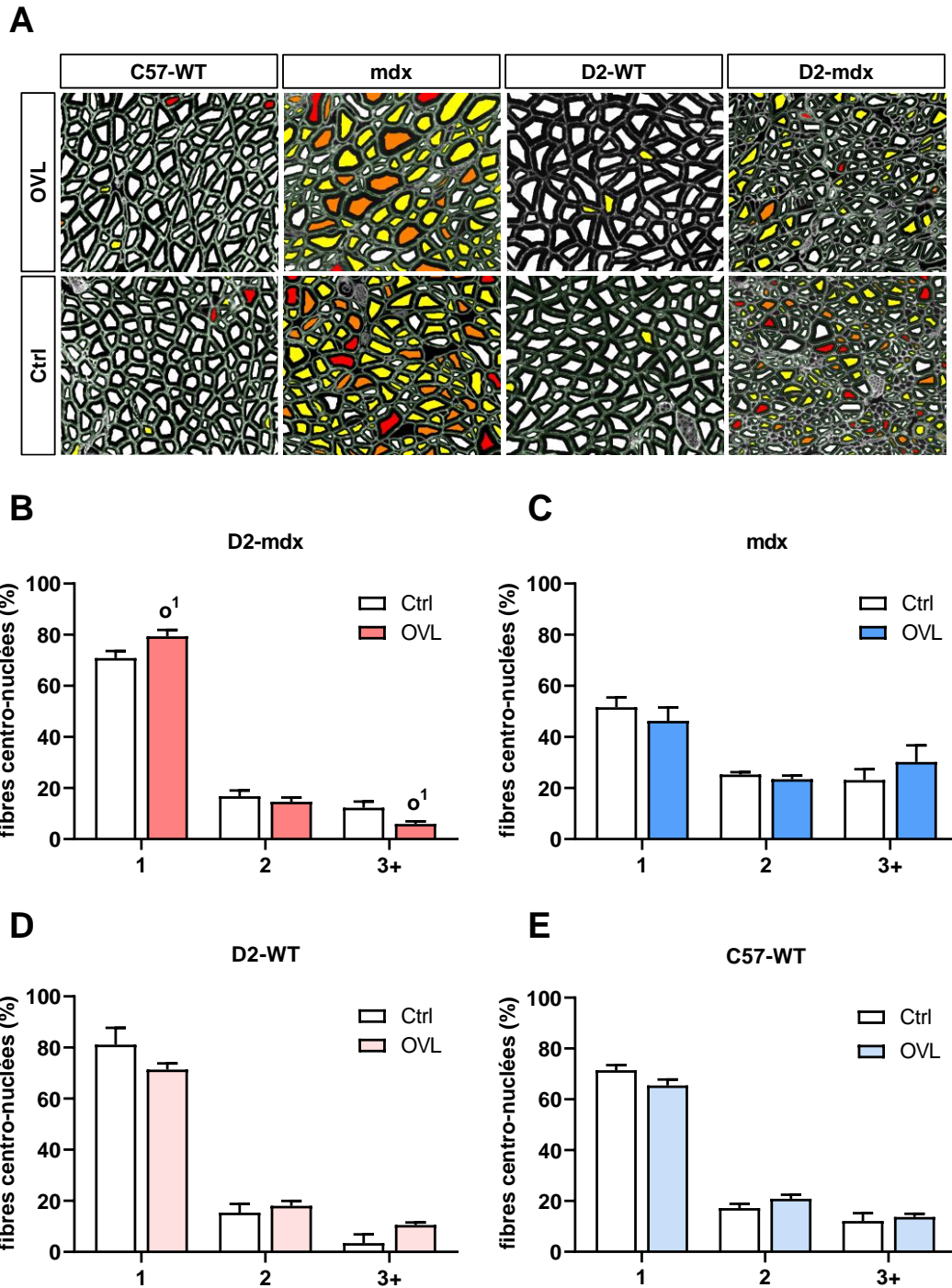


Figure A3- 11 : L'overload induit une diminution de la distribution du nombre de noyaux centraux par fibres musculaires seulement chez les souris D2-mdx. (A) Cartographie du nombre de noyaux centraux par fibres. Blanc : 0, jaune : 1, orange : 2, rouge : 3. (B-C-D-E) Pourcentage de fibres centro-nuclées dans une coupe transversale de plantaris de souris (B) D2-mdx, n=6-4 par groupe ; (C) mdx, n=13-11 par groupe ; (D) D2-WT, n=5-4 par groupe ; (E) C57-WT, n=9-10 par groupe. Ctrl : contrôle ; OVL : overload. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM. o : significativement différent de Ctrl. 1 : $p < 0.05$, (Test ANOVA à deux facteurs).

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 3) - Résultats

En conclusion, nous avons mis en évidence que l'OVL n'augmentait ni la MEC ni le pourcentage de fibres centro-nuclées dans un modèle sévère de DMD, ce qui suggère que les marqueurs histologiques de dommages musculaires ne sont pas aggravés par l'OVL. Ces résultats sont un peu différents de ceux obtenus chez la mdx. Ils sont également différents de ceux observés chez la souris WT pour qui apparaît quelques dommages musculaires, du moins évalué histologiquement.

IV. DISCUSSION

L'objectif de cette étude était de déterminer si un exercice de résistance chronique initié à l'âge de 2 mois pouvait être bénéfique sur les paramètres fonctionnels de souris D2-mdx, un modèle sévère de DMD, comme chez les souris mdx, un modèle modéré de DMD. Pour ce faire, nous avons réalisé une surcharge mécanique (« overload », OVL) du muscle plantaris de souris D2-mdx et mdx, afin de mimer des exercices de musculation pendant 1 mois. Ce modèle supra physiologique est connu pour améliorer de façon marquée la force maximale absolue dans les muscles de rongeurs sains (Binkhorst and 't Hof MA van, 1973; Booth and Thomason, 1991; Michel et al., 1989) et mdx (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012) . Néanmoins, aucune étude ne s'est encore intéressée à l'effet d'un tel exercice dans un modèle murin sévère de la DMD présentant une faiblesse et une fragilité musculaire plus importantes comparé à un modèle murin moins sévère. Nos résultats ont mis en évidence que l'OVL a amélioré la fonction du muscle plantaris aussi bien chez des souris D2-mdx que chez des souris mdx, indiquant que ce type d'exercice chronique a des effets bénéfiques sur la performance musculaire quel que soit la sévérité du modèle de DMD.

IV.1. LA PERFORMANCE MUSCULAIRE EST TRÈS AMÉLIORÉE DANS UN MODÈLE MURIN SÉVÈRE DE DMD

De façon originale, nous montrons que l'OVL a permis d'améliorer de façon notable l'ensemble des paramètres fonctionnels (P0, sP0, résistance à la fatigue) chez la souris D2-mdx. À titre de comparaison, une thérapie génique restaurant l'expression de dystrophine à l'aide du saut d'exon n'augmente pas la force maximale chez les souris D2-mdx (voir axe 2), ce qui souligne l'intérêt potentiel de ce type d'exercice chronique de résistance afin de lutter contre la faiblesse musculaire dans le cas de muscle dystrophique. De plus, les effets bénéfiques de l'OVL observés chez la souris D2-mdx sont similaires à ceux constatés chez la souris mdx, ce qui suggère qu'il n'y a pas de crainte particulière à avoir de ce type d'exercice musculaire, du moins dans le cadre d'une étude préclinique, bien que le muscle des souris D2-mdx présentent une grande fragilité musculaire (une susceptibilité accrue vis-à-vis des dommages induits par les contractions musculaires), encore plus exacerbée que chez les souris mdx. Il n'est pas possible de comparer nos résultats obtenus chez la souris D2-mdx du fait de

l'absence d'étude précédente, mais nos résultats observés chez la souris mdx sont en accord avec les données de la littérature, où il a été montré que l'OVL d'1 mois et de 6 mois du muscle plantaris a amélioré la force maximale absolue chez des souris mdx (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012). De la même manière, un entraînement de résistance consistant en 6 séances d'entraînement isométrique réalisées sur 4 semaines a permis d'augmenter, la force maximale de 12 % dans le muscle EDL chez des souris mdx (Lindsay et al., 2019a). Enfin, il est important de noter que le gain de performance en réponse à l'OVL du muscle plantaris est similaire à celui observé chez la souris saine, indiquant que le muscle murin dystrophique est tout autant « entraînable » qu'un muscle murin sain. Toutefois, ce résultat diffère de celui d'une étude précédente obtenue chez des souris mdx plus âgées et après une période plus longue d'OVL (Joanne et al., 2012). En effet, cette dernière étude montre que les gains en réponse à l'OVL de force maximale absolue et de résistance à la fatigue sont inférieurs chez la souris mdx comparé à la souris WT.

IV.1. L'OVL INDUIT UNE HYPERTROPHIE MUSCULAIRE DANS UN MODÈLE MURIN SÉVÈRE DE DMD

L'augmentation de la force maximale absolue en réponse à l'OVL chez la souris D2-mdx est expliquée par l'augmentation de la force maximale spécifique, donc de la « qualité » fonctionnelle du muscle, et de la masse du muscle. En accord avec de précédentes études réalisées chez la souris mdx (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012), l'OVL induit bien une hypertrophie musculaire. Dans notre étude, elle s'explique chez la souris D2-mdx, comme chez la souris mdx, par une augmentation du diamètre moyen des fibres musculaires, indiquant une adaptation musculaire du muscle à l'OVL similaire entre les différents modèles sévère et modéré de DMD. Toutefois, cette adaptation n'est pas identique à celle des souris WT dans la mesure où nous n'avons pas constaté chez ces dernières d'augmentation du diamètre des fibres. Comme nous n'avons pas observé non plus d'une augmentation du nombre de fibres musculaires par coupe chez les souris WT, ce résultat peut laisser supposer que l'hypertrophie des muscles plantaris chez les souris WT provient, du moins en partie, d'une augmentation de la matrice extracellulaire (Cf. plus loin). Une étude récente montre que l'augmentation de la matrice extracellulaire induite par l'OVL dans le muscle sain n'est pas forcément désavantageuse pour le muscle sain (Stantzou et al., 2021).

IV.2. L'OVL INDUIT UN REMODELAGE MUSCULAIRE PLUS IMPORTANT DANS UN MODÈLE MURIN SÉVÈRE DE DMD

Par ailleurs, nos résultats indiquent que l'OVL engendre un remodelage musculaire, une conversion des fibres vers des fibres plus lentes. En effet, nous avons observé une baisse du pourcentage de fibres exprimant MHC-2b au profit d'une augmentation du pourcentage de fibres exprimant MHC-1 et MHC-2a, et ceci de manière similaire chez les souris D2-mdx et mdx, confirmant une adaptation du muscle identique indépendamment de la sévérité du modèle de DMD. De manière intéressante, ce remodelage est plus marqué chez les souris DMD que chez les souris WT. Cette conversion vers des fibres plus lentes en réponse à l'OVL a déjà été observé dans de précédentes études chez des souris mdx (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012). Elle peut être considérée comme bénéfique dans la mesure où il semblerait que les fibres plus lentes sont moins fragiles que les fibres plus rapides chez la souris mdx (Moens et al., 1993). De plus, ces fibres plus lentes ont généralement un métabolisme oxydatif plus performant, suggérant que les défauts mitochondriaux des muscles des souris mdx pourraient être améliorés (Kennedy et al., 2017). Enfin, cette conversion des fibres en réponse à l'OVL pourrait expliquer pourquoi la résistance à la fatigue est améliorée, puisque les fibres lentes sont connues pour être moins fatigables que les fibres les plus rapides, du moins dans les muscles sains.

IV.3. L'OVL N'INDUIT PAS DE DOMMAGES MUSCULAIRES DANS UN MODÈLE MURIN SÉVÈRE DE DMD

Une grande crainte de l'utilisation d'exercice de résistance chronique (muscultation) chez les patients DMD est le risque d'aggravation des dommages musculaires du fait que les muscles dystrophiques sont plus fragiles, et d'un épuisement progressivement des cellules souches du muscles (Sacco et al., 2010). Toutefois, cette étude montre que même un exercice chronique supra-physiologique infligé au muscle pendant 1 mois, n'entraîne aucune perte de fonction (au contraire) ni aucune aggravation des dommages musculaires au niveau histologique dans un modèle sévère de DMD. En effet, nous n'avons observé aucune augmentation du pourcentage de la matrice extracellulaire (MEC) chez les souris D2-mdx, suggérant un remplacement du tissu musculaire par du tissu fibrotique. De la même manière, il n'y a pas eu d'augmentation

TRAVAIL EXPÉRIMENTAL (Axe 3) - Discussion

du pourcentage de fibres centro-nuclées, qui auraient pu indiquer une dégénérescence accrue des fibres en réponse à l'OVL. Ces résultats chez la souris D2-mdx diffèrent un peu de ceux obtenus chez la souris mdx, mais nous n'observons pas également chez cette dernière de dommages histologiques accrus, comme décrit précédemment (Joanne et al., 2012). Finalement, l'OVL n'entraîne des dommages musculaires histologiques apparent que chez les souris WT (augmentation de la MEC et des fibres centro-nuclées), comme il été montré auparavant (Joanne et al., 2012; Terada et al., 2012). Ce qui semble normal car la souris WT présente très peu de dommages musculaires histologiques au niveau basal, contrairement aux souris D2-mdx et mdx.

V. CONCLUSION

Dans ce dernier axe, nous avons mis en évidence, pour la première fois, qu'un exercice de résistance chronique, supra-physiologique, pouvait améliorer fortement la fonction musculaire, sans exacerber les dommages musculaires, dans un modèle sévère de DMD. Il est donc important de souligner qu'un muscle fragile peut être entraîné, au même titre qu'un muscle sain. Il serait intéressant dans le futur de tester sur une plus longue période l'effet de l'OVL dans ce modèle murin sévère de DMD afin de déterminer si ses effets bénéfiques sont maintenus tels quels dans le long-terme. Ces résultats sont particulièrement encourageant pour la prise en charge thérapeutique des patients DMD, pour qui des exercices de musculation pourraient contrer, en partie du moins, la perte de tissu musculaire ainsi que la faiblesse musculaire associée. De plus, il nous semble important de déterminer à l'avenir les effets bénéfiques de l'exercice de résistance chronique dans le cas d'un muscle murin dystrophique ayant subis au préalable une thérapie génique restaurant la dystrophine, afin de vérifier si les effets de la thérapie génétique et de l'exercice chronique sont additifs.

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES

I. Discussion générale

A l'heure actuelle, le seul traitement utilisé pour les patients atteints de DMD, en plus de la « physiothérapie » ou kinésithérapie, est l'administration de glucocorticoïdes qui n'est pas complètement satisfaisante. Ainsi depuis des années, de nombreuses thérapies sont développées telles que des thérapies géniques (micro-dystrophine, saut d'exon etc...) qui visent à restaurer l'expression de la dystrophine (Chamberlain and Chamberlain, 2017), ou des traitements symptomatiques (Wagner et al., 2008), dans le but d'améliorer la fonction musculaire des malades. Cependant, aucune de ces nouvelles approches thérapeutiques testées ne seraient, pour l'instant, suffisamment efficaces pour guérir complètement les patients atteints de DMD, invitant donc à combiner plusieurs traitements thérapeutiques. L'exercice physique chronique, étant connu pour améliorer la fonction musculaire chez des individus ne présentant pas de pathologies neuromusculaires, pourrait être une alternative thérapeutique intéressante en complément d'une thérapie génique, afin d'améliorer, maintenir ou retarder le déclin fonctionnel du muscle dystrophique. Ainsi l'objectif général de ma thèse a été focalisé sur l'idée d'évaluer l'effet de différents types d'exercice physique chronique sur la fonction musculaire des muscles des membres inférieurs dans des modèles murins plus ou moins sévères de DMD, lorsqu'il est combiné ou non à un autre traitement. Ce travail de thèse est réalisé dans la continuité d'études précédentes de l'équipe de recherche (Delacroix et al., 2018; Ferry et al., 2015b, 2015a; Joanne et al., 2012; Roy et al., 2016). Ces dernières ont montré que des modèles d'exercice physique chronique d'endurance (Delacroix et al., 2018; Ferry et al., 2015b) et de résistance (force-vitesse, musculation...)(Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012) exercent des effets bénéfiques sur la fonction musculaire des muscles locomoteurs chez des souris dystrophiques, mais ne sont en aucun cas délétères.

I.1. PROX1 AMÉLIORE LA FRAGILITÉ DANS UN MODÈLE MURIN PEU SÉVÈRE DE DMD, SEULEMENT S'IL EST COMBINÉ À L'EXERCICE PHYSIQUE CHRONIQUE D'ENDURANCE (AXE 1)

Depuis plusieurs années, des traitements précliniques génétiques ou pharmacologiques favorisant la formation des fibres musculaires plus lentes et plus oxydatives, dans le muscle squelettique, se sont avérés bénéfiques chez les souris mdx sédentaires (Selsby et al., 2012; Stupka et al., 2008). Par ailleurs, dans les modèles murins de DMD, les fibres plus lentes et oxydatives semblent davantage épargnées par la pathologie. C'est pourquoi, dans un premier axe, nous nous sommes intéressés à étudier les effets de l'association de l'exercice chronique volontaire à la surexpression de *Prox1*, un facteur de transcription connu pour favoriser l'expression d'un programme de gènes codant pour des protéines contractiles de type lent dans le muscle sain (Kivelä et al., 2016), sur la fonction musculaire dans un modèle murin peu sévère de la DMD. Nous avons mis en évidence, d'une part, que le transfert de *Prox1* chez des souris mdx soumises à un exercice volontaire a permis de réduire encore plus la fragilité (**Figure Schéma Bilan 1**), alors que le transfert de *Prox1* chez des souris sédentaires seul n'a pas eu d'effet (**Figure Schéma Bilan 1**), montrant ainsi que l'exercice physique volontaire peut potentialiser les effets d'une thérapie génique qui a pour but de réduire les symptômes musculaires. D'autre part, nous avons observé que le transfert de *Prox1*, pouvait aggraver la faiblesse musculaire et entraîner une réduction du poids musculaire (**Figure Schéma Bilan 1**). Néanmoins, bien que le transfert de *Prox1* ait des effets négatifs sur le poids du muscle des souris mdx, nous avons montré que lorsqu'il est combiné à un exercice volontaire, il semble pouvoir réduire les cycles de dégénérescence-régénération des fibres musculaires et permettre ainsi de ralentir la progression de la maladie à long terme dans le muscle dystrophique, du moins dans un modèle murin peu sévère de DMD.

À l'avenir, il serait donc intéressant de vérifier si les effets bénéfiques de l'exercice sur une thérapie génique sont reproductibles dans des modèles murins sévères (souris DKO n'exprimant ni la dystrophine ni la desmine ou l'utrophine, ou souris D2-mdx) et plus proche de la pathologie humaine. En outre, il serait aussi intéressant de caractériser les effets d'autres formes d'exercices chroniques d'endurance combiné à la thérapie génique et notamment des exercices de course sur tapis roulant. En effet,

si la course volontaire a l'avantage d'être adapté à la condition physique des souris, puisque ce sont elles qui décident du temps et de la vitesse de course (en règle générale il s'agit de sprint de courtes durées), elle ne permet pas d'établir des intensités d'exercices qui pourraient servir de guide pour la prescription d'exercice chez des patients. Ainsi, évaluer les effets de protocoles de course sur tapis, d'intensités identifiées et maîtrisées, pourrait servir pour créer des protocoles plus facilement transposables chez l'homme. Par ailleurs, si nous avons étudié la fonction musculaire du Tibial antérieur, qui est modérément atteinte chez la souris mdx, il ne faut pas oublier que ce modèle murin présente également une altération importante des fonctions cardiaques et respiratoires (Ishizaki et al., 2008; Quinlan et al., 2004). Chez les patients DMD, les atteintes respiratoires et le développement de cardiomyopathies dilatées sont la plupart du temps à l'origine du décès prématuré des patients (van Essen and de Visser, 2004). Dans de prochaines études précliniques, déterminer dans quelle mesure différents types d'exercices d'endurance chronique, couplé ou non à des thérapies géniques, affectent le cœur et le diaphragme semble essentiel pour la mise au point de protocole d'exercice chez les patients.

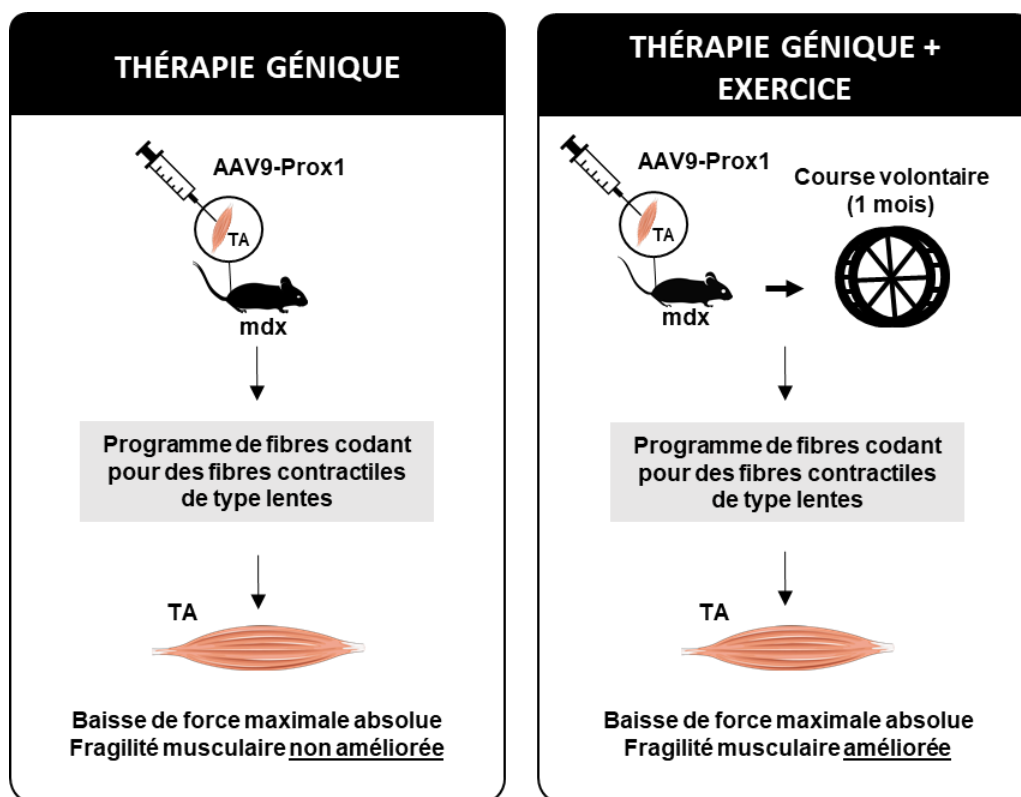


Figure Schéma Bilan 1 : Effet de l'exercice physique d'endurance combiné à une thérapie génique visant à améliorer la fonction musculaire d'un modèle murin modéré de DMD.

I.2. L'EXERCICE PHYSIQUE CHRONIQUE D'ENDURANCE DIMINUE L'EFFICACITÉ D'UNE THÉRAPIE VISANT À EXPRIMER LA DYSTROPHINE DANS UN MODÈLE MURIN SÉVÈRE DE DMD (AXE 2)

Le cadre général du deuxième axe était d'étudier l'effet de l'exercice lorsqu'il est combiné à une thérapie génique visant à restaurer la dystrophine chez des souris D2-mdx, un modèle murin plus sévère de DMD. Notre objectif premier était de déterminer si l'exercice physique chronique était capable de moduler l'efficacité d'une thérapie génique, visant à restaurer la dystrophine dans le muscle d'un modèle murin sévère de DMD. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que l'exercice d'endurance volontaire diminuait l'efficacité d'une thérapie génique par saut d'exon médié par un AAV, lorsqu'il était réalisé lors des premières semaines suivant l'injection du vecteur, en réduisant la restauration de la dystrophine (**Figure Schéma bilan 2B**).

Malgré cette légère diminution de l'expression de la dystrophine, on peut noter que cette altération de la restauration de la dystrophine n'a pas eu de conséquences fonctionnelles car nous n'avons pas observé de diminution de la force maximale absolue et spécifique (**Figure Schéma bilan 2B**).

De plus, on peut se poser la question suivante : Est-ce que l'effet négatif de l'exercice sur l'expression de la dystrophine dans le tibial antérieur n'est pas compensé par les effets bénéfiques de l'exercice qui peuvent s'exercer non seulement sur le muscle locomoteur malade mais également sur les autres types de muscle striés et même les autres organes ? Ainsi, il conviendrait d'étudier d'autres muscles, notamment le cœur et le diaphragme, d'autant plus que l'on sait que l'exercice associé à une thérapie génique visant à restaurer la dystrophine a des effets différentiels suivant le muscle étudié chez la souris mdx (Hamm et al., 2021; Hourdé et al., 2013). Il serait également intéressant de tester l'effet de l'exercice sur la thérapie génique par saut d'exon, mais cette fois avec une injection systémique. Ce mode d'injection à l'avantage de pouvoir restaurer la dystrophine dans l'ensemble des muscles de l'organisme et ainsi étudier l'effet de l'exercice simultanément sur les fonctions cardiaques, respiratoire et locomotrice. Néanmoins, l'efficacité de la thérapie dépend également de la distribution du vecteur (bio-distribution). On ne sait pas bien comment l'exercice physique peut affecter cette bio-distribution, en régulant le débit sanguin et en « ouvrant » des

capillaires musculaires, ou encore en modulant le système immunitaire (Ferry et al., 1990). En outre, comme expliqué précédemment, le choix de l'exercice volontaire ne permet pas d'établir des seuils d'intensités d'exercice d'endurance précis, au-delà duquel l'exercice n'a pas d'effets et au-delà duquel, il peut devenir délétère. C'est pourquoi, utiliser des exercices sur tapis roulant permettrait de mieux définir les protocoles bénéfiques de l'exercice. De plus, il reste aussi à déterminer si les différents types d'exercice physique chronique ont des effets différentiels suivant la thérapie génique utilisée. Pour cela, Il nous semble très important de disséquer les mécanismes à l'origine de la diminution de dystrophine induite par l'exercice physique chronique d'endurance. Ces connaissances peuvent être à l'origine de nouvelles pistes afin d'améliorer l'efficacité de la thérapie génique dans le futur. Enfin, pour contrer l'effet négatif de l'exercice sur la restauration de la dystrophine, tout en gardant ses effets positifs, il serait intéressant d'associer une deuxième thérapie complémentaire, comme le dantrolène (Wang et al., 2018) qui optimiserait l'efficacité de la thérapie utilisant le saut d'exon et permettrait ainsi d'augmenter l'expression de la dystrophine.

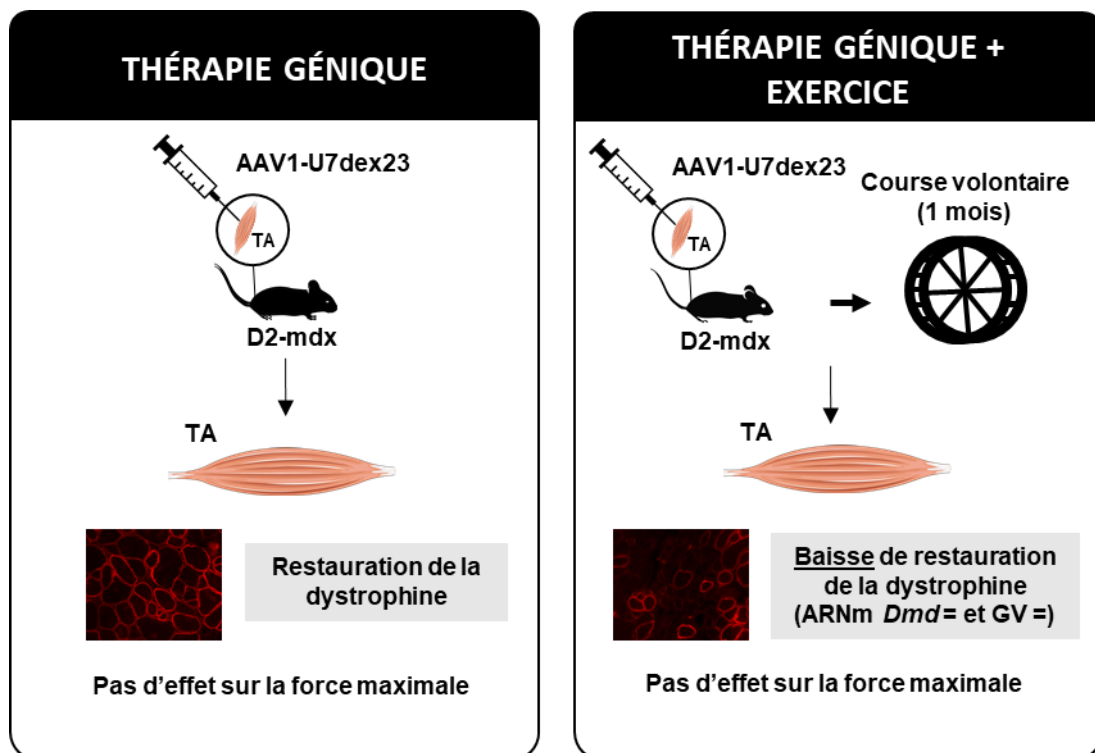


Figure Schéma Bilan 2 : Effet de l'exercice physique d'endurance sur une thérapie génique utilisant le saut d'exon pour restaurer la dystrophine, d'un modèle murin sévère de DMD.

I.3. L'EXERCICE PHYSIQUE CHRONIQUE DE RÉSISTANCE AMÉLIORE LA FONCTION MUSCULAIRE DANS UN MODÈLE MURIN SÉVÈRE DE DMD (AXE 3)

Il faut garder en tête que même une thérapie génique extrêmement efficace ne pourra pas restaurer complètement la fonction du muscle dystrophique. Par exemple, un muscle dystrophique faible et atrophié n'aura pas une fonction musculaire normale, même si dans le meilleur des cas, toutes les fibres expriment de la dystrophine après une thérapie génique. Par ailleurs, dans mon travail de thèse, l'exercice physique chronique d'endurance n'a pas été capable d'augmenter la force maximale dans différents modèles murins de DMD. C'est pourquoi, dans un dernier axe, nous nous sommes intéressés à l'entraînement en force-vitesse car il améliore la performance musculaire de manière conséquente dans le muscle sain et pourrait donc, en théorie, lutter contre la faiblesse musculaire. Si chez la souris mdx, un modèle modéré de la pathologie, ce type d'entraînement en résistance améliore la fonction musculaire des muscles des pattes postérieures (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012; Lindsay et al., 2019a), son effet sur la fonction musculaire dans un modèle murin sévère de DMD, qui présente une faiblesse et une fragilité encore plus importante, restait encore à déterminer. Nos résultats ont mis en évidence qu'un exercice en résistance chronique supra-physiologique améliore fortement la fonction musculaire, sans exacerber les dommages musculaires, chez des souris D2-mdx (**Figure Schéma bilan 3**). Ces résultats sont particulièrement encourageant pour la prise en charge thérapeutique des patients DMD, pour qui des exercices de musculation pourraient contrer, en partie du moins, la perte de tissu musculaire ainsi que la faiblesse musculaire associée. De plus, bien que nous n'ayons pas mesuré la fragilité, nous avons observé des effets bénéfiques de l'OVL similaires entre la souris D2-mdx et la souris mdx, ce qui suggère qu'il n'y a pas de crainte particulière à utiliser ce type d'exercice même dans un modèle de DMD plus sévère. Néanmoins, il conviendrait de mesurer ce paramètre puisque les muscles des souris D2-mdx présentent une grande fragilité musculaire (une susceptibilité accrue vis-à-vis des dommages induits par les contractions musculaires), bien plus exacerbée que chez les souris mdx. Enfin, maintenant que nos données préliminaires montrent que ce type d'exercice de résistance chronique permet d'améliorer la fonction musculaire sans provoquer de dommages musculaires, il reste à déterminer l'effet de l'OVL à la suite d'une thérapie génique qui aura augmenté

l'expression de la dystrophine afin d'évaluer si l'OVL peut potentialiser les effets bénéfiques de la thérapie.

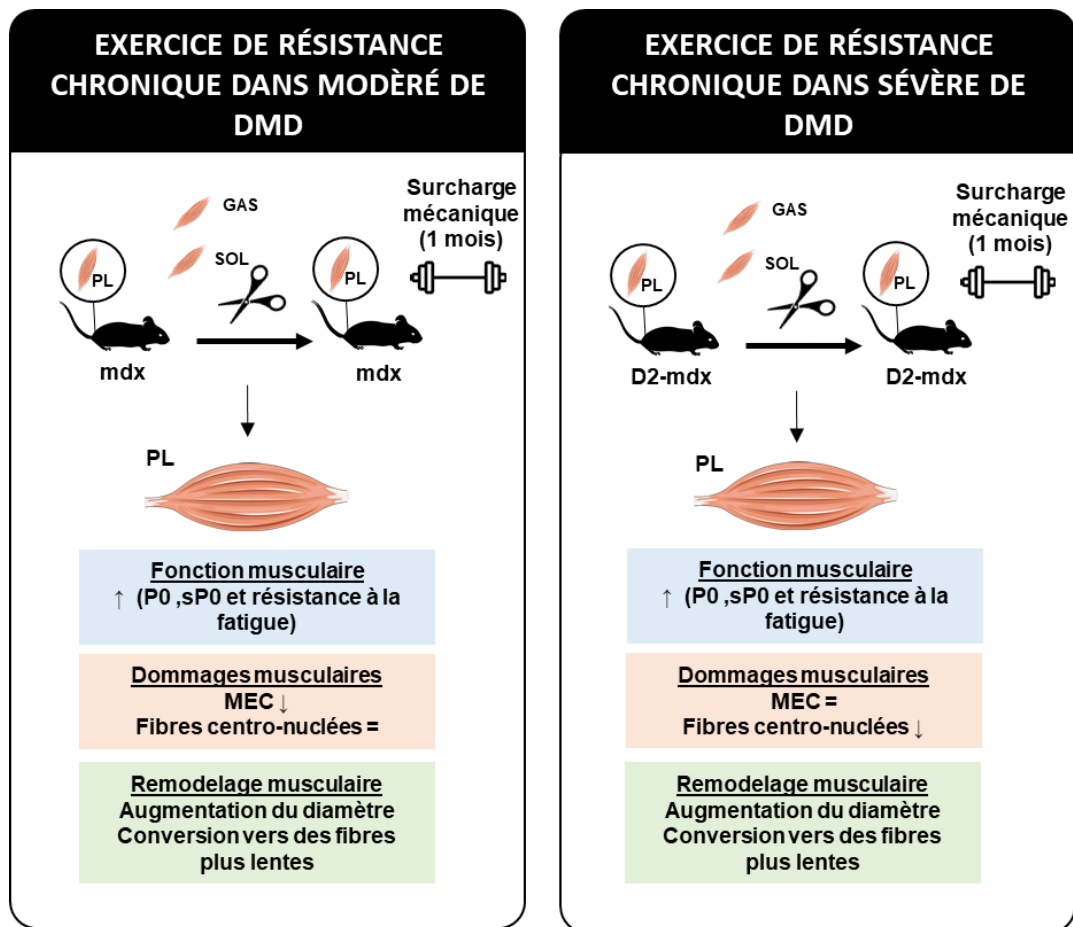


Figure Schéma Bilan 3 : Comparaison des effets d'un exercice de résistance chronique sur les muscles plantaires d'un modèle murin sévère et modéré de DMD.

I.4. LES DIFFÉRENTS TYPES D'EXERCICE PHYSIQUE CHRONIQUES ONT DES EFFETS VARIABLES SUR LA FONCTION MUSCULAIRE (AXES 1, 2 ET 3)

Les effets des différents types d'exercice physique sur la fonction musculaire sont décrits dans le **Tableau Bilan 1**. Ils dépendent à la fois du type d'exercice physique chronique et du modèle. De manière générale, les effets bénéfiques observés sur la fonction musculaire sont bien plus marqués avec un exercice de résistance chronique qu'avec un exercice de course volontaire que ce soit sur un modèle modéré ou sévère de DMD, notamment en termes de gain de force maximale isométrique qui combat l'éventuelle faiblesse musculaire du muscle dystrophique. Bien qu'il reste à déterminer l'effet d'un exercice de résistance sur la fragilité dans un modèle sévère de DMD, ces

données sont encourageantes pour l'utilisation d'un tel exercice dans le cadre de la DMD. D'autant plus, que dans une précédente étude il a été montré qu'un OVL de 6 mois a diminué la fragilité des muscles plantaires de souris mdx (Ferry et al., 2015a).

I.5. L'EXERCICE PHYSIQUE CHRONIQUE NE PROVOQUE PAS DE DOMMAGES MUSCULAIRES (AXES 1, 2 ET 3)

De manière intéressante, dans les différentes études de cette thèse nous n'avons pas observé d'accroissement des dommages musculaires à la suite d'un exercice physique chronique qu'il soit d'endurance ou de résistance et ce même dans un modèle sévère de DMD (**Tableau Bilan 1**). En effet, dans le premier axe de cette thèse l'expression de *Prox1* au niveau du transcrite, est similaire dans les muscles de souris mdx soumis ou non à un exercice d'endurance, ce qui indique que l'exercice volontaire ne provoque pas de nécrose de fibres transduites ou sur le point de l'être. Dans le second axe, avec une méthodologie équivalente mais cette fois dans un modèle murin sévère de DMD nous n'avons pas observé d'augmentation de fibrose ou de fibres centro-nuclées, ni de perte de GV à la suite de l'exercice chronique. Ces résultats corroborent ceux précédemment obtenus et mettent à mal l'hypothèse que l'exercice entraînerait une nécrose massive des fibres à l'origine d'une perte de vecteurs et du transgène. Enfin, dans le troisième axe de cette thèse a révélé que même un exercice de résistance chronique supra-physiologique dans un modèle murin sévère de DMD n'entraînait aucun dommage musculaire évident. Ensemble, les résultats de cette thèse démontrent que l'exercice sous n'importe quelle forme (endurance ou résistance) ne provoque pas de dommages musculaires et n'a donc aucune raison d'être contre-indiqué dans le cadre de la DMD, du moins dans le cadre d'études précliniques centrées sur le muscle locomoteur.

I.6. L'EXERCICE PHYSIQUE CHRONIQUE PROVOQUE UN REMODELAGE MUSCULAIRE (AXES 1, 2 ET 3)

De manière originale, nous n'observons pas le même remodelage musculaire en réponse à un exercice de course volontaire entre nos deux premières études des Axes 1 et 2 (**Tableau Bilan 1**). En effet, si chez la souris mdx, l'exercice de course volontaire à engendré une conversion vers des fibres plus lentes (au niveau transcriptionnel :

augmentation de l'expression de *Myh7* et *Tnni1* et diminution de l'expression de *Myh4* ; au niveau protéique : augmentation de la MHC-2x et diminution de la MHC-2b), c'est l'inverse qui s'est produit chez la souris D2-mdx (au niveau protéique : augmentation de la MHC-2a et augmentation de la MHC-2x). Dans la littérature, un remodelage musculaire vers des fibres plus lentes après un exercice d'endurance est bien documenté dans les muscles squelettiques de rongeurs et d'humains en bonne santé, ainsi que chez la souris mdx (Allen et al., 2001; Landisch et al., 2008). Le remodelage musculaire dépend-t-il donc de la sévérité du modèle ? La différence observée entre l'axe 1 et l'axe 2 est-elle due à la quantité de km courus ou « pattern » de course des souris ?

À part cette étude, aucune ne s'est encore intéressée à l'effet de l'exercice d'endurance sur la spécification en type de fibre chez la souris D2-mdx. Enfin, dans l'axe 3, nous avons bien observé une conversion de fibres rapides à plus lentes chez les souris D2-mdx, que l'on retrouve habituellement chez les souris mdx après un exercice de résistance chronique (Ferry et al., 2015a; Joanne et al., 2012)

		Exercice d'endurance (Course volontaire) <i>Muscle étudié : tibialis anterior</i>	Exercice de résistance (OVL) <i>Muscle étudié : plantaris</i>
mdx	Fonction musculaire	P0 = sP0 = Fragilité ↓	P0 ↑ sP0 ↑ Résistance à la fatigue ↑ Fragilité ND
	Dommages musculaires	ND dans cette étude	MEC ↓ Fibres centro-nuclées =
	Remodelage musculaire	Masse ↓ Nombre de fibre = Diamètre des fibres = Pas de conversion des types de fibres rapide à lent	Masse ↑ Nombre de fibre = Diamètre des fibres ↑ Conversion des types de fibres rapide à lent (MHC2b ↓, MHC2a ↑ et MHC1 ↑)

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES - Discussion générale

D2-mdx	Fonction musculaire	P0 = sP0 ↑ Fragilité ND	P0 ↑ sP0 ↑ Résistance à la fatigue ↑ Fragilité ND
	Dommages musculaires	MEC = Fibres centro-nuclées =	MEC = Fibres centro-nuclées ↓
	Remodelage musculaire	Masse ↓ Nombre de fibre = Diamètre des fibres = Conversion des types de fibres lente à rapide (MHC2b =, MHC 2x ↑ et MHC2a ↓)	Masse ↑ Nombre de fibre = Diamètre des fibres ↑ Conversion des types de fibres rapide à lente (MHC2b ↓, MHC2a ↑ et MHC1 ↑)

Tableau Bilan 1 : Effets des différents types d'exercices chroniques (endurance et résistance) sur la fonction musculaire, les dommages musculaires et le remodelage musculaire dans des modèles murins plus ou moins sévères de DMD. ND : non déterminé, P0 : force maximale absolue, sP0 : force maximale spécifique, MEC : matrice extracellulaire.

I.7. L'EXERCICE PHYSIQUE CHRONIQUE COMBINÉ À UNE THÉRAPIE INDUIT DES EFFETS VARIABLES SELON LA THÉRAPIE GÉNIQUE (AXES 1, 2 ET 3)

L'association de l'exercice chronique d'endurance à une thérapie génique, quelle qu'elle soit, a des résultats assez mitigés sur la fonction musculaire à la fois dans un modèle modéré et sévère de DMD. En effet, d'une part, une course volontaire chronique combiné à une thérapie génique utilisant une stratégie de saut d'exon visant à restaurer la dystrophine (Axe 2) ne semble pas avoir d'effets sur la fonction musculaire d'un modèle murin sévère de DMD, alors que la diminution de la fragilité reste à être vérifiée (**Tableau Bilan 2**). D'autre part, la course volontaire chronique associée cette fois à une thérapie visant à améliorer la fonction musculaire diminue la fonction musculaire mais réduit d'un autre côté la fragilité d'un modèle murin modéré de DMD (**Tableau Bilan 2**). Ensemble ces résultats révèlent une complexité qui mériterait d'être beaucoup plus étudiée. Ils suggèrent l'intérêt de tester une autre forme de protocole d'exercice chronique que l'endurance combiné à une thérapie génique. De plus, ils invitent à tester la situation où la réalisation de l'exercice serait réalisée après l'utilisation d'une thérapie génique.

	AAV9-Prox1 (mdx)	AAV1-U7dex23 (D2-mdx)	
	Exercice d'endurance (Course volontaire) <i>Muscle étudié : tibialis anterior</i>	Exercice d'endurance (Course volontaire) <i>Muscle étudié : tibialis anterior</i>	Exercice de résistance (OVL) <i>Muscle étudié : tibialis antérieur</i>
Fonction musculaire	P0 ↓ sP0 = Fragilité ↓	P0 = sP0 = Fragilité ND	ND

Tableau Bilan 2 : Effets de la combinaison des différents types d'exercices (endurance et résistance) à différentes thérapies géniques (Prox1 et U7dex23) sur la fonction musculaire, les dommages musculaires et le remodelage musculaire dans des modèles murins plus ou moins sévères de DMD. ND : non déterminé, P0 : force maximale absolue, sP0 : force maximale spécifique, MEC : matrice extracellulaire.

II. Conclusion générale

Dans cette thèse nous avons mis en évidence le potentiel thérapeutique de différents types d'exercice physique chronique quand il est combiné ou non à d'autres traitements géniques dans le cas de modèles précliniques de DMD. Notre étude apporte aussi de nouvelles recommandations concernant les protocoles thérapeutiques qui pourraient être mis en place pour les patients, en montrant l'impact négatif potentiel de l'exercice physique sur l'efficacité d'une thérapie génique. À l'avenir, il serait intéressant de déterminer l'effet de l'exercice volontaire, une fois la restauration de la dystrophine faite (par exemple, un mois après l'injection de la thérapie), afin de déterminer l'éventuel effet bénéfique de l'exercice sur la fonction musculaire chez un muscle dystrophique présentant un niveau de dystrophine satisfaisant. Enfin, maintenant que nous avons montré que l'exercice en résistance chronique a un fort potentiel thérapeutique pour contrer la faiblesse musculaire, même dans un modèle sévère de DMD, il nous semble important de déterminer si ces effets bénéfiques peuvent être additif chez des souris préalablement traitées avec une thérapie génique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A-

Aartsma-Rus, A., Deutekom, J.C.T.V., Fokkema, I.F., Ommen, G.-J.B.V., and Dunnen, J.T.D. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144.

Aartsma-Rus, A., Fokkema, I., Verschuuren, J., Ginjaar, I., Deutekom, J. van, Ommen, G.-J. van, and Dunnen, J.T. den (2009). Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* 30, 293–299.

Aartsma-Rus, A., Ginjaar, I.B., and Bushby, K. (2016). The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.* 53, 145–151.

Agbulut, O., Li, Z., Mouly, V., and Butler-Browne, G.S. (1996). Analysis of skeletal and cardiac muscle from desmin knock-out and normal mice by high resolution separation of myosin heavy-chain isoforms. *Biol. Cell* 88, 131–135.

Aldrich, T.K., and Uhrlass, R.M. (1987). Weaning from mechanical ventilation: successful use of modified inspiratory resistive training in muscular dystrophy. *Crit. Care Med.* 15, 247–249.

Allard, B. (2018). From excitation to intracellular Ca²⁺ movements in skeletal muscle: Basic aspects and related clinical disorders. *Neuromuscul. Disord. NMD* 28, 394–401.

Allen, D.L., Harrison, B.C., Maass, A., Bell, M.L., Byrnes, W.C., and Leinwand, L.A. (2001). Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 90, 1900–1908.

Al-Rewashdy, H., Ljubicic, V., Lin, W., Renaud, J.-M., and Jasmin, B.J. (2015). Utrophin A is essential in mediating the functional adaptations of mdx mouse muscle following chronic AMPK activation. *Hum. Mol. Genet.* 24, 1243–1255.

Amann, K.J., Renley, B.A., and Ervasti, J.M. (1998). A Cluster of Basic Repeats in the Dystrophin Rod Domain Binds F-actin through an Electrostatic Interaction *. *J. Biol. Chem.* 273, 28419–28423.

Ansved, T. (2001). Muscle training in muscular dystrophies. *Acta Physiol. Scand.* 171, 359–366.

Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754–755.

-B-

Baltgalvis, K.A., Jaeger, M.A., Fitzsimons, D.P., Thayer, S.A., Lowe, D.A., and Ervasti, J.M. (2011). Transgenic overexpression of γ -cytoplasmic actin protects against eccentric contraction-induced force loss in mdx mice. *Skelet. Muscle* 1, 32.

Baltgalvis, K.A., Call, J.A., Cochrane, G.D., Laker, R.C., Yan, Z., and Lowe, D.A. (2012). Exercise Training Improves Plantar Flexor Muscle Function in mdx Mice. *Med. Sci. Sports Exerc.* 44, 1671–1679.

Barthélémy, F., and Wein, N. (2018). Personalized gene and cell therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 28, 803–824.

Baumann, C.W., Warren, G.L., and Lowe, D.A. (2020). Plasmalemma Function Is Rapidly Restored in Mdx Muscle after Eccentric Contractions. *Med. Sci. Sports Exerc.* 52, 354–361.

Bengtsson, N.E., Hall, J.K., Odom, G.L., Phelps, M.P., Andrus, C.R., Hawkins, R.D., Hauschka, S.D., Chamberlain, J.R., and Chamberlain, J.S. (2017). Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* 8, 14454.

Binkhorst, R.A., and 't Hof MA van, null (1973). Force-velocity relationship and contraction time of the rat fast plantaris muscle due to compensatory hypertrophy. *Pflugers Arch.* 342, 145–158.

Bonaldo, P., and Sandri, M. (2013). Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* 6, 25–39.

Booth, F.W., and Thomason, D.B. (1991). Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol. Rev.* 71, 541–585.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bowles, D., McPhee, S., Li, C., Gray, S., Jade, J., Camp, A., Le, C., Wang, B., Monahan, P., Rabinowitz, J., et al. (2011). Phase 1 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy Using a Translational Optimized AAV Vector. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 443–455.

Brereton, D., Plochocki, J., An, D., Costas, J., and Simons, E. (2012). The Effects of Glucocorticoid and Voluntary Exercise Treatment on the Development of Thoracolumbar Kyphosis in Dystrophin-Deficient Mice. *PLoS Curr.* 4, e4ffdf160de8b.

Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 1189–1192.

Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D.J., Case, L.E., Clemens, P.R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., et al. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 9, 77–93.

-C-

Call, J.A., Voelker, K.A., Wolff, A.V., McMillan, R.P., Evans, N.P., Hulver, M.W., Talmadge, R.J., and Grange, R.W. (2008). Endurance capacity in maturing mdx mice is markedly enhanced by combined voluntary wheel running and green tea extract. *J. Appl. Physiol.* 105, 923–932.

Call, J.A., McKeehen, J.N., Novotny, S.A., and Lowe, D.A. (2010). Progressive resistance voluntary wheel running in the mdx mouse. *Muscle Nerve* 42, 871–880.

Call, J.A., Warren, G.L., Verma, M., and Lowe, D.A. (2013). Acute failure of action potential conduction in mdx muscle reveals new mechanism of contraction-induced force loss. *J. Physiol.* 591, 3765–3776.

Capogrosso, R.F., Mantuano, P., Cozzoli, A., Sanarica, F., Massari, A.M., Conte, E., Fonzino, A., Giustino, A., Rolland, J.-F., Quaranta, A., et al. (2017). Contractile efficiency of dystrophic mdx mouse muscle: in vivo and ex vivo assessment of adaptation to exercise of functional end points. *J. Appl. Physiol.* 122, 828–843.

Carter, G.T., Wineinger, M.A., Walsh, S.A., Horasek, S.J., Abresch, R.T., and Fowler, W.M. (1995). Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse. *Neuromuscul. Disord.* *5*, 323–332.

Chakkalakal, J.V., Harrison, M.-A., Carbonetto, S., Chin, E., Michel, R.N., and Jasmin, B.J. (2004). Stimulation of calcineurin signaling attenuates the dystrophic pathology in mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 379–388.

Chalkiadaki, A., Igarashi, M., Nasamu, A.S., Knezevic, J., and Guarente, L. (2014). Muscle-specific SIRT1 gain-of-function increases slow-twitch fibers and ameliorates pathophysiology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *PLoS Genet.* *10*, e1004490.

Chamberlain, J.R., and Chamberlain, J.S. (2017). Progress toward Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* *25*, 1125–1131.

Chamberlain, J.S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D., and Faulkner, J.A. (2007). Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J.* *21*, 2195–2204.

Chapman, V.M., Miller, D.R., Armstrong, D., and Caskey, C.T. (1989). Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 1292–1296.

Chaussonot, R. (2020). Neurobiologie des troubles cognitifs des modèles murins de la myopathie de Duchenne. 225.

Chin, E.R., Olson, E.N., Richardson, J.A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J.M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (1998a). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* *12*, 2499–2509.

Chin, E.R., Olson, E.N., Richardson, J.A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J.M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (1998b). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* *12*, 2499–2509.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Coley, W.D., Bogdanik, L., Vila, M.C., Yu, Q., Van Der Meulen, J.H., Rayavarapu, S., Novak, J.S., Nearing, M., Quinn, J.L., Saunders, A., et al. (2016). Effect of genetic background on the dystrophic phenotype in mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 25, 130–145.

Comim, C.M., Ventura, L., Freiburger, V., Dias, P., Bragagnolo, D., Dutra, M.L., Amaral, R.A., Camargo-Fagundes, A.L.S., Reis, P.A., Castro-Faria-Neto, H.C., et al. (2019). Neurocognitive Impairment in mdx Mice. *Mol. Neurobiol.* 56, 7608–7616.

Consolino, C.M., and Brooks, S.V. (2004). Susceptibility to sarcomere injury induced by single stretches of maximally activated muscles of mdx mice. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 96, 633–638.

Cordova, G., Negroni, E., Cabello-Verrugio, C., Mouly, V., and Trollet, C. (2018). Combined Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy to Optimize Treatment Efficacy. *Front. Genet.* 9, 114.

Coulton, G.R., Morgan, J.E., Partridge, T.A., and Sloper, J.C. (1988). THE mdx MOUSE SKELETAL MUSCLE MYOPATHY: I. A HISTOLOGICAL, MORPHOMETRIC AND BIOCHEMICAL INVESTIGATION. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 14, 53–70.

Cox, G.A., Phelps, S.F., Chapman, V.M., and Chamberlain, J.S. (1993). New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nat. Genet.* 4, 87–93.

Cunha, T.F., Moreira, J.B.N., Paixão, N.A., Campos, J.C., Monteiro, A.W.A., Bacurau, A.V.N., Bueno, C.R., Ferreira, J.C.B., and Brum, P.C. (2012). Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* 112, 1839–1846.

-D-

Danowski, B.A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J.M., and Sanger, J.W. (1992). Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* 118, 1411–1420.

Darras, B.T., Urion, D.K., and Ghosh, P.S. (2018). *Dystrophinopathies* (University of Washington, Seattle).

Deconinck, N., and Dan, B. (2007). Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatr. Neurol.* 36, 1–7.

Deconinck, N., Tinsley, J., De Backer, F., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Davies, K., and Gillis, J.M. (1997). Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat. Med.* 3, 1216–1221.

Delacroix, C., Hyzewicz, J., Lemaitre, M., Friguet, B., Li, Z., Klein, A., Furling, D., Agbulut, O., and Ferry, A. (2018). Improvement of Dystrophic Muscle Fragility by Short-Term Voluntary Exercise through Activation of Calcineurin Pathway in mdx Mice. *Am. J. Pathol.* 188, 2662–2673.

Delling, U., Tureckova, J., Lim, H.W., De Windt, L.J., Rotwein, P., and Molkentin, J.D. (2000). A Calcineurin-NFATc3-Dependent Pathway Regulates Skeletal Muscle Differentiation and Slow Myosin Heavy-Chain Expression. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6600–6611.

Dellorusso, C., Crawford, R.W., Chamberlain, J.S., and Brooks, S.V. (2001). Tibialis anterior muscles in mdx mice are highly susceptible to contraction-induced injury. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 22, 467–475.

Desguerre, I., and Laugel, V. (2015). Diagnostic et histoire naturelle de la dystrophie musculaire de Duchenne. *Arch. Pédiatrie* 22, 12S24-12S30.

Dick, J., and Vrbová, G. (1993). Progressive deterioration of muscles in mdx mice induced by overload. *Clin. Sci.* 84, 145–150.

Duan, D. (2018). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 26, 2337–2356.

Duchenne, G. (1868). De la Paralysie musculaire pseudo-hypertrophique, ou paralysie myo-sclérosique, par le Dr Duchenne (de Boulogne). 146.

Dumonceaux, J., Marie, S., Beley, C., Trollet, C., Vignaud, A., Ferry, A., Butler-Browne, G., and Garcia, L. (2010). Combination of Myostatin Pathway Interference and Dystrophin Rescue Enhances Tetanic and Specific Force in Dystrophic mdx Mice. *Mol. Ther.* 18, 881–887.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dupont-Versteegden, E.E., McCarter, R.J., and Katz, M.S. (1994). Voluntary exercise decreases progression of muscular dystrophy in diaphragm of mdx mice. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 77, 1736–1741.

Dupont-Versteegden, E.E., Knox, M., Gurley, C.M., Houlé, J.D., and Peterson, C.A. (2002). Maintenance of muscle mass is not dependent on the calcineurin-NFAT pathway. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 282, C1387–C1395.

-E-

Eagle, M. (2002). Report on the Muscular Dystrophy Campaign workshop: Exercise in neuromuscular diseases Newcastle, January 2002. *Neuromuscul. Disord.* 12, 975–983.

Emery, A.E.H., Muntoni, F., and Quinlivan, R.C.M. (2015). *Duchenne Muscular Dystrophy* (OUP Oxford).

Erb, W.H. (1840-1921) (1884). *Traité d'électrothérapie / par le Dr W. Erb... ; traduit par le Dr Ad. Rueff,...* 683.

Ervasti, J.M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1772, 108–117.

van Essen, A.J., and de Visser, M. (2004). The natural history of Duchenne muscular dystrophy. Analysis of data from a Dutch survey and review of age related events. 23.

-F-

Faulkner, G., Lanfranchi, G., and Valle, G. (2001). Telethonin and Other New Proteins of the Z-Disc of Skeletal Muscle. *IUBMB Life* 51, 275–282.

Faulkner, J.A., Larkin, L.M., Claflin, D.R., and Brooks, S.V. (2007). Age-Related Changes in the Structure and Function of Skeletal Muscles. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 1091–1096.

Feher, J. (2017). Contractile Mechanisms in Skeletal Muscle. In *Quantitative Human Physiology (Second Edition)*, J. Feher, ed. (Boston: Academic Press), pp. 305–317.

Ferry, A. (1999). Performance et entraînement physiques et sportifs en force—vitesse (puissance). *Sci. Sports* 14, 115–129.

Ferry, A., Weill, B.L., and Rieu, M. (1990). Immunomodulations induced in rats by exercise on a treadmill. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 69, 1912–1915.

Ferry, A., Parlakian, A., Joanne, P., Fraysse, B., Mgrditchian, T., Roy, P., Furling, D., Butler-Browne, G., and Agbulut, O. (2015a). Mechanical Overloading Increases Maximal Force and Reduces Fragility in Hind Limb Skeletal Muscle from Mdx Mouse. *Am. J. Pathol.* 185, 2012–2024.

Ferry, A., Benchaouir, R., Joanne, P., Peat, R.A., Mougnot, N., Agbulut, O., and Butler-Browne, G. (2015b). Effect of voluntary physical activity initiated at age 7 months on skeletal hindlimb and cardiac muscle function in mdx mice of both genders. *Muscle Nerve* 52, 788–794.

Ferry, A., Messéant, J., Parlakian, A., Lemaitre, M., Roy, P., Delacroix, C., Lilienbaum, A., Hovhannisyanyan, Y., Furling, D., Klein, A., et al. (2020). Desmin prevents muscle wasting, exaggerated weakness and fragility, and fatigue in dystrophic mdx mouse. *J. Physiol.* 598, 3667–3689.

Flanagan, W.M., Corthésy, B., Bram, R.J., and Crabtree, G.R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352, 803–807.

Fosset, M., Jaimovich, E., Delpont, E., and Lazdunski, M. (1983). [3H]nitrendipine receptors in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 258, 6086–6092.

Franzini-Armstrong, C., and Protasi, F. (1997). Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* 77, 699–729.

Freundt, J.K., and Linke, W.A. (2019). Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control. *J. Appl. Physiol.* 126, 1474–1482.

Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif. Tissue Int.* 96, 183–195.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Fukada, S., Morikawa, D., Yamamoto, Y., Yoshida, T., Sumie, N., Yamaguchi, M., Ito, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., et al. (2010). Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes. *Am. J. Pathol.* 176, 2414–2424.

Fukada, S., Akimoto, T., and Sotiropoulos, A. (2020). Role of damage and management in muscle hypertrophy: Different behaviors of muscle stem cells in regeneration and hypertrophy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1867, 118742.

-G-

Ganong, W.F., and Jobin, M. (2012). *Physiologie médicale* (Bruxelles: De Boeck).

Gao, L., Balshaw, D., Xu, L., Tripathy, A., Xin, C., and Meissner, G. (2000). Evidence for a role of the luminal M3-M4 loop in skeletal muscle Ca(2+) release channel (ryanodine receptor) activity and conductance. *Biophys. J.* 79, 828–840.

Gao, Y., Arfat, Y., Wang, H., and Goswami, N. (2018). Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and Potential Countermeasures. *Front. Physiol.* 9, 235.

Gehrig, S.M., Ryall, J.G., Schertzer, J.D., and Lynch, G.S. (2008). Insulin-like growth factor-I analogue protects muscles of dystrophic mdx mice from contraction-mediated damage. *Exp. Physiol.* 93, 1190–1198.

Gehrig, S.M., Koopman, R., Naim, T., Tjoakarfa, C., and Lynch, G.S. (2010). Making fast-twitch dystrophic muscles bigger protects them from contraction injury and attenuates the dystrophic pathology. *Am. J. Pathol.* 176, 29–33.

Gianola, S., Pecoraro, V., Lambiase, S., Gatti, R., Banfi, G., and Moja, L. (2013). Efficacy of Muscle Exercise in Patients with Muscular Dystrophy: A Systematic Review Showing a Missed Opportunity to Improve Outcomes. *PLOS ONE* 8, e65414.

Gordish-Dressman, H., Willmann, R., Dalle Pазze, L., Kreibich, A., van Putten, M., Heydemann, A., Bogdanik, L., Lutz, C., Davies, K., Demonbreun, A.R., et al. (2018).

“Of Mice and Measures”: A Project to Improve How We Advance Duchenne Muscular Dystrophy Therapies to the Clinic. *J. Neuromuscul. Dis.* 5, 407–417.

Gordon, B.S., Lowe, D.A., and Kostek, M.C. (2014). Exercise increases utrophin protein expression in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 49, 915–918.

Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., and Danos, O. (2004a). Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science* 306, 1796–1799.

Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J.-C., Garcia, L., and Danos, O. (2004b). Le saut d'exon thérapeutique: un espoir pour les dystrophinopathies. *médecine/sciences* 20, 1163–1165.

Goyenvalle, A., Babbs, A., Wright, J., Wilkins, V., Powell, D., Garcia, L., and Davies, K.E. (2012). Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2559–2571.

Gregorevic, P., Blankinship, M.J., Allen, J.M., Crawford, R.W., Meuse, L., Miller, D.G., Russell, D.W., and Chamberlain, J.S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* 10, 828–834.

-H-

Hakim, C.H., Wasala, N.B., Pan, X., Kodippili, K., Yue, Y., Zhang, K., Yao, G., Haffner, B., Duan, S.X., Ramos, J., et al. (2017). A Five-Repeat Micro-Dystrophin Gene Ameliorated Dystrophic Phenotype in the Severe DBA/2J-mdx Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 6, 216–230.

Hamm, S.E., Fathalikhani, D.D., Bukovec, K.E., Addington, A.K., Zhang, H., Perry, J.B., McMillan, R.P., Lawlor, M.W., Prom, M.J., Vanden Avond, M.A., et al. (2021). Voluntary wheel running complements microdystrophin gene therapy to improve muscle function in mdx mice. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 21, 144–160.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hammers, D.W., Hart, C.C., Matheny, M.K., Wright, L.A., Armellini, M., Barton, E.R., and Sweeney, H.L. (2020). The D2. mdx mouse as a preclinical model of the skeletal muscle pathology associated with Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Rep.* *10*, 14070.

Hayes, A., and Williams, D.A. (1996). Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle. *J. Appl. Physiol.* *80*, 670–679.

Head, S.I., Williams, D.A., Stephenson, D.G., and Gage, P.W. (1992). Abnormalities in structure and function of limb skeletal muscle fibres of dystrophic mdx mice. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* *248*, 163–169.

Herzog, W. (2017). Skeletal muscle mechanics: questions, problems and possible solutions. *J. NeuroEngineering Rehabil.* *14*, 98.

Heydemann, A., Ceco, E., Lim, J.E., Hadhazy, M., Ryder, P., Moran, J.L., Beier, D.R., Palmer, A.A., and McNally, E.M. (2009). Latent TGF- β -binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3703–3712.

Himeda, C.L., Chen, X., and Hauschka, S.D. (2011). Design and Testing of Regulatory Cassettes for Optimal Activity in Skeletal and Cardiac Muscles. In *Muscle Gene Therapy: Methods and Protocols*, D. Duan, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 3–19.

Ho, P.P., Lahey, L.J., Mourkioti, F., Kraft, P.E., Filareto, A., Brandt, M., Magnusson, K.E.G., Finn, E.E., Chamberlain, J.S., Robinson, W.H., et al. (2018). Engineered DNA plasmid reduces immunity to dystrophin while improving muscle force in a model of gene therapy of Duchenne dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E9182–E9191.

Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. *10*.

Hoogaars, W.M.H., Mouisel, E., Pasternack, A., Hulmi, J.J., Relizani, K., Schuelke, M., Schirwis, E., Garcia, L., Ritvos, O., Ferry, A., et al. (2012). Combined effect of AAV-U7-induced dystrophin exon skipping and soluble activin Type IIB receptor in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* *23*, 1269–1279.

Hopkins, P.M. (2006). Skeletal muscle physiology. *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain* 6, 1–6.

Hourdé, C., Joanne, P., Medja, F., Mougnot, N., Jacquet, A., Mouisel, E., Pannerec, A., Hatem, S., Butler-Browne, G., Agbulut, O., et al. (2013). Voluntary Physical Activity Protects from Susceptibility to Skeletal Muscle Contraction–Induced Injury But Worsens Heart Function in mdx Mice. *Am. J. Pathol.* 182, 1509–1518.

Hovhannisyan, Y., Melikyan, G., Mougnot, N., Gao-Li, J., Friguet, B., Paulin, D., Li, Z., Ferry, A., and Agbulut, O. (2019). Effects of the selective inhibition of proteasome caspase-like activity by CLi a derivative of nor-cerpegin in dystrophic mdx mice. *PLOS ONE* 14, e0215821.

Hudson, A.L., Gandevia, S.C., and Butler, J.E. (2019). A Principle of Neuromechanical Matching for Motor Unit Recruitment in Human Movement. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 47, 157–168.

Hughes, D.C., Wallace, M.A., and Baar, K. (2015). Effects of aging, exercise, and disease on force transfer in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309, E1–E10.

Hyzewicz, J., Ruegg, U.T., and Takeda, S. (2015). Comparison of Experimental Protocols of Physical Exercise for mdx Mice and Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *J. Neuromuscul. Dis.* 2, 325–342.

-|-

Illesley, J.L., Sudol, M., and Winder, S.J. (2002). The WW domain: Linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell. Signal.* 14, 183–189.

Irving, M. (2017). Regulation of Contraction by the Thick Filaments in Skeletal Muscle. *Biophys. J.* 113, 2579–2594.

Ishizaki, M., Suga, T., Kimura, E., Shiota, T., Kawano, R., Uchida, Y., Uchino, K., Yamashita, S., Maeda, Y., and Uchino, M. (2008). Mdx respiratory impairment following fibrosis of the diaphragm. *Neuromuscul. Disord.* 18, 342–348.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-J-

Joanne, P., Hourdé, C., Ochala, J., Caudéran, Y., Medja, F., Vignaud, A., Mouisel, E., Hadj-Said, W., Arandel, L., Garcia, L., et al. (2012). Impaired Adaptive Response to Mechanical Overloading in Dystrophic Skeletal Muscle. *PLOS ONE* 7, e35346.

-K-

Kennedy, T.L., Moir, L., Hemming, S., Edwards, B., Squire, S., Davies, K., and Guiraud, S. (2017). Utrophin influences mitochondrial pathology and oxidative stress in dystrophic muscle. *Skelet. Muscle* 7, 22.

Kennedy, T.L., Guiraud, S., Edwards, B., Squire, S., Moir, L., Babbs, A., Odom, G., Golebiowski, D., Schneider, J., Chamberlain, J.S., et al. (2018). Micro-utrophin Improves Cardiac and Skeletal Muscle Function of Severely Affected D2/mdx Mice. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 11, 92–105.

Khairallah, R.J., Shi, G., Sbrana, F., Prosser, B.L., Borroto, C., Mazaitis, M.J., Hoffman, E.P., Mahurkar, A., Sachs, F., Sun, Y., et al. (2012). Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy. *Sci. Signal.* 5, ra56.

Khurana, T.S., and Davies, K.E. (2003). Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 379–390.

Kivelä, R., Salmela, I., Nguyen, Y.H., Petrova, T.V., Koistinen, H.A., Wiener, Z., and Alitalo, K. (2016). The transcription factor Prox1 is essential for satellite cell differentiation and muscle fibre-type regulation. *Nat. Commun.* 7.

Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* 265, 4560–4566.

Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–228.

Korenbaum, E., and Rivero, F. (2002). Calponin homology domains at a glance. *J. Cell Sci.* 115, 3543–3545.

Kosir, A.M., Mader, T.L., Greising, A.G., Novotny, S.A., Baltgalvis, K.A., and Lowe, D.A. (2015). Influence of Ovarian Hormones on Strength Loss in Healthy and Dystrophic Female Mice. *Med. Sci. Sports Exerc.* 47, 1177–1187.

Kunkel, L.M. (1986). Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 322, 73–77.

Kurz, L., Sj, M., P, S., Sm, P., and J, L. (1983). Correlation of scoliosis and pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr. Orthop.* 3, 347–353.

-L-

Landisch, R.M., Kosir, A.M., Nelson, S.A., Baltgalvis, K.A., and Lowe, D.A. (2008). Adaptive and nonadaptive responses to voluntary wheel running by mdx mice. *Muscle Nerve* 38, 1290–1293.

Larson, C.M., and Henderson, R.C. (2000). Bone Mineral Density and Fractures in Boys with Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Pediatr. Orthop.* 20, 71.

Leyva-Leyva, M., Sandoval, A., Felix, R., and González-Ramírez, R. (2018). Biochemical and Functional Interplay Between Ion Channels and the Components of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex. *J. Membr. Biol.* 251, 535–550.

Li, D., Long, C., Yue, Y., and Duan, D. (2009). Sub-physiological sarcoglycan expression contributes to compensatory muscle protection in mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 1209–1220.

Li, L., Xiong, W.-C., and Mei, L. (2018). Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu. Rev. Physiol.* 80, 159–188.

Lindsay, A., Larson, A.A., Verma, M., Ervasti, J.M., and Lowe, D.A. (2019a). Isometric resistance training increases strength and alters histopathology of dystrophin-deficient mouse skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 126, 363–375.

Lindsay, A., Southern, W.M., McCourt, P.M., Larson, A.A., Hodges, J.S., Lowe, D.A., and Ervasti, J.M. (2019b). Variable cytoplasmic actin expression impacts the sensitivity of different dystrophin-deficient mdx skeletal muscles to eccentric contraction. *FEBS J.* 286, 2562–2576.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lindsay, A., Baumann, C.W., Rebbeck, R.T., Yuen, S.L., Southern, W.M., Hodges, J.S., Cornea, R.L., Thomas, D.D., Ervasti, J.M., and Lowe, D.A. (2020). Mechanical factors tune the sensitivity of mdx muscle to eccentric strength loss and its protection by antioxidant and calcium modulators. *Skelet. Muscle* 10, 3.

Ljubicic, V., Miura, P., Burt, M., Boudreault, L., Khogali, S., Lunde, J.A., Renaud, J.-M., and Jasmin, B.J. (2011). Chronic AMPK activation evokes the slow, oxidative myogenic program and triggers beneficial adaptations in mdx mouse skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3478–3493.

Long, C., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Mireault, A.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 345, 1184–1188.

Long, C., Amoasii, L., Mireault, A.A., McAnally, J.R., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Bhattacharyya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* 351, 400–403.

Lynch, G.S., Hinkle, R.T., Chamberlain, J.S., Brooks, S.V., and Faulkner, J.A. (2001). Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *J. Physiol.* 535, 591–600.

-M-

Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., Lewis, S., Shilling, C.J., Kota, J., Serrano-Munuera, C., et al. (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 67, 771–780.

Mariot, V., Le Guiner, C., Barthélémy, I., Montus, M., Blot, S., Torelli, S., Morgan, J., Muntoni, F., Voit, T., and Dumonceaux, J. (2020). Myostatin Is a Quantifiable Biomarker for Monitoring Pharmaco-gene Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 18, 415–421.

Matsakas, A., Yadav, V., Lorca, S., and Narkar, V. (2013). Muscle ERR γ mitigates Duchenne muscular dystrophy via metabolic and angiogenic reprogramming. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 27, 4004–4016.

Matsumura, C.Y., Taniguti, A.P.T., Pertille, A., Santo Neto, H., and Marques, M.J. (2011). Stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in mdx mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301, C1344-1350.

Mattila, P.S., Ullman, K.S., Fiering, S., Emmel, E.A., McCutcheon, M., Crabtree, G.R., and Herzenberg, L.A. (1990). The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J.* 9, 4425–4433.

Mayeuf-Louchart, A., Hardy, D., Thorel, Q., Roux, P., Gueniot, L., Briand, D., Mazeraud, A., Bouglé, A., Shorte, S.L., Staels, B., et al. (2018). MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skelet. Muscle* 8, 25.

McDonald, C.M., Meier, T., Voit, T., Schara, U., Straathof, C.S.M., D'Angelo, M.G., Bernert, G., Cuisset, J.-M., Finkel, R.S., Goemans, N., et al. (2016). Idebenone reduces respiratory complications in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 26, 473–480.

McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., and Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech.* 8, 195–213.

Mendell, J.R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., Bowles, D., Gray, S., Li, C., Galloway, G., et al. (2010). Dystrophin Immunity in Duchenne's Muscular Dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 363, 1429–1437.

Michel, R.N., Olha, A.E., and Gardiner, P.F. (1989). Influence of weight bearing on the adaptations of rat plantaris to ablation of its synergists. *J. Appl. Physiol.* 67, 636–642.

Miura, P., Chakkalakal, J.V., Boudreault, L., Bélanger, G., Hébert, R.L., Renaud, J.-M., and Jasmin, B.J. (2009). Pharmacological activation of PPAR β /delta stimulates

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

utrophin A expression in skeletal muscle fibers and restores sarcolemmal integrity in mature mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4640–4649.

Moens, P., Baatsen, P.H., and Maréchal, G. (1993). Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 14, 446–451.

Mokhtarian, A., Lefaucheur, J.P., Even, P.C., and Sebille, A. (1995). Effects of Treadmill Exercise and High-Fat Feeding on Muscle Degeneration in Mdx Mice at the time of Weaning. *Clin. Sci.* 89, 447–452.

Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95.

Muraine, L., Bensalah, M., Dhiab, J., Cordova, G., Arandel, L., Marhic, A., Chapart, M., Vasseur, S., Benkhelifa-Ziyyat, S., Bigot, A., et al. (2020). Transduction Efficiency of Adeno-Associated Virus Serotypes After Local Injection in Mouse and Human Skeletal Muscle. *Hum. Gene Ther.* 31, 233–240.

Murton, A.J., Constantin, D., and Greenhaff, P.L. (2008). The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1782, 730–743.

-N-

Nelson, C.E., Hakim, C.H., Ousterout, D.G., Thakore, P.I., Moreb, E.A., Rivera, R.M.C., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F.A., Yan, W.X., et al. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 351, 403–407.

Nigro, G., Comi, L.I., Politano, L., and Bain, R.J.I. (1990). The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int. J. Cardiol.* 26, 271–277.

-O-

Obermann, W.M.J., and al. (1996). The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 134, 1441–1453.

Olson, E.N., and Williams, R.S. (2000). Calcineurin Signaling and Muscle Remodeling. *Cell* 101, 689–692.

Olthoff, J.T., Lindsay, A., Abo-Zahrah, R., Baltgalvis, K.A., Patrinostrò, X., Belanto, J.J., Yu, D.-Y., Perrin, B.J., Garry, D.J., Rodney, G.G., et al. (2018). Loss of peroxiredoxin-2 exacerbates eccentric contraction-induced force loss in dystrophin-deficient muscle. *Nat. Commun.* 9, 5104.

-P-

Pastoret, C., and Sebillé, A. (1993). Quel avenir pour la souris mdx comme modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne ? *Médecine/Sciences* 9, 737.

Péréon, Y., Mercier, S., and Magot, A. (2015). [Duchenne muscular dystrophy pathophysiology]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Française Pédiatr.* 22, 12S18-23.

Petchey, L.K., Risebro, C.A., Vieira, J.M., Roberts, T., Bryson, J.B., Greensmith, L., Lythgoe, M.F., and Riley, P.R. (2014). Loss of Prox1 in striated muscle causes slow to fast skeletal muscle fiber conversion and dilated cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 9515–9520.

Petrof, B.J. (1998). The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Cell. Biochem.* 179, 111–124.

Ponting, C.P. (1996). Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: Binding partners of SH3 domains? *Protein Sci.* 5, 2353–2357.

-Q-

Quattrocelli, M., Capote, J., Ohiri, J.C., Warner, J.L., Vo, A.H., Earley, J.U., Hadhazy, M., Demonbreun, A.R., Spencer, M.J., and McNally, E.M. (2017). Genetic modifiers of

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

muscular dystrophy act on sarcolemmal resealing and recovery from injury. *PLoS Genet.* *13*.

Quinlan, J.G., Hahn, H.S., Wong, B.L., Lorenz, J.N., Wensch, A.S., and Levin, L.S. (2004). Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul. Disord. NMD* *14*, 491–496.

-R-

Rao, A., Luo, C., and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* *15*, 707–747.

Reid, M.B. (2005). Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *288*, R1423–R1431.

Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M.T., Espanel, X., and Sudol, M. (1999). The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol. Chem.* *380*, 431–442.

Ríos, E., Gillespie, D., and Franzini-Armstrong, C. (2019). The binding interactions that maintain excitation–contraction coupling junctions in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* *151*, 593–605.

Rivas-Pardo, J.A., Eckels, E.C., Popa, I., Kosuri, P., Linke, W.A., and Fernández, J.M. (2016). Work Done by Titin Protein Folding Assists Muscle Contraction. *Cell Rep.* *14*, 1339–1347.

Rodrigues, M., Echigoya, Y., Maruyama, R., Lim, K.R.Q., Fukada, S., and Yokota, T. (2016a). Impaired regenerative capacity and lower revertant fibre expansion in dystrophin-deficient mdx muscles on DBA/2 background. *Sci. Rep.* *6*, 38371.

Rodrigues, M., Echigoya, Y., Fukada, S., and Yokota, T. (2016b). Current Translational Research and Murine Models For Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Neuromuscul. Dis.* *3*, 29–48.

Rosenberg, A.S., Puig, M., Nagaraju, K., Hoffman, E.P., Villalta, S.A., Rao, V.A., Wakefield, L.M., and Woodcock, J. (2015). Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* *7*, 299rv4.

Roy, R.R., and Edgerton, V.R. (1995). Response of mouse plantaris muscle to functional overload: comparison with rat and cat. *Comp Biochem Physiol Physiol* 111, 569–575.

Roy, P., Rau, F., Ochala, J., Messéant, J., Fraysse, B., Lainé, J., Agbulut, O., Butler-Browne, G., Furling, D., and Ferry, A. (2016). Dystrophin restoration therapy improves both the reduced excitability and the force drop induced by lengthening contractions in dystrophic mdx skeletal muscle. *Skelet. Muscle* 6, 23.

Roy, S., Wolff, C., and Ingham, P.W. (2001). The u-boot mutation identifies a Hedgehog-regulated myogenic switch for fiber-type diversification in the zebrafish embryo. *Genes Dev.* 15, 1563–1576.

Rüegg, M.A., and Glass, D.J. (2011). Molecular mechanisms and treatment options for muscle wasting diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 373–395.

-S-

Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S., Pomerantz, J.H., Artandi, S.E., et al. (2010). Short Telomeres and Stem Cell Exhaustion Model Duchenne Muscular Dystrophy in mdx/mTR Mice. *Cell* 143, 1059–1071.

Sacco, P., Jones, D.A., Dick, J.R., and Vrbová, G. (1992). Contractile properties and susceptibility to exercise-induced damage of normal and mdx mouse tibialis anterior muscle. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 82, 227–236.

Sander, M., Chavoshan, B., Harris, S.A., Iannaccone, S.T., Stull, J.T., Thomas, G.D., and Victor, R.G. (2000). Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13818–13823.

Schertzer, J.D., Ryall, J.G., and Lynch, G.S. (2006). Systemic administration of IGF-I enhances oxidative status and reduces contraction-induced injury in skeletal muscles of mdx dystrophic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E499-505.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Schiaffino, S., and Reggiani, C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 77, 493–501.

Selsby, J.T., Morine, K.J., Pendrak, K., Barton, E.R., and Sweeney, H.L. (2012). Rescue of Dystrophic Skeletal Muscle by PGC-1 α Involves a Fast to Slow Fiber Type Shift in the mdx Mouse. *PLoS ONE* 7.

Selsby, J.T., Acosta, P., Sleeper, M.M., Barton, E.R., and Sweeney, H.L. (2013). Long-term wheel running compromises diaphragm function but improves cardiac and plantarflexor function in the mdx mouse. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 115, 660–666.

Shimizu-Motohashi, Y., Komaki, H., Motohashi, N., Takeda, S., Yokota, T., and Aoki, Y. (2019). Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status of Therapeutic Approaches. *J. Pers. Med.* 9, 1.

Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A.S., Barnard, E.A., Darlison, M.G., and Barnard, P.J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* 244, 1578–1580.

Skalsky, A.J., and McDonald, C.M. (2012). PREVENTION AND MANAGEMENT OF LIMB CONTRACTURES IN NEUROMUSCULAR DISEASES. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 23, 675–687.

Slater, C.R. (2017). The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2183.

Spaulding, H.R., and Selsby, J.T. (2018). Is Exercise the Right Medicine for Dystrophic Muscle? *Med. Sci. Sports Exerc.* 50, 1723–1732.

Spaulding, H.R., Quindry, T., Quindry, J.C., and Selsby, J.T. (2020). Nutraceutical and pharmaceutical cocktails did not preserve diaphragm muscle function or reduce muscle damage in D2-mdx mice. *Exp. Physiol.* 105, 989–999.

Spencer, M.J., and Mellgren, R.L. (2002). Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2645–2655.

Spencer, M.J., Croall, D.E., and Tidball, J.G. (1995). Calpains Are Activated in Necrotic Fibers from mdx Dystrophic Mice *. *J. Biol. Chem.* 270, 10909–10914.

Stantzou, A., Relizani, K., Morales-Gonzalez, S., Gallen, C., Grassin, A., Ferry, A., Schuelke, M., and Amthor, H. (2021). Extracellular matrix remodelling is associated with muscle force increase in overloaded mouse plantaris muscle. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 47, 218–235.

Straub, V., Rafael, J.A., Chamberlain, J.S., and Campbell, K.P. (1997). Animal Models for Muscular Dystrophy Show Different Patterns of Sarcolemmal Disruption. *J. Cell Biol.* 139, 375–385.

Stupka, N., Plant, D.R., Schertzer, J.D., Emerson, T.M., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., and Lynch, G.S. (2006). Activated calcineurin ameliorates contraction-induced injury to skeletal muscles of mdx dystrophic mice. *J. Physiol.* 575, 645–656.

Stupka, N., Schertzer, J.D., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., and Lynch, G.S. (2008). Stimulation of calcineurin $\text{A}\alpha$ activity attenuates muscle pathophysiology in mdx dystrophic mice. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R983–R992.

Sussman, M. (2002). Duchenne Muscular Dystrophy. *JAAOS - J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 10, 138–151.

Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H., and Ozawa, E. (1992). Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett.* 308, 154–160.

Swaggart, K.A., Demonbreun, A.R., Vo, A.H., Swanson, K.E., Kim, E.Y., Fahrenbach, J.P., Holley-Cuthrell, J., Eskin, A., Chen, Z., Squire, K., et al. (2014). Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6004–6009.

-T-

Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J.K.W., Chew, W.L., Widrick, J.J., Yan, W.X., Maesner, C., Wu, E.Y., Xiao, R., Ran, F.A., et al. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* 351, 407–411.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Taillandier, D., Combaret, L., Pouch, M.-N., Samuels, S.E., Béchet, D., and Attaix, D. (2004). The role of ubiquitin–proteasome-dependent proteolysis in the remodelling of skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.* 63, 357–361.

Takekura, H., Lino, M., Takekura, H., Nishi, M., Kuno, J., Minowa, O., Takano, H., and Noda, T. (1994). Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 369, 556–559.

Terada, M., Kawano, F., Ohira, T., Nakai, N., Nishimoto, N., and Ohira, Y. (2012). Effects of Mechanical Over-Loading on the Properties of Soleus Muscle Fibers, with or without Damage, in Wild Type and Mdx Mice. *PLOS ONE* 7, e34557.

-V-

Vaillend, C., Billard, J.-M., and Laroche, S. (2004). Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmdmdx mouse. *Neurobiol. Dis.* 17, 10–20.

Venugopal, V., and Pavlakis, S. (2021). Duchenne Muscular Dystrophy. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.

Verhaart, I.E.C., and Aartsma-Rus, A. (2019). Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 373–386.

Vohra, R., Batra, A., Forbes, S.C., Vandenborne, K., and Walter, G.A. (2017). Magnetic Resonance Monitoring of Disease Progression in mdx Mice on Different Genetic Backgrounds. *Am. J. Pathol.* 187, 2060–2070.

-W-

Wagner, K.R., Fleckenstein, J.L., Amato, A.A., Barohn, R.J., Bushby, K., Escolar, D.M., Flanigan, K.M., Pestronk, A., Tawil, R., Wolfe, G.I., et al. (2008). A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 63, 561–571.

- Waisman, A., Norris, A., Costa, M.E., and Kopinke, D. (2021). Automatic and unbiased segmentation and quantification of myofibers in skeletal muscle. *BioRxiv* 2021.01.20.427432.
- Wang, B., Li, J., and Xiao, X. (2000). Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 13714–13719.
- Watchko, J.F., O'Day, T.L., and Hoffman, E.P. (2002). Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models. *J. Appl. Physiol.* 93, 407–417.
- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., et al. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87–91.
- Weller, B., Karpati, G., and Carpenter, S. (1990). Dystrophin-deficient mdx muscle fibers are preferentially vulnerable to necrosis induced by experimental lengthening contractions. *J. Neurol. Sci.* 100, 9–13.
- Whitehead, N.P., Yeung, E.W., Froehner, S.C., and Allen, D.G. (2010). Skeletal Muscle NADPH Oxidase Is Increased and Triggers Stretch-Induced Damage in the mdx Mouse. *PLOS ONE* 5, e15354.
- Wigle, J.T., and Oliver, G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98, 769–778.
- Wilson, J.M., Loenneke, J.P., Jo, E., Wilson, G.J., Zourdos, M.C., and Kim, J.-S. (2012). The Effects of Endurance, Strength, and Power Training on Muscle Fiber Type Shifting. *J. Strength Cond. Res.* 26, 1724–1729.
- Wineinger, M.A., Abresch, R.T., Walsh, S.A., and Carter, G.T. (1998). EFFECTS OF AGING AND VOLUNTARY EXERCISE ON THE FUNCTION OF DYSTROPHIC MUSCLE FROM mdx MICE. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 77, 20–27.
- Wu, Z., Asokan, A., and Samulski, R.J. (2006). Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol. Ther.* 14, 316–327.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-X-

Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S.C., McCullough, B., Gao, G., and Wilson, J.M. (1999). Gene Therapy Vectors Based on Adeno-Associated Virus Type 1. *J. Virol.* 73, 3994–4003.

-Y-

Yang, Y., Haecker, S.E., Su, Q., and Wilson, J.M. (1996). Immunology of gene therapy with adenoviral vectors in mouse skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1703–1712.

Yiu, E.M., and Kornberg, A.J. (2015). Duchenne muscular dystrophy. *J. Paediatr. Child Health* 51, 759–764.

-Z-

Zalk, R., Clarke, O.B., des Georges, A., Grassucci, R.A., Reiken, S., Mancina, F., Hendrickson, W.A., Frank, J., and Marks, A.R. (2015). Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature* 517, 44–49.

Zelikovich, A.S., Quattrocelli, M., Salamone, I.M., Kuntz, N.L., and McNally, E.M. (2019). Moderate exercise improves function and increases adiponectin in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *Sci. Rep.* 9, 5770.

Titre : Effet de l'exercice physique, combiné ou non à une thérapie génique, sur la fonction musculaire de modèles murins de dystrophie musculaire de Duchenne

Mots clés : Muscle squelettique – Exercice physique – Thérapie génique – D2-mdx - mdx

Résumé : La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie neuromusculaire causée par des mutations du gène DMD codant la dystrophine, une protéine essentielle à l'intégrité de la fibre du muscle squelettique. Son absence engendre une fragilité musculaire accrue lors de contractions intenses, ainsi qu'une faiblesse musculaire extrême (perte de force maximale...). À ce jour, il n'existe pas encore de traitement curatif, mais l'utilisation de plusieurs approches thérapeutiques combinées semble prometteuse. Dans cette thèse, nous avons testé l'idée que l'activité physique régulière pourrait être un moyen de diminuer les symptômes dystrophiques du muscle squelettique, notamment ceux en relation avec la fonction musculaire, dans des modèles murins de DMD.

Tout d'abord, nous avons évalué l'effet d'un exercice physique chronique d'endurance lorsqu'il est associé à la surexpression de Prox1, un facteur de transcription connu pour favoriser des fibres plus lentes dans un muscle sain, celles-ci étant décrites comme moins atteintes dans la DMD. Nous avons mis en évidence que cette combinaison permettait de diminuer la fragilité musculaire, chez la souris mdx, le modèle murin

classique de la DMD, et avait donc le potentiel d'arrêter la progression de la pathologie, ce qui n'était pas le cas avec une approche symptomatique seule. Par la suite, nous avons regardé l'effet de l'exercice physique chronique d'endurance lorsqu'il est combiné à une thérapie génique, qui restaure l'expression de la dystrophine, chez la souris D2-mdx, un modèle sévère de DMD. Nous avons montré que l'exercice chronique d'endurance diminuait l'efficacité de la thérapie génique, en diminuant la restauration de la dystrophine. Enfin, nous avons caractérisé les effets de l'exercice physique chronique de résistance chez la souris D2-mdx. Nos résultats indiquent une amélioration très importante de la fonction musculaire en réponse à la surcharge mécanique, sans dommages musculaires évidents dans ce modèle sévère.

En conclusion, les résultats de cette thèse contribuent à une meilleure connaissance des effets variés et complexes des différents types d'exercice physiques chroniques dans différents modèles murins de DMD, et devraient donner des pistes pour améliorer les traitements de la DMD, en prenant en compte l'activité physique.

Title : Effect of exercise, combined or not with gene therapy, on muscle function in mice models of Duchenne muscular dystrophy

Keywords : Skeletal muscle – Physical exercise – Gene therapy– D2-mdx - mdx

Abstract : Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disease caused by mutations in the DMD gene encoding dystrophin, a protein essential for the integrity of the skeletal muscle fiber. Its absence causes increased muscle fragility during intense contractions, and extreme muscle weakness (loss of maximal strength...). Currently, there is no curative treatment, but the use of several combined therapeutic approaches seems promising. In this thesis, we tested the idea that regular physical activity could be a way to decrease dystrophic symptoms of skeletal muscle, especially those related to muscle function, in mice models of DMD.

First, we evaluated the effect of chronic endurance exercise when combined with overexpression of Prox1, a transcription factor known to promote slower fibers in healthy muscle, which are described as less affected in DMD. We demonstrated that this combination allowed to decrease muscle fragility in mdx mice, the classical mouse model of DMD, and thus had the potential to stop the progression of the disease, which was not the case with a symptomatic approach alone. Subsequently, we

were interested in the effect of chronic endurance exercise when combined with gene therapy, which restores dystrophin expression, in D2-mdx mouse, a severe model of DMD. We showed that chronic endurance exercise decreased the efficiency of the gene therapy, by decreasing the restoration of dystrophin. Finally, we characterized the effects of chronic resistance exercise in D2-mdx mice. Our results indicate an incredibly significant improvement in muscle function in response to mechanical overload, without obvious muscle damage in this severe model.

In conclusion, the results of this thesis contribute to a better understanding of the varied and complex effects of different types of chronic physical exercise in different mice models of DMD, and should provide new options for improving DMD treatments, considering physical activity.