



HAL
open science

Dérégulations de trafic de cholestérol et du système endolysosomal dans la myopathie de Duchenne : vers des approches thérapeutiques combinées

Abbass Jaber

► To cite this version:

Abbass Jaber. Dérégulations de trafic de cholestérol et du système endolysosomal dans la myopathie de Duchenne : vers des approches thérapeutiques combinées. Sciences pharmaceutiques. 2023. dumas-04569637

HAL Id: dumas-04569637

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04569637v1>

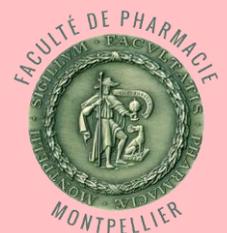
Submitted on 6 May 2024

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License



UNIVERSITE DE MONTPELLIER

UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Dérégulations de trafic de cholestérol et du système endolysosomal dans la myopathie de Duchenne : vers des approches thérapeutiques combinées

Thèse

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Montpellier en vue d'obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par

Abbass JABER

Soutenue le : 28/09/2023

Président : Mme Anne-Dominique LAJOIX, PharmD – PhD Professeur d'Université - UM

Assesseurs : M David ISRAELI, PhD

Chercheur - Généthon

Mme Evelyne GICQUEL, PhD

Chercheur - Généthon

M Serge BRAUN, PharmD-PhD

Directeur Scientifique - AFM-Téléthon

PREAMBULE

Le travail présenté dans cette thèse d'exercice s'inscrit dans le cadre de travaux de recherche d'un doctorat en sciences, menés au sein du laboratoire des 'Dystrophies Musculaires Progressives', dirigé par le Dr Isabelle Richard au Généthon.

Le Généthon est l'un des 3 laboratoires de l'AFM-Téléthon, une association de militants, malades et parents de malades concernés par les maladies génétiques rares, et surtout les maladies neuromusculaires. Créé en 1990 par l'Association française contre les myopathies, Généthon était l'un des premiers laboratoires à étudier le génome humain. Après avoir identifié des gènes responsables des maladies génétiques dans les années 90, les travaux du Généthon se sont focalisés sur le développement préclinique et clinique de médicaments de thérapie génique, avec un intérêt particulier pour les maladies neuromusculaires.

Aujourd'hui, le département de recherche et de développement héberge une unité Inserm (UMR_S951 - INTEGRARE), où est menée la recherche académique, et dans laquelle sont réalisés les travaux de cette thèse.

Notre équipe des 'Dystrophies Musculaires Progressives' s'intéresse tout particulièrement à l'étude et au développement de traitements innovants pour les dystrophies musculaires. Ces myopathies représentent un group hétérogène de maladies héréditaires (plus de 30 dystrophies), la plus connue et la plus fréquente étant la myopathie de Duchenne (ou Dystrophie Musculaire de Duchenne – DMD).

La DMD est une maladie génétique rare et débilitante qui affecte principalement les garçons dès leur plus jeune âge. Cette dystrophie musculaire provoque une dégénérescence progressive des muscles, entraînant une faiblesse musculaire sévère et une perte de la fonction motrice. La DMD est causée par des mutations dans le gène *DMD*, codant pour une protéine essentielle du muscle, la dystrophine. Les symptômes de la DMD sont souvent détectés dès le jeune âge, et la maladie a un impact significatif sur la qualité de vie des patients ainsi que sur leurs familles. Actuellement, les interventions médicales et thérapeutiques visent à atténuer les symptômes et à améliorer la qualité de vie des patients, mais il manque toujours de traitements curatifs. L'approche la plus prometteuse est la thérapie génique par microdystrophine, qui vise à restaurer l'expression d'une forme raccourcie mais fonctionnelle de la dystrophine.

Le projet présenté s'oriente autour de 2 axes majeurs : le premier est l'étude des mécanismes pathologiques encore mal compris dans la DMD, notamment les perturbations du métabolisme de cholestérol et du système endolysosomal dans le muscle. Le deuxième axe consiste à développer de nouvelles approches de thérapies combinées, associant la thérapie génique à des traitements complémentaires ciblant les dérégulations du métabolisme du cholestérol et du système endolysosomal.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr David Israeli, mon directeur de thèse, pour avoir encadré ce travail pendant les deux dernières années. Merci de m'avoir accordé tant de crédit pour mon travail et pour toujours m'avoir traité en tant que collègue. Nos discussions sont toujours enrichissantes et pleines d'ardeur scientifique.

Je souhaite également remercier le Dr. Isabelle Richard pour m'avoir donné l'opportunité de rejoindre son laboratoire pour mon stage de Master 2 et de continuer mon doctorat au sein de son équipe. Je suis reconnaissant pour ton support continu, sans lequel ce travail ne serait pas possible.

Je voudrais remercier les membres de mon jury d'avoir accepté ma demande. Je remercie le Pr Anne Lajoix d'avoir accepté de présider le jury, merci pour votre disponibilité et votre aide. Je suis reconnaissant au Dr. Evelyne Gicquel d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit. Merci Evelyne pour tous tes conseils et toutes nos discussions, c'est toujours tant enrichissant. Merci au Dr Serge Braun d'avoir accepté d'être membre du jury et d'évaluer mon travail.

Ensuite, je souhaite remercier de tout mon cœur la meilleure équipe, la DDC, qui m'a accueilli depuis plus de 2 ans. Un grand merci à Jérôme, mon premier mentor au labo, j'ai tellement appris à tes côtés et c'est toujours un grand plaisir de travailler avec toi. Merci à Célia, le couteau suisse de l'équipe, on sera perdu sans toi. Merci Ai, j'ai tellement appris de toi, merci pour tout ton aide et ta participation à ce projet. Merci à Laura, ma partenaire de labo et du doctorat, on n'a plus qu'un an ! Merci à Rania pour tout ton aide sur ce projet, c'était un plaisir de pouvoir travailler avec toi pendant ton stage. Merci à tous les autres membres de l'équipe, je suis reconnaissant pour toute votre aide et votre support : Sonia, Anthony, Evelyne, Valeria, Maxime, Nathalie, Laurence, Carinne, Marine, Eva, Auriane, Stephany, Melissa, Elise. Un grand merci également à tous les anciens membres de la DDC : Juliette, Fanny, Cynthia, Camille, Alan, Julie, Ariane.

Merci à l'ensemble du personnel de Généthon et tout particulièrement aux plateformes qui m'aident constamment dans mon travail. Merci à la plateforme d'évaluation préclinique, notamment Christophe, Emilie et Fanny pour votre aide en histologie ; Laetitia, Adeline, Béatrice, Romane et Guillaume pour votre aide en expérimentation animale. Je suis reconnaissant pour la plateforme d'imagerie pour leur aide sur ce projet. Merci Daniel, Jérémie, et Simon.

Merci à mes proches pour votre présence, votre soutien et tous nos bons moments ensemble : Rayan, Habib, Laura et Juliette. Merci à ma famille, ma force, pour leur soutien toutes ces années : mes parents, mes sœurs Solange, Ikram et Heba, mon frère et binôme de l'aventure en France Ali.

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE.....	3
REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES.....	12
LISTE DES TABLES.....	15
INTRODUCTION.....	16
I- Le muscle squelettique.....	16
I-1 Organisation générale du muscle.....	16
I-2 Structure et composition des myofibrilles.....	17
I-2-1 Les protéines.....	17
a) Les protéines contractiles.....	17
b) Les protéines régulatrices.....	18
c) Les protéines structurales.....	18
I-2-2 Le sarcomère.....	18
I-2-3 Les organelles.....	18
I-3 Les types de fibres musculaires.....	19
I-4 Physiologie d'activation musculaire : couplage excitation-contraction.....	20
I-5 Types d'actions musculaires.....	23
I-6 Mécanismes énergétiques musculaires.....	24
I-7 Cellules satellites et régénération musculaire.....	25
I-8 Fonctions du muscle : sarcopénie, exercice/inactivité et myopathies.....	26
I-8-1 Sarcopénie et atrophie musculaire.....	26
I-8-2 L'effet de l'exercice et l'inactivité physique sur la fonction musculaire.....	26
I-8-3 Les myopathies et l'atteinte de la fonction musculaire.....	26
I-9 Les dystrophies musculaires progressives.....	27
II- Dystrophie Musculaire de Duchenne : physiopathologie et approches thérapeutiques.....	30
II-1 Description de la maladie.....	30
II-2 Présentation Clinique.....	31

II-3 Origine génétique de la maladie : le gène <i>DMD</i> et la dystrophine	32
II-3-1 Le gène <i>DMD</i>	32
II-3-2 La dystrophine musculaire	32
II-4 Mécanisme et pathophysiologie de la DMD	35
II-4-1 Mécanismes pathologiques menant à la mort des cellules musculaires.....	36
a) Stress mécanique et fragilisation du sarcolemme.....	36
b) Dommages musculaires liés aux radicaux libres : Stress oxydatif et nitrosant	37
c) Perte de l'homéostasie calcique.....	38
d) Ischémie musculaire	39
e) Dysfonctionnements mitochondriaux	39
f) Défauts d'autophagie et perte d'homéostasie protéique	39
g) Dysfonctionnements lysosomaux dans la DMD	40
h) Perturbations du métabolisme des lipides et du cholestérol.....	41
II-4-2 Evènements survenant à la suite de la mort des fibres musculaires et contribuant à la progression de la maladie	41
a) Inflammation et réponse immunitaire	41
b) Régénération et épuisement du pool des cellules souches musculaires	42
c) Fibrose et dépôts adipeux dans le muscle	43
II-5 Prise en charge thérapeutique et traitements en développement	44
II-5-1 Prise en charge thérapeutique actuelle de la DMD	44
a) Traitements par glucocorticoïdes	44
b) Prise en charge respiratoire et cardiaque.....	44
c) Prise en charge d'autres troubles	45
II-5-2 Stratégies visant à la restauration de l'expression d'une forme de dystrophine fonctionnelle	45
a) Approches de sauts d'exons	45
b) Approches basées sur la translecture du codon stop.....	46
c) Approche de restauration de la dystrophine par transfert de gène.....	46
d) Approches d'éditions du génome par le système CRISPR-Cas9.....	53
OBJECTIFS	55
RESULTATS.....	58

I-	Caractérisation des défauts des lysosomes et du métabolisme du cholestérol dans le muscle dystrophique	58
I-1	Caractérisation des défauts lysosomaux dans le muscle	58
I-1-1	L'essai de 'puncta' de galectine-3 (<i>Galectin-3 Puncta Assay</i>).....	58
I-1-2	La perméabilisation de la membrane lysosomale altère la fonction des protéases lysosomales	59
I-2	La surexpression de Galectin-3 dans DMD et d'autres dystrophies musculaires corrèle avec des dommages du lysosome.....	60
I-3	Systèmes de contrôle de qualité des lysosomes.....	66
I-3-1	Voie TFEB de biogenèse lysosomale	67
I-3-2	Élimination des lysosomes endommagés : lysophagie	70
I-3-3	Réparation de la membrane lysosomale : voie ESCRT	72
I-4	Perturbations du métabolisme du cholestérol et son lien avec les défauts lysosomaux	73
I-4-1	Accumulation de cholestérol dans le muscle DMD.....	73
I-4-2	Accumulation de cholestérol dans les lysosomes de myotubes DMD.....	78
I-4-3	Une diète riche en cholestérol exacerbe le phénotype dystrophique chez des souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i> et augmente les dégâts lysosomaux.....	79
I-5	L'effet du transfert de gène sur la restauration des dérégulations du métabolisme du cholestérol et du système endolysosomal.....	83
II-	Le développement d'une approche de thérapie combinée pour la DMD	90
II-1	Développement d'un système de screening <i>in vitro</i> de molécules candidates pour thérapie combinée.....	91
II-2	Thérapie combinée chez les souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i>	96
	DISCUSSION	102
	CONCLUSION	109
	MATERIELS ET METHODES.....	111
I-	Expérimentation Animale.....	111
I-1	Évaluation de la fonction musculaire	111
I-1-1	Test d'échappement :.....	111
I-1-2	Test d'agrippement :.....	111
I-2	Prélèvements et Sacrifice.....	112
II-	Génération du vecteur AAV-microdystrophine.....	112
II-1	Construction microdystrophine	112

II-2	Production du vecteur AAV recombinant	112
III-	Culture cellulaire	113
III-1	Culture de cellules dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPS).....	113
III-2	Culture de myoblastes humains immortalisés	113
III-3	Détection de puncta de galectine-3 par traitement avec LLOMe	114
III-4	Essais de fluorescence <i>in vitro</i>	114
III-5	Criblage de drogues par efflux de cholestérol	115
IV-	Analyses moléculaires	115
IV-1	Extraction des protéines et Western Blot.....	115
IV-2	Extraction des ARN totaux et RT-qPCR	116
IV-3	Extraction ADN et quantification de VGCN.....	117
IV-4	Analyse de Lipidomique	117
IV-5	Quantification du cholestérol libre dans des biopsies musculaires.....	118
IV-6	Analyses de transcriptome.....	118
IV-7	Quantification de CK dans le sérum.....	118
IV-8	Quantification de fragments de MYOM3 par test ELISA.....	118
IV-9	Quantification de LGALS3 par test ELISA	119
V-	Histologie et Immunofluorescence	119
V-1	Colorations histochimiques.....	119
V-2	Immunohistochimie fluorescente	120
VI-	Statistiques et Analyses d'Images	121
	BIBLIOGRAPHIE.....	124

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AAP : *Assembly-activating protein* - protéine chaperonne d'assemblage

AAV : Adeno-associated virus - virus adéno-associé

AAVr : virus adéno-associé recombinant

ABD : *Actin-binding domain* - domaine de liaison à l'actine,

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

ADP : adénosine diphosphate

Akt : Protéine Kinase B

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

ASO : *antisense oligonucleotide* - oligonucléotide anti-sens

ATP : adénosine-triphosphate

B

BMD : Dystrophie Musculaire de Becker

Bp : *base pairs* - paire de bases

BSA : *Bovine serum albumin* - albumine de sérum bovin

C

Cas : protéines associées à CRISPR

CK : créatine kinase

CP : créatine phosphate

CR : *cysteine rich domain* - domaine riche en cystéine

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic* - courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées

D

DAGC : *dystrophin-associated glycoprotein complex* – Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DG : dystroglycane

DHP : dihydropyridine

DIA : diaphragme

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*

E

EC : excitation – contraction

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay* - dosage immuno-enzymatique

EMA : *European Medicines Agency* - agence européenne du médicament

EOPS : Exempt d'organisme pathogène spécifique

ESCRT : *endosomal sorting complex required for transport* – Complexe de tri endosomal nécessaire au transport

F

FAP: *fibro-adipogenic progenitors* - progéniteur fibro-adipogénique

FDA: *Food and Drug Administration*

FDB: muscle Flexor digitorum brevis

G

GA: muscle gastrocnémien

GRMD: *Golden Retriever muscular dystrophy*

H

HBSS : solution saline équilibrée de Hank

HDR: *homology directed repair*, recombinaison homologue

H&E: hématoxyline & éosine

HEK293: *human embryonic kidney 293*

I

IgG: Immunoglobulines G

iPSC: *induced pluripotent stem cells* – cellules souches pluripotentes induites

ITR: inverted-terminal repeat - répétition inversée terminale

K

Kb: kilobase

kDa: kilodalton

kg: kilogramme

L

LGMD : *Limb Girdle Muscular Dystrophy* – Dystrophie des ceintures

LLOMe : L-leucyl-L-leucine methyl ester

M

MAAP : protéine accessoire associée à la membrane

MAM : *Mitochondria-associated ER membranes* – membranes de RE associées aux mitochondries

MEC : matrice extracellulaire

MD : microdystrophine

MHC : *myosin heavy chain* – chaîne lourde de myosine

mPTP : *mitochondrial permeability transition pore* - pore de transition de perméabilité mitochondriale

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

MuSC: Muscle stem cells – cellules souches musculaires

MVB : *multivesicular bodies* - corps multivésiculaires

N

NF-κB : facteur nucléaire kappa B

NHEJ : *non-homologous end joining* - jonction d'extrémités non-homologues

nNOS : *neuronal nitric oxide synthase* - synthase neuronale de monoxyde d'azote

NOX2 : NADPH oxydase 2

NPDC : maladie de Niemann Pick de type C

NSAA : *North Star Ambulatory Assessment* – indice d'évaluation ambulatoire de la fonction motrice

O

ORF: *open reading frame*, origine de réplication

P

P : phosphate

PBS : *phosphate-buffered saline* - tampon phosphate salin

PCR : *Polymerase chain reaction* - réaction en chaîne par polymérase

PLA2 : phospholipase A2

PIC : *Protease Inhibitor Cocktail* - inhibiteur de protéases

PTC : *premature stop codon* – codon stop prématuré

Q

qPCR : *Quantitative polymerase chain reaction* , PCR en temps réel.

R

RE : réticulum endoplasmique

RIPA: *radio-immuno precipitation assay buffer*

RNS : *reactive nitrogen species* - espèces réactives de l'azote

ROS : *reactive oxygen species* - espèces réactives de l'oxygène

RS : réticulum sarcoplasmique

RT : *Reverse transcription* - transcription inverse

RT-qPCR : PCR en temps réel associée à une reverse transcription

RyR : récepteurs à la ryanodine

S

SA : *stretch-activated* - canaux activés par l'étirement

SERCA: *sarco-endoplasmic reticulum CA++ ATPase*

SG : sarcoglycane

SOC: *Store-operated calcium channels* -

Spc5.12 : promoteur synthétique c5.12

SREBP: *Sterol regulatory element binding proteins*

SVF : sérum de veau fœtal

T

TA : muscle tibial antérieur

TFEB : transcription Factor EB

TMRM : Tetramethylrhodamine

V

VG : *viral genome*, génomes viraux

VGCN : *viral genome copy number* - nombre de copies de vecteurs par noyau

VP : *viral protein*, protéine virale

W

WB: western blot

WT: *wild type*

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure du muscle et de la myofibrille.	17
Figure 2. Organisation de la triade dans le muscle squelettique et distribution des réseaux de mitochondries.....	19
Figure 3. Mécanismes de contraction musculaire.	22
Figure 4. Types d'actions musculaires.....	23
Figure 5. Régénération et réparation du muscle squelettique.....	26
Figure 6. Les différents types de myopathies..	27
Figure 7. Les protéines impliquées dans les dystrophies musculaires.....	29
Figure 8. Dessin d'un patient atteint de la myopathie de Duchenne, représenté par le docteur Guillaume-Benjamin Duchenne de Boulogne en 1868.....	30
Figure 9. Evolution clinique de la DMD.....	31
Figure 10. Structure et fonctions du gène DMD et de la dystrophine..	34
Figure 11. Mécanismes physiopathologiques des dystrophies musculaires.....	36
Figure 12. Perméabilisation des fibres musculaires dans un muscle dystrophique.	37
Figure 13. Génome de l'AAV sauvage et de l'AAV recombinant (AAVr)..	48
Figure 14. Production des AAVr par triple transfection.....	49
Figure 15 – Constructions de microdystrophine en expérimentation clinique.....	50
Figure 16. La localisation des constructions de microdystrophines en essai clinique au DAGC.	51
Figure 17. 'Galectin Puncta Assay' dans une lignée cellulaire myogénique..	59
Figure 18. La perméabilisation de la membrane du lysosome altère l'activité de la cathepsine B.	60
Figure 19. Galectine-3 est régulée à la hausse dans le muscle et le sérum de jeunes souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i> . 61	
Figure 20. Immunomarquage de LGALS3 et LAMP2 sur des coupes transversales de muscles TA chez des souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i> et WT.....	62
Figure 21. La surexpression de galectine-3 dans le muscle DMD est attribué en partie aux fibres musculaires.....	63
Figure 22. 'Galectin Puncta Assay' sur des coupes de muscles de tibialis cranialis de chiens DMD (Golden Retriever Muscle Dystrophy 'GRMD') et d'un chien sain de 6 mois.	64
Figure 23.' Galectin Puncta Assay' et marquage H&E sur des biopsies de muscles de patients DMD et de patients sains du même âge.....	65
Figure 24. 'Galectin Puncta Assay' et marquages H&E sur des biopsies musculaires d'un patient d'une dystrophie de ceinture (Gamma-Sarcoglycanopathie ou LGMDR5) et d'un patient de maladie de Pompe.	66
Figure 25. Activation de la voie TFEB dans le muscle des souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i>	68
Figure 26. Expression de protéines et gènes lysosomaux.....	69
Figure 27. Surrégulation de cathepsine B dans le muscle des souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i>	70
Figure 28. Co-immunomarquage de LC3B, LGALS3 et LAMP2 dans le muscle TA de souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i> et WT de 7 semaines.	71
Figure 29. Défaut du flux autophagique dans le muscle TA et le diaphragme de souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i>	72

Figure 30. Activation de la voie de réparation lysosomale ESCRT.	73
Figure 31. Accumulation de cholestérol dans le muscle DMD.	74
Figure 32. Accumulation de cholestérol libre dans des myotubes dérivés de cellules iPS de patient DMD.	75
Figure 33. Données transcriptomiques de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, chez des patients DMD et de modèles animaux.	76
Figure 34. Trafic intracellulaire du LDL-cholestérol.	77
Figure 35. Effets de l'accumulation de cholestérol dans le lysosome sur les voies de régulation du cholestérol.	78
Figure 36. Le cholestérol s'accumule spécifiquement dans les lysosomes de myotubes dérivés d'iPSC de patient DMD.....	79
Figure 37. Elargissement des lysosomes dans des myotubes DMD dérivés de cellules iPS.	79
Figure 38. Une diète riche en lipides et en cholestérol cause une accumulation de lipides dans le foie de souris WT et <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i>	80
Figure 39. La diète riche en cholestérol augmente la fibrose dans le GA et le diaphragme des souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i>	81
Figure 40. Le cholestérol est accumulé dans les lysosomes dans le muscle GA des souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i>	82
Figure 41. La diète riche en cholestérol augmente les dégâts lysosomaux.	83
Figure 42. Thérapie génique par AAV-microdystrophine chez des souris <i>Dmd^{mdx}</i>	84
Figure 43. Evaluation de l'entrée du vecteur AAVr dans le muscle et l'expression de la microdystrophine.	85
Figure 44. Evaluation de la force musculaire et de biomarqueurs circulants.	86
Figure 45. La thérapie génique avec la microdystrophine réduit la fibrose musculaire chez les souris <i>Dmd^{mdx}</i>	86
Figure 46. Restauration des dérégulations du cholestérol après transfert de microdystrophine.	88
Figure 47. La microdystrophine réduit légèrement les dégâts lysosomaux à haute dose.	90
Figure 48. Principe du système de criblage in vitro.	91
Figure 49. L'inhibition de NPC1 par U18666A induit une accumulation spécifique de cholestérol dans le lysosome de myoblastes.....	92
Figure 50. Le NBD-cholestérol s'accumule dans les lysosomes des myoblastes après traitement avec U18666A.....	93
Figure 51. Criblage de molécules éliminant le cholestérol des myoblastes humains.	94
Figure 52. Criblage de molécules éliminant le cholestérol des myotubes humains.....	95
Figure 53. Expérimentation d'une thérapie combinée chez les souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i>	96
Figure 54. La combinaison de la drogue X avec la thérapie génique n'influence pas le taux d'expression de la microdystrophine.....	97
Figure 55. Amélioration de la fonction musculaire et des biomarqueurs sériques chez les souris traitées avec la thérapie combinée.	98
Figure 56. La combinaison de la drogue X à l'AAV-microdystrophine chez les souris <i>Dmd^{mdx-4Cv}</i> restaure les paramètres histologiques du muscle au niveau des souris WT.....	99
Figure 57. La thérapie combinée réduit la fibrose dans le diaphragme et le GA.....	100
Figure 58. 'Galectin Puncta Assay' sur coupes transversales de TA.	101

Figure 59. Construction de microdystrophine utilisée dans les études in vivo. 112

LISTE DES TABLES

Tableau 1. Types et caractéristiques des différentes fibres musculaires.	20
Tableau 2. Les isoformes non musculaires de la dystrophine.	32
Tableau 3. Liste des médicaments approuvés par la FDA et basés sur des stratégies de sauts d'exons pour le traitement de la DMD.	46
Tableau 4. Essais cliniques en cours utilisant l'approche de transfert de microdystrophine par AAVr.	53
Tableau 5. Lignées cellulaires utilisées.	114
Tableau 6. Sondes utilisées pour les essais de fluorescence in vitro.	115
Tableau 7. Anticorps primaires utilisés en WB.	116
Tableau 8. Amorces d'oligonucléotides utilisées pour les essais de PCR quantitative par essais SYBR Green.	117
Tableau 9. Liste d'anticorps primaires utilisés pour les essais d'immunofluorescence.	121

INTRODUCTION

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie musculaire progressive et rare. C'est une maladie génétique récessive liée à l'X, affectant principalement les garçons dès le jeune âge, et causant une perte musculaire progressive. Elle touche principalement le muscle squelettique, ainsi que le muscle cardiaque au stade plus avancé de la maladie. Afin de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie et l'objectif du projet, une description du muscle squelettique sera faite dans une première partie de l'introduction, avant de présenter la dystrophie musculaire de Duchenne dans une seconde partie.

I- Le muscle squelettique

Représentant près de 40% de la masse corporelle ^[1], le muscle squelettique est l'un des tissus les plus dynamiques et élastiques du corps humain. Le tissu musculaire est composé principalement d'eau (75%), de protéines (20%) et d'autres composés tels que des sels, des minéraux, de graisse et de glucides ^[2]. Il contribue à plusieurs fonctions corporelles, à la fois métaboliques et mécaniques.

D'un point de vue mécanique, le muscle permet la conversion de l'énergie chimique en énergie mécanique, cela au travers de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate). Cette énergie mécanique permet la génération d'une force, la maintenance de la posture et l'exécution des mouvements physiques.

D'un point de vue métabolique, le muscle est un contributeur majeur au métabolisme énergétique basal. Il participe ainsi à la production de chaleur, nécessaire pour maintenir la température corporelle. Le tissu musculaire sert aussi particulièrement pour le stockage de nombreux métabolites, tels que les glucides et les acides aminés ^[2].

A travers son rôle de réservoir d'acides aminés, le muscle permet de garantir une synthèse protéique continue dans d'autres tissus et organes, comme le cerveau, le cœur, la peau et le foie. En période de jeûne, les acides aminés provenant du muscle permettent à la fois la synthèse protéique et la néoglucogenèse, assurant ainsi une homéostasie glucidique et protéique (protéostase) ^[3]. De ce fait, une détérioration de la fonction ou de la masse musculaire, notamment avec l'âge, pourraient altérer la protéostase ^[4] et causer l'accumulation d'agrégats protéiques.

Le muscle squelettique joue aussi un rôle primordial dans l'homéostasie du glucose et la résistance à l'insuline. En stockant près de 80% des glucides, principalement sous forme de glycogène ^[5] le muscle squelettique est essentiel pour la distribution du glucose. Il est stimulé par l'insuline, et est à lui-seul responsable de l'absorption de 80% du glucose en période post-prandiale ^{[6][7]}. De ce fait, des altérations de la fonction métabolique dans le muscle pourront avoir des effets sévères. La désensibilisation du muscle à l'insuline (insulino-résistance) est considérée comme le poinçon du syndrome métabolique, précurseur de prédiabète ^[8-10].

I-1 Organisation générale du muscle

Le muscle squelettique est caractérisé par une disposition bien définie de fibres musculaires associées par du tissu conjonctif. Une fibre musculaire fait environ 100 µm de diamètre et 1 cm de longueur, est délimitée par une membrane (le sarcolemme) et contient une solution aqueuse (le sarcoplasme). Chaque fibre

musculaire est enveloppée par du tissu conjonctif fin (endomysium). Les fibres sont groupées en faisceaux entourés d'un tissu conjonctif relativement lâche (pérимysium). Le rassemblement de ces faisceaux par un tissu conjonctif plus dense (épимysium) constitue le muscle. Les réseaux du tissu conjonctif s'unissent à chaque extrémité du muscle et forment le tissu conjonctif dense des tendons : ceux-ci sont fermement fixés à la couche externe de l'os et forment le lien mécanique entre muscle et os (**Figure 1**)^[11].

Ces fibres sont elles-mêmes composées d'environ 2000 myofibrilles, formant des cellules multinucléées de forme allongée et cylindrique.

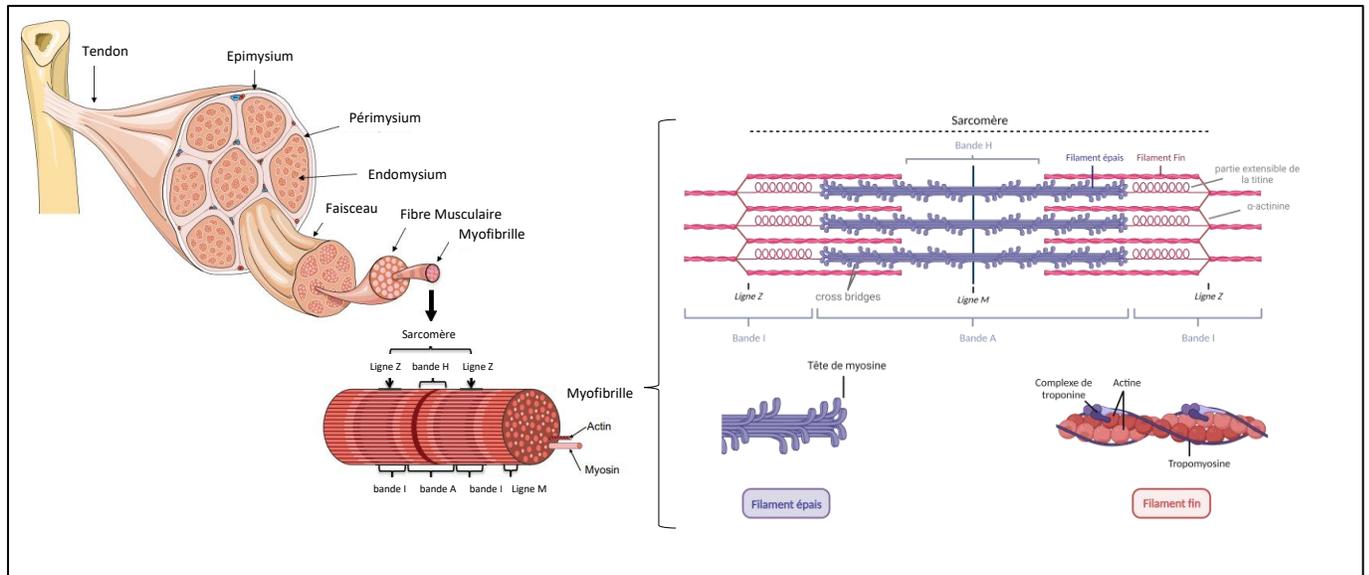


Figure 1. Structure du muscle et de la myofibrille. (Adapté de Bonetto et al., 2019)

I-2 Structure et composition des myofibrilles

I-2-1 Les protéines

Les fibres musculaires sont constituées principalement de protéines, à un niveau d'environ 80% de leur masse sèche ^[12]. Il existe 3 catégories principales de protéines musculaires : les protéines contractiles, les protéines régulatrices et les protéines structurelles.

a) Les protéines contractiles

Les deux protéines myofibrillaires les plus abondantes sont la myosine et l'actine, représentant environ 70-80% de la quantité totale de protéines dans une fibre musculaire ^[2].

- **La myosine** : c'est une protéine contractile, par sa capacité à hydrolyser l'ATP (activité ATPasique) ^[13]. Elle est composée de plusieurs chaînes : deux chaînes lourdes (*MHC : Myosin Heavy Chain*) et quatre chaînes légères. Environ 200 molécules de myosine s'associent de manière antiparallèle pour former un filament épais, avec les têtes de myosine se positionnant à l'extérieur du filament.

- **L'actine** : c'est une protéine globulaire qui se polymérise pour former deux chaînes hélicoïdales constituant la plus grande partie d'un filament fin. Elle forme avec la myosine un complexe appelé actomyosine, créant des ponts d'union (*crossbridges*) entre les deux structures.

b) Les protéines régulatrices

Les protéines régulatrices sont l'ensemble des protéines empêchant l'association permanente de l'actine à la myosine, inhibant ainsi la contraction musculaire, et acceptant le signal déclenchant la levée de cette inhibition. Les plus importantes sont :

- La **tropomyosine** : elle est délimitée par les deux chaînes d'actine, et elle bloque l'interaction entre la myosine et l'actine.
- Les **troponines** : situées à intervalle régulier le long des filaments fins. Il existe 3 sous-unités (TnI, TnC et TnT). TnC est capable de fixer le calcium, provoquant le déplacement des protéines régulatrices vers le centre du filament fin, libérant ainsi le site réactionnel de l'actine pour la myosine.

c) Les protéines structurales

D'autres protéines structurales participent à l'organisation et la stabilité des myofibrilles, parmi lesquelles l'**alpha actinine** qui délimite le sarcomère ; la **nébuline** qui se lie aux filaments d'actine et régule leur longueur, la **desmine et la vimentine** qui forment les filaments intermédiaires et participent à l'intégrité de la fibre musculaire et la transmission de la force, la **titine** qui interagit avec l'actine et la myosine pour préserver les composants du sarcomère lors des cycles de contraction-relaxation.

I-2-2 Le sarcomère

Les filaments épais et fins sont organisés d'une manière parfaitement régulière. Les filaments fins se joignent à l'une de leurs extrémités par l'intermédiaire de l'alpha actinine pour former la ligne Z. Des filaments intermédiaires (desmine, vimentine) assurent des connexions longitudinales et transverses entre les lignes Z. Une autre protéine structurale, la nébuline chemine le long du filament fin. L'espace délimité par deux lignes Z est ainsi défini comme le sarcomère. Les filaments épais sont aussi reliés à la ligne Z par l'intermédiaire de la titine.

L'association de sarcomères (100 à 400) en série constitue une myofibrille présentant une striation transversale formée de l'alternance de bandes isotropes (I) et anotropes (A).

I-2-3 Les organelles

Les myofibrilles s'associent pour former une fibre. La membrane de cette fibre (sarcolemme) s'invagine périodiquement pour former le système tubulaire transverse (**Tubule T**), celui-ci permettant le transfert de l'excitation électrique de la surface membranaire aux vésicules du réticulum sarcoplasmique ^[14]. L'association entre le Tubule T et le réticulum sarcoplasmique (RS) se fait dans une région appelée citerne terminal/jonction RS ^[15]. La citerne terminale permet le stockage du calcium. L'association entre un tubule T et deux citernes terminales forment ensemble une structure : **la triade** ^[16] (**Figure 2**).

- **Le réticulum sarcoplasmique (RS)** est un régulateur principal de l'homéostasie calcique dans le muscle, indispensable au couplage entre l'excitation électrique et l'interaction actine-myosine. Il est responsable du stockage, du relargage et de la récupération du calcium. Deux protéines du réticulum sarcoplasmique, SERCA (*sarco-endoplasmic reticulum Ca⁺⁺ ATPase*) et la calséquestrine, contribuent au maintien de cette homéostasie.
- Les **mitochondries** : les mitochondries forment un système tri-dimensionnel dans le muscle, et génèrent l'énergie requise pour le fonctionnement du muscle en condition d'aérobie ou d'endurance. L'organisation et l'abondance des mitochondries dans le muscle peuvent être affectées par plusieurs conditions de stimulation physiques (exercice d'endurance activant la biogenèse mitochondriale par exemple) ou de conditions physiopathologiques. Des maladies neuro-musculaires congénitales ou acquises, l'obésité et le syndrome métabolique sont associés avec des anomalies dans le réseau mitochondrial.

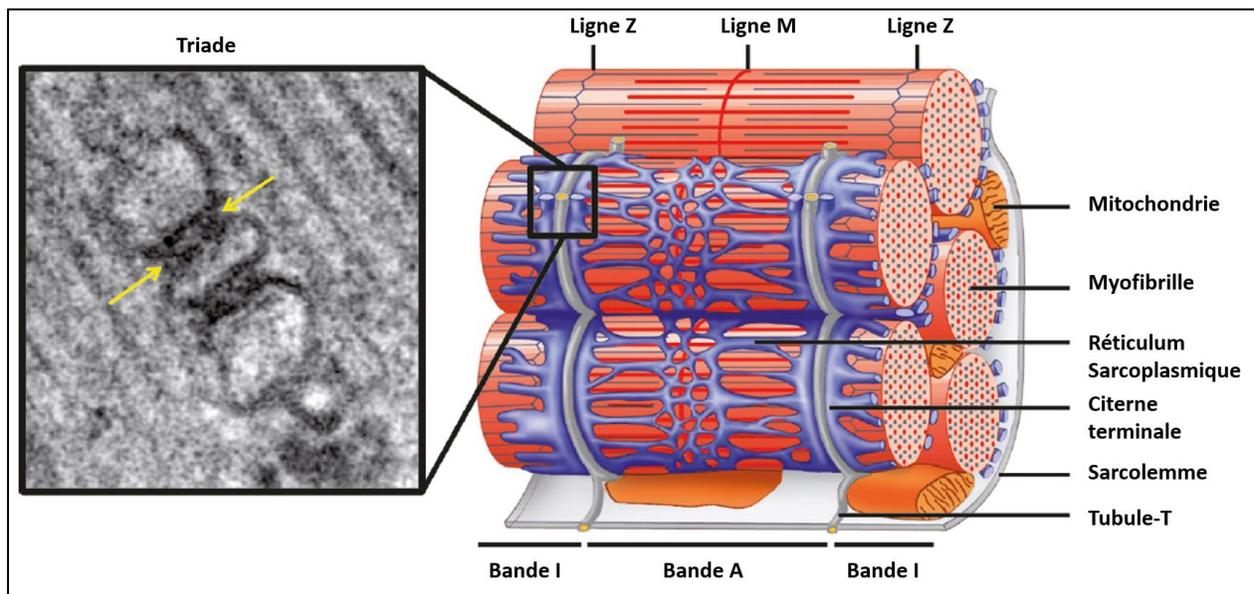


Figure 2. Organisation de la triade dans le muscle squelettique et distribution des réseaux de mitochondries. (adapté de Al-Qusairi & Laporte, 2011). Une micrographie électronique (à gauche) montre une jonction de triade, le tubule T est entouré par des citernes terminales de RS.

I-3 Les types de fibres musculaires

Le muscle squelettique est un tissu hétérogène disposant d'une variabilité biochimique, mécanique et métabolique. Des premiers travaux sur la vascularisation du muscle ont permis d'identifier deux types de muscle : les muscles dits 'rouges' et les muscles 'blancs'. Depuis, plusieurs classifications des fibres musculaires ont été proposées selon différents critères comme les propriétés contractiles, la vitesse de raccourcissement lors d'une contraction (*Fast / Slow twitch*), le degré de fatigabilité durant une activité

prolongée (fatigable/ non fatigable), la prédominance de certaines voies métaboliques ou enzymatique (oxydative, glycolytique), ou encore l'expression de différents isoformes de *MHC* ^[17].

Cependant, les muscles sont rarement homogènes, mais composés d'un pourcentage variable de fibres rapides et lentes. Cette variabilité de types de fibres au sein d'un même muscle représente une adaptabilité physiologique et permet au muscle de participer à des activités à demandes mécaniques et métaboliques variables.

Pour simplifier, nous retenons la classification la plus classique des fibres musculaires qui distingue 3 principaux (non exclusifs) types de fibres : type I, IIa et IIb/IIx. (**Tableau 1**)

	Type I	Type IIa	Type IIb/ IIx
Couleur	Rouge	Rouge	Blanche
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Métabolisme énergétique prédominant	Beta-Oxydation (voie aérobie)	Beta-Oxydation (Voie aérobie)	Glycolyse (voie anaérobie)
Résistance à la fatigue	Élevée	Intermédiaire	Faible
Isoforme MHC prédominante	I ou <i>Myh7</i>	IIa ou <i>Myh2</i>	IIb ou <i>Myh4</i>

Tableau 1. Types et caractéristiques des différentes fibres musculaires.

I-4 Physiologie d'activation musculaire : couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction (EC) représente la coordination de deux procédés requis pour la génération de force : la transmission du stimuli nerveux à la triade, suivi par le relargage de calcium des citernes terminales et l'interaction entre l'actine et la myosine formant les ponts d'unions dits 'cross-bridges'.

Le potentiel d'action arrive dans la membrane fibre musculaire, et est conduit à l'intérieur des myofibrilles via le système tubulaire transverse (**Figure 3a**). Quand l'influx nerveux arrive à la triade, une sous-unité des récepteurs de la dihydropyridine (DHP) sur le tubule T s'ouvre, permettant un flux entrant de calcium ^[18]. Ce flux de calcium déclenche l'ouverture des récepteurs de la ryanodine dans les citernes terminales du RS, libérant de grandes quantités de calcium dans le sarcoplasme. Le calcium libéré dans le sarcoplasme se lie alors à la protéine régulatrice troponine C (TnC) sur le filament fin d'actine. Cela déclenche une série d'évènements moléculaires menant au glissement des filaments d'actine et de myosine et la génération de force (**Figure 3b**). En résumé :

- La tête de myosine est en position 'armée', liée à l'adénosine diphosphate (ADP) et au phosphate (P).
- Le calcium libéré dans le sarcoplasme se lie à la troponine en déplaçant la tropomyosine. Cela libère les sites de liaison de l'actine à la myosine.
- La tête de myosine se lie à l'actine et l'ion phosphore est libéré.
- Les têtes de myosine se déplacent vers le centre du sarcomère en tirant les filaments d'actine.
- La molécule d'ADP est libérée.

- Une deuxième molécule d'ATP viendra détacher la myosine de l'actine, la troponine et la tropomyosine reviennent à leur place.
- L'activité ATPase de la myosine hydrolyse l'ATP en ADP et P, remplaçant la myosine dans sa position armée pour la formation d'un nouveau *cross-bridge*.

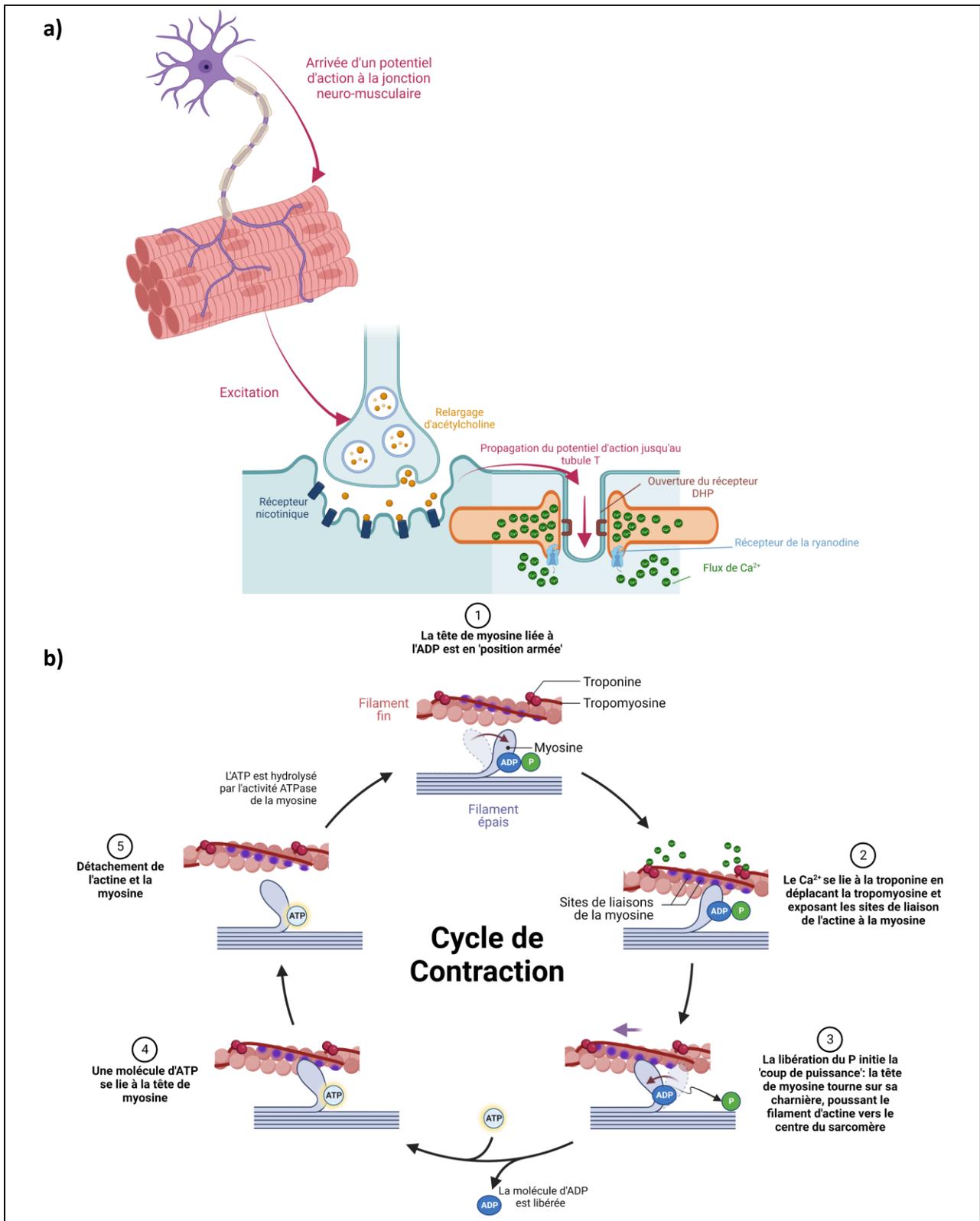


Figure 3. Mécanismes de contraction musculaire. a) L'arrivée du potentiel d'action à la jonction neuro-musculaire cause un relargage de Ca^{2+} du RS dans le sarcoplasme. b) Le cycle de contraction musculaire à la suite de la liaison du Ca^{2+} à la troponine.

I-5 Types d'actions musculaires

Les actions musculaires peuvent être classifiées en 3 catégories principales : statique (ou isométrique), concentrique dynamique et excentrique dynamique (**Figure 4**).

Une action isométrique est caractérisée par la génération d'une force en absence de mouvement d'une articulation ou d'un membre. Sous ces conditions, la résistance est supérieure à la force générée.

En contraste, une action dynamique (ou isotonique) implique une génération de force et mouvement d'articulation, et peuvent être concentriques ou excentriques. Les actions concentriques causent un raccourcissement du muscle, l'origine et l'insertion du muscle se rapprochent (par exemple : fléchir le coude). Les forces excentriques causent une élongation du muscle, avec un écartement de l'origine de l'insertion du muscle ^[19].

La conversion d'énergie chimique en énergie mécanique a été décrite en 1954 ^[20,21]. Cette théorie, appelée celle des 'filaments glissants' reste à ce jour la plus convaincante. La force générée par des '*cross-bridges*' (ou ponts d'unions) individuels actine-myosine est transmise longitudinalement et latéralement dans la fibre. Le mouvement est produit quand la force atteint la jonction myotendineuse, les tendons et les articulations.

La force générée dépend de plusieurs facteurs, dont le degré de l'activation par le système nerveux, l'angle d'insertion des fibres musculaires dans le tendon, la taille du muscle, l'espace entre les filaments, le nombre de ponts d'unions formés et la qualité d'interaction entre les éléments cellulaires.

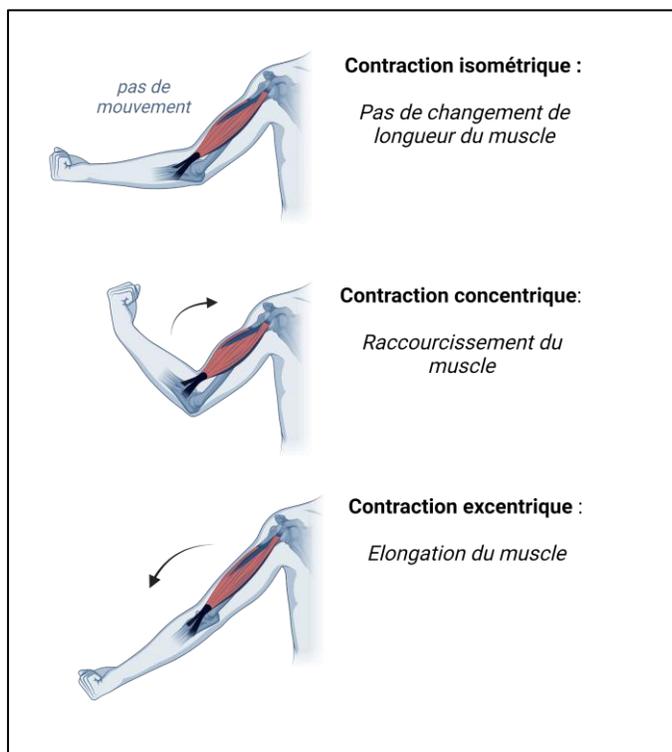


Figure 4. Types d'actions musculaires. Le muscle peut se contracter de façon isométrique, concentrique ou excentrique.

I-6 Mécanismes énergétiques musculaires

Le muscle squelettique a besoin d'énergie sous forme d'ATP pour pouvoir produire une force. La voie métabolique pour produire cette énergie diffère en fonction de la durée et de l'intensité de l'activité. Les glucides (glucose sanguin et glycogène musculaire) et les graisses (acides gras libres dans le plasma et triglycérides musculaires) sont les deux carburants principaux utilisés par les fibres musculaires pour produire l'ATP ^[22]. Le métabolisme des acides aminés pourrait participer aussi en faible pourcentage à la production d'énergie ^[23]. La sélection d'un type de carburant dépend généralement de l'intensité de l'exercice. Pour des exercices de hautes intensités, le glycogène musculaire est utilisé. Pour des intensités plus faibles et longues, le muscle utilise le métabolisme des acides gras.

Trois voies énergétiques principales permettent au muscle d'assurer sa fonction contractile : les stocks d'ATP / CP (créatine phosphate), la glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative. Ces 3 voies peuvent être activées en même temps à différents points durant un exercice, en fonction de l'intensité de l'effort.

Les petites réserves d'ATP et CP dans le muscle permettent de soutenir une activité courte d'haute intensité (quelques secondes). La glycolyse anaérobie permet la production d'ATP rapidement pour soutenir une action musculaire de quelques minutes. Cependant, les produits finaux de cette voie (H⁺, lactate) altèrent la fonction musculaire et sont associés à une fatigue musculaire. Pour des exercices intenses et longs (quelques minutes à quelques heures), l'énergie est fournie par la phosphorylation oxydative générée dans le réseau mitochondrial. Le réseau de capillaires vasculaires est important pour cette voie, et assure la livraison de l'oxygène aux fibres musculaires actives. Le développement de ce réseau dépend de la demande métabolique de chaque fibre.

I-7 Cellules satellites et régénération musculaire

Dans un muscle sain, des contractions répétitives peuvent causer des lésions du sarcolemme menant à une dégénération musculaire et à de l'inflammation. En réponse à ces blessures, le muscle est capable de se régénérer, en activant les cellules souches musculaires résidentes (*MuSCs* pour *muscle Stem Cells*, aussi appelées cellules satellites). Les cellules satellites résident entre la lame basale et le sarcolemme des fibres musculaires [24]. Ces cellules sont quiescentes dans un muscle mature, mais elles gardent leur potentiel à fournir des myoblastes en réponse à des blessures musculaires. Des petites blessures, qui peuvent survenir régulièrement au cours de l'activité quotidienne, entraîneront une prolifération minimale des cellules satellites, alors que des blessures majeures vont activer une prolifération prolongée et plus importante avant la différenciation [25]. Les cellules satellites activées permettent ainsi le remplacement des fibres endommagées (**Figure 5**).

Les cellules satellites activées peuvent subir deux modes de division : symétrique ou asymétrique (**Figure 5**). Une division asymétrique des cellules satellites permettra la génération de progéniteurs myogéniques, qui, une fois différenciés, permettront la régénération et la réparation des fibres musculaires. La division symétrique permettra quant à elle de préserver le stock des cellules satellites. L'équilibre entre les divisions symétriques et asymétriques est primordial pour maintenir le stock des cellules souches et obtenir la génération de progéniteurs en nombre suffisant pour la croissance et la régénération musculaire [26].

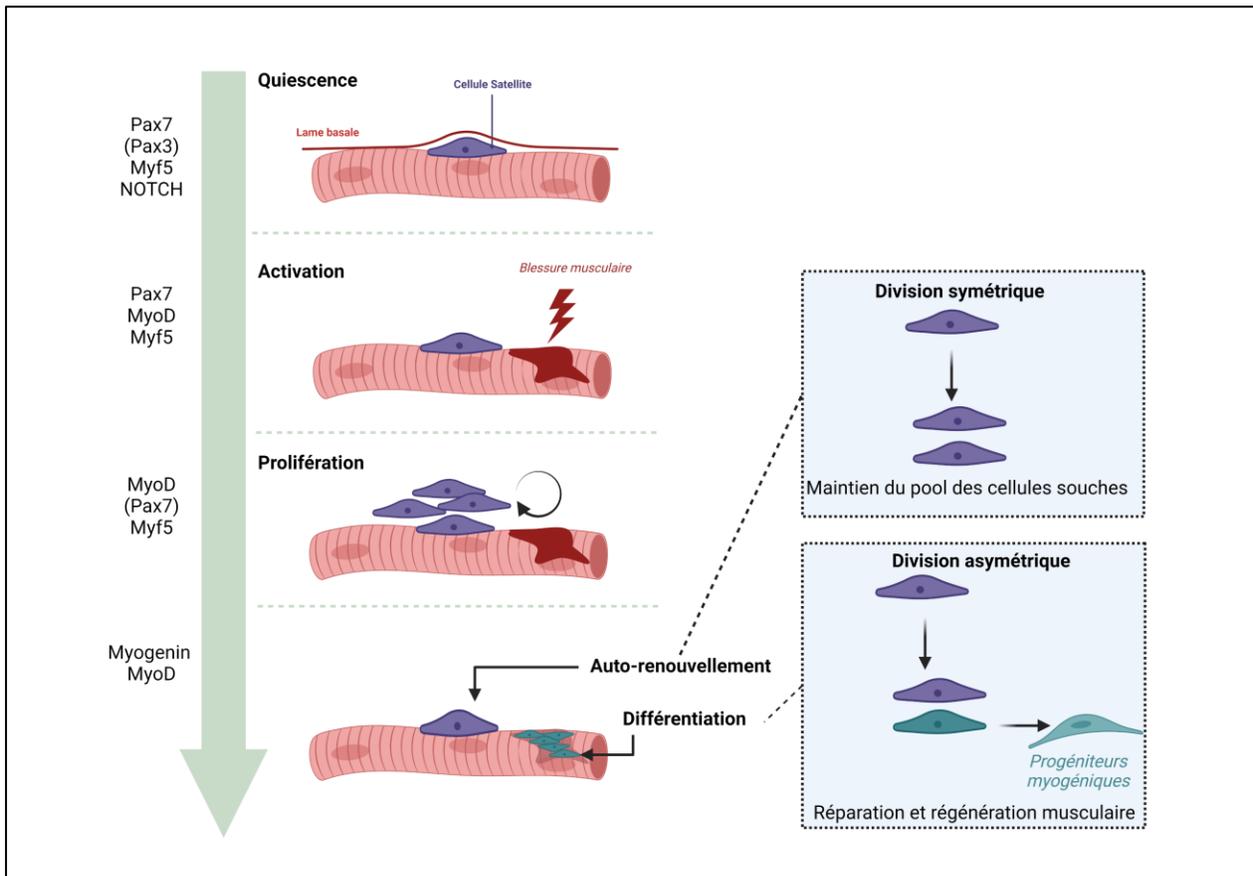


Figure 5. Régénération et réparation du muscle squelettique. En état normal, les cellules satellites sont quiescentes et expriment Pax7, Pax3 dans certains muscles et Myf5, avec une activation de la voie de signalisation Notch. Après une lésion, les cellules satellites sont activées et vont fournir des progéniteurs myogéniques exprimant MyoD. Les myoblastes vont ensuite se différencier en myotubes exprimant la myogénine, et fusionneront à la fibre endommagée (en cas de lésion légère) ou fusionneront ensemble pour former une fibre musculaire (en cas de lésion sévère). Durant ce processus, les cellules satellites s'auto-renouvellent par division symétrique pour renouveler le stock de cellules souches.

I-8 Fonctions du muscle : sarcopénie, exercice/inactivité et myopathies

Le muscle squelettique est un tissu fondamental et essentiel du corps humain, remplissant plusieurs fonctions physiologiques et mécaniques vitales comme le mouvement et la mobilité, le maintien de la posture, le maintien des fonctions respiratoire et cardiaque, la régulation du métabolisme énergétique et du glucose. Ces fonctions peuvent être affectées par plusieurs perturbations physiologiques, physiopathologiques et environnementales.

I-8-1 Sarcopénie et atrophie musculaire

Le vieillissement est souvent associé à une sarcopénie [27]. La sarcopénie est définie comme une perte de masse et de force musculaire qui survient avec l'âge [28]. L'atrophie musculaire aurait aussi des effets négatifs importants sur plusieurs fonctions physiologiques comme la thermorégulation, la respiration et l'homéostasie métabolique [29]. Ce déclin de la fonction musculaire est corrélé notamment avec une diminution de la fonction des cellules souches musculaires [30], responsables de la régénération musculaire, et une atrophie des fibres musculaires de type II [31]. Les facteurs régulant ces changements avec l'âge sont encore mal élucidés ; l'inflammation et le stress oxydatif [32], la perte en mitochondries [33], ainsi que l'inactivité physique [34] pourraient contribuer à la sarcopénie.

I-8-2 L'effet de l'exercice et l'inactivité physique sur la fonction musculaire

L'inactivité physique et l'exercice ont des effets significatifs sur la fonction musculaire. Des études ont montré que de longues périodes de repos causeraient une diminution importante de la force musculaire [35,36]. Cette perte de force est associée notamment avec une atrophie des fibres musculaires [37]. Cela est dû en partie à une perte de la protéostase, avec une activation des voies de la protéolyse [38]. D'autre part, l'exercice est important pour prévenir ou ralentir l'atrophie musculaire, en modulant plusieurs processus physiologiques comme la fonction des organelles, les voies de signalisation ou les mécanismes de régulation épigénétiques [39].

I-8-3 Les myopathies et l'atteinte de la fonction musculaire

Différentes myopathies peuvent affecter les fonctions musculaires. Ces myopathies peuvent être d'origine héréditaire ou secondaires à d'autres troubles (myopathies acquises) (**Figure 6**).

Les myopathies acquises sont souvent secondaires à de troubles endocriniens (hyper- ou hypothyroïdie), inflammatoires (maladies auto-immunes) et se présentent par une faiblesse ou une fatigabilité musculaire.

Elles peuvent être dues aussi à des traitements médicamenteux (traitement par statines pour l'hypercholestérolémie).

De l'autre côté, les myopathies héréditaires sont dues à des mutations dans des gènes affectant plusieurs fonctions musculaires comme l'intégrité et la structure du muscle (myopathies congénitales et dystrophies musculaires), la contraction musculaire (myotonies et canalopathies) ou le métabolisme énergétique (myopathies mitochondriales et métaboliques). Ces myopathies possèdent plusieurs symptômes communs, comme la faiblesse et la fonte musculaire, mais elles peuvent différer par leur sévérité et leur âge d'apparition. Par exemple, les myopathies congénitales apparaissent en général à la naissance, et sont causées par une altération de la structure ou de la fonction des fibres musculaires, causant une faiblesse musculaire et un retard de développement de la fonction motrice [40]. En revanche, les dystrophies musculaires se présentent par une faiblesse musculaire progressive, avec un spectre de sévérité assez variable en fonction du type de la dystrophie et l'âge d'apparition.

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons particulièrement à certaines dystrophies musculaires qui seront décrites plus en détails.

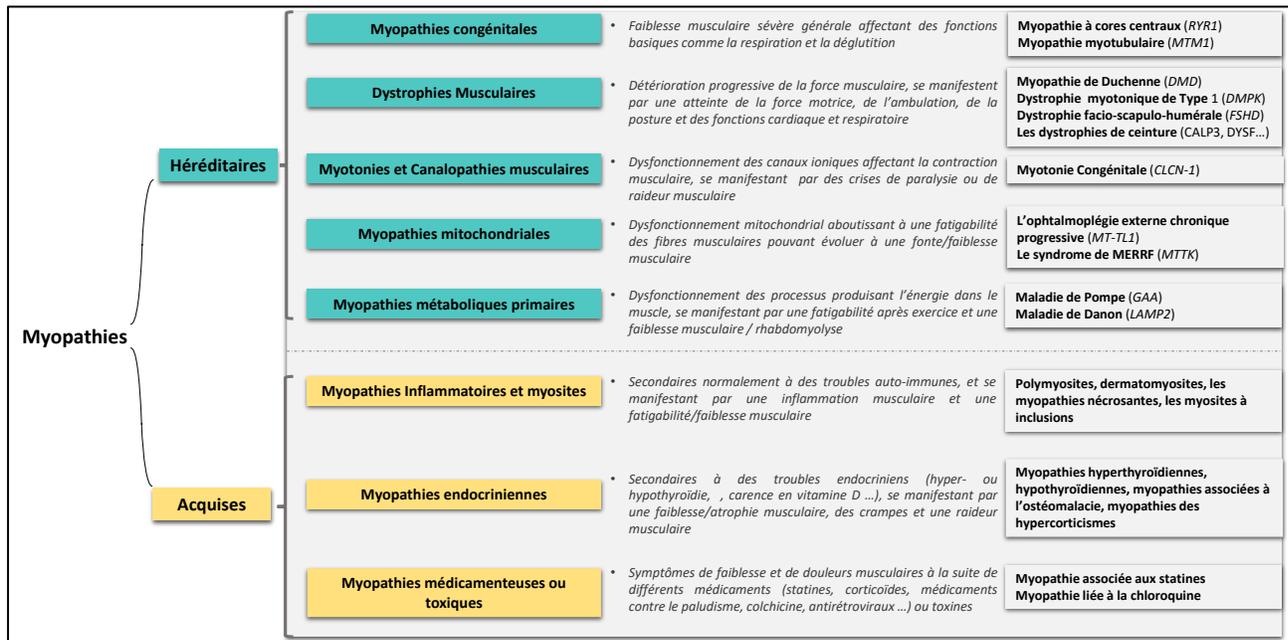


Figure 6. Les différents types de myopathies. Il n'existe pas une classification officielle des myopathies. Ici, nous retenons deux grandes classes de myopathies, les myopathies héréditaires dues à des mutations dans des gènes spécifiques, et les myopathies acquises, qui sont secondaires à d'autres troubles.

I-9 Les dystrophies musculaires progressives

Les dystrophies musculaires progressives sont un groupe hétérogène de maladies génétiques affectant principalement le muscle squelettique et provoquant une détérioration progressive de la force musculaire. Elles se manifestent généralement par une atteinte de la force motrice, de l'ambulation, de la posture et des fonctions cardiaques et respiratoires aux stades plus avancés dans certaines dystrophies.

Ces dystrophies sont causées par des mutations de gènes codant pour une grande variété de protéines, impliquées (non exclusivement) dans l'organisation du sarcolemme ou du sarcomère, de la matrice extracellulaire (MEC), de la membrane nucléaire, mais aussi d'enzymes cytoplasmiques ^[41,42].

Le degré de sévérité des dystrophies musculaires est variable en fonction du gène affecté, et l'affection d'un même gène peut se manifester par différentes formes de dystrophies ^[43]. L'apparition de la maladie peut survenir à l'enfance ou à l'âge adulte, selon le type de dystrophie.

Le diagnostic est généralement basé sur des symptômes cliniques tels qu'une faiblesse musculaire, principalement dans les membres proximaux, et confirmé par des études histologiques montrant une dégénérescence musculaire, et des analyses sérologiques montrant une élévation de créatine kinase (CK). Le diagnostic est ensuite confirmé par une analyse génétique confirmant le gène muté.

L'une des premières dystrophies musculaires décrites et la plus fréquente est la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Celle-ci est due à une absence ou une réduction de l'expression d'une protéine : la dystrophine ^[44].

Dans le muscle squelettique, la dystrophine interagit, directement ou indirectement avec le sarcolemme, le cytosquelette (filaments d'actine, filaments intermédiaires, microtubules et autres protéines structurales), des protéines canoniques, des protéines de signalisation et d'échafaudage (*scaffolding proteins*). Collectivement, la dystrophine et ses partenaires forment le complexe glycoprotéique associé à la dystrophine (DAGC pour *dystrophin-associated glycoprotein complex*) (**Figure 7**).

Le DAGC est composé de 11 protéines : la dystrophine, le sous-complexe dystroglycane (DG) (α -dystroglycane et β -dystroglycane), le sous-complexe sarcoglycane (SG) (α -sarcoglycane, β -sarcoglycane, γ -sarcoglycane et δ -sarcoglycane), le sarcospane, la syntrophine, la dystrobrevine et nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*) ^[45].

La caractérisation du complexe protéique associé à la dystrophine ^[46] et des réseaux du cytosquelette sous-sarcolemmique a permis d'identifier d'autres dystrophies musculaires que la DMD ^[47] : les dystrophies musculaires des ceintures (ou LGMD pour *Limb Girdle Muscular Dystrophy*).

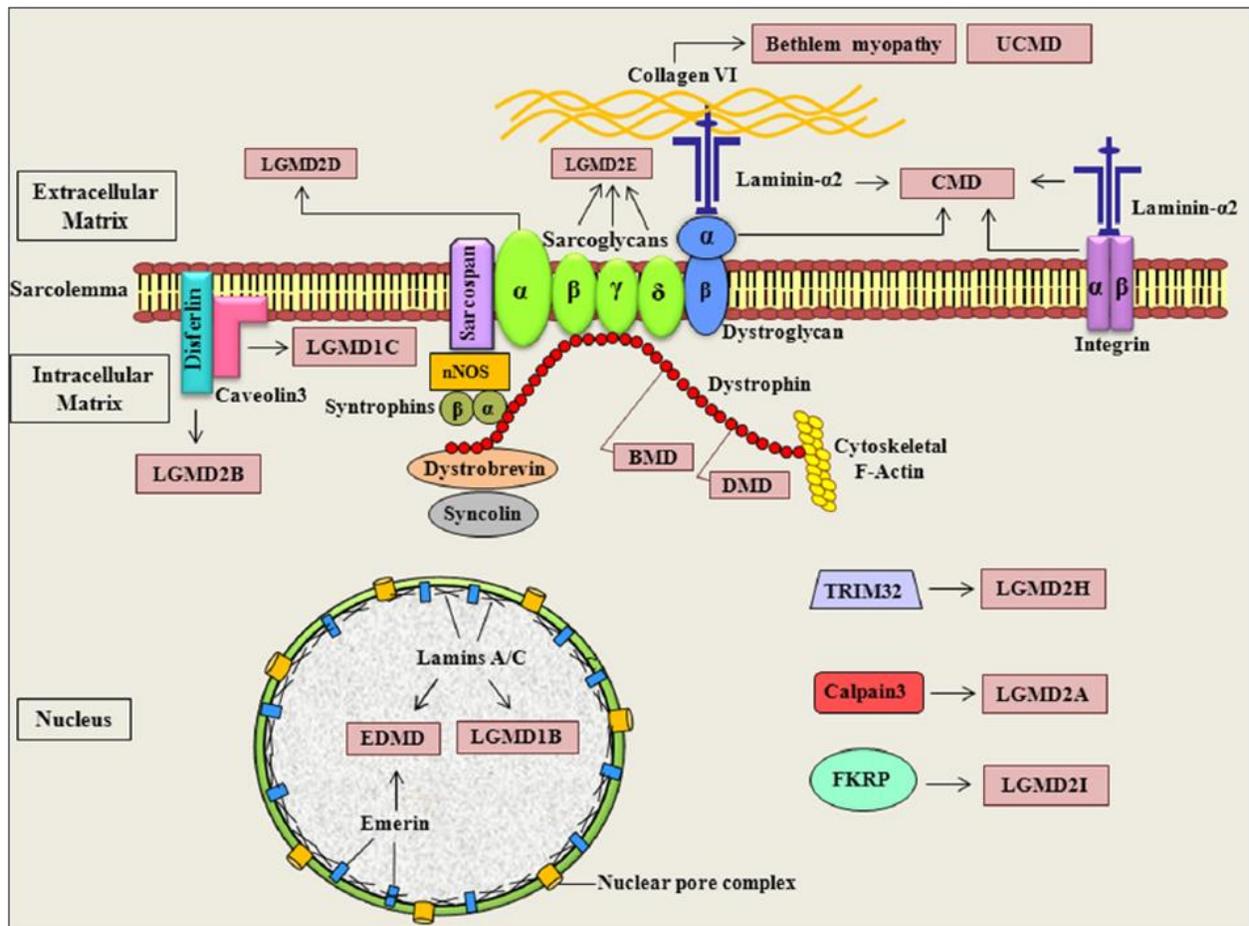


Figure 7. Les protéines impliquées dans les dystrophies musculaires (adapté de Shin et al., 2013). Des mutations de gènes codant pour différentes protéines causent des dystrophies musculaires. Plusieurs protéines font partie du DAGC et sont nécessaires pour le maintien de la structure du muscle lors des contractions. D'autres protéines de la matrice extra-cellulaire, de la membrane plasmique et nucléaire ainsi que des enzymes cytoplasmiques peuvent aussi causer des dystrophies musculaires.

Les dystrophies musculaires des ceintures sont un groupe hétérogène de maladies musculaires, affectant principalement les muscles proximaux au début de la maladie, ou distaux-proximaux aux stades plus avancés. Ces dystrophies musculaires ont en commun un état permanent de dégénérescence et régénération des fibres musculaires, une élévation de CK dans le sérum, une infiltration fibro-adipeuse et une altération dégénérative évidentes sur imagerie IRM du muscle^[48]. L'âge de l'apparition de la maladie peut varier de la petite enfance (non congénitale) jusqu'à un âge adulte avancé. La progression de la maladie est généralement symétrique, mais est variable à la fois entre les différents types de LGMD et entre les patients ayant une même LGMD. Effectivement, ces dystrophies présentent un large spectre d'atteinte et d'atrophie musculaire, allant de formes très sévères, telles que celles qui apparaissent dans l'enfance et ont une progression rapide, à des formes relativement bénignes d'apparition tardive.

Il existe plus de 30 types de LGMD génétiquement distinctes, divisées en 2 catégories principales : les formes dominantes (anciennement dites type 1, nouvelle nomenclature 'D' pour *dominant*) et les formes récessives (anciennement LGMD type 2, nouvelle nomenclature type 'R' pour *recessive*).

Les formes de LGMD les plus fréquentes , et qui font le sujet de recherche et de développement d'approches thérapeutiques par notre laboratoire incluent la calpainopathie (LGMDR1) ^[49], les sarcoglycanopathies (LGMDR3-R4-R5-R6) ^[50], la LGMDR9 liée à la FKRP et la dysferlinopathie (LGMDR2) ^[49].

II- Dystrophie Musculaire de Duchenne : physiopathologie et approches thérapeutiques

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou myopathie de Duchenne est une maladie rare musculaire, grave et progressive affectant principalement les garçons, et pour laquelle il manque aujourd'hui de traitements curatifs. Dans cette partie, une description de la maladie, sa physiopathologie ainsi que les approches thérapeutiques seront traitées.

II-1 Description de la maladie

La myopathie de Duchenne est une maladie génétique musculaire à transmission récessive liée au chromosome X, et due à l'absence ou au dysfonctionnement d'une protéine, la dystrophine, encodée par le gène *DMD*. Elle affecte environ 1/5000 garçons ^[51,52], et est considérée comme la dystrophie musculaire la plus fréquente.

La maladie a été décrite initialement par Edward Meryon (1807-1880), en reportant les cas cliniques de 9 garçons présentant des signes de perte musculaire progressive, comme l'élargissement des muscles du mollet ^[53]. La DMD a été plus tard caractérisée davantage par le docteur Duchenne de Boulogne (1806-1875) en 1861, dans son livre intitulé « De l'électrisation localisée et de son application à la pathologie et à la thérapeutique » dans lequel il fait une évaluation complète du premier patient atteint d'« atrophie musculaire progressive avec dégénération » (nommée plus tard Dystrophie Musculaire de Duchenne) (**Figure 8**) ^[53].

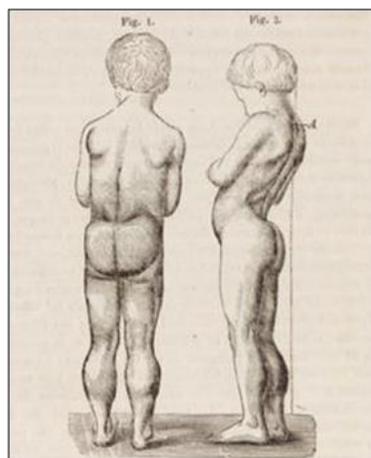


Figure 8. Dessin d'un patient atteint de la myopathie de Duchenne, représenté par le docteur Guillaume-Benjamin Duchenne de Boulogne en 1868.

Avec l'essor de la génétique moléculaire, le gène *DMD* a été cloné pour la première fois en 1987 par Koeing et al ^[54], et associé au phénotype de la myopathie. Des études ultérieures ont montré que ce gène code pour une protéine, la dystrophine ^[44,55]. La DMD est ainsi due à des mutations dans le gène *DMD*, ce qui empêche la production de l'isoforme musculaire de la dystrophine (Dp427m) ^[56].

Les mutations dans le gène *DMD* peuvent aussi causer un autre type de dystrophie musculaire moins sévère, appelé dystrophie musculaire de Becker (BMD). Celle-ci est caractérisée par une apparition plus tardive et une progression plus lente des signes cliniques que dans la DMD ^[57].

La myopathie de Duchenne est très rare chez les femmes (<1/million), et affecte généralement des filles avec le syndrome de Turner ^[58-61], ou est liée à des mutations bi-alléliques ^[62].

II-2 Présentation Clinique

La myopathie se manifeste précocement avec une faiblesse des membres proximaux inférieurs et une élévation de CK secondaire à une dégradation continue des fibres musculaires ^[41]. Une déficience cognitive est souvent aperçue chez les patients, surtout dans la mémoire de travail et la fonction exécutive, mais cette déficience n'est pas progressive ^[63]. Des déficiences cardiaques et respiratoires sont observées à partir de la deuxième et de la troisième décennie chez les patients ^[64] (**Figure 9**).

La plupart des patients perdent l'ambulation autour de 10-12 ans ^[57] et nécessitent une assistance à la ventilation autour de 20 ans. Avec des soins optimaux, les patients DMD vivent entre 20 et 40 ans, et décèdent à la suite de complications respiratoires et/ou cardiaques. La survie des patients DMD s'est améliorée au fil des années, notamment grâce à une amélioration des recommandations de soins et à une meilleure prise en charge des atteintes cardiopulmonaires ^[65]. D'ailleurs, une étude en France a montré que l'espérance de vie médiane a passé de 25,77 ans pour les patients nés avant 1970, à 40,95 pour ceux nés après 1970 ^[66].

Les femmes porteuses (mutation du gène *DMD* sur un chromosome X) sont généralement asymptomatiques, mais dans de cas plus rares elles peuvent présenter un phénotype BMD ^[67,68]. Environ 2,5-19% des porteurs ont des syndromes du muscle squelettique et 7,3-16,7% développent une cardiomyopathie dilatée ^[69], mais les atteintes respiratoires sont normalement absentes.

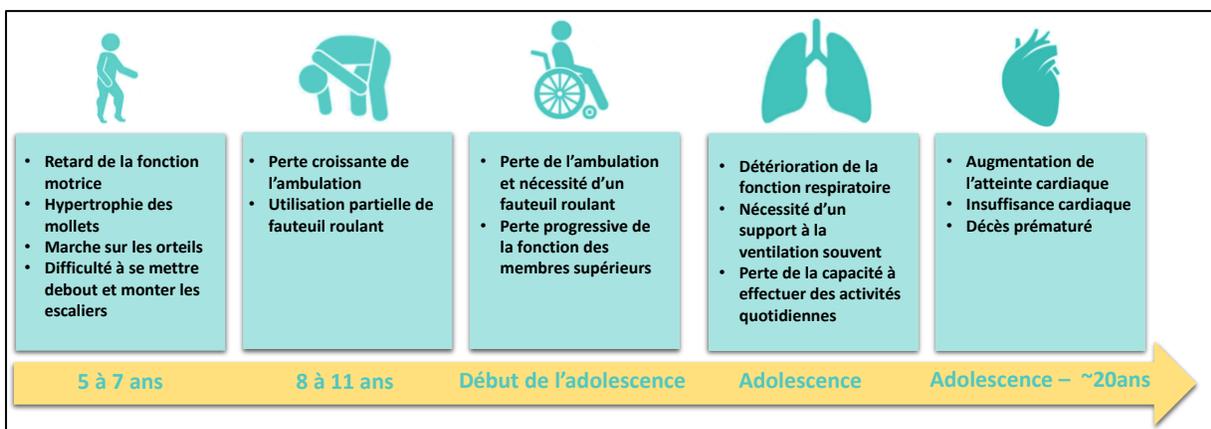


Figure 9. Evolution clinique de la DMD (adapté de Asher et al., 2020).

La principale cause de décès des patients aujourd’hui est l’atteinte cardiovasculaire [70,71]. La myopathie de Duchenne est en effet associée à une cardiomyopathie dilatée et à des anomalies du rythme cardiaque, notamment des arythmies supraventriculaires. La cardiomyopathie dilatée observée est caractérisée par une fibrose généralisée de la paroi libre du ventricule gauche [72]. Une insuffisance cardiaque apparaît aussi avec la progression de la maladie [73]. Par conséquent, le diagnostic et la prise en charge précoces de l’atteinte cardiovasculaire sont essentiels à la survie et à l’amélioration de la qualité de vie des patients.

II-3 Origine génétique de la maladie : le gène *DMD* et la dystrophine

II-3-1 Le gène *DMD*

Le gène *DMD* est le plus grand gène codant connu, avec plus de 2,6 millions de paires de bases (bp) et 79 exons codant pour plusieurs isoformes de dystrophine (**Figure 10a**). La grande taille du gène le rend particulièrement sujet aux mutations. Effectivement, des milliers de mutations du gène *DMD* ont été identifiées chez les patients *DMD* et *BMD* [74].

Environ 60-70% des mutations chez les patients *DMD* sont des délétions, et 20% sont des mutations ponctuelles, de petites délétions ou des insertions [75,76]. Chez les patients *BMD*, 60-70% des mutations sont des délétions, 20% sont des duplications et 5-10% sont des mutations ponctuelles, de petites délétions ou des insertions [75,77,78].

Les délétions et les duplications se trouvent dans des *hotspots* du gène *DMD*, avec environ 47% des mutations des patients *DMD* dans la région des exons 45-55 [79], et 7% entre les exons 3-9 [80].

Le gène *DMD* code pour l’isoforme musculaire de la dystrophine (Dp427m) (**Figure 10b**), mais aussi pour deux autres isoformes complètes et plusieurs isoformes courtes transcrites à partir de plusieurs promoteurs internes (**Tableau 2**).

Isoformes complètes	Dp427C	Exprimée dans les neurones corticaux [81]
	Dp427p	Exprimée dans les cellules de Purkinje cérébelleuses. Identifiée chez la souris et très faiblement exprimée chez l’Homme durant l’embryogenèse et en période post-natale [82,83]
Isoformes courtes	Dp260	Exprimée principalement dans la rétine [84]
	Dp140	Exprimée dans le système nerveux central et les reins [85] et hautement exprimée dans le cerveau au stade embryonnaire [83]
	Dp116	Exprimée principalement dans les nerfs périphériques et les cellules de Schwann [86]
	Dp71	Exprimée de façon ubiquitaire mais particulièrement dans les cellules neuronales [87]
	Dp40	Provient du même promoteur que Dp71 mais est polyadénylée dans l’intron 70 [88]

Tableau 2. Les isoformes non musculaires de la dystrophine.

II-3-2 La dystrophine musculaire

L’isoforme **Dp427m** a une taille d’environ 427 kilos daltons (kDa) et est exprimée spécifiquement dans les muscles squelettique et cardiaque. C’est une protéine sous-sarcolemmique, composée de plusieurs

domaines de liaison, lui permettant de créer un lien mécanique entre la MEC et le cytosquelette. Ce lien est primordial pour le maintien de la structure du muscle.

La dystrophine est un élément critique du DAGC, elle est essentielle pour la maintenance de la rigidité de la fibre musculaire ^[89], mais aussi pour la protection du muscle contre le stress mécanique lors de la contraction musculaire ^[90,91].

La dystrophine musculaire contient 4 grands domaines qui lui permettent de lier des partenaires protéiques : (**Figure 10b-c**)

- **Le domaine N-terminal ou *Actin-binding domain* (ABD)** : il lie les filaments d'actine.
- **Le domaine central '*rod*'** : composé de 24 répétitions de spectrine (R1-R24) et de quatre charnières ou *hinge* (H1-H4), ce domaine permet à la dystrophine de lier plusieurs composants sarcomériques et sarcolemmiques. Il existe deux régions de liaisons directes au sarcolemme (R1-R3 et R10-R12), un site de liaison aux filaments d'actine par des interactions électrostatiques (R11-R15) ^[92], ainsi que deux sites d'interactions avec les microtubules (R4-R15 et R20-R23) ^[93,94]. Les spectrines R16 et R17 contiennent le site de liaison de nNOS. Cette liaison est indispensable pour la localisation correcte de nNOS au niveau du sarcolemme ^[95,96]. La localisation de nNOS au sarcolemme joue un rôle de signalisation paracrine, en diffusant de l'oxide nitrique vers les vaisseaux sanguins ce qui favorise la vasodilatation dans les muscles contractiles. Une délocalisation de nNOS pourrait causer une ischémie fonctionnelle lors de l'exercice ^[97,98], ou aussi un stress nitrosant endommageant les cellules et affectant la production de force dans le muscle ^[99,100].
- **Le domaine riche en cystéine (CR)** : il permet à la dystrophine de se lier aux autres protéines du DAGC, par interaction avec la protéine transmembranaire β -DG ^[101]. Le domaine CR interagit aussi avec la calmoduline ^[102], qui joue un rôle important dans les voies de signalisation du calcium ^[103].
- **Le domaine C-terminal** : ce domaine contient un site de liaison direct au sarcolemme ^[104], ainsi que des sites d'interaction avec les membres du DAGC (syntrophine et dystrobrevine). L' α -syntrophine joue un rôle important de signalisation, en liant plusieurs canaux ioniques (canaux de sodium Na1.4 et Na1.5, de potassium Kiv2, Kiv4.1 et de calcium TRPC1 et TRPC4). Elle sert aussi d'ancrage à nNOS avec la dystrophine ^[104,105].

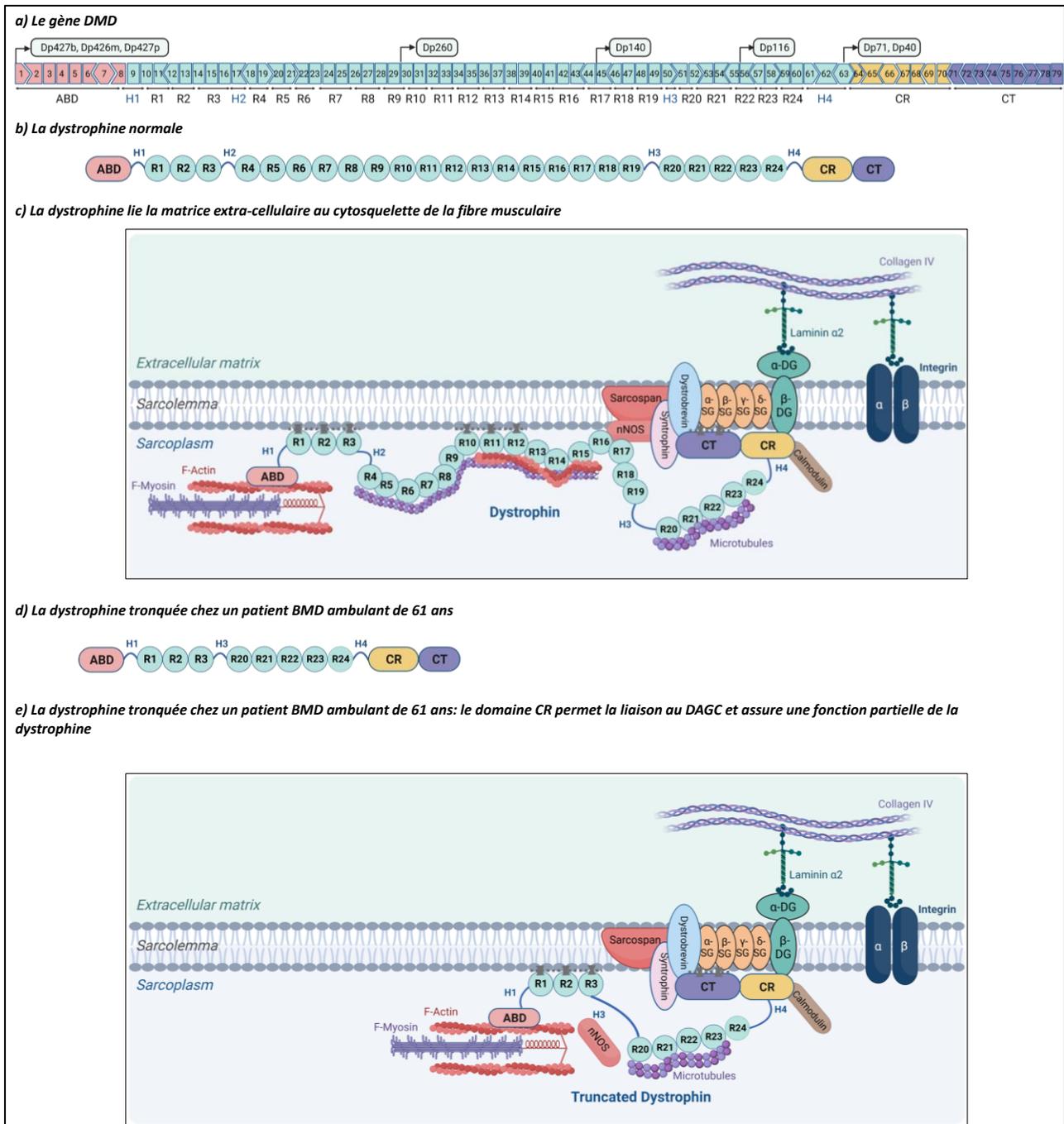


Figure 10. Structure et fonctions du gène DMD et de la dystrophine. a) Le gène complet DMD fait ~2,4 Mb et contient 8 promoteurs et 79 exons. Trois promoteurs en amont (Dp427b, Dp427m et Dp427p) produisent le cDNA complet d'environ 11,4 kb et la protéine complète d'environ 427 kDa. Quatre promoteurs internes (Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71) produisent des isoformes non-musculaires tronquées de la dystrophine. L'épissage alternatif à l'extrémité 3' et la polyadénylation alternative (ajout d'une queue polyA à l'ARN) produisent des isoformes supplémentaires de dystrophine. La protéine complète produite à partir de Dp427m est l'isoforme musculaire primaire. b-c) La dystrophine complète peut être divisée en 4 domaines principaux : le domaine en N-terminal qui se lie aux filaments d'actine (ABD ; encodé par les exons 1 à 8) – le domaine rod (R : encodé par les exons 8-64) – le domaine riche en cystéine (CR : encodé par les exons 64-70) – le domaine C-terminal (encodé par les exons 71-79). Le domaine rod est lui-même divisé en 24

répétitions de type spectrine et 4 charnières (*hinge*) entrecoupées. **d-e)** Chez les patients BMD, une dystrophine partiellement fonctionnelle est produite (cas reporté par England et al., 1990 et adapté de Asher et al., 2020) et contient les domaines cruciaux nécessaires pour se connecter aux filaments d'actine et à la matrice extra-cellulaire, permettant une fonction partielle de la dystrophine.

II-4 Mécanisme et pathophysiologie de la DMD

La myopathie de Duchenne a été avant tout considérée comme une maladie de dégénérescence musculaire et de nécrose^[106], bien que les mécanismes causant la mort musculaire aient été peu compris. Plusieurs hypothèses concernant la mort musculaire ont été proposées avant la découverte de la dystrophine, dont une ischémie musculaire, une anomalie moto-neuronale, une déficience nutritionnelle, des défauts métaboliques ou encore des dommages du sarcolemme et une dérégulation calcique^[107]. L'hypothèse attribuant les observations cliniques dans la DMD à l'instabilité du sarcolemme était la plus convaincante. L'identification de la dystrophine et de *DMD* comme étant la protéine et le gène^[44,54] en cause dans la maladie, a supporté cette hypothèse, selon laquelle DMD est causée par des défauts structurels et fonctionnels du sarcolemme.

En effet, l'absence d'une dystrophine fonctionnelle dans les muscles squelettique et cardiaque causerait un défaut dans l'intégrité du sarcolemme, rendant les fibres musculaires plus susceptibles aux dommages induits par les contractions musculaires. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer la pathogenèse de plusieurs dystrophies musculaires où des protéines du complexe DAGC sont affectées. Cependant, d'autres dystrophies musculaires sont causées par des protéines non structurales du muscle (*CALP3* pour LGMDR1, *DYSF* pour LGMDR2, *HGMCR* pour une nouvelle dystrophie identifiée)^[108-111], indiquant que la déstabilisation du sarcolemme n'expliquerait pas tous les mécanismes menant à la dégénérescence musculaire.

En ce qui suit, nous décrivons les différentes perturbations moléculaires et cellulaires causant directement ou indirectement la dégénérescence des fibres musculaires, et les changements physiopathologiques que subit le muscle dystrophique à la suite de la mort des fibres musculaires (**Figure 11**). Les mécanismes physiopathologiques seront décrits pour la DMD, mais plusieurs mécanismes sont communs à d'autres dystrophies musculaires, avec une variabilité en termes de sévérité et de chronologie.

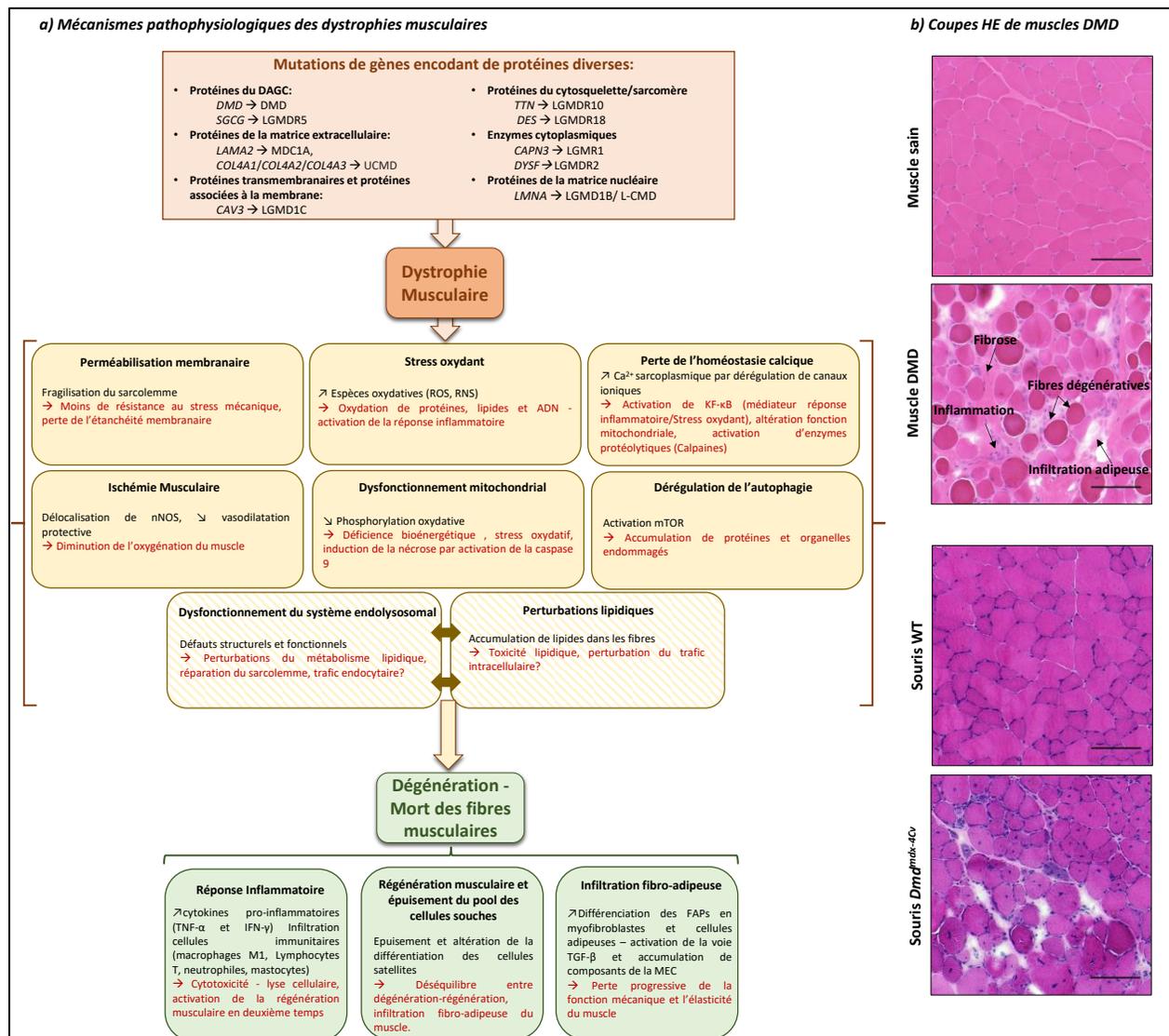


Figure 11. Mécanismes physiopathologiques des dystrophies musculaires. a) Les mécanismes menant directement ou indirectement à la dégénérescence musculaire sont représentés au milieu. Ici, nous proposons le dysfonctionnement du système endolysosomal et les perturbations lipidiques comme contributeurs à la pathogenèse de la DMD, toutefois davantage de travaux sont nécessaires pour évaluer leur implication dans la mort des fibres musculaires. b) Coupes transversales de muscles squelettiques de patients DMD et de modèles souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ marquées en hématoxyline/éosine (H&E). Une distribution plus désorganisée des fibres est claire dans le muscle dystrophique, avec une perte des liens entre les fibres. Une infiltration des cellules inflammatoires (accumulats de noyaux entre les fibres), une fibrose (augmentation de composants de matrice extracellulaire) et une infiltration adipeuse (espace blanc sur coupe H&E) sont observées. Chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$, il y a des fibres centronuclées (noyau positionné au centre de la fibre au lieu de la périphérie), ces fibres correspondant aux fibres régénératives. Barre d'échelle = 100 μ m.

II-4-1 Mécanismes pathologiques menant à la mort des cellules musculaires

a) Stress mécanique et fragilisation du sarcolemme

La force musculaire générée par le sarcomère lors des cycles de contraction-relaxation est transmise à travers le sarcolemme. Cette transmission de force induit un stress mécanique considérable au sarcolemme. En conditions physiologiques, l'intégrité du sarcolemme est maintenue grâce au lien entre le cytosquelette, le sarcolemme et la MEC, assurée par les complexes DAGC et intégrine.

Dans la myopathie de Duchenne, comme dans plusieurs LGMD, l'effondrement du complexe DAGC fragilise le sarcolemme et le rend plus susceptible aux dommages induits par la contraction. Ce mécanisme est l'un des premiers évènements clés survenant dans la DMD et pourrait expliquer plusieurs évènements pathologiques observés plus tard. En effet, la rupture du sarcolemme est un mécanisme caractéristique des fibres pré-nécrotiques^[112]. Ces ruptures de la membrane, aussi appelées 'déchirures' (*tears*) ou lésions 'delta' peuvent être détectées par une fuite passive d'enzymes musculaires comme la CK du muscle au sang, surtout après stimulation du muscle (après l'exercice par exemple). La perte de l'étanchéité de la membrane plasmique est aussi mise en évidence par la pénétration de colorants (Bleu Evans) ou de protéines circulantes (IgG, albumine) à l'intérieur des fibres (**Figure 12**), permettant d'identifier les fibres endommagées sur des coupes transversales de muscle dystrophique.

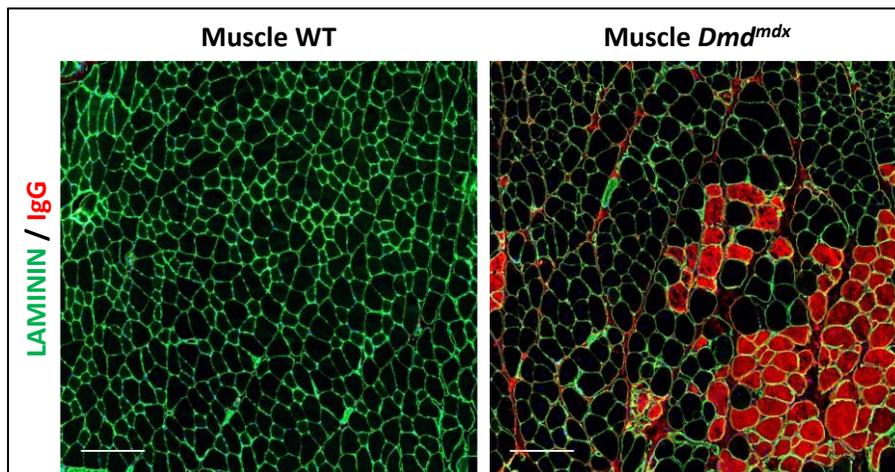


Figure 12. Perméabilisation des fibres musculaires dans un muscle dystrophique. Coupes transversales du muscle gastrocnémien chez des souris *Dmd^{mdx}* et WT montrant des fibres musculaires perméabilisées et positives au marquage aux IgG de la souris (rouge). (Barre d'échelle = 200 μ m)

b) Dommages musculaires liés aux radicaux libres : Stress oxydatif et nitrosant

Un stress oxydatif excessif peut produire des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, ou de l'oxyde nitrique. Ces espèces oxydatives primaires sont converties en espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) et des espèces réactives de l'azote (RNS pour *Reactive Nitrogen Species*), qui peuvent endommager les composants lipidiques des membranes, les protéines structurales et régulatrices du sarcomère, ainsi que l'ADN.

Le muscle DMD est caractérisé par un stress oxydatif considérable qui participe à son affaiblissement, se manifestant notamment par une augmentation des ROS et des RNS, et par des niveaux élevés d'oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN^[113-116].

- **Stress oxydant et ROS**

L'augmentation du stress oxydatif dans le muscle est due en grande partie à la surexpression du complexe NOX2 (*ROS-generating NADP(P)H oxidase*) dans le sarcolemme ^[117]. NOX2 est activé par la protéine associée au microtubule Tac1 à la suite de l'étirement mécanique du muscle, menant à une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ^[118,119]. Ce processus est particulièrement aggravé dans la DMD puisque le réseau de microtubules est dense et désorganisé (à cause de la perte de l'interaction dystrophine-microtubule). L'inhibition de ce complexe pourrait éviter le dommage du muscle chez la souris *Dmd*^{mdx} ^[120].

L'infiltration des neutrophiles contenant des myéloperoxydases et d'autres cellules inflammatoires, ainsi que le dysfonctionnement mitochondrial sont aussi des sources importantes de ROS dans le muscle DMD.

- **Stress nitrosant et RNS**

Une autre source majeure de dommages par radicaux libres dans le muscle DMD est due aux RNS. La perte de la liaison de nNOS à la dystrophine cause son détachement du sarcolemme ^[99,121]. De ce fait, nNOS ne pourrait plus excréter l'oxide nitrique vers les vaisseaux sanguins, et serait activé dans le cytoplasme, causant ainsi un stress nitrosant dans le muscle.

Un niveau élevé de stress oxydatif cause une dégénérescence musculaire en augmentant la réponse inflammatoire et en interférant avec le processus de régénération ^[122]. Bien que le stress oxydatif joue un rôle primordial dans la pathogenèse de DMD, les approches de traitements avec des anti-oxydants classiques n'ont pas montré un grand effet bénéfique chez les patients ^[115].

- c) Perte de l'homéostasie calcique**

Une des caractéristiques du muscle dystrophique est la surcharge en Ca²⁺ détectée dans le cytosol ^[123,124], et tout particulièrement dans l'espace sous-sarcolemmique ^[125]. Cette élévation du calcium dans le cytosol est importante pendant la contraction musculaire, mais est aussi observée dans des myotubes en repos ^[126].

En fait, la dystrophine et le complexe DAGC forment un complexe d'échafaudage pour un grand nombre de protéines, dont des protéines du métabolisme calcique impliquées dans l'activation, la modulation ou la terminaison des signaux calciques ^[102,127,128]. Effectivement, le complexe DAGC est lié à plusieurs acteurs de l'homéostasie calcique comme les canaux SOC (*store operated calcium channel*), les canaux SA (*Stretch-Activated*) et l'échangeur sodium-calcium NCX ^[127,129].

Une altération du fonctionnement du RS participe aussi à l'augmentation du calcium dans le cytosol. En effet, le stress nitrosant/oxydant dans le muscle dystrophique cause une nitrosation et une phosphorylation des récepteurs à la ryanodine (RyR), ce qui déstabilise leur liaison à la calstabile ^[130], et augmente leur ouverture lors de la contraction, entraînant une fuite du calcium du RS vers le cytosol ^[131].

L'élévation de calcium serait impliquée dans l'activation de NF-κB, un facteur de transcription impliqué entre autres dans la réponse inflammatoire et le stress oxydatif, et elle cause également une surcharge mitochondriale en calcium et une altération du métabolisme énergétique cellulaire. Une des conséquences délétères est également l'activation des enzymes dépendantes du calcium (comme les calpaines et la

phospholipase A2). L'activation de ces enzymes conduit finalement à la dégradation des protéines du muscle et la nécrose des fibres ^[132].

Bien que la dérégulation de l'homéostasie calcique joue un rôle majeur dans la dégénération des fibres musculaires dans les dystrophies musculaires, les inhibiteurs des canaux à calcium n'ont pas montré un effet clinique bénéfique chez les patients DMD ^[133].

d) Ischémie musculaire

Un des rôles de la dystrophine est l'ancrage de nNOS au sarcolemme. Cela permet à nNOS de remplir une fonction paracrine en relarguant de l'acide nitrique dans le système vasculaire environnant, induisant une vasodilatation protectrice ^[95]. La délocalisation de nNOS dans le cytoplasme, à la suite de l'absence de la dystrophine, empêche l'oxygénation du muscle et cause un dommage ischémique aux fibres musculaires ^[134].

e) Dysfonctionnements mitochondriaux

Les mitochondries jouent un rôle primordial dans le mécanisme bioénergétique du muscle squelettique, par leur capacité à synthétiser de l'ATP par phosphorylation oxydative ^[135]. Les mitochondries jouent aussi un rôle crucial dans la signalisation du muscle en contrôlant le niveau du calcium et l'initiation de la mort cellulaire dépendante du calcium ^[136].

Dans la myopathie de Duchenne, les déficits mitochondriaux sont caractéristiques de la pathogenèse du muscle dystrophique. La fonction mitochondriale dans le muscle dystrophique est altérée, avec une diminution majeure de phosphorylation oxydative ^[137,138], et surtout de l'activité du complexe I ^[139].

Ces dysfonctionnements mitochondriaux ont été attribués notamment à une surcharge de Ca^{2+} qui causerait une ouverture importante du pore mPTP (*mitochondrial permeability transition pore*) et une diminution de la synthèse d'ATP ^[136]. De nouvelles études réalisées dans notre équipe ont permis de corrélérer la diminution de la phosphorylation oxydative et de la production de l'ATP avec la dérégulation d'un cluster de micro-ARN (miR) (locus Dlk1-Dio3) ^[140], contenant notamment le miR-379 ^[141]. L'augmentation de ces miRNA dans la circulation serait en partie attribuée aux fibres régénératives ^[140].

Le dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative contribue au stress oxydatif, à travers une augmentation d'émission de H_2O_2 ^[142-144]. Un stress du réticulum endoplasmique est aussi causé par le dysfonctionnement mitochondrial, à la suite de la perturbation de l'interaction aux sites de contacts MAMs (*Mitochondria-associated ER membranes*) ^[145,146]. De plus, la déficience bioénergétique résultante des mitochondries est corrélée à la nécrose et à l'atrophie musculaire, par induction de l'activation de la caspase 9 ^[144].

f) Défauts d'autophagie et perte d'homéostasie protéique

Les dommages musculaires décrits (notamment la perméabilisation du sarcolemme, l'activation des protéases dépendantes du calcium, les stress oxydant et nitrosant) causent une accumulation d'organelles défectueuses et une altération des composants cellulaires dans le muscle dystrophique.

Dans un muscle sain, l'autophagie (ou macro-autophagie) joue un rôle primordial dans la maintenance de la masse musculaire, cela en agissant sur le renouvellement des composants cellulaires, en conditions normales mais aussi en réponse à des stimulations (par exemple le stress cellulaire, la privation de nutriments ou d'acides aminés) [147,148]. Des défauts d'autophagie peuvent avoir un effet délétère sur le muscle, et sont à l'origine de plusieurs myopathies telles que les myopathies vacuolaires autophagiques [149].

Dans le muscle DMD, plusieurs études ont montré des défauts importants d'autophagie [150,151], avec une accumulation d'organelles endommagées. Ces défauts d'autophagie ont été attribués à plusieurs causes, dont une activation de mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) par phosphorylation par Akt (*protein kinase B*) [150]. Le stress oxydatif est aussi impliqué indirectement dans les défauts d'autophagie, en activant de façon continue une kinase appelée *Src*, qui active mTOR via la phosphorylation de PI3K/Akt [152].

L'accumulation des protéines et des organelles endommagées, suite à un défaut de flux autophagique, contribue directement à la dégénération des cellules musculaires dans le muscle DMD [151]. Pour cela, l'autophagie pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour la DMD. Par exemple, une diète faible en protéine chez les souris *Dmd^{mdx}* a montré une réactivation de l'autophagie et une amélioration significative de la fonction et de la structure du muscle [150]. Le traitement par un agoniste pharmacologique contre AMPK active aussi l'autophagie, et améliore le phénotype dystrophique dans le diaphragme [153].

g) Dysfonctionnements lysosomaux dans la DMD

Le système endolysosomal joue un rôle primordial pour le maintien de l'homéostasie tissulaire dans le muscle. En plus d'être les régulateurs primaires du flux autophagique [154], les lysosomes sont engagés dans plusieurs fonctions cellulaires cruciales faisant d'eux un centre métabolique cellulaire clé [155]. Les lysosomes sont impliqués dans la réparation de la membrane plasmique [156], l'homéostasie des ions métalliques [157] et le métabolisme des lipides [158].

Dans la DMD, des anomalies dans la structure et l'activité des lysosomes ont été identifiées il y a longtemps [159-161] et plus récemment [162,163]. Ce qui est particulièrement intéressant est le fait que les souris *Dmd^{mdx}* montrent des anomalies des lysosomes à un stade très précoce (10 jours) [164]. A cet âge, il n'y a pas encore de perturbations histologiques détectables chez la souris *Dmd^{md}*, ce qui suggère que les perturbations de la fonction et de la structure des lysosomes seraient des événements précoces dans la cascade pathologique de DMD.

Cependant, très peu d'études ont considéré les défauts lysosomaux comme primaires à la physiopathologie de DMD. Plutôt, plusieurs études se sont focalisées sur la perturbation de l'autophagie [150,165-167]. En fait, l'autophagie et l'activité lysosomale sont des processus fonctionnels corrélés, et un dysfonctionnement de l'autophagie a été identifié dans plusieurs maladies de surcharge lysosomale. Dans ces maladies, le défaut principal est attribué aux lysosomes, et le défaut de l'autophagie est clairement secondaire [154,168]. Récemment, des perturbations de l'autophagie secondaires aux défauts lysosomaux ont été détectées dans des dystrophies musculaires, dans les muscles squelettique [169] et cardiaque [170]. Il reste à déterminer si les perturbations de l'autophagie décrites dans la DMD sont secondaires ou pas à des défauts lysosomaux sous-jacents.

h) Perturbations du métabolisme des lipides et du cholestérol

Les biopsies musculaires de jeunes patients DMD montrent des anomalies lipidiques [171]. Il y a notamment une accumulation de phosphatidylcholine, de cholestérol, de sphingomyéline et de triglycérides, et une abondance d'acides gras monoinsaturés dans les zones les plus altérées du muscle [172,173].

Des études ont aussi montré des dérégulations des lipides circulants chez les patients DMD [174,175], avec notamment une augmentation des triglycérides, des phospholipides, du cholestérol (total, libre et estérifié). Des perturbations lipidiques ont aussi été détectées chez des patients BMD et des femmes porteuses saines DMD [176]. Ces analyses ont laissé suggérer que la myopathie de Duchenne pourrait être une nouvelle forme de dyslipidémie génétique [176,177].

Les dérégulations lipidiques sont surtout observées à un stade précoce de la maladie chez les patients et les animaux [173,176,178]. Cela suggère que ces dérégulations pourraient jouer un rôle important dans la pathogenèse de la DMD. Cependant les mécanismes de ces observations, et leur effet sur l'évolution de la maladie, restent peu compris.

Récemment, une étude de notre équipe a permis d'identifier une dérégulation du métabolisme du cholestérol et des acides gras dans le muscle DMD [179]. A partir d'un screening de micro-ARN (ou miRNA) dans le sérum d'une cohorte de patients DMD, nous avons identifié une dérégulation de miRNA circulants. Une analyse de ces dérégulations se basant à la fois sur les gènes hôtes et cibles nous a permis d'identifier une perturbation de la voie de synthèse du cholestérol (voie du mévalonate) et de la voie de synthèse des acides gras. Ces résultats ont été validés par une détection d'accumulation de cholestérol dans des biopsies de muscles de patients DMD et de souris *Dmd^{mdx}*. Cette accumulation de cholestérol musculaire corrélait avec une activation des facteurs de transcriptions SREBP1 et SREBP2, régulant notamment la synthèse endogène et l'absorption cellulaire du cholestérol.

L'accumulation du cholestérol musculaire pourrait être corrigée chez les souris *Dmd^{mdx}* par une administration de la simvastatine, un hypocholestérolémiant connu [179]. Le traitement avec la simvastatine a aussi déjà montré une amélioration des muscle squelettique [180] et cardiaque [181] chez la souris.

I-4-2 Evènements survenant à la suite de la mort des fibres musculaires et contribuant à la progression de la maladie

a) Inflammation et réponse immunitaire

L'endommagement des fibres musculaires et la dégénération causent une infiltration des cellules inflammatoires dans le muscle. Il y a principalement une infiltration de lymphocytes T et de macrophages chez des jeunes patients (2-8 ans) [182], précédant l'apparition de la maladie, et qui contribue directement à la progression de la dystrophie.

- **L'infiltration des macrophages**

Au début de la phase d'inflammation, une infiltration de macrophages pro-inflammatoires de type M1 est observée. Ces macrophages activés constituent une source majeure de cytokines pro-inflammatoires (TNF-

α et IFN- γ) qui participent à l'activation des systèmes protéolytiques et à l'inhibition de la régénération musculaire [182–184]. La production de l'oxyde nitrique par ces macrophages promeut aussi la lyse cellulaire. De plus, les macrophages sont responsables de la phagocytose des fibres endommagées, et de l'activation des lymphocytes T par présentation d'antigènes.

Lors de l'étape ultérieure, les macrophages M1 sont remplacés par des macrophages M2, activés par des cytokines anti-inflammatoires (IL-4 et IL-10), qui eux favoriseront la fibrose et la régénération musculaire par la stimulation de la prolifération des cellules satellites [185].

- **Le rôle des lymphocytes T**

Les lymphocytes CD4+ dans le muscle dystrophique sont une source importante de cytokines, et aident à l'activation d'autres cellules immunitaires, notamment les lymphocytes T CD8+ [186]. Les lymphocytes CD8+ cytotoxiques participent à la mort cellulaire par cytotoxicité dépendante de la perforine [187,188].

- **L'infiltration d'autres cellules immunitaires**

Une infiltration de neutrophiles est également présente dans le muscle dystrophique, constituant une source importante d'anions superoxyde [189]. Les mastocytes sont aussi impliqués dans la réponse immunitaire du muscle dystrophique [190,191]. La dégranulation des mastocytes autour des fibres endommagées va promouvoir la lyse membranaire au travers de certaines protéases (par exemple les chymases, les tryptases et les carboxypeptidases). En plus, ces cellules relarguent des histamines et du TNF- α qui peuvent promouvoir une nécrose des fibres musculaires.

La présence abondante des cellules immunitaires dans le muscle dystrophique a poussé à l'expérimentation d'immunosuppresseurs chez des patients DMD. Cependant, ces essais n'ont pas montré une amélioration significative chez les patients [192,193].

b) Régénération et épuisement du pool des cellules souches musculaires

Au début de la progression de la myopathie de Duchenne, la dégénération des fibres musculaires est compensée par une régénération active du muscle. Cependant, la mort cellulaire continue mène finalement à un déséquilibre entre la dégénération et la régénération, avec une diminution du nombre des cellules satellites au fur et à mesure des cycles de dégénération-régénération. Cela aboutit progressivement à un remplacement des fibres musculaires fonctionnelles par du tissu fibro-adipeux, altérant la fonction mécanique générale du muscle [194,195].

Certaines études ont suggéré que le complexe DAGC joue un rôle direct dans la régénération musculaire. En effet, la réparation du muscle, par la division asymétrique des cellules satellites, nécessiterait l'interaction de protéines du complexe DAGC (dystrophin-PAR1b et β 1-syntrophin-p38 γ /Carm1) [196,197]. L'effondrement du complexe DAGC pourrait donc compromettre l'engagement myogénique des cellules satellites activées, et altérerait la réparation du muscle. D'autres études ont aussi montré l'expression de la dystrophine dans les cellules satellites [198]. L'équipe de M.Rudnicki a notamment suggéré un rôle de la dystrophine dans le maintien de la polarité, de par son association à la *serine-threonine protein kinase 2* (MARK2), qui joue un rôle pivot dans la polarité de la cellule. De ce fait, l'absence de la dystrophine chez les patients DMD causerait une diminution des divisions asymétriques et donc une baisse de la génération

de progéniteurs myogéniques nécessaires à la régénération musculaire ^[198,199]. Cependant, cette théorie dite de 'phénotype de cellules souches' dans DMD ^[200] nécessite davantage de travaux pour démontrer comment l'altération de la division asymétrique causerait un défaut de régénération chez les modèles animaux et chez les patients.

c) Fibrose et dépôts adipeux dans le muscle

La fibrose est désignée comme le remplacement d'un tissu sain, à la suite d'une blessure ou un endommagement, par un tissu cicatriciel composé principalement de tissu conjonctif fibreux ^[201].

Une des caractéristiques principales du muscle dystrophique est le remplacement des fibres musculaires dégénérées par du tissu fibreux et adipeux. La fibrose se met en place progressivement au cours des cycles de dégénération-régénération, avec une activation des fibroblastes qui secrètent les protéines de la MEC, comme les collagènes et la fibronectine ^[202].

La source primaire des composants fibrogènes sont les myofibroblastes ^[203], dérivés de la différenciation des progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs pour *fibro-adipogenic progenitors*). Les FAPs sont des cellules résidentes du muscle ayant le potentiel de se différencier en myofibroblastes ou en adipocytes ^[204]. Dans un muscle sain, les FAPs fournissent un support aux progéniteurs musculaires lors de la régénération. Ce lien est altéré dans les dystrophies musculaires, avec une élévation chronique des FAPs et une altération de leur programme d'apoptose à cause de la dégénération chronique ^[205]. Les FAPs subissent une différenciation progressive en myofibroblastes ^[206], ainsi qu'en cellules adipeuses blanches ^[207], et participent directement à la transformation fibro-adipeuse du muscle dystrophique.

• Voies de signalisation et de régulation de la fibrose

Plusieurs voies de signalisations modulent la progression de la fibrose dans le muscle dystrophique.

Le signal pro-fibrotique primaire est assuré par TGF- β ^[208], qui active les fibroblastes et l'expression des protéines de la MEC ^[209]. L'expression de TGF- β et de ses récepteurs dans le muscle des patients DMD corrèle avec le niveau de fibrose musculaire ^[210], et contribue directement à la pathogenèse des dystrophies musculaires ^[211].

TGF- β et ses récepteurs sont localisés principalement dans la MEC en complexe avec les LTBP (*latent TGF β binding proteins*), aux zones inflammatoires et fibrotiques du muscle dystrophique ^[210,212]. Son activation nécessite son relargage du complexe par des protéases (notamment les métalloprotéinases MMP2 et MMP9 de la MEC). Une fois libérées, les isoformes de TGF- β se lient à leurs récepteurs transmembranaires et activent la voie canonique de TGF- β . Cela mène à l'activation de SMAD et à sa translocation dans le noyau, où il va réguler l'expression de plusieurs gènes cibles, dont des gènes codant pour des protéines de la MEC ^[213–215], des récepteurs à la MEC à la surface des cellules ^[216], ainsi que d'autres gènes profibrotiques amplifiant l'action de TGF- β (comme le facteur CTGF : *Connective Tissue Growth Factor*) ^[217].

En plus des voies de signalisation moléculaires régulant la fibrose, la rigidité (*stiffness*) musculaire a été montrée comme un signal fibrogène important dans plusieurs tissus ^[121,218]. En effet, le muscle squelettique est un tissu mécanosensible ^[219]. L'un des facteurs de transcription mécanosensible est YAP (*yes-associated protein*), et celui-là est dérégulé dans les dystrophies musculaires ^[220]. YAP est transloqué dans le noyau

en réponse aux substrats rigides, et cible le facteur *CTGF* et d'autres acteurs du programme fibrogénique [220].

La transformation fibro-adipeuse du muscle et l'alourdissement de la MEC finit par altérer la fonction motrice du muscle, et corrèle directement avec l'âge de la perte de l'ambulation des patients [221]. En plus, la fibrose mènera à une production excessive de cytokines profibrotiques et un statut d'inflammation chronique dans le muscle.

II-5 Prise en charge thérapeutique et traitements en développement

La myopathie de Duchenne est une maladie qui nécessite une prise en charge multidisciplinaire précoce. Malgré des avancées thérapeutiques majeures lors des 30 dernières années, il manque aujourd'hui de traitements curatifs. La prise en charge actuelle consiste principalement à traiter les symptômes dans le but de freiner la progression de la maladie et d'améliorer la qualité de vie des patients. D'autres stratégies thérapeutiques, visant notamment à restaurer l'expression d'une forme fonctionnelle de la dystrophine, sont en cours de développement, et certaines approches ont récemment obtenu l'autorisation réglementaire aux Etats-Unis et en Europe.

II-5-1 Prise en charge thérapeutique actuelle de la DMD

La prise en charge actuelle des patients DMD consiste en une approche multidisciplinaire traitant les différentes manifestations musculaires (muscles squelettique et cardiaque) et extra-musculaires de la maladie. De ce fait des recommandations sont publiées pour permettre d'assurer la meilleure prise en charge et de prolonger la durée et la qualité de vie des patients [222-224].

a) Traitements par glucocorticoïdes

Le traitement par glucocorticoïdes (Deflazacort et Prednisone) est actuellement recommandé le plus tôt possible [225] et tout au long de la vie du patient [222]. Ces traitements ont montré une amélioration significative de la force et de la fonction motrice, et peuvent retarder la perte de l'ambulation [226,227]. Ils ralentissent aussi la survenue des atteintes pulmonaire [228] et cardiaque [229], et réduisent le risque de scoliose [230].

Les effets des glucocorticoïdes varient en fonction des régimes de traitement, avec un retardement plus important chez les patients prenant le traitement quotidiennement (2 ans) que chez les patients avec des schémas de prises on/off (1 an) [231].

Cependant, ces traitements présentent des effets secondaires qui peuvent être problématiques. En effet, les glucocorticoïdes comme la prednisone ou le deflazacort, ont une activité minéralocorticoïde, qui pourrait causer une hypertension, une prise de poids et une atrophie cutanée [56]. Ils sont aussi associés avec un retard de la croissance et de la puberté, une déminéralisation osseuse, un changement de comportements, des cataractes et une insuffisance rénale [225].

b) Prise en charge respiratoire et cardiaque

L'atteinte de la fonction respiratoire chez les patients DMD est associée avec des troubles respiratoires du sommeil et des altérations des échanges gazeux nocturnes, se manifestant au début par une hypoventilation nocturne ^[232]. La prise en charge de l'insuffisance respiratoire consiste à évaluer la fonction respiratoire régulièrement dès le diagnostic. Ensuite, une assistance respiratoire par ventilation mécanique est utilisée chez les patients présentant une hypoventilation ^[223].

Le phénotype cardiaque de la DMD est associé principalement avec une cardiomyopathie dilatée progressive et des troubles du rythme cardiaque ^[73]. La prise en charge des atteintes cardiaques inclut une détection précoce des symptômes d'insuffisance et des arythmies par des bilans annuels. Lors de l'apparition de ces symptômes, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) et des β -bloquants sont prescrits chez les patients. Notamment, le traitement prophylactique avec des inhibiteurs de l'ACE pourrait retarder l'apparition des symptômes cardiaques ^[233-235].

c) Prise en charge d'autres troubles

Les patients DMD présentent d'autres troubles au fur et à mesure de l'évolution de la maladie, qui nécessitent une gestion adaptée à chaque patient.

- **Gestion orthopédique** : les patients DMD sont susceptibles à des déformités musculaires, à une scoliose et à des fractures. Pour cela, une prévention est mise en place avec notamment de la physiothérapie pour préserver la stabilité et l'ambulation ^[56]. En cas de scoliose, une intervention chirurgicale peut être nécessaire.
- **Gestion des troubles endocrinologiques** : ces troubles sont communs chez les patients, surtout avec l'administration des glucocorticoïdes. Pour cela, un régime alimentaire peut être mis en place pour contrer la prise de poids et l'altération du métabolisme du glucose et des lipides. Une supplémentation en calcium/vitamine D est prescrite pour traiter la déminéralisation osseuse.
- **Gestion des troubles neuropsychiques et neurodéveloppementales** : ces troubles se manifestent notamment par des atteintes cognitives, des troubles de l'attention/d'hyperactivité, des troubles obsessionnels compulsifs et des troubles du spectre autistique. Pour cela, un accompagnement psychique et éducatif est mis en place, et des traitements adaptés sont mis en place en fonction du trouble diagnostiqué.
- **Gestion des troubles gastro-intestinaux et urologiques** : au stade plus avancé de la maladie, ces troubles sont fréquents et nécessitent des prises en charge pharmacologiques adaptées.

II-5-2 Stratégies visant à la restauration de l'expression d'une forme de dystrophine fonctionnelle

a) Approches de sauts d'exons

Le saut d'exon thérapeutique est une méthode qui consiste à restaurer le cadre de lecture des transcrits de la dystrophine, dans le but d'avoir de transcrits partiellement fonctionnels similaires à ceux présents chez les patients BMD (**Figure 10d-e**). Cela se fait par des oligonucléotides antisens (ASOs), qui se lient à l'exon cible durant l'épissage du pré-ARNm, et empêchent l'inclusion de ce dernier dans l'ARNm ^[236].

Ces stratégies sont personnalisées à des mutations spécifiques. Plusieurs approches ont été développées principalement pour cibler les mutations localisées dans les *hotspots* du gène *DMD*. Quatre médicaments sont actuellement approuvés par la FDA, et ciblent les délétions dans les exons 51 ^[237,238], 53 ^[239,240] et 45 ^[241] (**Tableau 3**).

Cependant, ces traitements nécessitent des administrations répétées, dues à un *turnover* permanent des ASOs, des transcrits et des protéines. D'ailleurs, les taux de restauration de la dystrophine sont assez faibles pour ces ASOs : 1% pour le Golodirsén ^[242], 2,8% pour le Viltolarsén ^[243] et 1,74% pour le Casimersén ^[244].

Médicament	Forme Chimique	Exon ciblé	Compagnie	Date de mise sur le marché
Eteplirsén	PMO	51	Sarepta	2016
Golodirsén	PMO	53	Sarepta	2019
Viltolarsén	Morpholino PMO	53	NS Pharma	2020
Casimersén	PMO	45	Sarepta	2021

Tableau 3. Liste des médicaments approuvés par la FDA et basés sur des stratégies de sauts d'exons pour le traitement de la DMD.

b) Approches basées sur la translecture du codon stop

Environ 10-15% des patients DMD présentent des mutations ponctuelles (ou mutations non-sens) causant des codons stop prématurés (PTC) ^[74]. La translecture du codon stop consiste à utiliser des molécules pharmacologiques qui se lient aux PTC et qui forcent la machinerie traductionnelle à ajouter un acide aminé aléatoire au lieu d'arrêter la traduction. L'Ataluren est une petite molécule qui supprime les codons stop prématurés. Bien que son efficacité soit limitée, il a montré une tendance d'efficacité thérapeutique et un bon profil de sécurité lors des essais cliniques ^[245], ce qui lui a valu l'obtention d'une mise sur le marché conditionnelle pour les patients ambulants ^[246].

c) Approche de restauration de la dystrophine par transfert de gène

La myopathie de Duchenne est le sujet de développement de plusieurs stratégies de thérapie génique visant à guérir la maladie, cela en restaurant l'expression de la dystrophine par transfert de gène. Cette approche consiste à apporter une copie saine (gène thérapeutique) du gène ciblé afin de restaurer l'expression de la protéine déficiente. Plusieurs vecteurs de délivrance de gène ont été développés. Parmi eux, les vecteurs Adeno-Associés recombinants (AAVr) dérivés des virus AAV (*adeno-associated virus*) sont les plus utilisés pour les maladies neuromusculaires. L'approche la plus prometteuse pour le traitement de la DMD aujourd'hui consiste à rapporter une version raccourcie de la dystrophine (mini- ou microdystrophine) à l'aide d'un vecteur AAVr. Pour cela, nous expliquerons brièvement le concept de la thérapie génique par AAVr avant de présenter les essais en cours utilisant cette approche pour la DMD.

- **Les AAVr en tant que vecteurs de thérapie génique :**

Les AAV ont été découverts initialement par accident dans une préparation d'adénovirus ^[247], puis ont été aussi détectés dans des tissus humains ^[248]. Avec l'essor de la génétique moléculaire et la caractérisation des maladies génétiques, les AAV ont été étudiés en tant que vecteurs potentiels pour le transfert de gènes pour la première fois en 1984 ^[249]. Aujourd'hui, 3 médicaments utilisant des AAVr pour le transfert de gène

sont approuvés : *Glybera* pour le traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase (LPL) approuvé par l'EMA en 2012 ^[250], *Luxturna* approuvé en 2017 pour le traitement d'une maladie rétinienne héréditaire ^[251], *Zolgensma* approuvé par la FDA en 2019 pour le traitement d'une forme d'atrophie musculaire spinale ^[252].

L'AAV sauvage :

Les AAV sont des virus de la famille *Parvoviridae* du genre *Dependovirus*. Ce sont des virus non-enveloppés, composés d'une capsidie icosaédrale d'environ 25 nm de diamètre renfermant un ADN simple-brin de 4,7 kb ^[253]. De part et d'autre de l'ADN simple brin se trouvent des petites répétitions terminales (*Inverted terminal repeat* - ITR) non-codantes, qui sont des motifs palindromiques d'environ 145 paires de bases. Ces structures se replient sur elles-mêmes en formant des boucles en épingle à cheveux aux extrémités 5' et 3' ^[254]. Les ITR jouent un rôle dans l'encapsidation du génome dans les particules virales, ainsi que dans la réplication et dans l'intégration du virus dans le génome de l'hôte ^[255].

Le génome de l'AAV comporte deux cadres de lectures ouverts principaux (ORF pour *open reading frame*) : le gène *Rep* code les protéines de réplifications Rep, le gène *Cap* code les protéines virales structurales VP. Des ORF alternatifs codent trois protéines accessoires : la protéine chaperonne d'assemblage (AAP), la protéine accessoire associée à la membrane (MAAP) et la protéine X (**Figure 13**).

Un large nombre de variants d'AAV provenant de tissus humains ou des primates a été identifié à ce jour ^[256]. Il existe au moins 12 sérotypes principaux (AAV1 à AAV13), et plus de 100 variants ont été isolés et étudiés en tant que vecteurs de transfert de gène ^[257]. Des études épidémiologiques ont montré qu'entre 40 et 80% de la population humaine possède des anticorps contre les AAV, indiquant une exposition aux différents sérotypes d'AAV.

Les AAV recombinants (AAVr) :

Les AAVr sont dérivés de l'AAV sauvage. Dans ce système, seules les séquences d'ITR en *cis* de l'AAV sauvage sont conservées, et servent pour l'encapsidation et l'expression du transgène ^[258]. Les gènes *Rep* et *Cap* sont remplacés par une cassette d'expression du transgène d'intérêt ^[259]. La taille de la cassette est en générale comprise entre 4,1 et 4,9 kb ^[260]. Cette cassette inclut principalement un promoteur, l'ADN complémentaire (ADNc) du gène thérapeutique et un signal de polyadénylation (**Figure 13**).

L'une des méthodes les plus communes de production d'AAVr est la transfection de cellules productrices adhérentes ou en suspension par 3 plasmides (**Figure 14**). Un premier plasmide apportera les séquences des gènes *Rep* et *Cap* en trans, nécessaires pour la réplication et l'assemblage du virion ^[261]. Le transgène entouré des ITR est fourni en *cis* dans un deuxième plasmide. Un troisième plasmide (dit *helper plasmid*) encodant des gènes de l'adénovirus est utilisé pour améliorer la production des particules d'AAVr. À la suite de la production, les AAVr sont purifiés par chromatographie en colonne ou par gradient de centrifugation ^[262].

Les obstacles de la thérapie génique par AAVr :

Une des limites majeures à la thérapie génique à travers des vecteurs AAVr est la réponse immunitaire contre les capsides des AAVr, avec la production d'anticorps neutralisants par le système immunitaire de

l'hôte. En effet, environ 80% de la population humaine serait séropositive aux AAV [263]. L'immunogénicité pourrait survenir ainsi d'anticorps anti-capsides préexistants ou aussi des cellules transduites qui présentent des antigènes de la capside sur le complexe MHC-I, menant à une réponse cytotoxique des lymphocytes T CD8+ [264]. Les réponses immunitaires observées sont liées aux hautes doses d'AAV administrées chez les patients ($\sim 10^{13}$ - 10^{14} génomes des vecteur vg / kg). Bien que ces hautes doses soient nécessaires pour atteindre un effet thérapeutique bénéfique [265], elles sont plus susceptibles de causer de réponses immunitaires non désirées. Pour cela, il faut établir un équilibre entre la dose de vecteurs et l'efficacité thérapeutique pour une meilleure issue clinique [266].

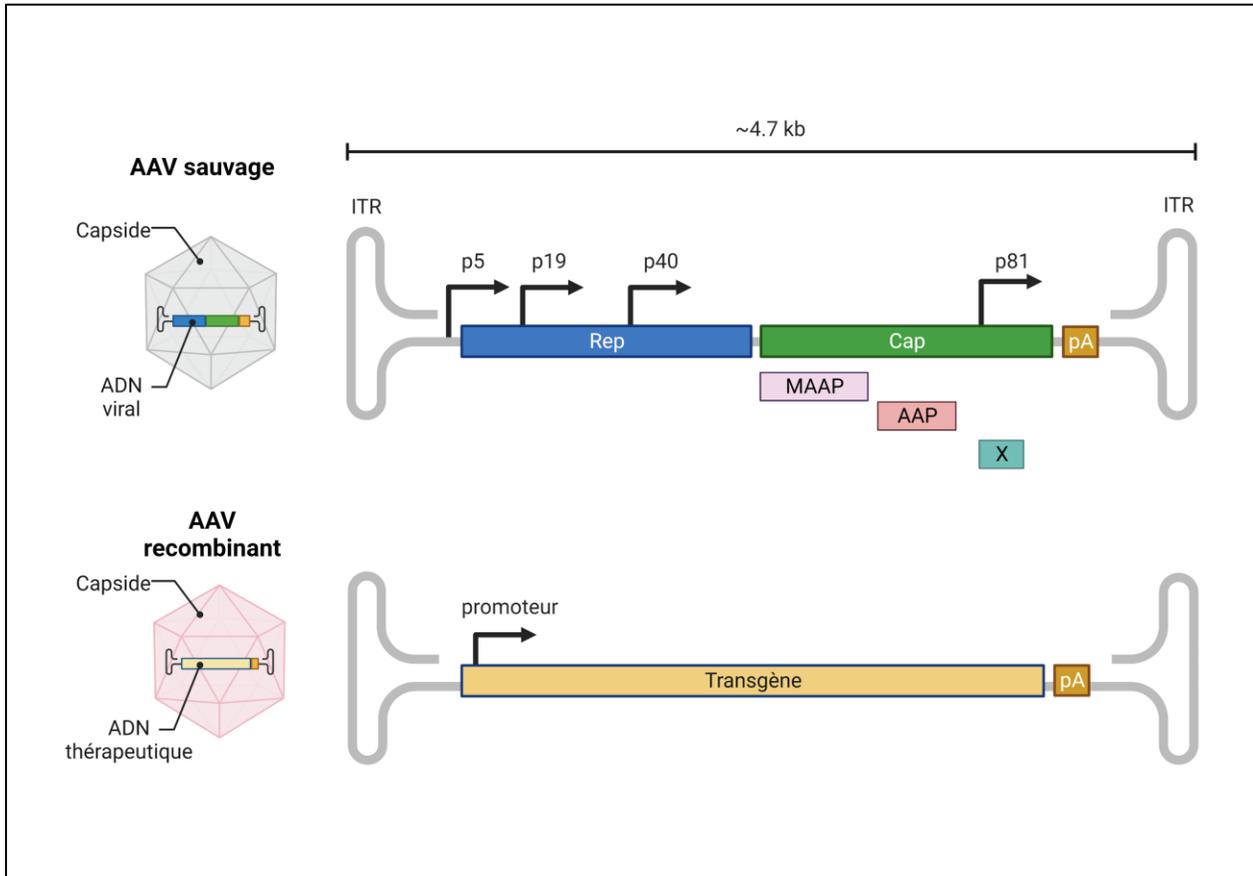


Figure 13. Génome de l'AAV sauvage et de l'AAV recombinant (AAVr). Le génome de l'AAVr est construit en supprimant les gènes Rep, Cap, Maap et Aap et en les remplaçant par une cassette d'expression du transgène comprenant un promoteur, une séquence d'ADN complémentaire (ADNc) du transgène et un signal polyA. Les ITRs sont les seuls éléments restants du génome de l'AAV sauvage et assurent la réplication et l'encapsidation de l'AAVr.

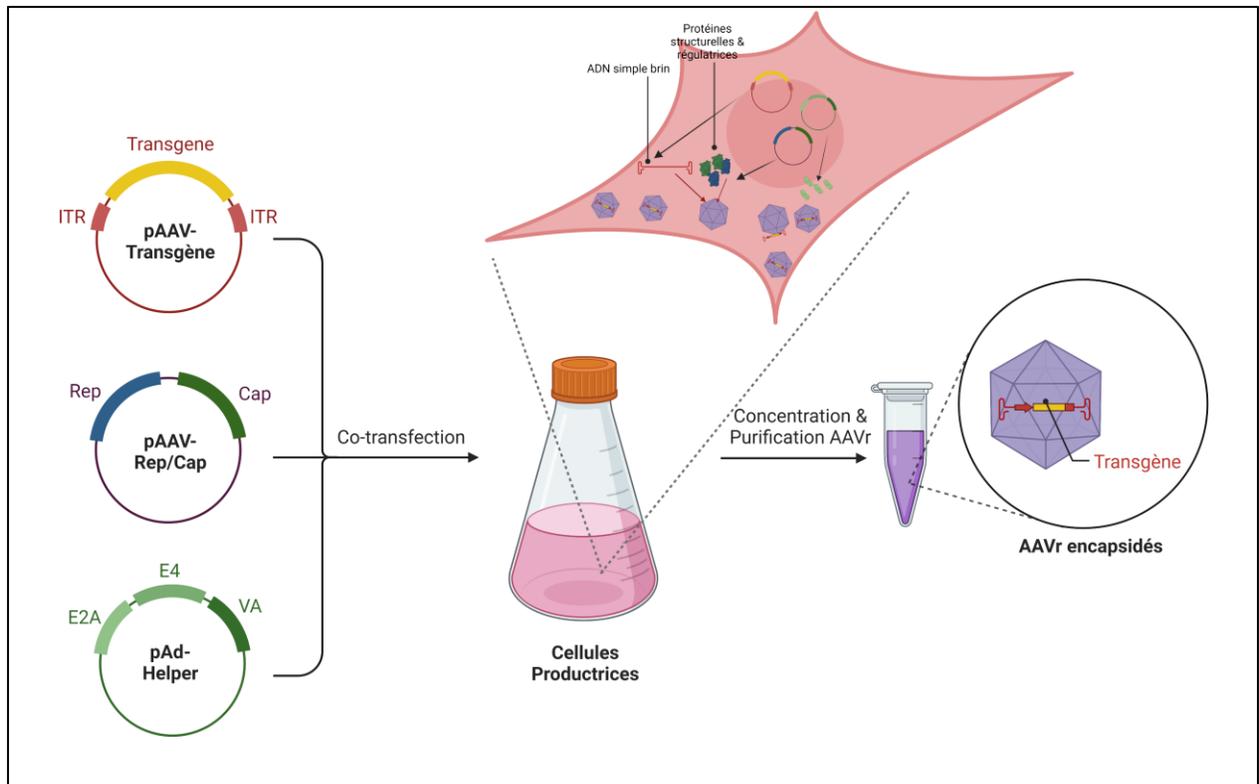


Figure 14. Production des AAVr par triple transfection. Des cellules productrices (en général HEK293T) sont co-transfectées par 3 plasmides. Les gènes Rep (nécessaires pour la réplication) et Cap (encodant pour la capsid du virion) sont fournis in trans dans un plasmide. Le transgène entouré des ITR est fourni in cis dans un deuxième plasmide. Un troisième plasmide contenant des séquences d'Adénovirus est aussi utilisé pour favoriser la production des particules d'AAVr. Par la suite, les particules d'AAVr sont récoltées et purifiées.

- **Approche de transfert de gène pour la myopathie de Duchenne : la microdystrophine**

Le cadre de lecture ouvert de l'ARNm du gène *DMD* fait environ 11,5 kb, ce qui dépasse largement la capacité d'encapsidation des AAVr. Pour surmonter cette limite, des mini- ou microdystrophines (MD) ont été conçues en gardant les domaines essentiels de la dystrophine [100,267–269]. Cette approche se base principalement sur des observations faites chez des patients BMD, chez qui des formes courtes de dystrophine peuvent réduire la sévérité du phénotype par rapport à la DMD [98,270] (**Figure 10**). Surtout, cette approche est théoriquement applicable à tous les patients DMD, quelles que soient les mutations qu'ils portent.

Une autre approche consiste à fragmenter la cassette d'expression de la dystrophine dans plusieurs vecteurs AAVr [271–273], ce qui permet d'inclure plus de domaines de la dystrophine dans le transgène final.

Depuis la première construction réduite de dystrophine générée en 1997 [274], plus de 30 configurations de microdystrophines ont été publiées. Plusieurs optimisations ont été faites au fur et à mesure de la caractérisation des domaines de liaisons de la dystrophine, et des fonctions assurées par chaque domaine. Notamment, les travaux du laboratoire du Dr. Dickson se sont focalisés sur l'optimisation des codons de la séquence du transgène [275]; le laboratoire du Dr. Duan a inclus les répétitions R16-R17 à sa construction, nécessaires pour la liaison de nNOS au sarcolemme [95,96].

Trois essais cliniques sont en cours aux Etats-Unis (Sarepta Therapeutics, Pfizer et Solid Biosciences). Chaque essai utilise une construction de microdystrophine légèrement différente (**Figure 15**). Un autre essai clinique sponsorisé par Généthon est en cours en Europe en collaboration avec Sarepta. Le médicament développé par Sarepta Therapeutics (*Elevidys*) a eu une autorisation accélérée de commercialisation par la FDA le 22 juin 2023, pour les patients entre 4-5 ans. Cette autorisation a fait suite à des débats sur l'efficacité du traitement. En effet, l'essai clinique n'a pas atteint les objectifs fixés en termes d'amélioration fonctionnelle chez les patients ^[276]. L'autorisation a été ainsi basée sur les résultats secondaires (*surrogate endpoints*), évoqués par le niveau d'expression de la microdystrophine. L'argumentation était que la production de microdystrophine devrait raisonnablement entraîner une amélioration de la fonction musculaire ^[277]. Il faut noter que l'autorisation donnée par la FDA est conditionnelle et dépendra prochainement sur des résultats de la phase III en cours dans une plus grande cohorte de patients.

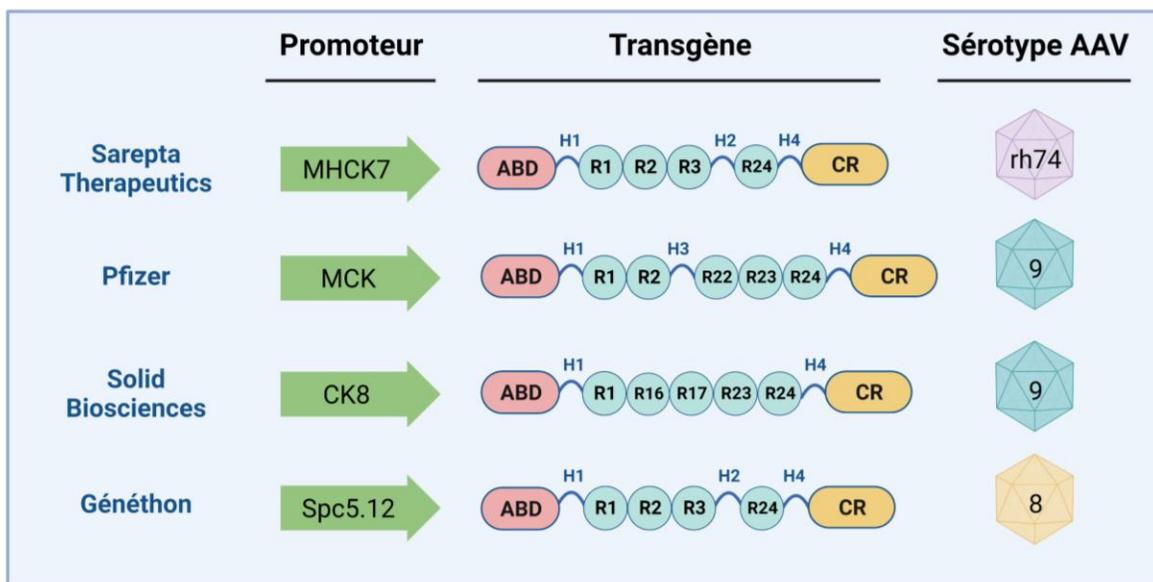


Figure 15 – Constructions de microdystrophine en expérimentation clinique (Adapté de Elangkov & Dickson 2021). Les promoteurs utilisés dans ces constructions (en vert) sont spécifiques du muscle et du cœur. Le transgène de toutes les constructions contient les séquences codantes pour les domaines considérés cliniquement pertinents et fonctionnels. Le choix du sérotype d'AAV repose également sur le tropisme tissulaire, ces sérotypes ciblent particulièrement le muscle et le cœur.

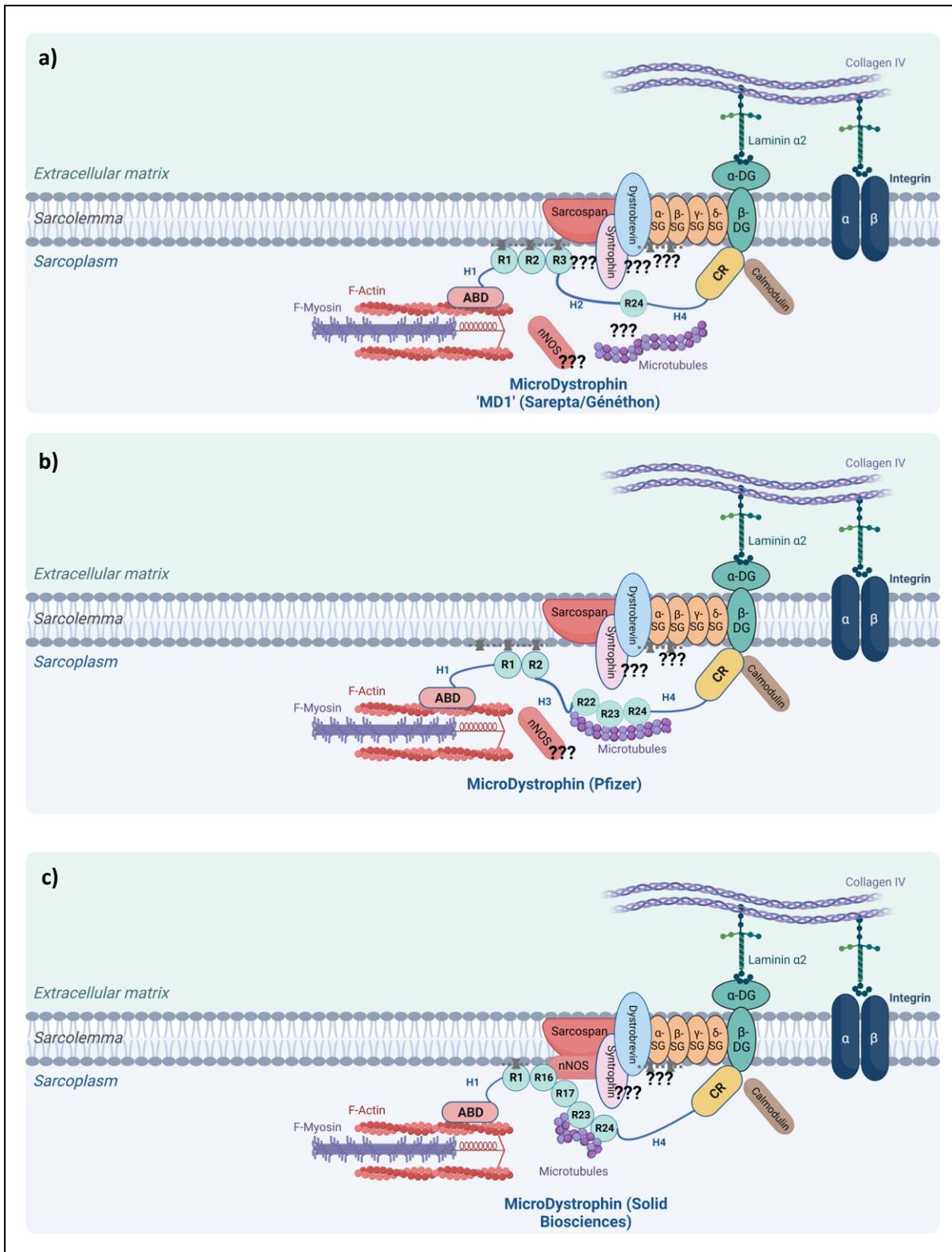


Figure 16. La localisation des constructions de microdystrophines en essai clinique au DAGC. a) La microdystrophine 'MD1' utilisée par Sarepta et Généthon lie les filaments d'actine au DAGC. b) La microdystrophine utilisée par Pfizer assure le lien aux microtubules par R22-R24 en plus. c) La microdystrophine utilisée par Solid Bioscience inclut les spectrines R16-R17 qui permettent la liaison de nNOS.

Médicament Expérimental / Essais cliniques	Déroulement de l'essai	Evaluation / Résultats	Avancement
Sarepta Therapeutics [SRP-9001 - <i>Elevidys</i>] NCT03375164 (Phase I/II) - 2017 NCT04626674 (Phase I) - 2020 NCT03769116 (Phase II) – 2018 - NCT05096221 – (Phase III) 2021	<ul style="list-style-type: none"> • Une première cohorte a été administrée en phase I/II à une dose de 2^{E14} vg/kg. • Une deuxième cohorte de patients a reçu en phase I une dose de 1,33^{E14} vg/kg et a montré un profil de sécurité satisfaisant. • Une étude de phase II randomisée en double aveugle était lancée en 2018. • Une étude de phase III a été lancée en 2021. 	<ul style="list-style-type: none"> • Des analyses des biopsies de la phase I/II ont montré une expression robuste de microdystrophine (81% de fibres positives) ^[278,279]. • Une amélioration de l'indice NSAA (<i>North Star Ambulatory Assessment</i>) a été observée chez les 4 patients en phase I/II mais aucune amélioration significative était obtenue en phase II. • Effets secondaires graves chez 4 patients en phase II qui ont été résolus. 	<ul style="list-style-type: none"> • Début septembre 2017 • Recrutement en cours de 120 patients pour une étude de phase III • Autorisation de mise sur le marché donnée par la FDA le 22 juin 2023 pour les patients entre 4-5 ans (l'autorisation est dépendante sur la vérification du bénéfice clinique dans l'essai de confirmation en cours)
Pfizer [PF-06939926] NCT03362502 (Phase Ib) – 2017 NCT04281485 (Phase III) - 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Une première étude de phase Ib a évalué une dose de 1^{E14} vg/kg. • Une deuxième étude d'escalade de dose s'est faite à une dose de 3^{E14}vg/kg • Une phase III avec 99 patients a été lancée en 2022. 	<ul style="list-style-type: none"> • Une amélioration d'indice NSAA chez 2 patients après un an, diminution de CK ^[280]. • Expression de microdystrophine : 69% de fibres positives avec la haute dose. • Effets secondaire graves survenus chez 2 patients (toxicité rénale) et résolus. Des réponses immunitaires de gravité variable observées chez tous les patients. 	<ul style="list-style-type: none"> • Début en décembre 2017. • Essai suspendu en décembre 2021 suite au décès d'un patient • L'essai a redémarré en avril 2022 après modification du protocole d'injection
Solid Biosciences [SGT-001] NCT03368742 (Phase I,II)	<ul style="list-style-type: none"> • Une première cohorte de patients a reçu une faible dose de 5^{E13} vg/kg en phase I/II. Une deuxième cohorte a reçu une dose plus haute de 2^{E14} vg/kg. • 9 patients ont été injectés en janvier 2022. 	<ul style="list-style-type: none"> • Les niveaux d'expression de microdystrophine étaient variables (5-50%) dans les biopsies musculaires. • Une amélioration de la capacité pulmonaire a été observée, et la capacité motrice ne s'est pas dégradée en comparaison avec les patients inclus dans l'histoire naturelle. • Effets indésirables graves répertoriés (hépatite et giardase) chez deux patients mais résolus rapidement. • Une activation de la cascade de complément a causé des réponses inflammatoires chez deux patients et une thrombocytopénie chez 1 patient. 	<ul style="list-style-type: none"> • Début décembre 2017 – <i>En cours</i> • Essai suspendu puis réhabilité en octobre 2020 après modification des protocoles de l'essai et de production de vecteurs ^[281].
Généthon / Sarepta Therapeutics [GNT 0004] 2020-002093-27 (Phase I/II/III)	<ul style="list-style-type: none"> • Premier patient injecté en avril 2021 • Première étude de détermination de dose qui sera suivie par une étude randomisée contre placebo 	<ul style="list-style-type: none"> • Résultats non communiqués. 	<ul style="list-style-type: none"> • Essai lancé en décembre 2018.

Tableau 4. Essais cliniques en cours utilisant l'approche de transfert de microdystrophine par AAVr.

Bien que ces traitements représentent une grande avancée pour le traitement de la DMD, leur efficacité à long terme reste discutable. En effet, les AAV sont des virus non intégratifs par définition, et il est possible qu'avec le renouvellement musculaire, le transgène encodant la microdystrophine disparaisse. Des études à long terme sont encore nécessaires pour aborder ce point.

Du plus, des effets secondaires graves ont été observés chez plusieurs patients, probablement liés à une activation de la réponse immunitaire innée (se manifestant par une insuffisance rénale) et une réponse immunitaire cellulaire contre le vecteur. Normalement, tous les patients inclus dans ces études sont pré-examinés pour une potentielle réponse humorale à la capsid du vecteur, et traités par des hautes doses de glucocorticoïdes pour contrer la réponse immunitaire aux capsides virales. En outre, les patients présentant des anticorps neutralisant aux AAV sont exclus de ces études.

Récemment, une collaboration entre les 4 compagnies menant les essais cliniques a permis de mieux comprendre les effets graves observés chez des patients des différentes études cliniques. En effet, certains épitopes présents dans les constructions de la microdystrophine (épitopes encodés par les exons 8 à 11) pourraient causer une réponse immunitaire cytotoxique au non soi, chez les patients ayant des délétions dans les exons codant pour ces épitopes (des effets graves sont observés chez les patients ayant des délétions de l'exon 8 à l'exon 21) ^[282]. Cette meilleure compréhension de la réponse immunitaire contre le transgène permettra dans le futur de mieux éviter les effets indésirables, et d'exclure les patients avec des mutations spécifiques (ce qui a été le cas pour l'autorisation de la FDA à Sarepta où les patients ayant des délétions des exons 8 et/ou 9 sont exclus).

d) Approches d'éditions du génome par le système CRISPR-Cas9

Le développement des systèmes d'éditions du génome a permis d'exploiter de nouvelles approches thérapeutiques pour la correction des différentes mutations retrouvées dans la DMD, notamment avec le système CRISPR-Cas9 (courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées – Protéine Cas associée à CRISPR). Ce système repose sur l'utilisation de guides d'ARN qui reconnaissent des régions complémentaires spécifiques de l'ADN, et qui permettent à l'enzyme Cas9 de générer une coupure double brin sur la location ciblée ^[283]. Les coupures sont ensuite réparées par les systèmes de réparation de l'ADN de la cellule-hôte : le système de réparation par jonction d'extrémités non-homologues (*non-homologous end joining* ; NHEJ) et le système de réparation par recombinaison homologue (*homology directed repair* ; HDR) ^[284]. Le système HDR est prédominant dans les cellules en division et permet de réparer la coupure double brin en insérant une séquence d'ADN modèle sans erreurs, tandis que le système NHEJ est prédominant dans les cellules post-mitotiques, et est plus susceptible aux erreurs générant de petites insertions ou délétions (INDELS) de nucléotides au niveau du site de coupure.

Les approches d'édition du génome testées dans le cadre de la DMD visent à restaurer le cadre de lecture pour générer une forme fonctionnelle de la dystrophine. Cela se fait par plusieurs stratégies : des délétions d'exons, des sauts d'exons, des réparations du cadre de lecture par NHEJ, l'utilisation du système HDR pour corriger des mutations avec de séquences d'ADN donneurs, ou aussi l'édition de base unique sur un site cible pour corriger les mutations ponctuelles (*base editing*) ^[285].

De preuves de concepts pour ces différentes stratégies ont été faites sur des modèles cellulaires et animaux [285–287]. Des travaux sont aussi faits sur des approches moins spécifiques, ciblant potentiellement un plus grand nombre de mutations, en supprimant par exemple les exons 45-55 [288] ou les exons 47-58 [289]. D'autres stratégies consistent à cibler toutes les mutations de la DMD, en modulant l'expression de gènes homologues à la dystrophine, comme l'utrophine [290].

Néanmoins, ce type d'approches d'édition de génome fait face à plusieurs défis, notamment l'optimisation du système de délivrance, la gestion du risque de réponse immunitaire et surtout le risque d'édition hors-cible (*off-target*). Jusqu'à maintenant, un seul patient DMD a reçu un traitement expérimental utilisant un système CRISPR-Cas9. Malheureusement ce patient est décédé peu après le traitement, probablement en raison d'une réponse immunitaire innée causée par la haute dose d'AAVr [291].

OBJECTIFS

Le travail présenté s'inscrit dans le cadre des travaux du laboratoire des 'Dystrophies musculaires Progressives' dirigé par Dr. Isabelle Richard. Les travaux de l'équipe portent sur le développement de traitements innovants pour des dystrophies musculaires rares, pour lesquelles il n'existe pas de traitements à ce jour. Plusieurs médicaments expérimentaux de thérapie génique ont été développés par l'équipe, dont un qui est en essai clinique actuellement pour le traitement d'une myopathie des ceintures liée à la déficience en FKRP (LGMDR9).

Le projet présenté se focalise principalement sur l'étude des mécanismes physiopathologiques de la myopathie de Duchenne, dont certains sont communs pour plusieurs dystrophies musculaires. En effet, certains mécanismes pathologiques régissant plusieurs dystrophies musculaires sont encore mal élucidés. Le but du projet présenté est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, en déchiffrant ces mécanismes. Notre approche consiste à développer des thérapies combinées, associant à la fois la thérapie génique visant à restaurer le gène déficient, à un traitement complémentaire des perturbations cellulaires et métaboliques du muscle. Cette approche permettra d'un côté de réduire la dose d'AAVr utilisée (en réduisant donc les risques de toxicité et des réponse immunitaire) tout en améliorant l'effet thérapeutique de la thérapie génique.

Récemment l'équipe a pu identifier une dérégulation du mécanisme du cholestérol dans la DMD. Plusieurs indications lient la dérégulation du métabolisme du cholestérol à des défauts du système endolysosomal. Cela nous a mené à émettre l'hypothèse que des défauts du système endolysosomal pourraient survenir dans la DMD, et joueront potentiellement un rôle important dans la pathogenèse de la dystrophie.

Le premier objectif de ce projet est de caractériser les défauts du système endolysosomal et leur lien avec la perturbation du métabolisme du cholestérol. Le deuxième objectif est le développement d'une thérapie combinée, avec le transfert de la microdystrophine par un vecteur AAVr et la correction des troubles métaboliques secondaires.

Objectif 1 : Caractériser les dérégulations du système endolysosomal dans le muscle dystrophique, et leur corrélation avec les défauts de métabolisme du cholestérol.

- **Galectine-3 : un biomarqueur potentiel de dommages lysosomaux dans DMD**

Une indication majeure pour l'implication d'une dysfonction lysosomale dans la DMD est la régulation à la hausse importante du biomarqueur de dommages lysosomaux galectine-3 (LGALS3) dans le muscle DMD. En effet, galectine-3 est un régulateur fondamental de la réponse au stress lysosomal ^[292-294] et un biomarqueur de dommage lysosomal ^[294,295]. Galectine-3 est fortement surexprimée dans le muscle dystrophique ^[296] et son niveau d'expression corrèle avec la sévérité du modèle animal de DMD et aussi avec le niveau d'expression de la dystrophine ^[297]. De plus, l'expression de galectine-3 est normalisée par la restauration de l'expression de la dystrophine ^[298]. Galectine-3 est aussi associée avec l'inflammation ^[299], et sa régulation à la hausse dans la DMD pourrait être attribuée à la réponse inflammatoire dans le muscle ^[300]. Cependant, de nouvelles études ont suggéré une expression de galectine-3 dans les cellules musculaires (plutôt que les cellules immunitaires infiltrées), et un rôle important de galectine-3 dans la régénération musculaire ^[301,302].

Ces indications suggèrent que galectine-3 pourrait être un biomarqueur de dommages lysosomaux dans la DMD. Pour répondre à ces questions, nous allons en premier temps étudier l'expression et la localisation de galectine-3 dans le contexte de la DMD et d'autres dystrophies musculaires. Nous chercherons aussi à caractériser les différents paramètres de la fonction lysosomale et de la réponse au stress lysosomal.

- **Indices liant l'excès de cholestérol aux altérations lysosomales et aux dystrophies musculaires**

De plus en plus d'études montrent que l'excès de lipides pourrait interférer avec les fonctions lysosomales, y compris l'acidification [303,304], le trafic [305-308], le relargage des exosomes [309], l'activité enzymatique [163], l'autophagie [308,310-313], et l'activation de la voie mTOR [314].

La maladie de Niemann Pick de type C (NPDC) est un exemple pertinent de maladie lysosomale causée par un excès de cholestérol. NPDC1 est causée par des mutations et un dysfonctionnement du transporteur de cholestérol lysosomal NPC1, et est caractérisée par une accumulation de cholestérol dans le lysosome [315]. Cette maladie illustre bien le lien entre l'excès de cholestérol, les dysfonctions de l'autophagie et du lysosome, et la survenue d'une cascade de mécanismes pathologiques.

En contraste, le mécanisme moléculaire liant la surcharge de cholestérol à la dégénération musculaire dans la DMD n'est pas encore compris. Quelques études antérieures ont montré que l'accumulation de cholestérol musculaire dans les tubules T du sarcolemme et dans les structures de la triade peut avoir un effet négatif sur le métabolisme musculaire [316]. Ceci est dû à une réduction de l'efficacité du couplage excitation-contraction du muscle et de l'endocytose du glucose (c'est-à-dire en provoquant une résistance à l'insuline). Nous soupçonnons cependant qu'en outre (comme pour les maladies de stockage lysosomales), l'excès de cholestérol pourrait s'accumuler dans le système endolysosomal et provoquer un dysfonctionnement lysosomal.

Pour cela, nous chercherons à comprendre l'effet de la surcharge de cholestérol sur le phénotype dystrophique, et particulièrement sur le système endolysosomal dans le muscle.

Pour cela, des souris *Dmd*^{mdx-4Cv} et WT seront mises sous diète lipidique riche en cholestérol pour étudier ces mécanismes. En effet, il est bien connu que les patients DMD présentent certaines caractéristiques du syndrome métabolique. Il est également bien connu qu'un régime alimentaire occidental (riches en glucides, en graisses saturées et en cholestérol) peut aggraver le syndrome métabolique chez l'Homme et chez l'animal. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un régime riche en graisses et en cholestérol pourrait augmenter la teneur en cholestérol du muscle squelettique chez les souris saines et dystrophiques. Cela nous permettra d'évaluer si l'augmentation de cholestérol dans le muscle pourrait aggraver la dystrophie musculaire, et permettra aussi d'étudier l'effet de l'excès de cholestérol sur le système endolysosomal dans le muscle.

Objectif 2 : Développer de nouvelles approches thérapeutiques combinées pour le traitement des dystrophies musculaires.

Le second axe du projet se focalise sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour la myopathie de Duchenne.

L'approche thérapeutique la plus prometteuse actuellement pour le traitement de la DMD consiste à délivrer une forme raccourcie mais fonctionnelle de la dystrophine (la microdystrophine) à l'aide d'un vecteur AAVr. Bien que ces approches aient montré des résultats très intéressants chez les animaux, les résultats des études cliniques ont été plus mitigés. En effet, les hautes doses thérapeutiques utilisées dans les études cliniques sont associées souvent avec de toxicités rénale, hépatique et de réponses immunitaires sévères. Il est donc nécessaire de parvenir à réduire les doses de virus délivrées en clinique, tout en gardant l'effet thérapeutique. Une approche étudiée consiste à développer de vecteurs AAVr modifiés ciblant spécifiquement le muscle, et qui permettent d'avoir de réduire les doses de vecteurs administrées tout en gardant des niveaux d'expression similaires du transgène. En revanche, notre approche consiste à associer une dose suboptimale d'AAVr à un traitement complémentaire, afin d'améliorer l'effet de la thérapie génique en corrigeant les altérations secondaires non corrigées par le transfert de la microdystrophine.

En premier temps, un système de criblage *in vitro* pour des molécules éliminant le cholestérol du muscle serait développé. Ensuite, les molécules les plus prometteuses seront testées chez les souris $DMD^{mdx-4Cv}$, seules et en combinaison avec un vecteur AAV délivrant la séquence codante d'une forme de microdystrophine, à dose réduite (suboptimale).

RESULTATS

I- Caractérisation des défauts des lysosomes et du métabolisme du cholestérol dans le muscle dystrophique

La première étape du projet consistait à caractériser les défauts des lysosomes et du métabolisme de cholestérol dans le muscle dystrophique. En premier temps, nous avons adapté l'essai de détection de la perméabilisation de la membrane lysosomale par *puncta* de galectine-3 au muscle squelettique, ce qui nous permet d'identifier précisément les dégâts lysosomaux dans les dystrophies musculaires. Ensuite, des souris *Dmd^{mdx-4Cv}* et WT ont été mises sous diète riche en cholestérol, le but de cette étude étant d'étudier l'effet de l'accumulation du cholestérol sur le phénotype dystrophique, et sa corrélation avec les défauts de la fonction lysosomale. Nous avons aussi évalué l'effet du transfert de la microdystrophine par AAVr sur la restauration des différentes perturbations métaboliques chez les souris *Dmd^{mdx}*.

I-1 Caractérisation des défauts lysosomaux dans le muscle

I-1-1 L'essai de '*puncta*' de galectine-3 (*Galectin-3 Puncta Assay*)

Les galectines sont des lectines qui se lient spécifiquement aux glucides ^[317]. Ces lectines sont présentes dans le cytosol, le noyau et la MEC et sont transloquées à la membrane des endo-lysosomes endommagés avant leur élimination par autophagie ^[295]. Plusieurs études se sont focalisées récemment sur la réponse de stress lysosomal, dans laquelle la perméabilisation de la membrane lysosomale joue un rôle central ^[318]. Cependant, très peu d'études se sont penchées sur l'étude des dommages des endo-lysosomes dans le muscle.

Des myoblastes humains immortalisés ont été fixés, ou différenciés en myotubes élongés pendant 7 jours puis fixés, et immunomarqués pour galectine-3 (LGALS3) (**Figure 17**). Un signal diffus de galectine-3 a été observé chez les cellules contrôles. Le traitement avec L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLOMe), un agent lysosomotrope qui induit des lésions membranaires spécifiques du lysosome ^[319], pendant 20 minutes, a causé la formation de spots ou '*puncta*' caractéristiques des lysosomes endommagés.

Cela indique que galectine-3 est exprimée dans les cellules myogéniques, et est recrutée spécifiquement aux lysosomes endommagés, assurant ainsi un rôle primordial dans la réponse au stress lysosomal. L'immunomarquage de galectine-3 pourrait donc être appliqué pour détecter la perméabilisation de la membrane lysosomale dans le muscle.

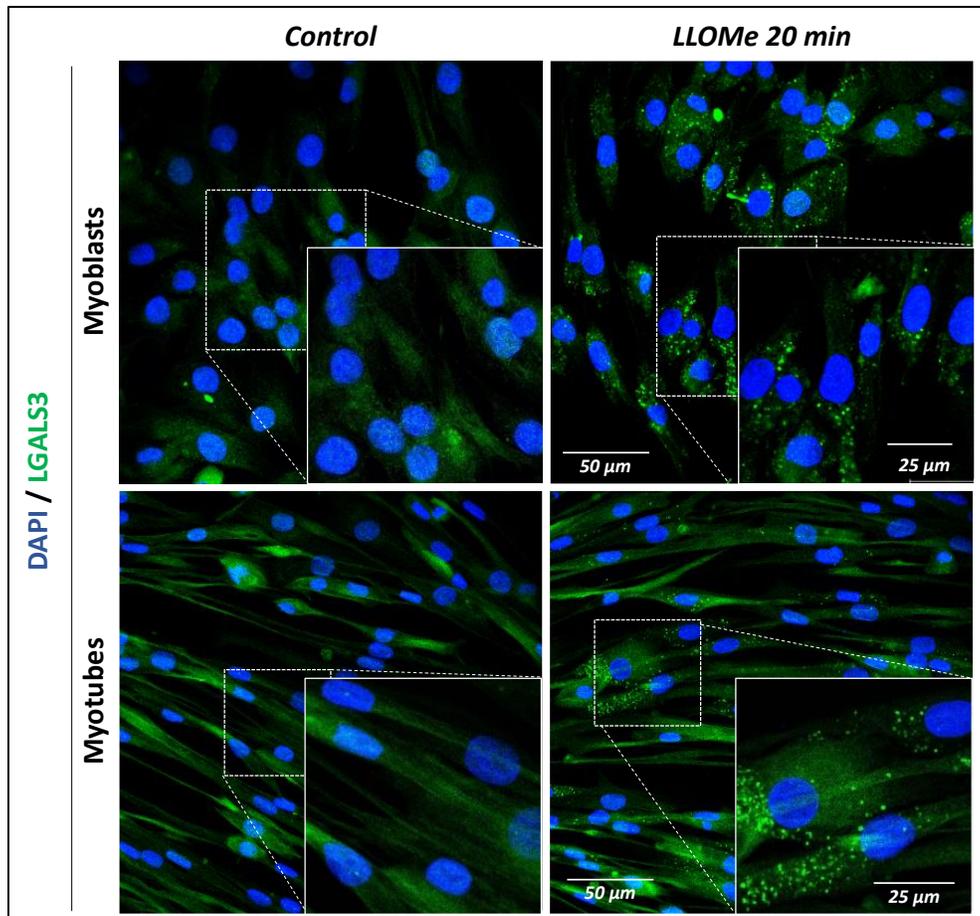


Figure 17. 'Galectin Puncta Assay' dans une lignée cellulaire myogénique. Dans les myoblastes et myotubes, l'immunomarquage de LGALS3 montre un signal diffus dans toute la cellule. Après traitement avec LLOMe, un agent causant un dommage spécifique de la membrane lysosomale, le marquage change d'un aspect diffus à ponctué indiquant des lésions de la membrane lysosomale.

I-1-2 La perméabilisation de la membrane lysosomale altère la fonction des protéases lysosomales

Les lysosomes contiennent plus de 60 hydrolases lysosomales solubles ^[320] impliquées dans diverses fonctions cellulaires vitales, dont la dégradation intracellulaire des protéines, le métabolisme énergétique et les réponses immunitaires ^[321]. La cathepsine B (CTSB) existe sous deux formes, pro-CTSB (non mature) et une forme activée ou mature. La maturation de CTSB nécessite l'environnement acide du lysosome.

Ici, nous avons traité des myoblastes et des myotubes avec LLOMe pendant 3 heures, causant une perméabilisation de la membrane des lysosomes, puis nous avons évalué l'activité de CTSB. Pour cela les cellules ont été incubées avec un substrat fluorescent de CTSB, 'Magic Red' (**Figure 18**). Ce substrat est utilisé pour l'évaluation de l'activité intracellulaire de la CTSB, par la libération d'un fluorophore lors de son clivage par la CTSB. Le traitement des cellules avec LLOMe a réduit significativement l'activité de la CTSB dans les myoblastes et les myotubes (**Figure 18a-c**), quantifiée par imagerie fluorescente. En plus, un western blot (WB) de la forme mature de CTSB dans des myotubes a montré une expression réduite après traitement par LLOMe.

Cela indique que la perméabilisation de la membrane lysosomale cause une altération de la fonction de CTSB, et une réduction de sa maturation. Cela pourrait être dû à une diminution de l'acidité du lysosome. Ainsi, la détection des dommages de la membrane lysosomale pourrait indiquer aussi l'altération de certaines fonctions assurées par le lysosome.

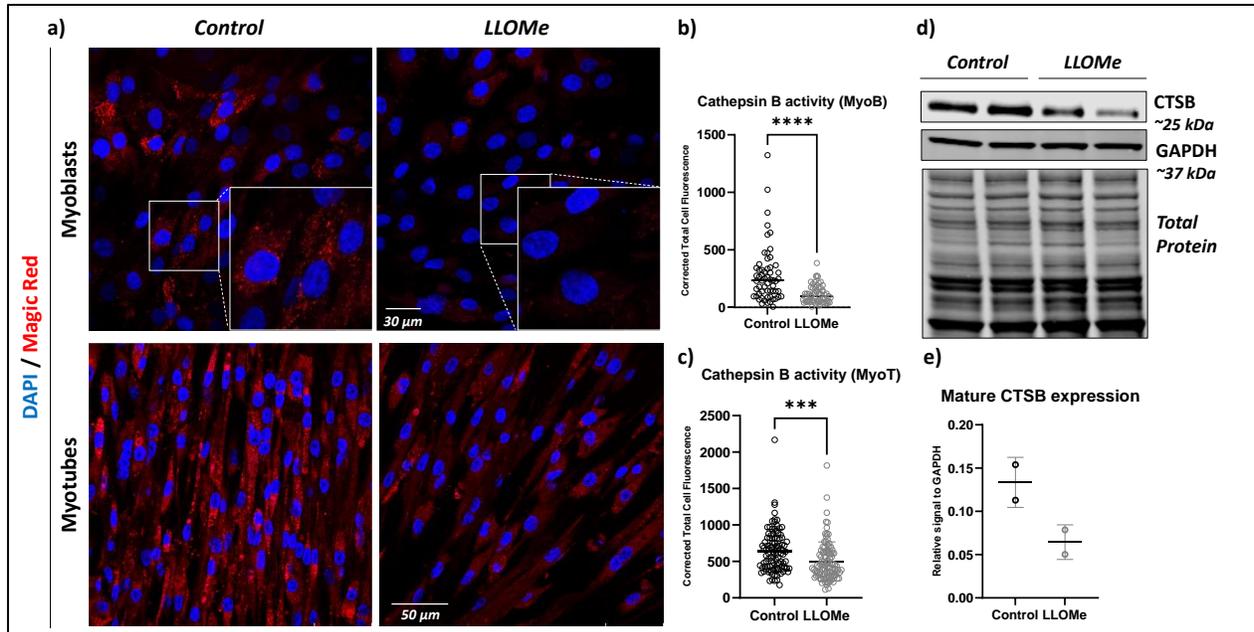


Figure 18. La perméabilisation de la membrane du lysosome altère l'activité de la cathepsine B. a) Les myoblastes ou les myotubes ont été traités avec LLOMe pendant 3h, puis incubés avec une solution de Magic Red – CTSB pour 30 min, avant d'être fixés et imagés au microscope confocal. b-c) La fluorescence cellulaire totale corrigée pour au moins 60 cellules individuelles a été quantifiée pour chaque condition. d) Western blot montrant la forme mature de CTSB dans des myotubes traités ou pas avec LLOMe. (n=2). e) Quantifications des bandes du WB normalisées au signal de GAPDH.

I-2 La surexpression de Galectine-3 dans DMD et d'autres dystrophies musculaires corrèle avec des dommages du lysosome

La surexpression de galectine-3 au niveau d'ARNm a été répertoriée précédemment dans des modèles animaux de la DMD [296,297]. Cependant, aucune étude n'a corrélé cette surexpression à un endommagement des lysosomes.

Pour commencer, l'expression de galectine-3 au niveau de l'ARNm et de protéines a été étudiée chez de jeunes souris *Dmd*^{mdx-4Cv} de 7 semaines. Une régulation à la hausse significative a été observée à la fois en protéines et en ARNm dans les muscles gastrocnémien (GA) et tibial antérieur (TA) des souris dystrophiques par rapport aux souris *Wild-Type* (WT) (Figure 19a-f). En plus, une augmentation significative de galectine-3 a été détectée dans le sérum des souris *Dmd*^{mdx-4Cv} par rapport aux souris contrôles (quantification par WB et par test ELISA) (Figure 19g-i).

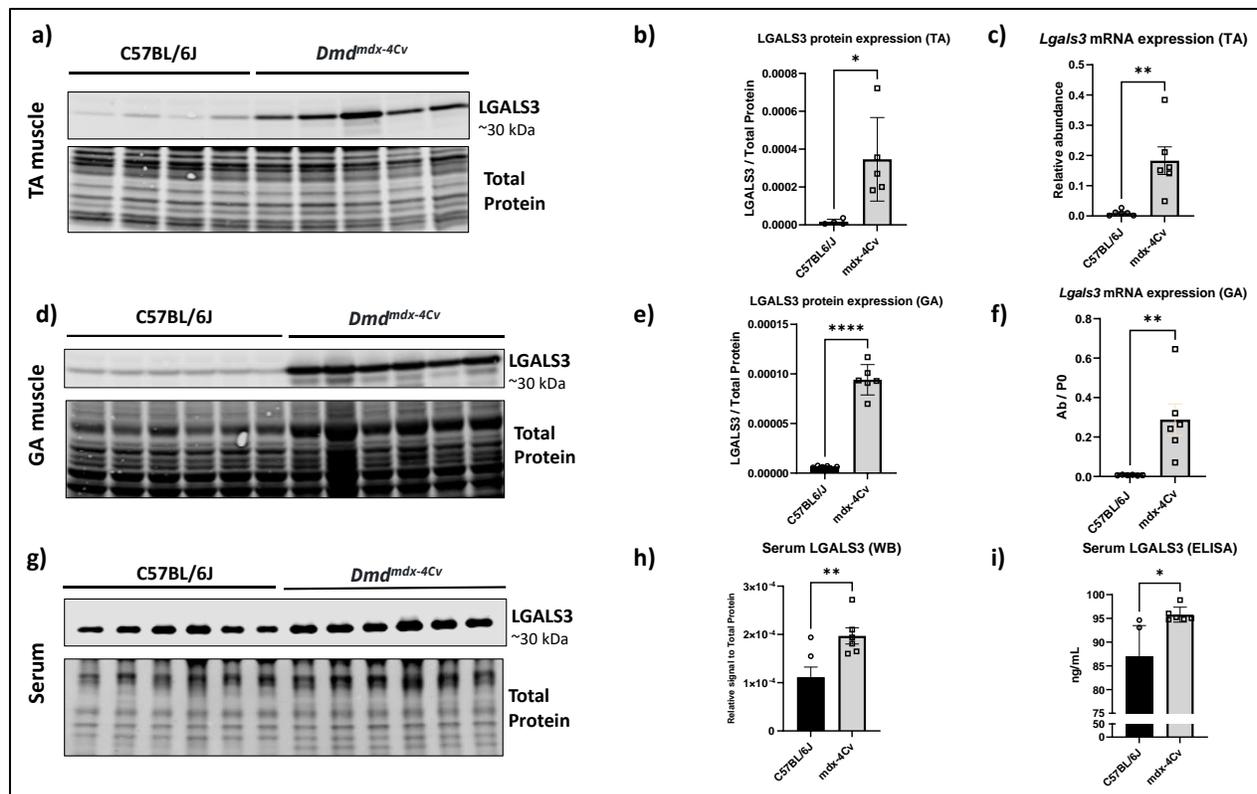


Figure 19. Galectine-3 est régulée à la hausse dans le muscle et le sérum de jeunes souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. **a & d)** Western Blot de LGALS3 dans les muscles tibial antérieur (TA) et gastrocnémien (GA) chez des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ de 7 semaines et des souris WT contrôles (C57BL/6J) ($n \geq 4$). **b & e)** Quantifications du signal des bandes de LGALS3, normalisées au signal du marquage des protéines totales. **c & f)** Expression de LGALS3 chez les mêmes souris déterminées par RT-qPCR et normalisée au gène de ménage Rplp0. **g)** Western blot de LGALS3 dans le sérum de souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et de souris WT. **h)** Quantification du signal des bandes normalisée au signal de protéines totales dans le sérum. **i)** Dosage par ELISA de la forme murine de LGALS3 dans le sérum de souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et de souris WT.

Ensuite, nous avons effectué un immunomarquage de LGALS3 et de LAMP2 (protéine de la membrane lysosomale) sur des coupes transversales du muscle TA (**Figure 20**). Ce marquage a montré une colocalisation des *puncta* de galectine-3 avec LAMP2 à l'intérieur des fibres musculaires des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ de 7 semaines, indiquant un degré important de lésions de la membrane lysosomale dans les fibres du muscle dystrophique. En plus, un élargissement et une augmentation du nombre des lysosomes sont aperçus par l'immunomarquage de LAMP2 dans le muscle des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. Cela est indicatif d'un stress lysosomal, et d'une accumulation de matériels non digérés dans le lumen du lysosome [318]. En plus, un marquage positif de LGALS3 et LAMP2 est observé à l'extérieur des fibres. Cela représente les cellules immunitaires (surtout les macrophages) infiltrées dans le muscle dystrophique, et qui expriment fortement galectine-3.

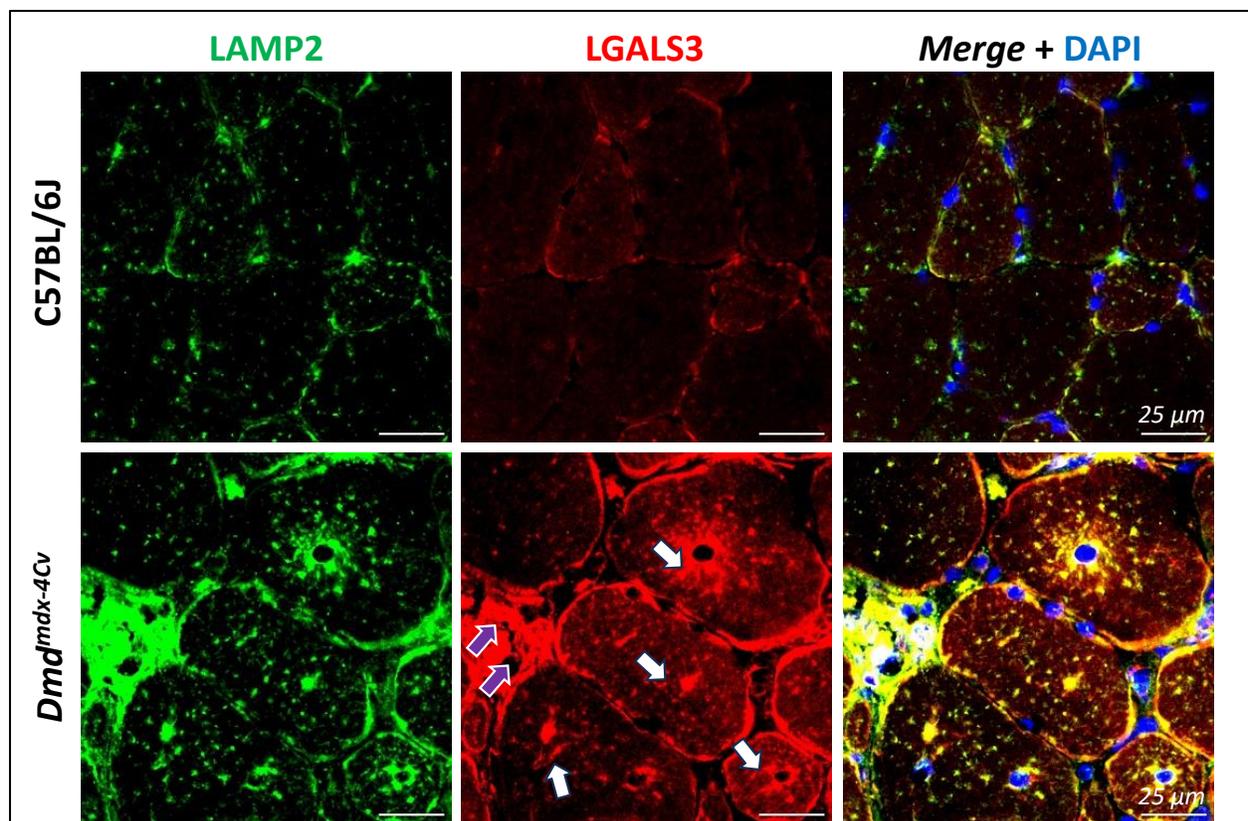


Figure 20. Immunomarquage de LGALS3 et LAMP2 sur des coupes transversales de muscles TA chez des souris *Dmd^{mdx-4Cv}* et WT. Les flèches en violet montrent les cellules immunitaires infiltrées dans le muscle et positives à LGALS3. Les flèches blanches montrent les puncta de LGALS3+/LAMP2+ indiquant les lysosomes endommagés à l'intérieur des fibres musculaires.

D'ailleurs, une comparaison des marquages de LGALS3 et CD11b (marqueur de macrophages) a été faite sur des coupes transversales en série (**Figure 21a**). Les zones d'inflammation dans le muscle dystrophique ont été marquées par LGALS3 et CD11b. Cependant, uniquement l'immunomarquage avec LGALS3 était positif à l'intérieur des fibres musculaires, montrant la spécificité de LGALS3 pour détecter les lysosomes endommagés dans les fibres musculaires du muscle dystrophique.

Pour montrer davantage l'origine myogénique de galectine-3 dans le muscle dystrophique, des myoblastes ont été isolés du muscle flexor digitorum brevis (FDB) de souris WT et souris *Dmd^{mdx-4Cv}* de 7 semaines, et cultivés pendant 6 jours dans un milieu de croissance, avant d'être fixés et immunomarqués pour LAMP2 et LGALS3 (**Figure 21b**). Une augmentation et un élargissement des vésicules LAMP2 sont claires dans les myoblastes DMD par rapport aux cellules contrôles. Aussi, des spots de galectine-3 colocalisés avec LAMP2 sont observés dans les myoblastes DMD, alors qu'aucun signal n'a été détecté dans les myoblastes WT.

La détection d'un stress lysosomal dans des myoblastes DMD montre que la perturbation du système endolysosomal pourrait être un évènement précoce dans la pathogenèse de la DMD, et confirme que la régulation à la hausse de galectine-3 dans le muscle DMD est en partie d'origine myogénique.

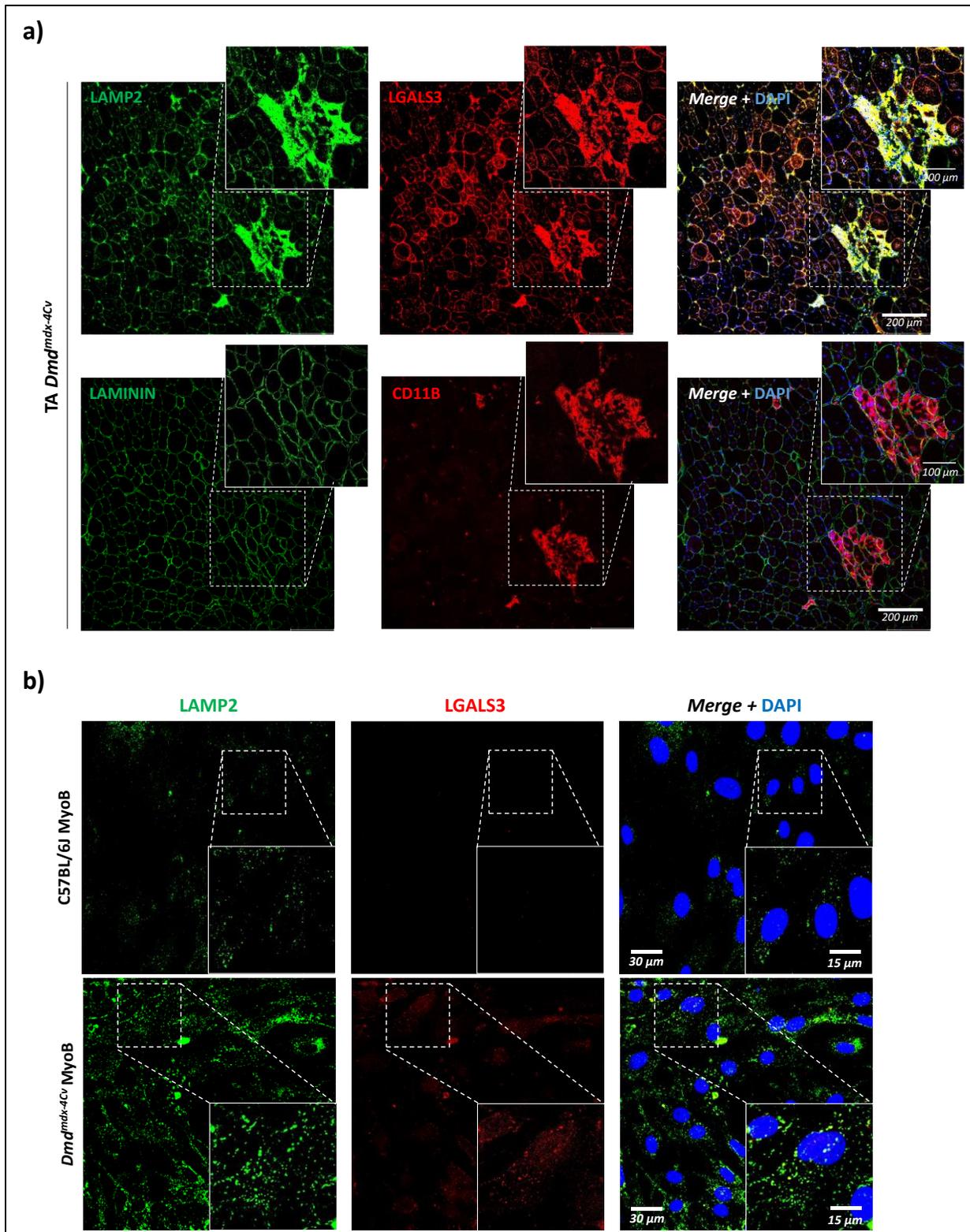


Figure 21. La surexpression de galectine-3 dans le muscle DMD est attribuée en partie aux fibres musculaires. **a)** Coupes transversales en série du muscle TA de souris *Dmd^{mdx-4Cv}* immunomarquées pour LGALS3, LAMP2 (lysosome), LAMININ (membrane) et CD11b (macrophages). **b)** Immunomarquage de LAMP2 et LGALS3 sur des myoblastes primaires isolés du muscle flexor digitorum brevis de souris *Dmd^{mdx-4Cv}* et contrôles (C57BL/6J) de 7 semaines.

Ensuite, nous avons validé l'essai des *puncta* de galectine-3 sur un autre modèle animal de la DMD : le GRMD (*Golden Retriever Muscle Dystrophy*) (**Figure 22**). Les muscles des chiens DMD ont montré effectivement des spots de galectine-3 dans les fibres musculaires, qui colocalisait avec LAMP2, indiquant un élargissement de lysosomes endommagés.

L'immunomarquage LAMP2/LGALS3 a été également fait sur des biopsies de muscles de patients DMD de 2 ans et de 3 ans et demi (**Figure 23**). Les lésions des lysosomes ont été détectées chez les deux patients, avec une sélectivité d'atteinte pour certaines fibres, ce qui corrélait avec l'atteinte musculaire observée en marquage H&E.

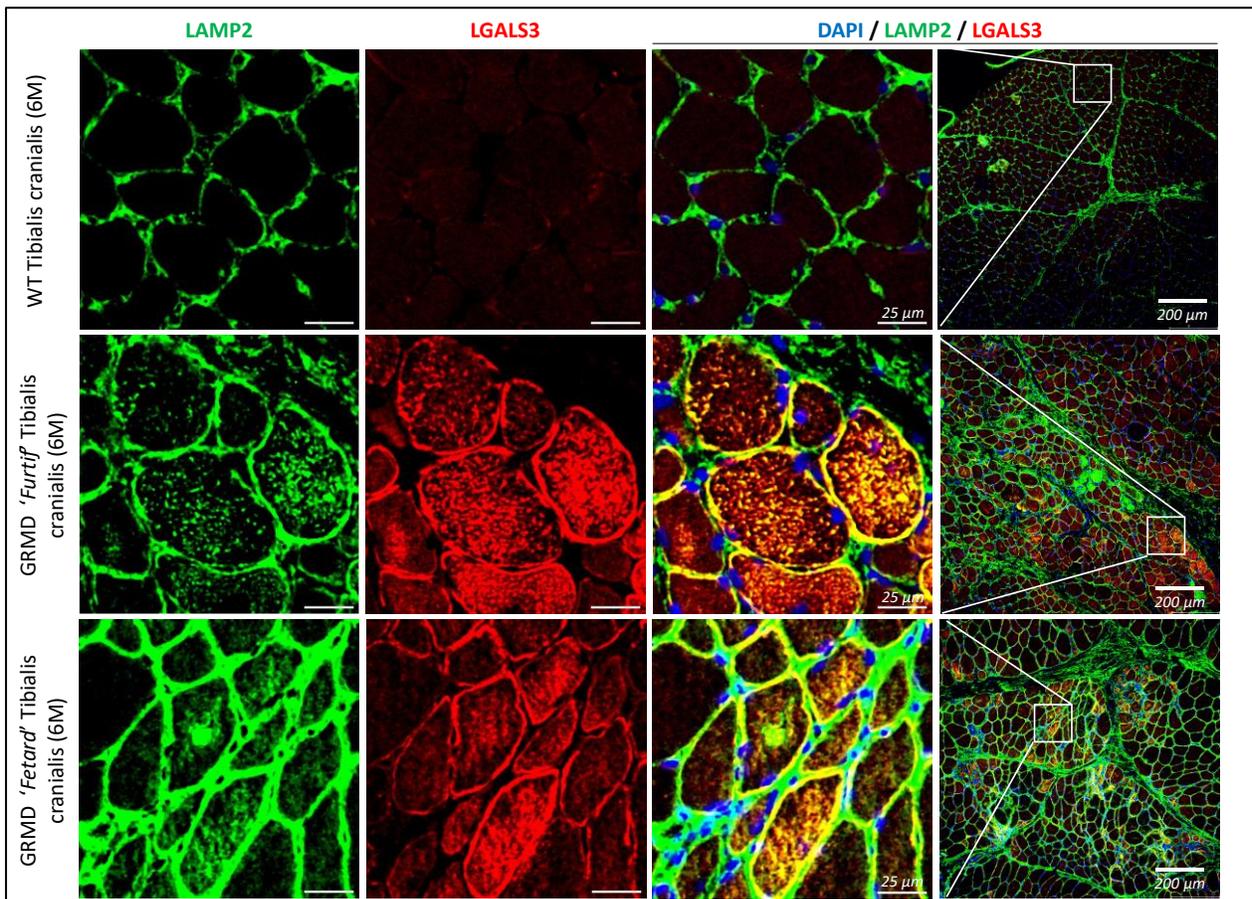


Figure 22. 'Galectin Puncta Assay' sur des coupes de muscles de tibialis cranialis de chiens DMD (*Golden Retriever Muscle Dystrophy* 'GRMD') et d'un chien sain de 6 mois.

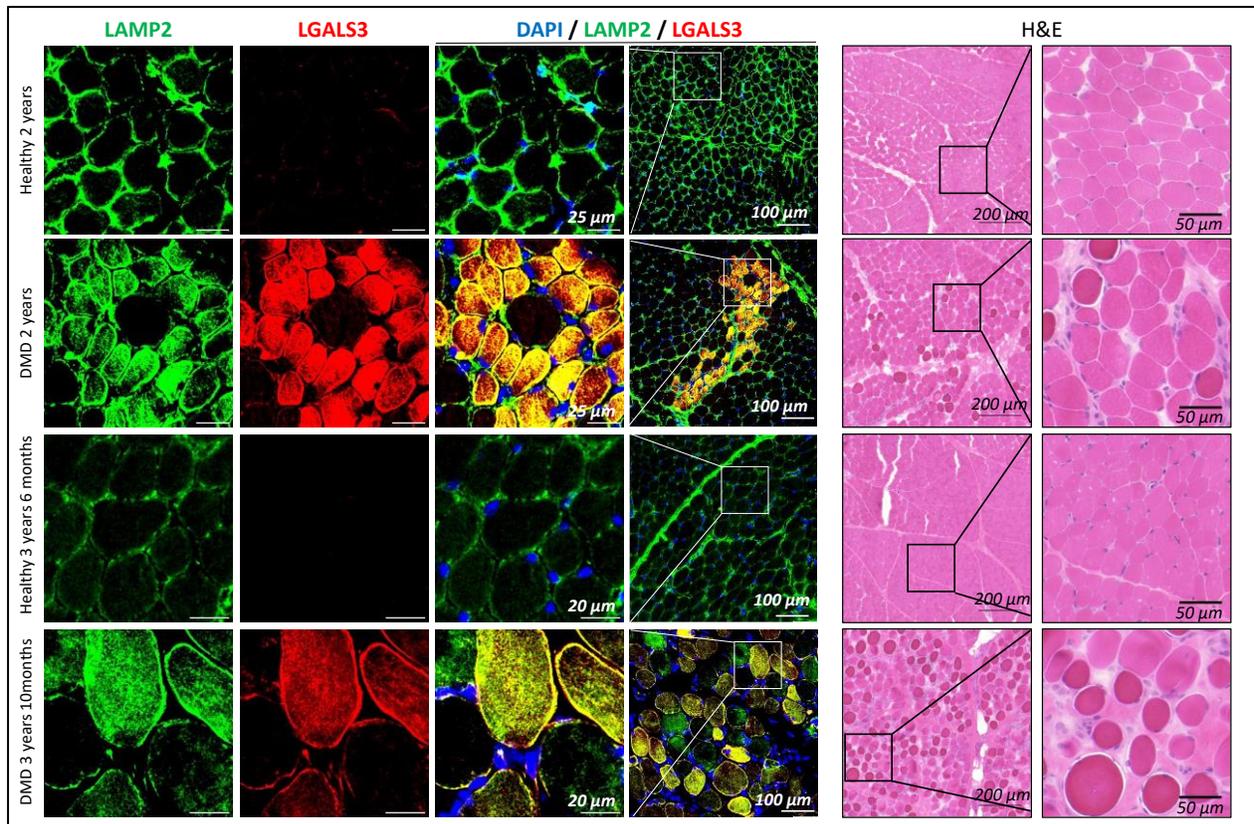


Figure 23. 'Galectin Puncta Assay' et marquage H&E sur des biopsies de muscles de patients DMD et de patients sains du même âge.

Nous voulions vérifier si les dégâts lysosomaux sont spécifiques à la DMD ou sont-ils un mécanisme commun à plusieurs dystrophies musculaires. Pour cela, l'immunomarquage LGALS3/LAMP2 a été fait sur des biopsies musculaires d'un patient atteint d'une forme de dystrophie des ceintures, la gamma-sarcoglycanopathie (LGMDR5) (Figure 24a). Certaines fibres présentaient effectivement des spots de LGALS3 indiquant des dégâts lysosomaux. Toutefois, il semblait qu'il y en a moins de fibres atteintes que chez les patients DMD, ce qui corrélait bien avec la sévérité du phénotype dystrophique évalué en marquage H&E.

En plus, des coupes musculaires de jeunes patients de la maladie de Pompe ont servi comme contrôle positif. Cette maladie est une maladie de stockage lysosomale affectant plusieurs tissus dont le muscle squelettique, et est caractérisée par une accumulation de glycogène dans les lysosomes, ce qui cause une dérégulation du métabolisme des lysosomes. Effectivement, l'immunomarquage avec LGALS3/LAMP2 a montré un degré très important d'atteinte lysosomale, affectant presque toutes les fibres musculaires, et corrélant avec le degré de la sévérité de la myopathie évalué en marquage HE (désorganisation complète du muscle et accumulation du tissu cicatriciel).

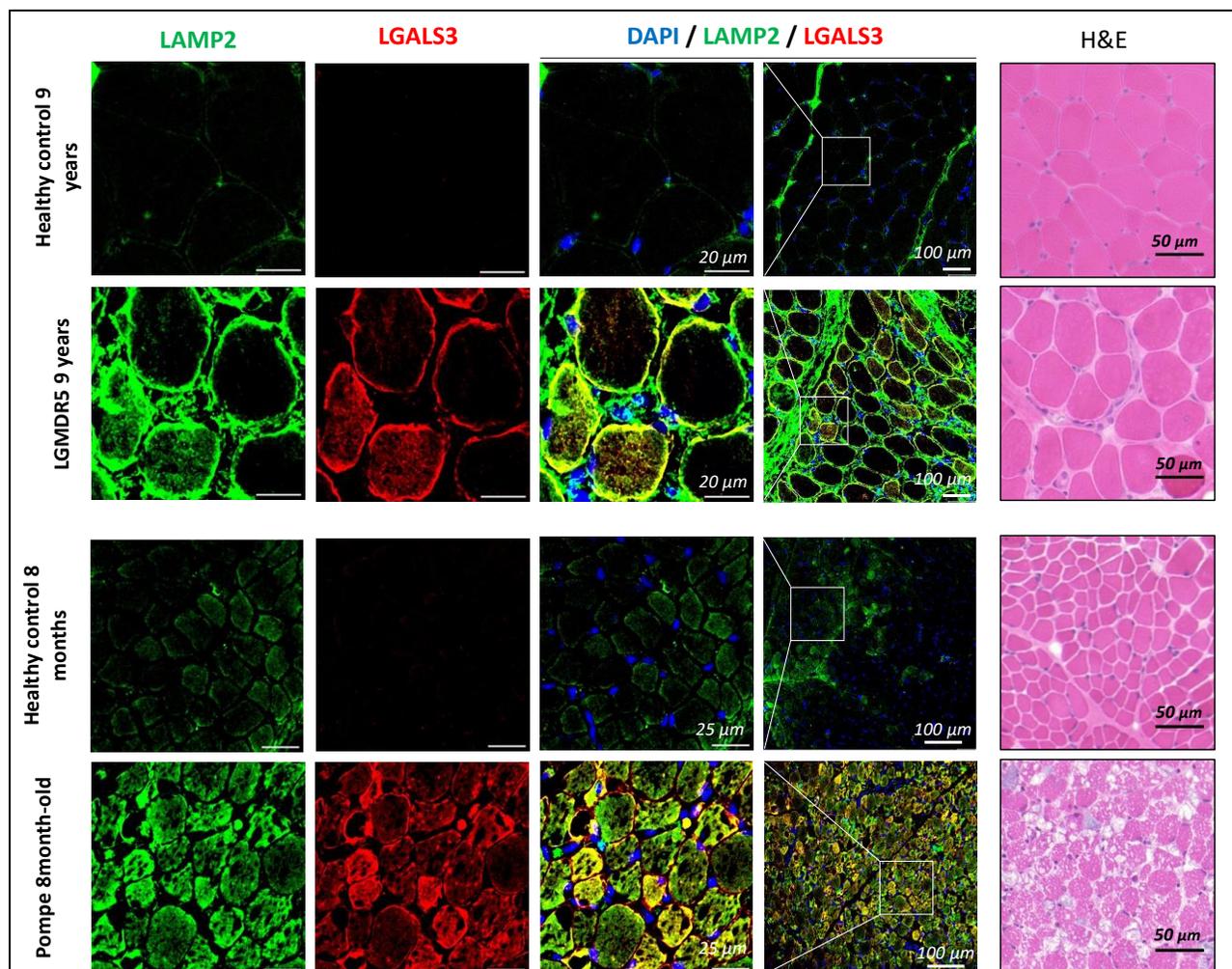


Figure 24. ‘Galectin Puncta Assay’ et marquages H&E sur des biopsies musculaires d’un patient d’une dystrophie des ceintures (Gamma-Sarcoglycanopathie ou LGMDR5) et d’un patient de la maladie de Pompe.

I-3 Systèmes de contrôle de qualité des lysosomes

Les dommages des lysosomes causent l’activation des voies de contrôle de qualité des lysosomes. En effet, les lysosomes assurent des fonctions vitales dans la cellule. Pour cela, différentes voies moléculaires assurent la réparation, le remplacement et l’élimination des lysosomes endommagées ^[322]. Une des premières voies décrites et les plus importantes est celle médiée par le facteur de transcription TFEB (*Transcription Factor EB*)^[323,324]. En conditions physiologiques ou riches en nutriments, ce facteur de transcription est phosphorylé et est retenu dans le cytosol sur la membrane des lysosomes (de façon dépendante de MTORC1). Lors de conditions dépourvues en nutriments ou de dégâts importants du lysosome, TFEB est déphosphorylé et transloqué dans le noyau, où il pourra activer la transcription de gènes impliqués dans l’autophagie et la biogénèse lysosomale, dont les protéases et les protéines de la

membrane du lysosome. Il est intéressant à noter que *TFEB* est hautement exprimé dans le muscle squelettique^[325], soulignant l'importance de la biogenèse lysosomale et l'autophagie pour le maintien de l'homéostasie tissulaire du muscle.

I-3-1 Voie TFEB de biogenèse lysosomale

Premièrement, nous avons voulu évaluer l'état d'activation de la biogenèse lysosomale dans la DMD. Pour cela, un immunomarquage de TFEB a été effectué sur des coupes transversales de muscles de souris *Dmd*^{*mdx-4Cv*} et WT de 7 semaines (**Figure 25a**). Une localisation spécifique de TFEB dans le noyau a été détectée dans le muscle des souris *Dmd*^{*mdx-4Cv*} contre un signal plus diffus dans la fibre musculaire chez les souris contrôles. Cette localisation nucléaire de TFEB est particulièrement évidente dans les fibres centronuclées (régénératrices). Une analyse de la colocalisation entre TFEB et le DAPI (noyau) a permis de mettre en évidence la translocation de TFEB dans le noyau chez les souris *Dmd*^{*mdx-4Cv*} par rapport aux souris contrôles (**Figure 25c**).

En plus, l'immunomarquage de TFEB sur des myoblastes isolés des mêmes souris a montré une localisation spécifique de TFEB dans le noyau (**Figure 25b**).

Aucune différence significative n'a été détectée entre les souris *Dmd*^{*mdx-4Cv*} et contrôles au niveau de l'expression protéique de TFEB dans le muscle (**Figure 25d-e**). En revanche, une sous-régulation des transcrits de *Tfeb* a été aperçue chez les souris *Dmd*^{*mdx-4Cv*} (**Figure 25f**). Cette sous-régulation pourrait être due à une boucle de rétroaction exercée par TFEB lui-même.

Ces résultats montrent que TFEB semble être activé dans le muscle dystrophique, mais aussi dans des myoblastes DMD. Il est toutefois intéressant de noter que l'activation de TFEB pourrait varier entre les différents types de fibres, et aussi entre les fibres en cours de dégénération et les fibres régénératrices. Ainsi une étude plus profonde est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes de l'activation de la biogenèse lysosomale dans le muscle dystrophique.

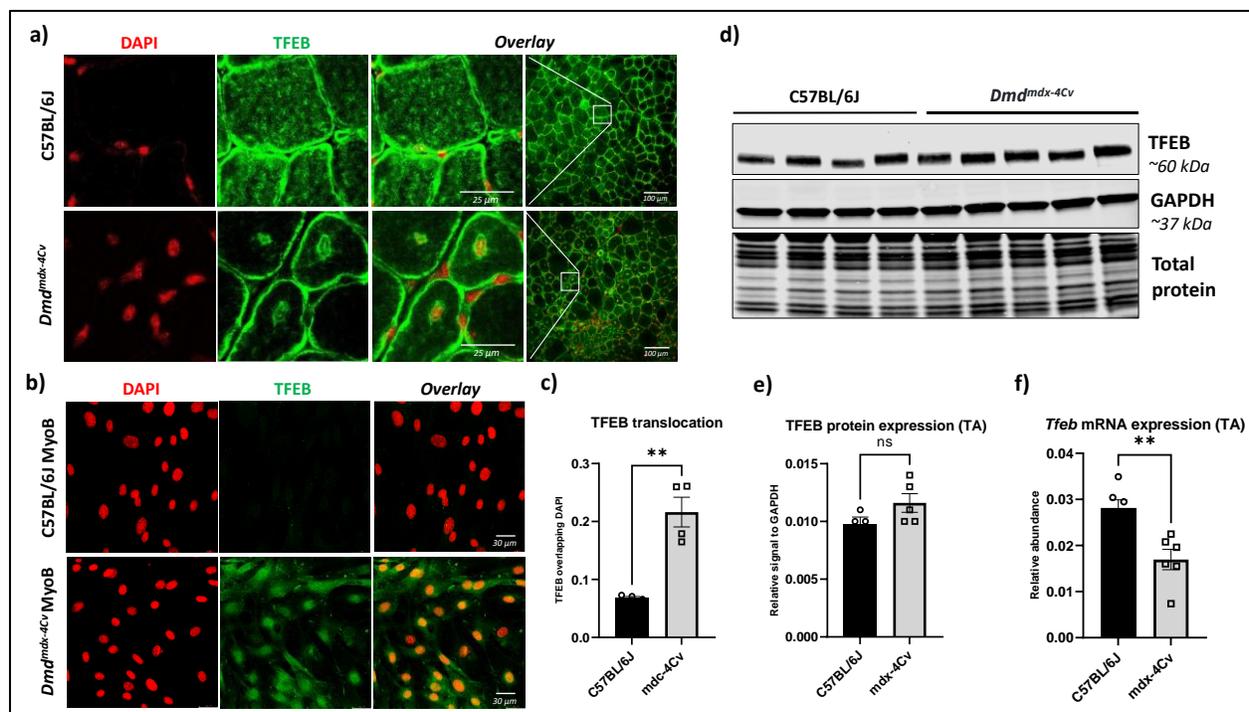


Figure 25. Activation de la voie TFEB dans le muscle des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. *a-b)* Immunomarquage de TFEB sur des coupes de muscles de souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et de souris contrôles de 7 semaines et sur des myoblastes isolés des mêmes souris. *c)* Quantification du signal TFEB colocalisé avec le DAPI dans au moins 4 images de 4 souris différentes. *d)* Western blot de TFEB dans le muscle TA des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et contrôles. *e)* Quantification des bandes de TFEB normalisée avec GAPDH ($n \geq 4$) *f)* Expression de *Tfeb* chez les mêmes souris évaluée par RT-qPCR.

Nous avons voulu ensuite étudier les différents protéines lysosomales contrôlés par TFEB. Une augmentation significative de LAMP2 a été détectée en western blot (**Figure 26a-b**), ce qui corrélait avec ce qui a été aperçu par immunofluorescence. Une surrégulation au niveau transcriptionnel de *Lamp2* a aussi été détecté (**Figure 26c**), ainsi qu'une surrégulation d'autres gènes impliqués dans l'activité protéolytique du lysosome comme cathepsine D (*Ctsd*), et dans l'acidification du lumen lysosomal (*Atp6v1h*) (**Figure 26c**).

Cela indique que l'activation et la translocation de TFEB dans le muscle dystrophique active la transcription de plusieurs gènes du métabolisme lysosomal, dont les protéines de la membrane, les pompes à protons nécessaires pour l'acidification du lumen et les protéases nécessaires pour l'activité dégradative du lysosome.

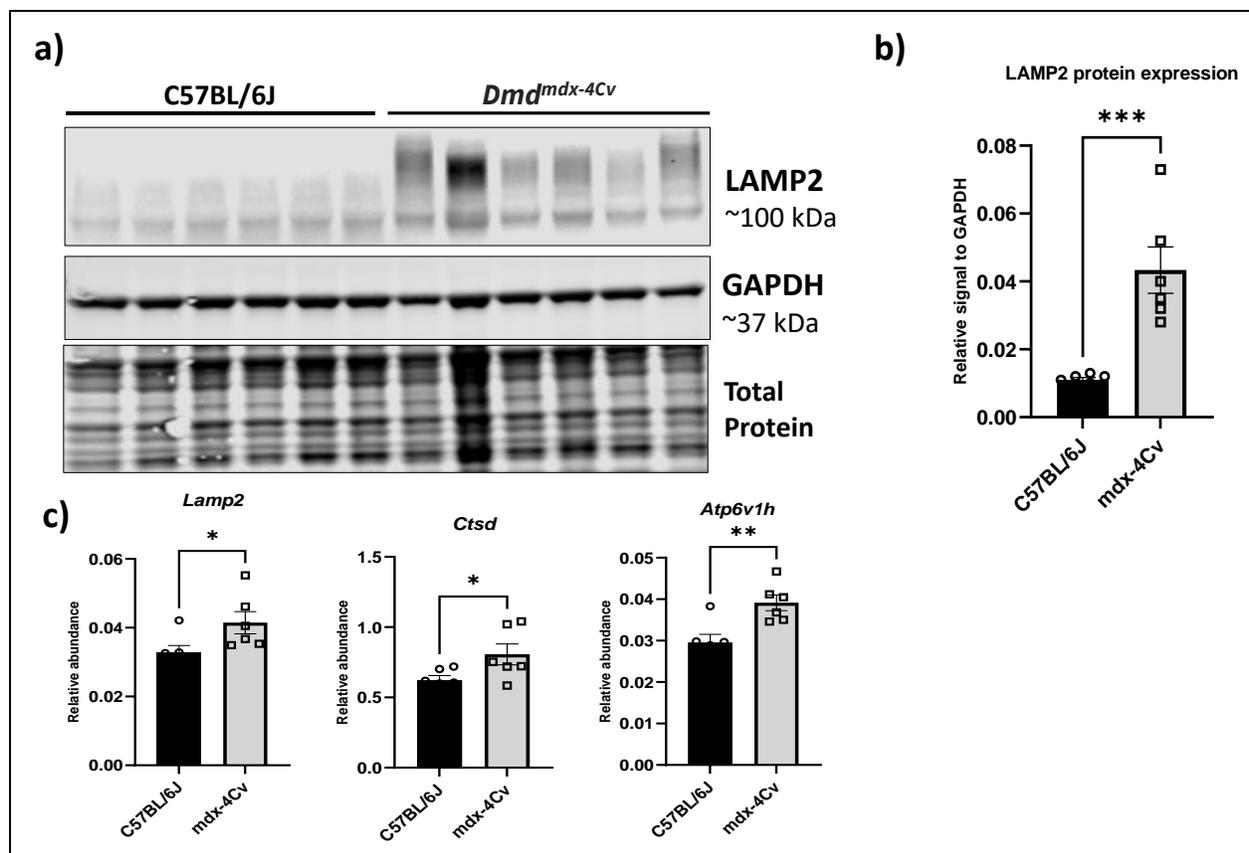


Figure 26. Expression de protéines et gènes lysosomaux. **a)** Western blot de LAMP2 sur le muscle TA des souris *Dmd^{mdx-4Cv}* et de souris WT de 7 semaines. **b)** Quantification des bandes du western blot (n=6). **c)** RT-qPCR de 3 gènes de la voie de biogenèse lysosomale.

La surexpression des cathepsines dans le muscle dystrophique a été déjà montrée [164], mais la cause de cette surrégulation était encore mal élucidée. Il est possible que cette surrégulation soit donc secondaire à un stress lysosomal significatif activant la voie TFEB.

La cathepsine B (CTSB) est l'une des cathepsines les plus surexprimées chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}* (**Figure 27b**). Dans le muscle TA de souris WT, CTSB colocalisait avec le marqueur lysosomal LAMP2 et présentait une distribution ponctuelle dans les fibres musculaires (**Figure 27a**). En revanche, chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}*, le co-immunomarquage de LAMP2 et CTSB a montré une distribution diffusée de CTSB dans tout le cytosol et non pas uniquement dans les lysosomes, indiquant possiblement une fuite des protéases du lumen du lysosome.

Ainsi, l'activation de la biogenèse lysosomale pourrait être à l'origine de la surrégulation des protéases lysosomales comme les cathepsines. Cependant, l'endommagement significatif des lysosomes et la perméabilisation de la membrane causerait une fuite de ces enzymes dans le muscle, ce qui pourrait altérer la fonction de certaines cathepsines et causer des dérégulations métaboliques cellulaires.

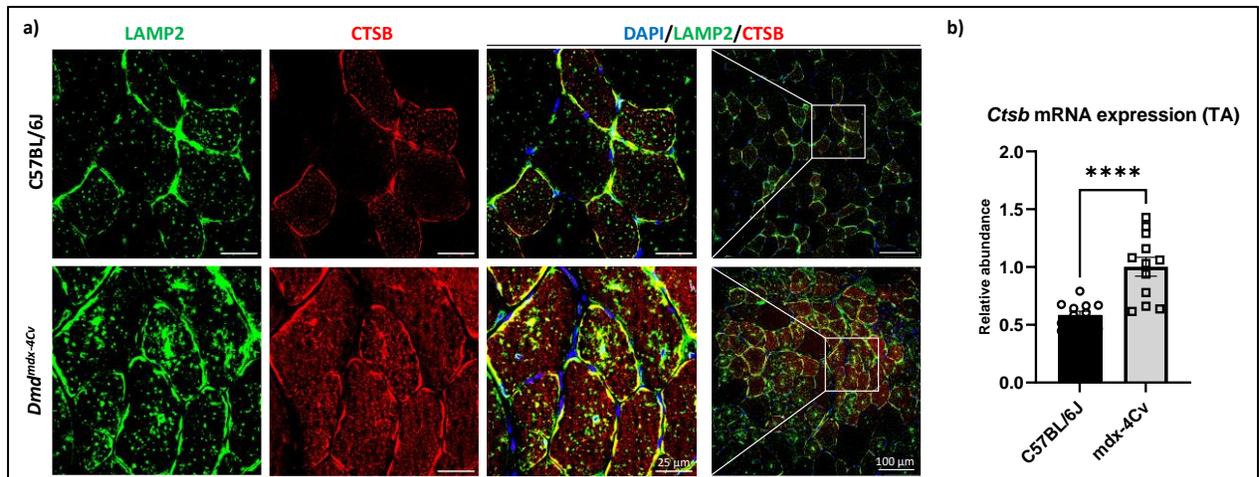


Figure 27. Surrégulation de cathepsine B dans le muscle des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. a) Immunomarquage de cathepsine B (CTSB) et LAMP2 dans le muscle TA des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et WT. b) RT-qPCR de *Ctsb* dans le même muscle.

I-3-2 Elimination des lysosomes endommagés : lysophagie

Bien que les lysosomes nouvellement synthétisés soient censés compenser l'activité de dégradation perdue, les lysosomes endommagés doivent encore être retirés pour éviter d'autres dommages causés par la fuite des cathepsines. Un des mécanismes assurant cela est l'autophagie sélective des lysosomes, aussi appelée 'lysophagie'. Les lysosomes endommagés sont ainsi sélectivement capturés par les autophagosomes pour être dégradés par d'autres lysosomes intacts.

Pour évaluer la lysophagie dans le muscle dystrophique, nous avons réalisé un co-immunomarquage de LAMP2, LGALS3 et LC3B (qui est un marqueur d'autophagosomes) dans le muscle TA de souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et contrôles (**Figure 28**). Une colocalisation des 3 protéines a été observée chez les souris dystrophiques. Ces spots positifs pour LAMP2, LC3B et LGALS3 représenteraient des lysosomes élargis et séquestrés par des doubles membranes, qui sont des structures typiques des autophagosomes.

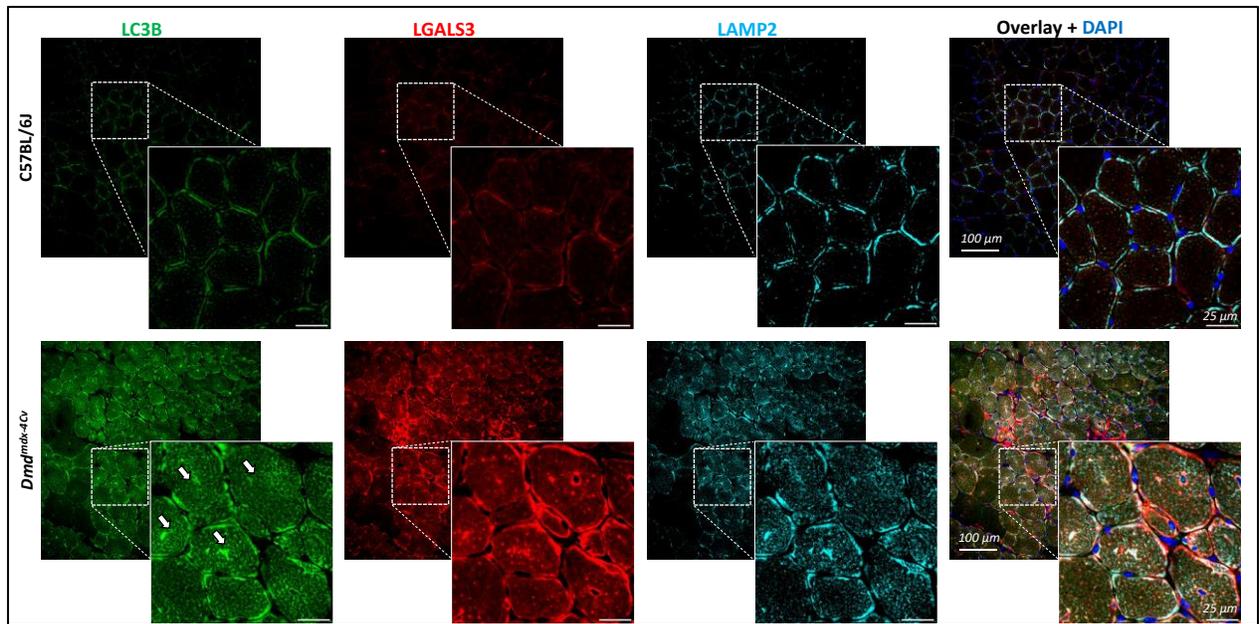


Figure 28. Co-immunomarkage de LC3B, LGALS3 et LAMP2 dans le muscle TA de souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et WT de 7 semaines.

La dérégulation de l'autophagie est connue dans la DMD, avec une accumulation d'organelles endommagés [151]. Un marqueur de l'efficacité de dégradation lysosomale est l'expression de SQSTM1 (aussi appelée p62). Cette protéine est incorporée dans les autophagosomes et est efficacement dégradée en conditions normales. Nous avons évalué l'expression de SQSTM1 dans deux muscles différents de souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et WT (**Figure 29**). Une augmentation significative de SQSTM1 a été détectée dans le diaphragme (muscle à dominance de fibres rapides oxydatives de type IIa) et le TA (muscle à dominance de fibres rapides glycolytiques de type IIb) par rapport aux souris WT. Cela indique une diminution de la capacité de dégradation de la machine d'autophagie.

Bien que les défauts d'autophagie dans la DMD soient connus depuis un moment, ceux-là ont été attribués principalement à une hyperactivation de la voie mTOR [150]. L'identification des dégâts lysosomaux pourrait aussi expliquer en partie le blocage de l'autophagie et la séquestration des organelles endommagés dans le muscle dystrophique. Cela permettra de mieux comprendre l'origine des défauts d'autophagie dans les dystrophies musculaires, et concevoir de nouvelles approches thérapeutiques ciblant ces défauts.

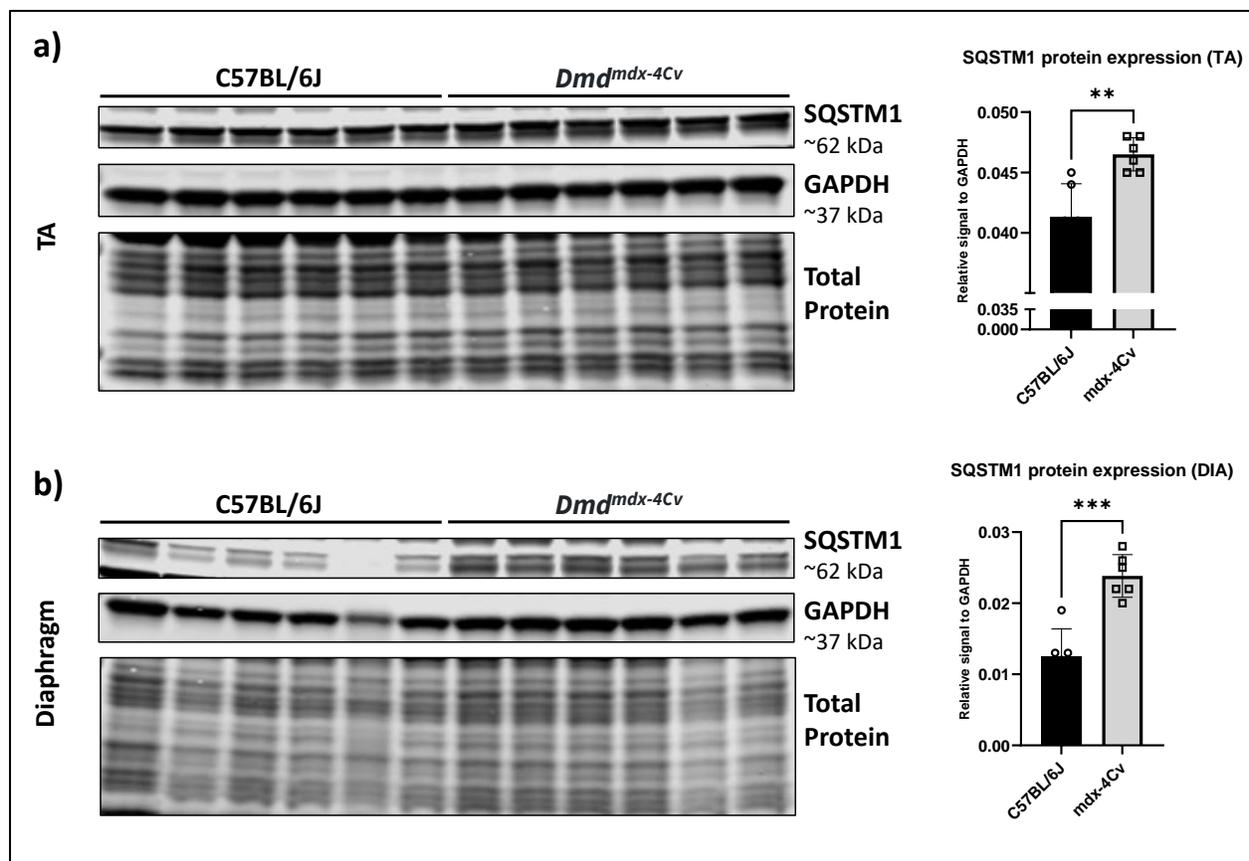


Figure 29. Défaut du flux autophagique dans le muscle TA et le diaphragme des souris *Dmd^{mdx-4Cv}*. a-b) WB de SQSTM1 dans le TA et le diaphragme de souris *Dmd^{mdx-4Cv}* et WT (n=6), et quantification des bandes des WB.

I-3-3 Réparation de la membrane lysosomale : voie ESCRT

En plus de l'élimination et du remplacement des lysosomes endommagés, il existe des voies de réparations pour bloquer les fuites lysosomales aiguës. L'une des voies de réparation majeure est médiée par le complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) [326]. Lors de la perméabilisation de la membrane lysosomale, plusieurs sous-unités du complexe ESCRT sont recrutées à la membrane de façon dépendante du Ca^{2+} . Une des sous-unités recrutées à la membrane est CHMP4B, qui est utilisée aussi comme marqueur de lésions lysosomales aiguës [292].

Nous avons effectué un co-immunomarquage de LAMP2 et CHMP4B sur des coupes transversales du muscle TA de souris *Dmd^{mdx-4Cv}*. Une colocalisation plus significative de LAMP2 et CHMP4B a été détectée chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}* par rapport aux contrôles WT (**Figure 30a-b**). Cependant, il n'y avait pas de différence significative au niveau de l'expression protéique entre les souris dystrophiques et les souris contrôles. En effet, CHMP4B et les protéines du complexe ESCRT sont impliquées aussi dans la formation des corps multivésiculaires (MVB) et le tri des protéines de cargaison endosomales. Ainsi, il est attendu de ne pas avoir une différence en termes d'expression à la suite des dommages lysosomaux, mais plutôt un recrutement aux lysosomes endommagés des protéines du complexe.

Cela montre qu'il y a un recrutement du complexe ESCRT aux lysosomes endommagés pour activer la voie de réparation de la membrane. Cependant, le degré d'activation et l'importance de cette voie dans le muscle dystrophique reste à déterminer.

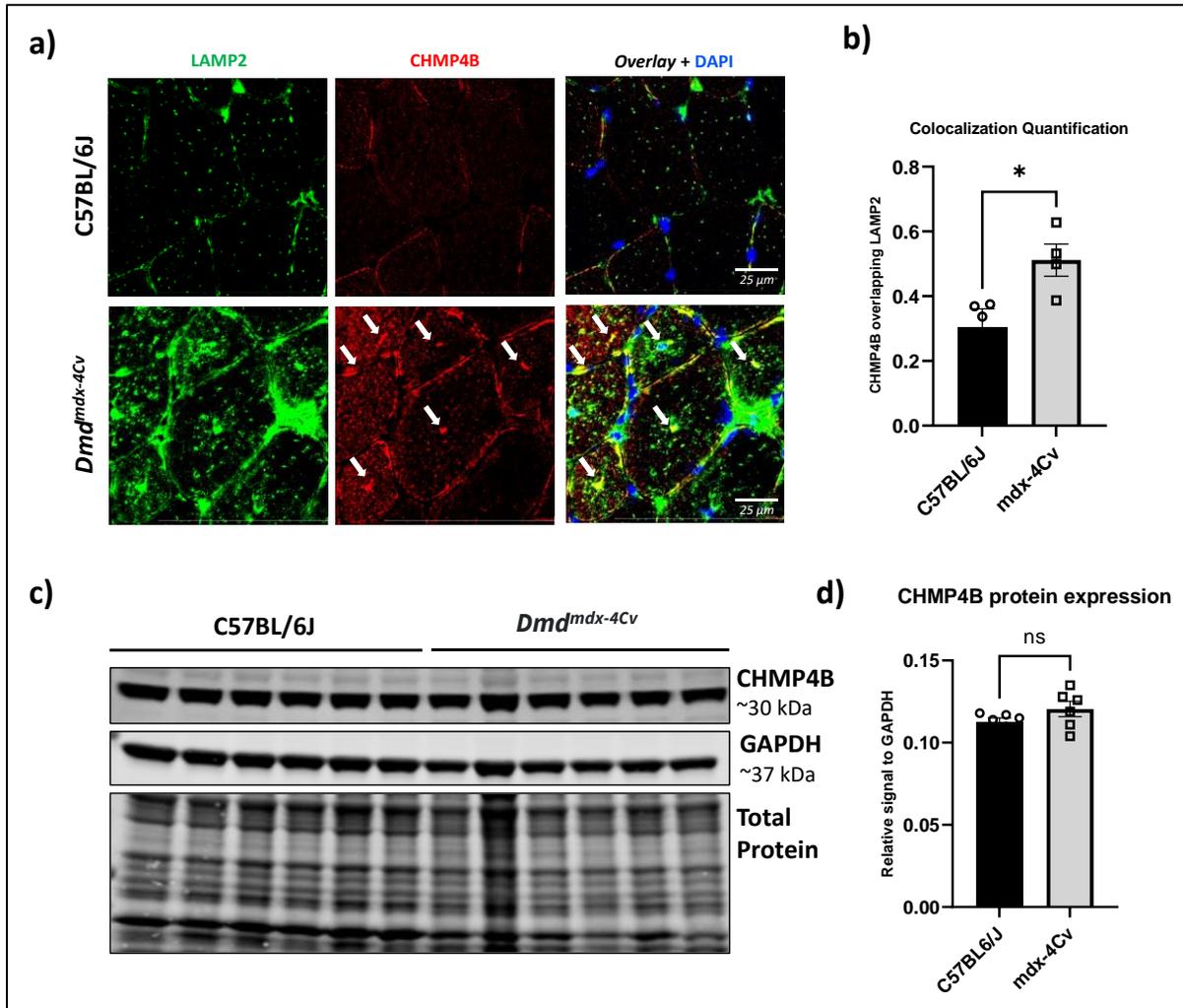


Figure 30. Activation de la voie de réparation lysosomale ESCRT. a) Co-immunomarquage de LAMP2 et CHMP4B sur des coupes transversales de muscle TA chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}* et WT. **b)** Quantification du signal de CHMP4B colocalisé avec LAMP2 (n=4). **c)** Western blot de CHMP4B dans le muscle TA des souris *Dmd^{mdx-4Cv}* et WT. **d)** Quantification des bandes du western blot normalisée au signal de GAPDH.

I-4 Perturbations du métabolisme du cholestérol et son lien avec les défauts lysosomaux

I-4-1 Accumulation de cholestérol dans le muscle DMD

Nous avons montré précédemment l'accumulation de cholestérol dans le muscle des patients DMD et des souris *Dmd^{mdx}* [179]. Cette accumulation de cholestérol dans le muscle est significative surtout à un stade

précoce de la maladie. Le marquage avec le filipin, fluorophore qui se lie au cholestérol libre, a montré une accumulation de cholestérol dans le muscle de jeunes patients DMD de 2 ans, et aussi chez des jeunes souris *Dmd*^{mdx-4Cv} par rapport aux contrôles WT (**Figure 31a**). Une étude de lipidomique dans le muscle GA de jeunes souris *Dmd*^{mdx-4Cv} a confirmé l'accumulation de cholestérol observée avec le marquage filipin (**Figure 31b**). En effet, des élévations de cholestérol, des esters de cholestérol et de sphingomyéline ont été détectées par rapport aux souris WT. Les souris *Dmd*^{mdx-4Cv} pourrait donc servir comme modèle pour l'étude de la dérégulation du cholestérol dans la DMD.

Il faut noter que le filipin ne détecte que le cholestérol libre, et ne permettra pas donc d'évaluer l'accumulation importante des esters de cholestérol dans le muscle dystrophique.

Une accumulation de cholestérol libre a été aussi observée dans des myotubes différenciés à partir de cellules iPS de patients DMD et de contrôle sain. Ces observations supportent davantage l'hypothèse que les dérégulations du cholestérol sont un évènement précoce dans la physiopathologie de la DMD (**Figure 32**).

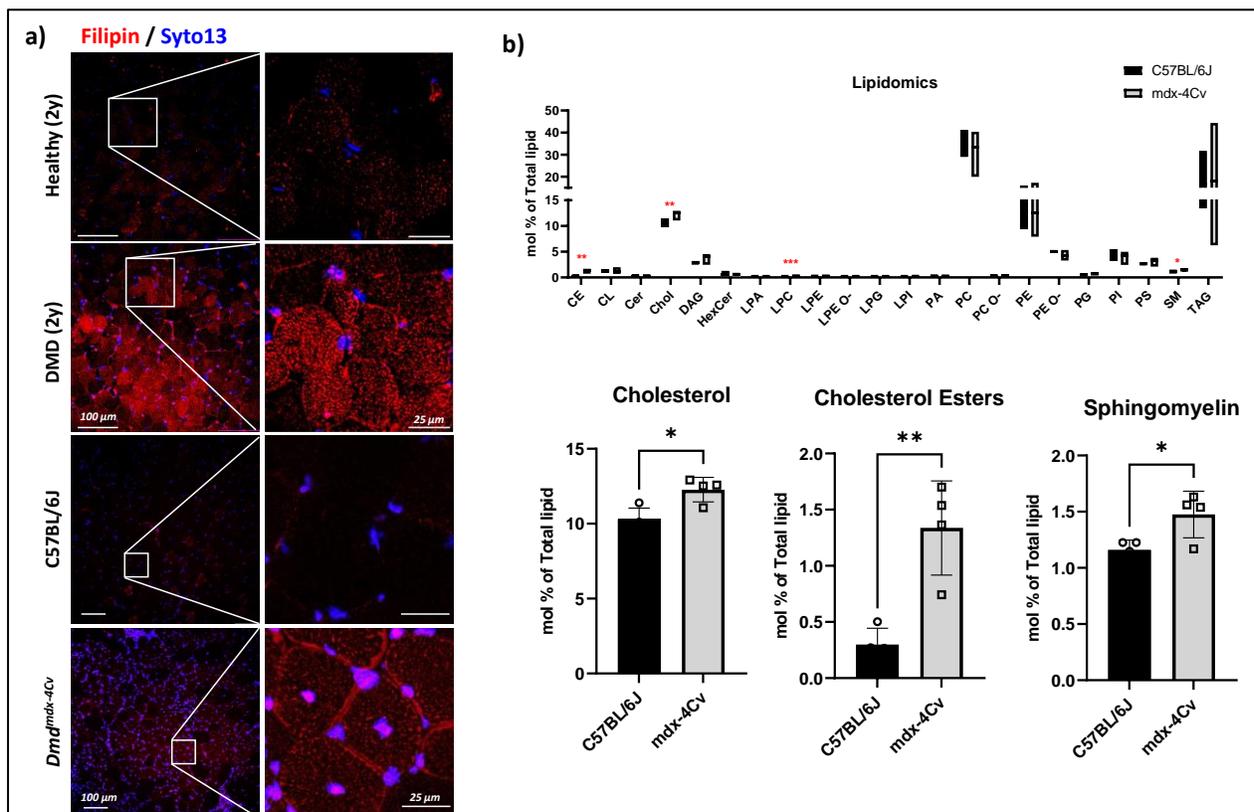


Figure 31. Accumulation de cholestérol dans le muscle DMD. a) Marquage au filipin (cholestérol libre) de biopsies musculaires d'un patient DMD et d'un patientt sain et de muscle GA de souris *Dmd*^{mdx-4Cv} et WT de 7 semaines (Syto13 = noyaux). **b)** Analyses de lipidomique du muscle GA de souris *Dmd*^{mdx-4Cv} et de contrôles WT (n=4) de 7 semaines. **c)** Représentation des lipides les plus dérégulés dans le muscle des souris *Dmd*^{mdx-4Cv}. Abréviations : CE = Cholesterol Esters ; CL = Cardioplin ; Cer = Ceramide ; Chol = Cholesterol ; DAG = Diacylglycerol ; HexCer = hexosylceramide ; LPA = lyso-phosphatidate ; LPC = lyso-Phosphotidylcholine ; LPE = lyso-Phosphotidylethanolamine ; LPE O- = lyso-Phosphotidylethanolamine (-ether) ; LPG = lyso-Phosphatidylglycerol ; LPI = lyso-Phosphatidylinositol ; LPS = lyso-Phosphatidylserine ; PA = Phosphatidate ; PC = Phosphatidylcholine ; PC O- = Phosphatidylcholine (-ether) ; PE =

Phosphatidylethanolamine ; PE O- = Phosphatidylethanolamine (-ether) ; PG = Phosphatidylglycerol ; PI = Phosphatidylinositol ; PS = Phosphatidylserine ; SM = Phosphatidylserine ; TAG = Triacylglycerol.

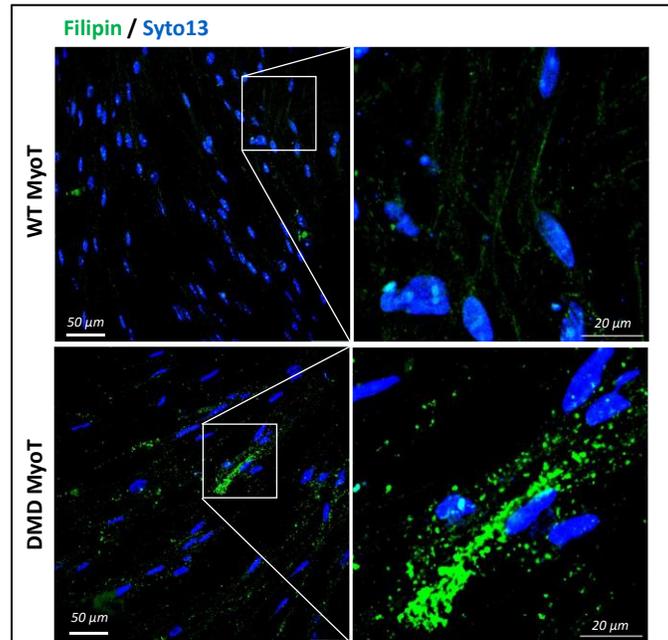


Figure 32. Accumulation de cholestérol libre dans des myotubes dérivés de cellules iPS de patient DMD.

Nous avons précédemment montré que l'accumulation du cholestérol dans le muscle dystrophique est corrélée avec une activation de la voie SREBP (*Sterol regulatory element binding proteins*) [179]. La translocation de SREBP dans le noyau active la transcription de gènes encodant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse endogène de cholestérol, comme *HMGCR* (*3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase*), ainsi que des récepteurs cellulaires du cholestérol, comme *LDLR* (*low density lipoprotein receptor*).

Les voies de régulation du cholestérol constituent un réseau complexe et étroitement contrôlé. En effet, l'homéostasie de cholestérol dépend de plusieurs mécanismes endogènes, cellulaires et moléculaires, mais aussi de l'apport exogène en cholestérol. Par exemple, la voie SREBP est activée lors d'un besoin cellulaire en cholestérol, et permet la synthèse de cholestérol et l'absorption du LDL-cholestérol (**Figure 34**). Lors d'un excès cellulaire en cholestérol, la voie de transport inverse du cholestérol, médiée par le facteur de transcription LXR, est activée ; et permet la sortie du cholestérol des tissus périphériques [327]. Dans la cellule, le trafic intracellulaire du cholestérol est médié par plusieurs récepteurs et transporteurs de lipides, dont les transporteurs lysosomaux de Niemann Pick NPC1 et NPC2 (**Figure 33**).

Pour essayer de mieux comprendre la dérégulation du cholestérol dans le muscle dystrophique, nous avons regardé l'expression des gènes principaux impliqués dans le métabolisme et le trafic du cholestérol, dans le muscle de patients DMD et d'animaux modèles (souris *Dmd^{mdx}* et chien GRMD) (**Figure 33**). Une surexpression des gènes de la voie SREBP est significative, comme attendu. Une surrégulation des gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol est également observée dans le muscle DMD. Cette activation de la voie LXR est probablement due à l'accumulation du cholestérol dans le muscle, et permettra de compenser en partie pour l'excès de cholestérol musculaire.

En se focalisant sur le trafic intracellulaire du cholestérol, uniquement le transporteur NPC2, situé dans le lumen du lysosome, était régulé à la hausse, mais pas le transporteur membranaire NPC1. En effet, le cholestérol libre, une fois arrivé dans le lysosome, se lie à NPC2 d'abord, avant d'être transporté à NPC1 à la limite de la membrane lysosomale (Figure 34). Donc une surexpression de NPC2 pourrait être pour contrer l'excès de cholestérol dans le lumen du lysosome. Cependant, le fait que NPC1 n'est pas aussi régulé à la hausse, suggère que le cholestérol ne sort pas de façon efficace du lysosome. Et de façon intéressante, l'expression transgénique de NPC1 chez des souris *Dmd^{mdx}* a déjà montré une amélioration du phénotype dystrophique [328].

En plus, l'accumulation du cholestérol dans le lysosome pourrait aussi avoir des effets sur la voie SREBP. En effet, la rétention du cholestérol dans le lysosome perturberait le retour d'information (*feedback*) cellulaire sur le niveau de cholestérol. Le cholestérol n'arrivera pas ainsi dans le RE, et le complexe Scap/SREBP ne sera pas retenu dans le RE en cas d'excès de cholestérol, mais se transloquera donc dans le noyau où il activera les gènes impliqués dans la synthèse et l'absorption du cholestérol (Figure 35).

Ces données et ces indications nous ont laissé émettre l'hypothèse que l'accumulation du cholestérol dans le muscle dystrophique pourrait être localisée surtout dans le compartiment endolysosomal.

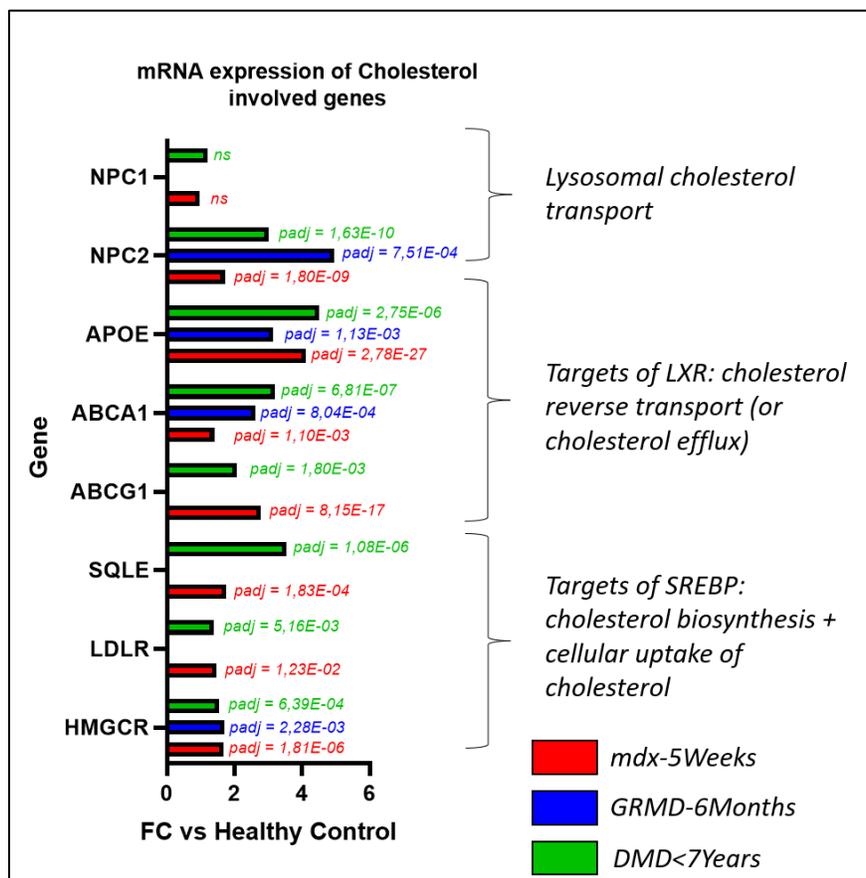


Figure 33. Données transcriptomiques de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, chez des patients DMD et de modèles animaux. Le fold change par rapport aux contrôles sains est représenté, ainsi que la p-value corrigée.

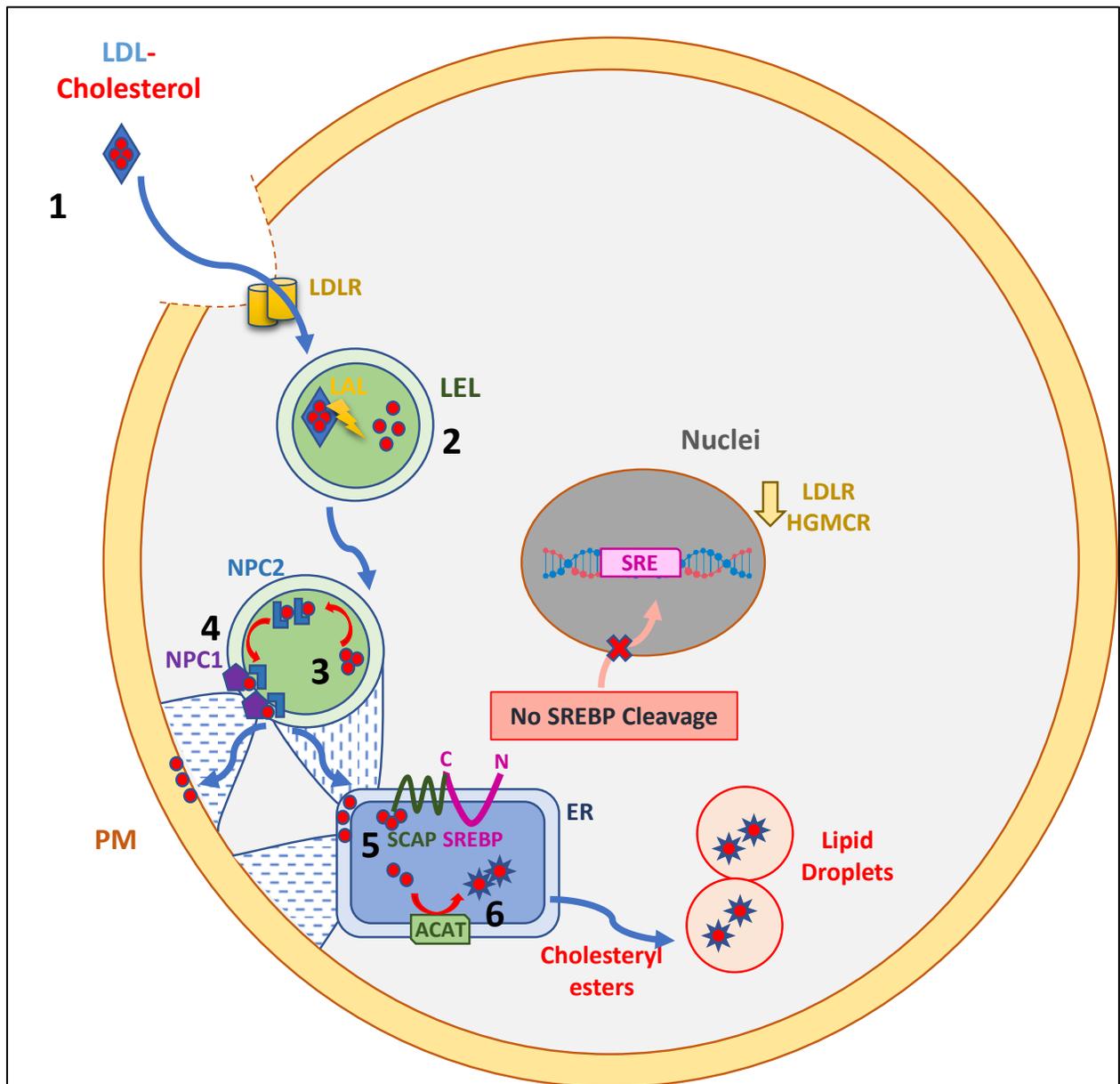


Figure 34. Trafic intracellulaire du LDL-cholestérol. 1) Le LDL-cholestérol se lie au récepteur au LDL (LDLR) et pénètre dans la cellule par une endocytose médiée par les fosses de clathrine. 2) Le LDL-cholestérol est transformé en cholestérol libre par la lipase lysosomale (LAL). 3) Le cholestérol libre se lie à NPC2 à l'intérieur du lysosome. 4) Le cholestérol est ensuite transféré à NPC1 sur la membrane lysosomale et est délivré aux autres compartiments cellulaires (membrane plasmique, RE). 5) La surcharge de cholestérol dans le RE retient le complexe Scap/SREBP dans le RE. SREBP n'est pas clivé dans l'appareil de Golgi et ne peut pas activer la transcription des gènes LDLR et HMGCR (causant une diminution de l'absorption et de la biosynthèse de cholestérol). 6) L'excès de cholestérol dans le RE est estérifié par ACAT puis transféré pour former les gouttelettes lipidiques. Abbreviations: LDL = Low-Density Lipoprotein; LAL = Lysosomal Acid Lipase ; LDLR = LDL-Receptor ; NPC1/2 = Niemann-Pick C1/2 ; LEL = Late-Endosome / Lysosome.

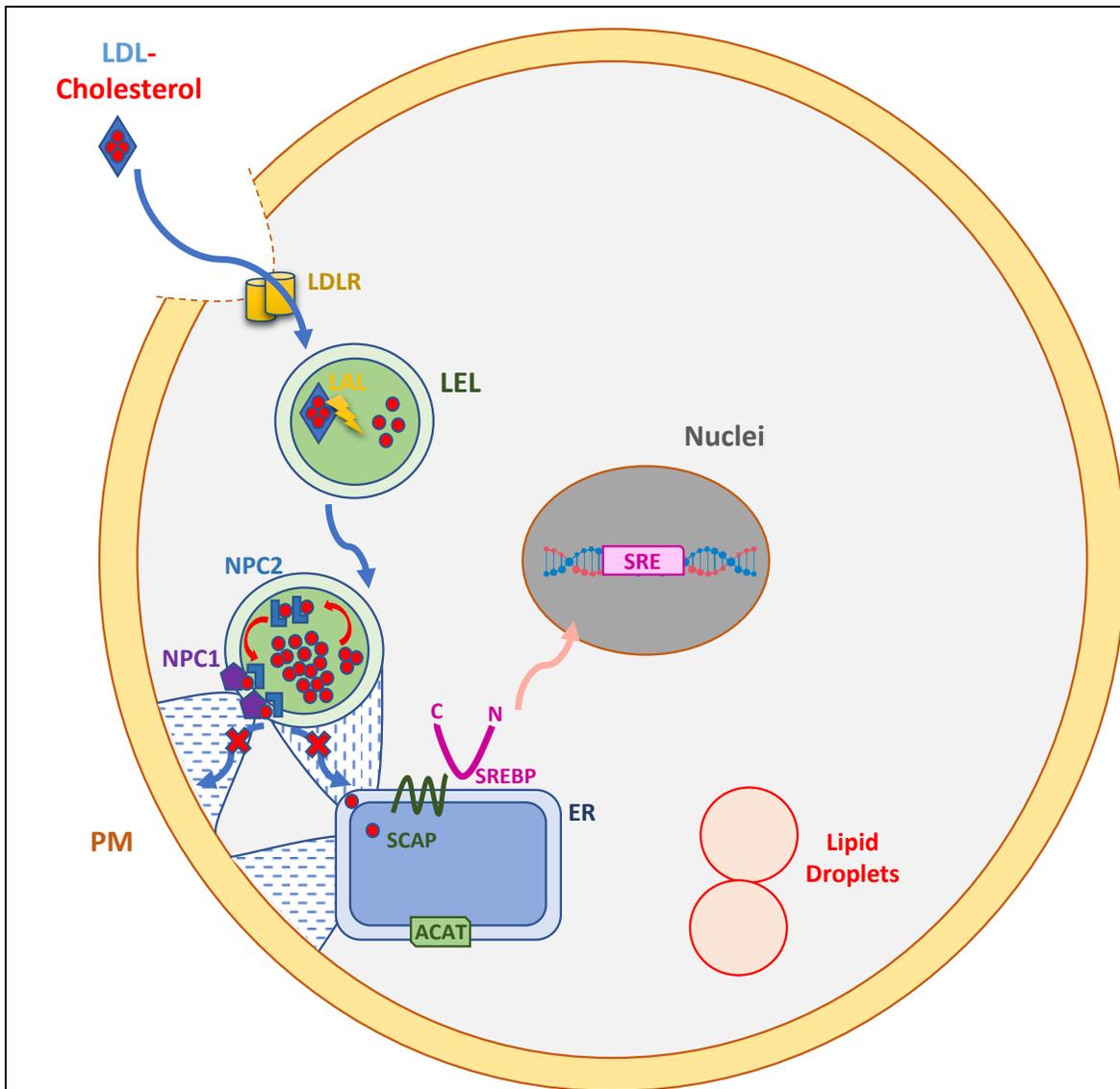


Figure 35. Effets de l'accumulation de cholestérol dans le lysosome sur les voies de régulation du cholestérol. L'accumulation du cholestérol dans le lysosome empêcherait le trafic intracellulaire du cholestérol. Le complexe Scap/SREBP se détachera (pas de rétrocontrôle par le cholestérol dans le RE) et SREBP est transloqué dans le noyau où il activera la voie d'absorption et de synthèse de cholestérol.

I-4-2 Accumulation de cholestérol dans les lysosomes de myotubes DMD

Pour vérifier si le cholestérol est accumulé spécifiquement dans les lysosomes de cellules DMD, nous avons traité des myotubes dérivés d'iPSC de patients DMD et contrôle sain avec un analogue fluorescent de cholestérol (NBD-cholestérol) et une sonde fluorescente marquant les lysosomes (*LysoTracker Red DND*) (**Figure 36a**). Les cellules ont été ensuite fixées et des images sont acquises par microscopie confocale. Une quantification de la colocalisation a montré une accumulation spécifique du cholestérol dans les lysosomes des myotubes DMD par rapport aux cellules contrôles (**Figure 36b-c**). Cela corrélait notamment avec une augmentation du nombre et de la taille des lysosomes dans les myotubes DMD, indiquant un stress lysosomal (**Figure 37**).

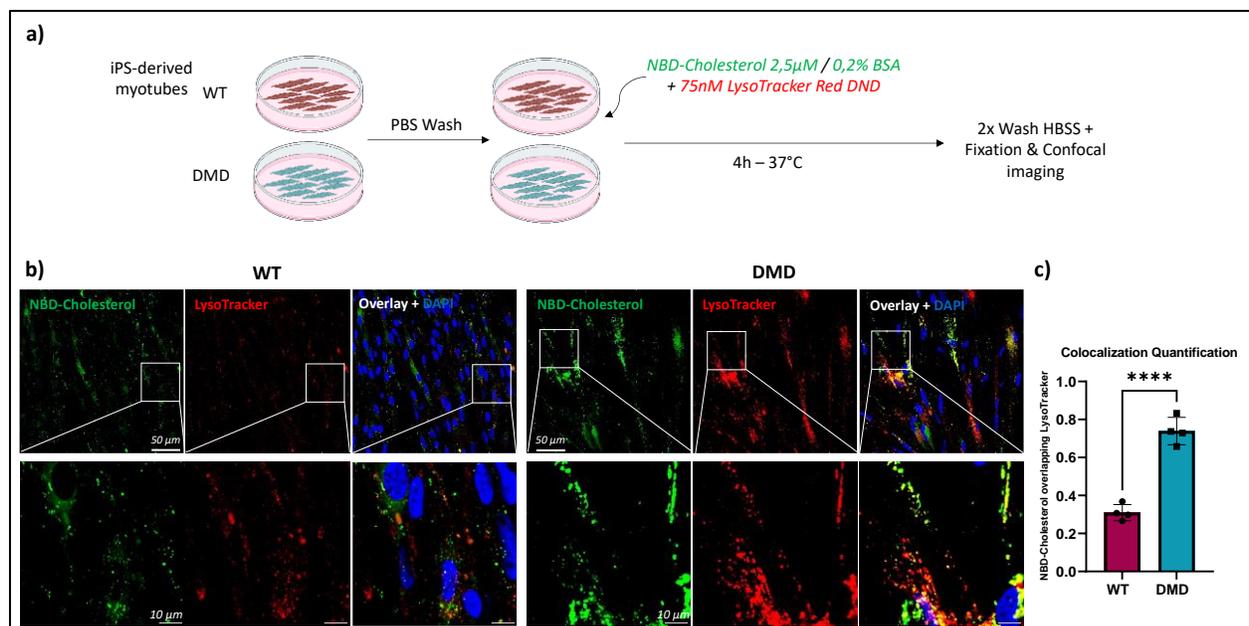


Figure 36. Le cholestérol s'accumule spécifiquement dans les lysosomes de myotubes dérivés d'iPSC de patient DMD. a) Des cellules iPS de patients DMD et contrôle ont été différenciées en myotubes, et chargées avec un analogue fluorescent de cholestérol et une sonde LysoTracker. b) Images prises au microscope confocal montrant la colocalisation du NBD-cholestérol et du LysoTracker. c) Quantification du signal fluorescent de NBD-cholestérol colocalisé avec le signal du LysoTracker.

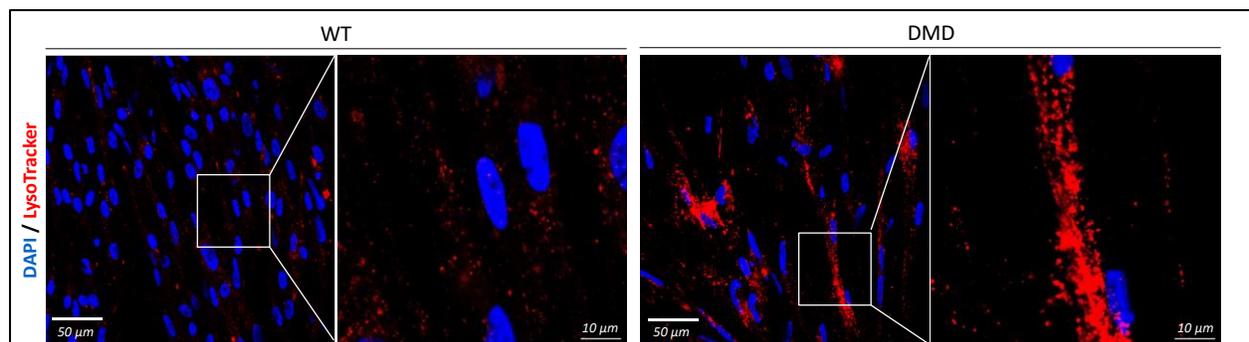


Figure 37. Elargissement des lysosomes dans des myotubes DMD dérivés de cellules iPS.

I-4-3 Une diète riche en cholestérol exacerbe le phénotype dystrophique chez des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et augmente les dégâts lysosomaux

Pour mieux comprendre l'effet du cholestérol sur la pathogenèse de la DMD, et son lien avec les lésions des lysosomes, nous avons mis de jeunes souris WT et $Dmd^{mdx-4Cv}$ sous diète lipidique riche en cholestérol ou sous diète normale, pendant 4 semaines (**Figure 38**). Tout d'abord, nous avons vérifié que la diète a bien eu un effet sur les souris. Pour cela, un marquage des lipides a été fait sur le foie. Effectivement, une grande accumulation de lipides a été observée chez les souris WT et $Dmd^{mdx-4Cv}$ sous diète riche en lipides (**Figure 38c**).

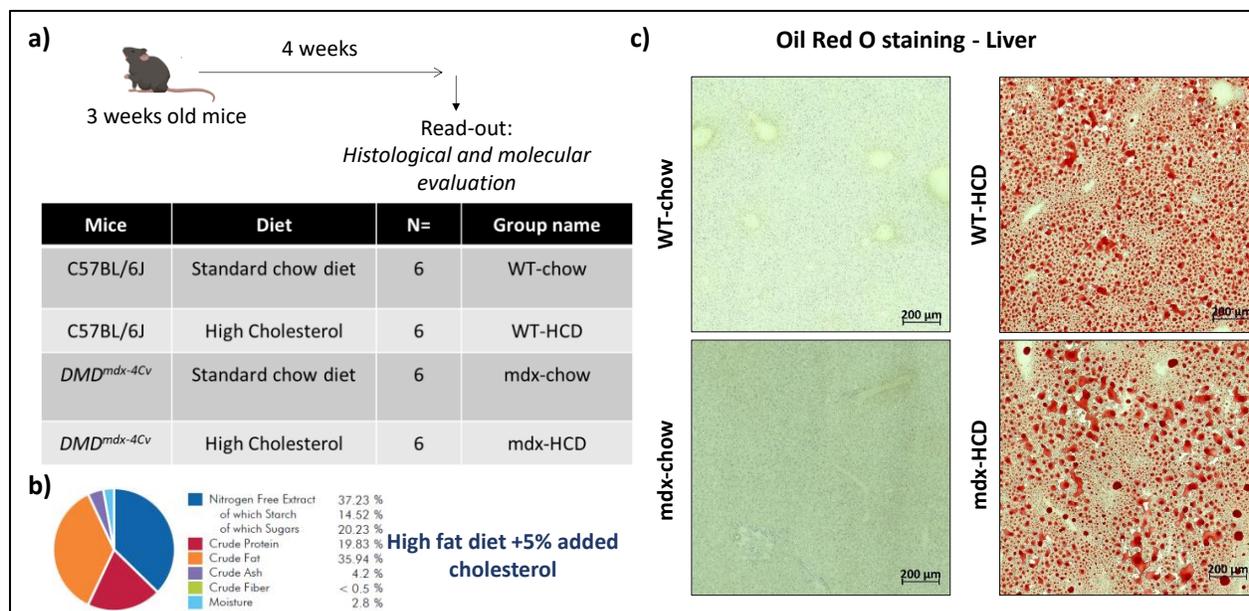


Figure 38. Une diète riche en lipides et en cholestérol cause une accumulation de lipides dans le foie de souris WT et *Dmd^{mdx-4Cv}*. **a)** Schéma expérimental : des souris WT et *Dmd^{mdx-4Cv}* de 3 semaines ont été mises sous diète normale ou diète riche en lipides et en cholestérol. **b)** Une diète riche en lipides a été utilisée (~36% de gras) et supplémentée avec 5% de cholestérol. **c)** Coupes transversales de foies colorées en Oil Red O marquant les lipides non polaires.

Ensuite, nous avons évalué la fibrose dans le diaphragme et le GA, les deux muscles les plus atteints chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}*, par marquage au rouge Sirius (**Figure 39**). La quantification de la surface positive au rouge Sirius a montré une augmentation significative de la fibrose chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}* sous diète riche en cholestérol par rapport aux souris dystrophiques sous diète normale. Cela indique que l'excès de cholestérol apporté par l'alimentation pourrait contribuer à l'exacerbation du phénotype dystrophique.

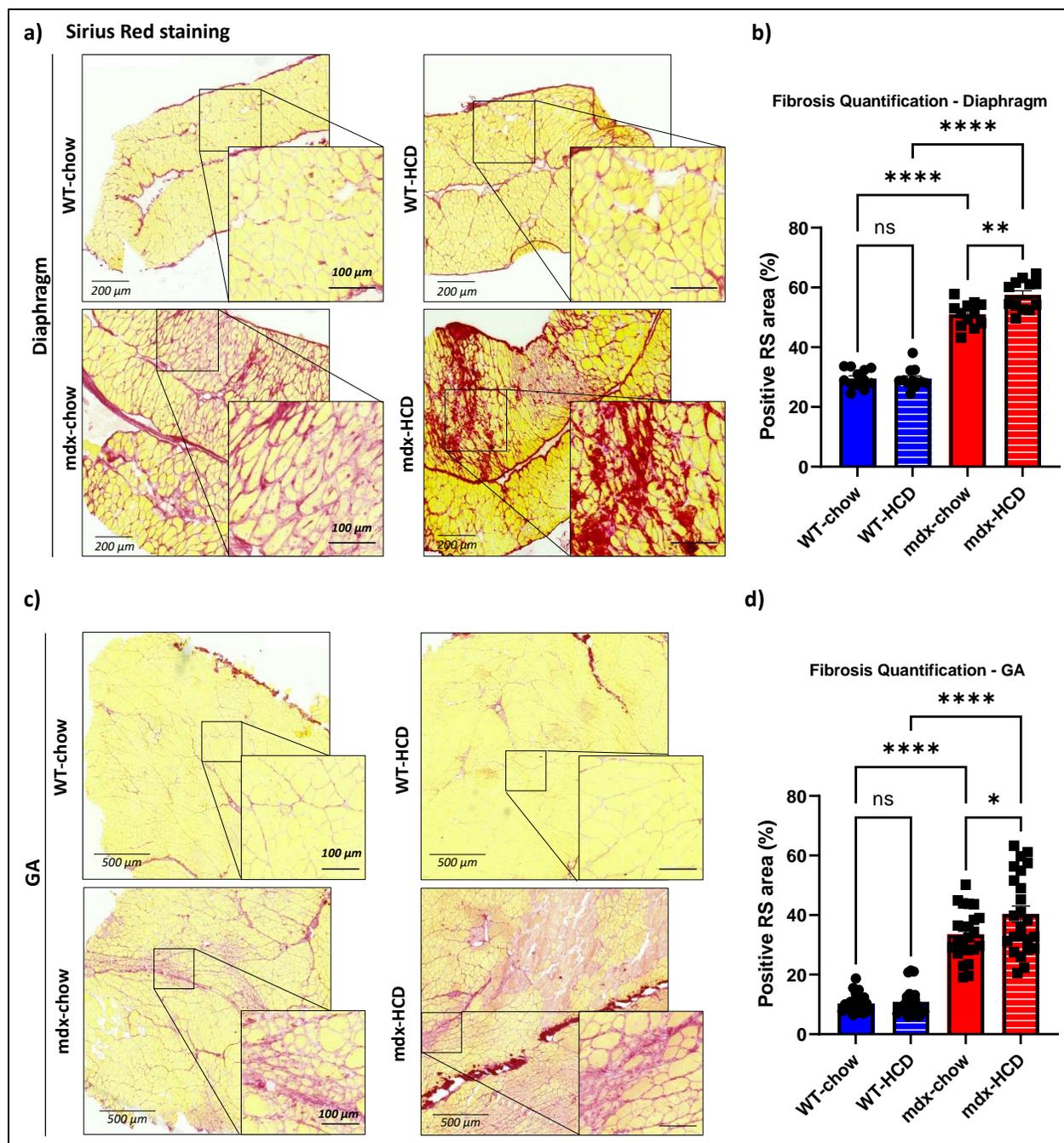


Figure 39. La diète riche en cholestérol augmente la fibrose dans le GA et le diaphragme des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. **a-c)** Marquage au rouge Sirius de coupes transversales de diaphragme et de GA. **b-d)** Quantification de la fibrose à partir du marquage RS.

Une quantification du cholestérol dans le muscle GA a été ensuite faite (**Figure 40c**). Les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ avaient une charge de cholestérol libre supérieure aux souris WT, comme attendu. Il est intéressant à noter que cette charge en cholestérol augmentait chez les souris WT sous diète riche en cholestérol, signifiant une accumulation de cholestérol musculaire même chez les souris WT. Cependant, un co-marquage de filipin (cholestérol libre) et LAMP2 (lysosome) a montré une localisation importante du cholestérol dans

les lysosomes chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ mais pas chez les WT, ce qui a été confirmé par une analyse de colocalisation (**Figure 40a-d**). En effet, la diète riche en cholestérol cause une augmentation de la charge musculaire en cholestérol chez les souris saines et dystrophiques, mais le cholestérol semble s'accumuler spécifiquement dans les lysosomes dans le muscle des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$.

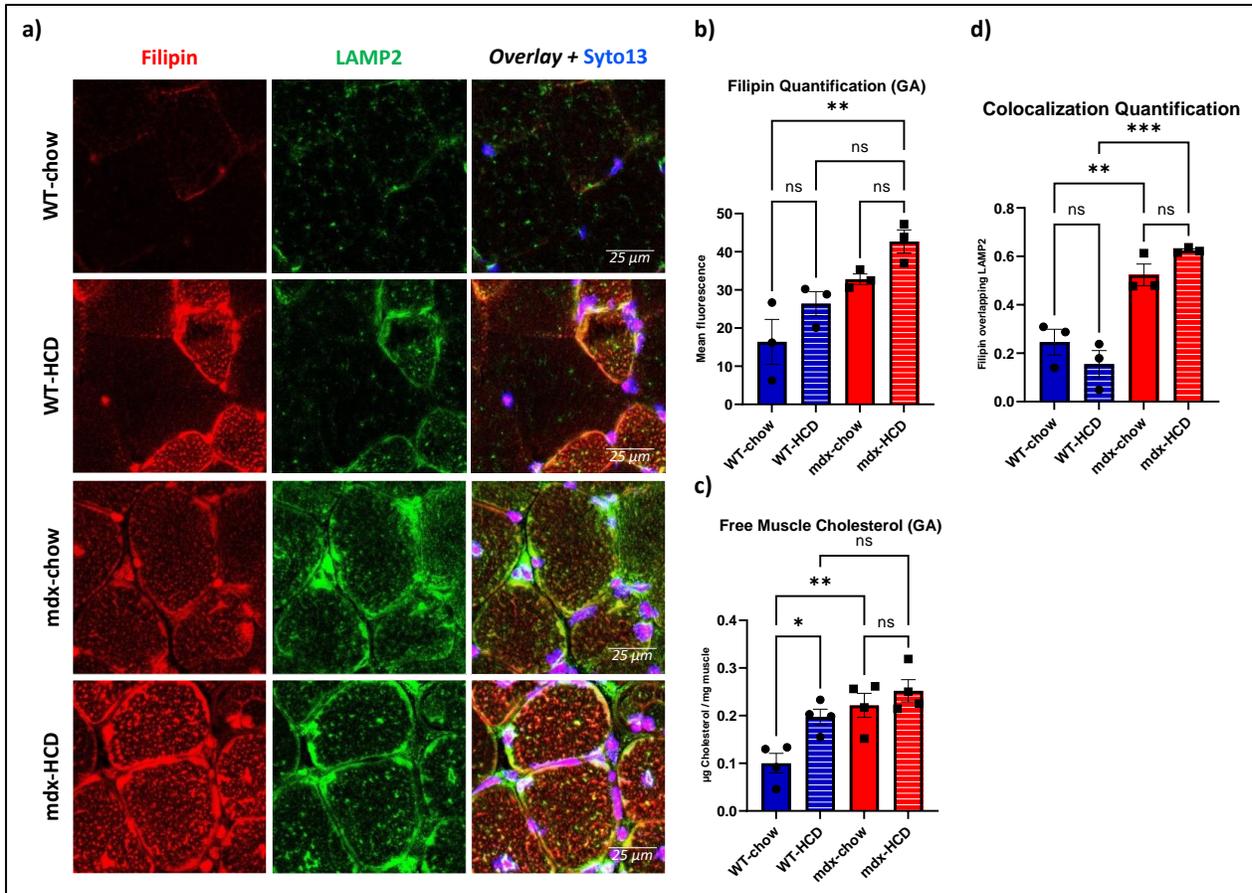


Figure 40. Le cholestérol est accumulé dans les lysosomes dans le muscle GA des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. **a)** Co-marquage de filipin (cholestérol libre) et LAMP2 (lysosome) sur des coupes transversales du muscle GA. **b)** Quantification du signal du filipin sur des coupes de souris différentes. **c)** Quantification du cholestérol libre dans les extraits lipidiques du muscle GA. **d)** Analyses du signal de filipin colocalisé avec le signal de LAMP2.

Ensuite, nous voulions évaluer l'effet de la diète riche en cholestérol sur la perméabilisation de la membrane lysosomale. L'essai des *puncta* de galectine-3 a montré, comme attendu, des spots LAMP2+/LGALS3+ chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$, qui corrôliaient avec une augmentation de l'expression de galectine-3 au niveau des protéines et de l'ARNm par rapport aux contrôles WT (**Figure 41**). De façon intéressante, une augmentation des spots LAMP2+/LGALS3+ était claire chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ sous diète riche en cholestérol par rapport à celles sous diète normale. Aussi, une augmentation significative de galectine-3 au niveau de l'ARNm et de protéine est aperçue avec la diète riche en cholestérol chez les souris dystrophiques. En plus, il est intéressant à noter que des petits spots LAMP2+/LGALS3+ ont été aussi détectés chez les souris WT sous diète riche en cholestérol, bien que ceux-là sont nettement moins importants que ceux caractéristiques du muscle dystrophique. Cependant, aucune élévation significative

de galectine-3 au niveau protéique ou de l'ARNm est observée chez les souris WT sous diète riche en cholestérol, suggérant que les dégâts lysosomaux seront assez limités.

Ces données indiquent que l'excès de cholestérol pourrait être en cause des dégâts lysosomaux dans le muscle. Cela est d'autant plus marquant dans le muscle dystrophique, où les dégâts lysosomaux sont déjà importants, et sont exacerbés par l'excès de cholestérol.

Il est donc clair que l'accumulation de cholestérol et d'autres lipides dans le muscle dystrophique est corrélée avec une perturbation du système endolysosomal, notamment à travers une perméabilisation de la membrane lysosomale. Cependant, il reste à déterminer quel évènement est précoce à l'autre. En effet, l'accumulation du cholestérol et d'autres lipides dans le compartiment lysosomal pourrait être indicatif d'une altération de la dégradation et du transport des lipides, à la suite d'un défaut du système endolysosomal. Aussi, la perméabilisation de la membrane lysosomale et le relargage de cathepsine B dans le cytosol pourrait être secondaire à un excès de cholestérol, déclenchant une cascade pathologique et une lipotoxicité.

Pourtant, le degré des dégâts lysosomaux observés chez des souris *Dmd*^{mdx-4Cv} et d'autres modèles animaux dystrophiques, dont les apports alimentaires ne contiennent pas de grandes quantités de lipides, laisse suggérer que les perturbations du système endolysosomal peuvent être précoces, et seront la cause d'une altération du métabolisme des lipides par perturbation des voies de trafic lipidique intracellulaires.

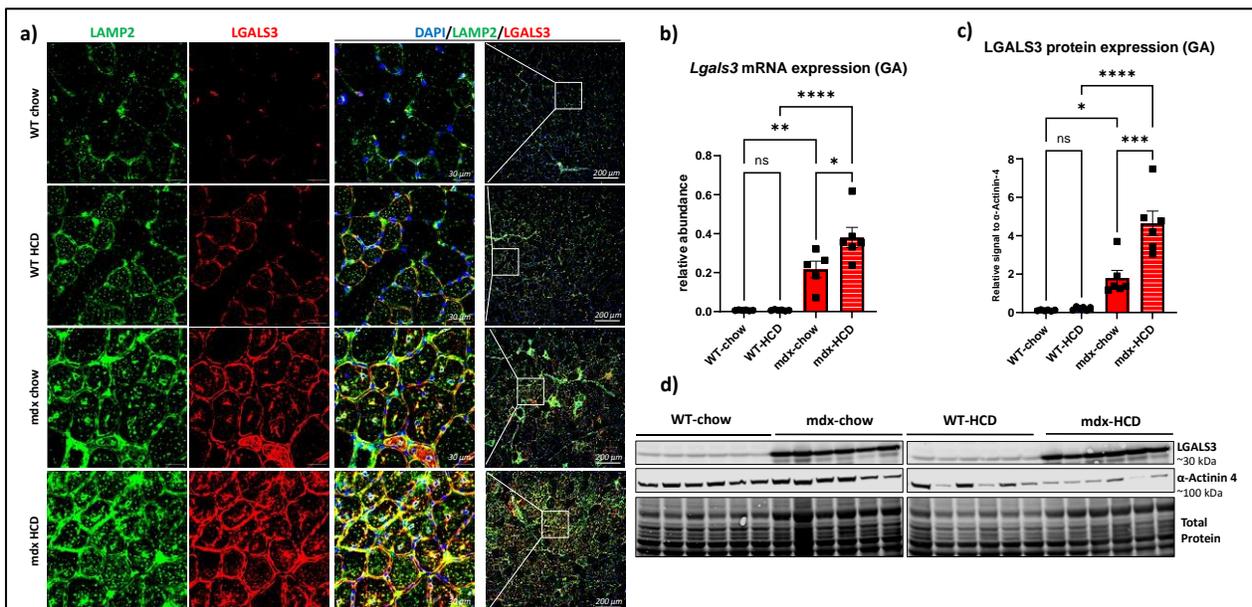


Figure 41. La diète riche en cholestérol augmente les dégâts lysosomaux. a) Co-immunomarquage de LAMP2 et LGALS3 sur des coupes transversales de muscle TA. **b)** Expression de *Lgals3* dans le muscle GA. **c)** Quantification de LGALS3 par western blot. **d)** Western blot de LGALS3 dans le muscle GA.

I-5 L'effet du transfert de gène sur la restauration des dérégulations du métabolisme du cholestérol et du système endolysosomal

L'approche thérapeutique la plus prometteuse pour le traitement de la DMD actuellement est la restauration d'une forme raccourcie fonctionnelle de la dystrophine, en délivrant par vecteur AAVr une séquence codante pour la microdystrophine. Cette approche avait montré de très bons résultats dans les modèles animaux, avec une amélioration de la force musculaire et de différents paramètres dystrophiques. Cependant, les résultats chez les patients étaient moins impressionnants, ce qui pourrait indiquer que la microdystrophine ne permettrait pas la réversion de tous les mécanismes pathologiques de la DMD.

Ici, nous voulions évaluer l'effet de la microdystrophine sur les dérégulations identifiées du cholestérol et du système endolysosomal. Pour cela, des souris Dmd^{mdx} ont été injectées par un vecteur viral AAV9 encapsidant une séquence codante de la microdystrophine sous le contrôle d'un promoteur musculaire (spc5.12). Deux doses de vecteurs ont été utilisées, une dose suboptimale (*low*) et une dose plus haute (*high*) connue d'être efficace dans ce modèle [329].

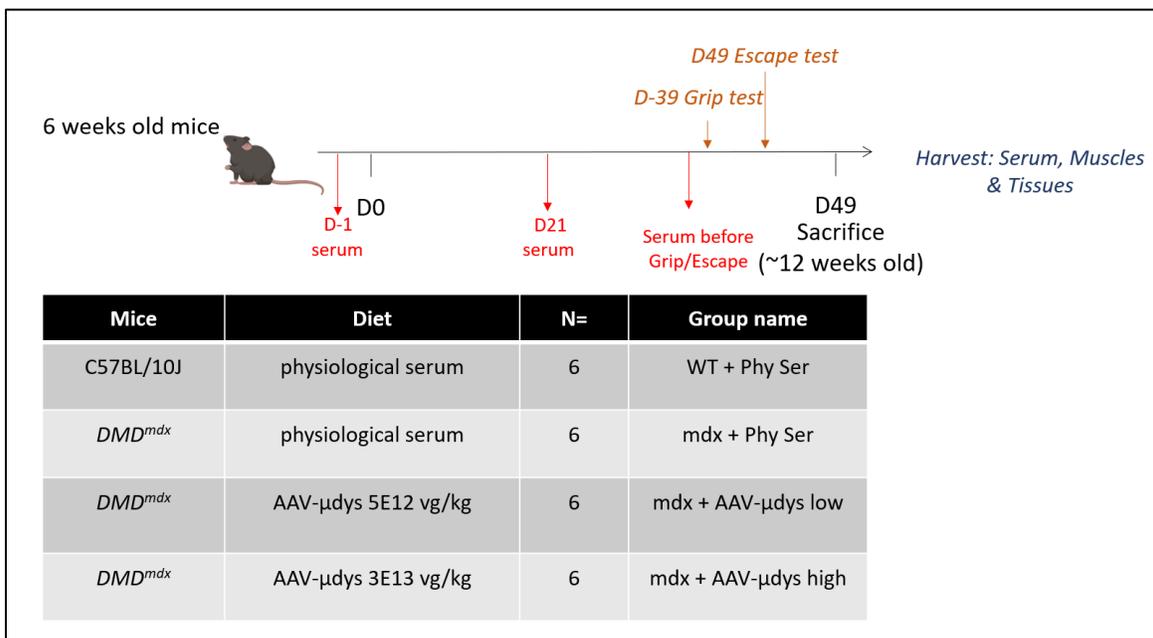


Figure 42. Thérapie génique par AAV-microdystrophine chez des souris Dmd^{mdx} . Des souris mâles de 6 semaines ont été incluses dans l'étude. Deux doses de vecteurs AAV9r encodant la séquence codante pour la microdystrophine sous le contrôle du promoteur musculaire *Spc5.12*, ont été injectées par voie IV chez les souris Dmd^{mdx} . Le sérum des souris a été collecté au cours de l'étude, et une évaluation de la fonction musculaire a été faite avant le sacrifice des souris après 6 semaines, et la collecte des muscles et tissus.

Premièrement, nous avons évalué l'entrée du vecteur AAVr et l'expression de la microdystrophine. Un effet dose a été observé au niveau des copies de vecteurs viraux dans les muscles (VGCN) (Figure 43a). Cela corrélait avec l'expression de la microdystrophine, indiquée par une transduction de la totalité des fibres du TA à haute dose, contre une expression moins importante avec la dose suboptimale (Figure 43b).

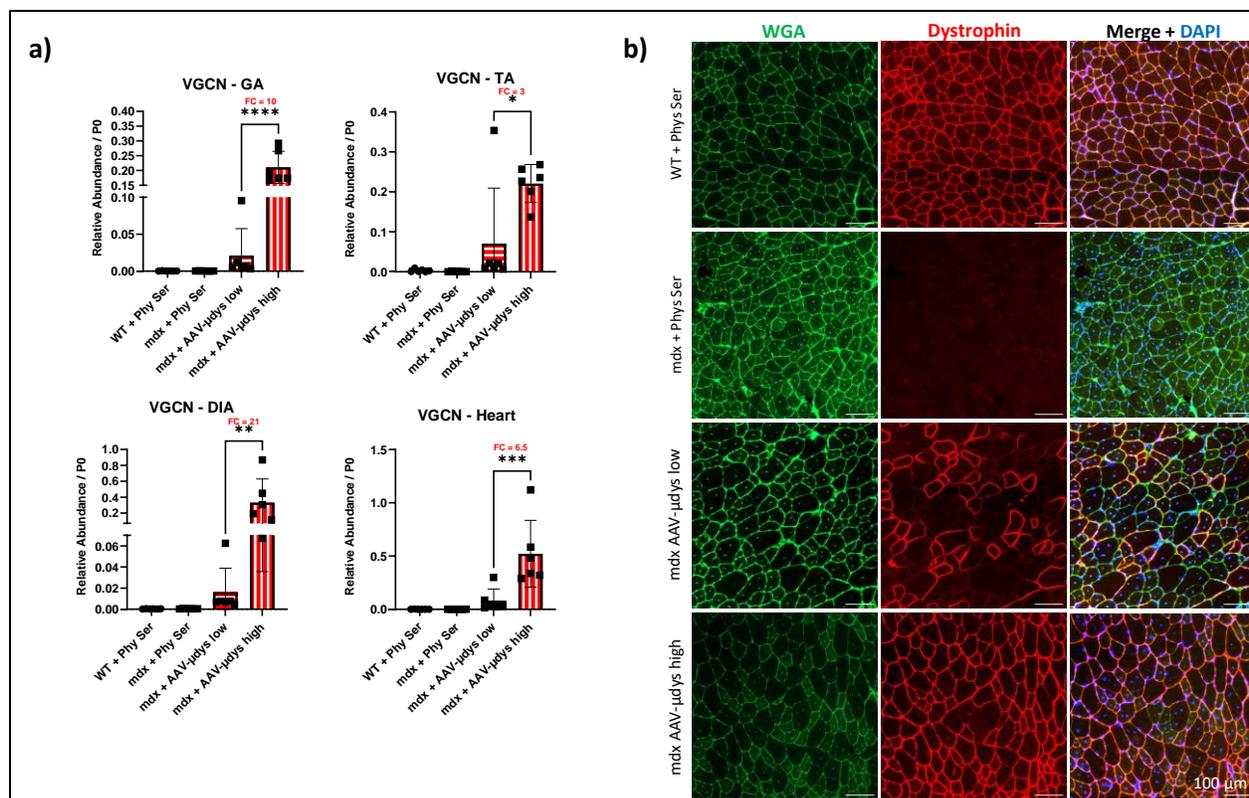


Figure 43. Evaluation de l'entrée du vecteur AAVr dans le muscle et de l'expression de la microdystrophine. a) Nombre de copies du génome viral (VGCN) dans les muscles, quantifiées par qPCR et normalisées au gène *Rplp0*. **b)** Immunomarquage de la Dystrophine (anticorps reconnaissant la partie N-terminale) avec la Wheat Germ Agglutinin WGA (marquant les membranes plasmique et nucléaire).

En ce qui concerne la force musculaire, un effet dose a été visible. En effet, il n'y avait pas d'amélioration significative de la force musculaire globale (*Escape Test*) ou des membres (*Grip Test*) avec la dose suboptimale. La dose haute de microdystrophine a permis une restauration partielle de la force musculaire globale chez les souris *Dmd^{mdx}*, mais pas jusqu'au niveau des souris WT (**Figure 44a-b**).

Nous avons également mesuré les biomarqueurs circulants dans le sérum des souris (**Figure 44c-d**). Une réduction significative des fragments de myomesine-3 (MYOM3) a été observée uniquement chez les souris *Dmd^{mdx}* traitées avec la haute dose de microdystrophine, bien qu'il n'y eût pas de restauration au niveau des souris WT.

Un effet-dose a été remarqué au niveau de la réduction de la fibrose dans différents muscles (**Figure 45**). En effet, la fibrose est significativement réduite avec la plus haute dose d'AAV, mais pas au niveau WT dans le diaphragme et le GA, qui sont deux tissus fortement fibrotiques chez ces souris.

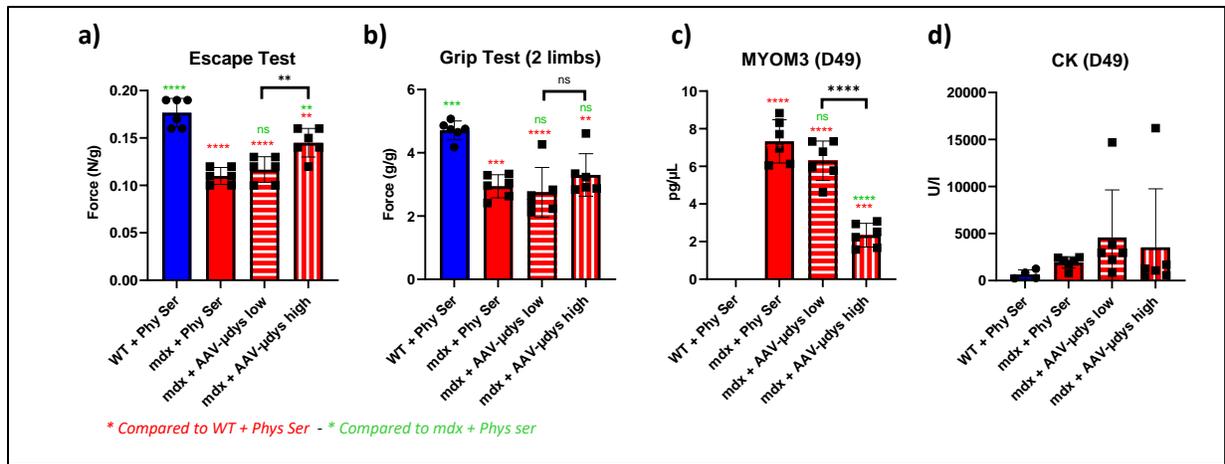


Figure 44. Evaluation de la force musculaire et de biomarqueurs circulants. a) Test d'échappement effectué chez les souris avant sacrifice et permettant de calculer la force musculaire globale. b) Test d'agrippement permettant de calculer la force des pattes supérieures des souris. c) Dosage des fragments de MYOM3 dans le sérum par test ELISA. d) Dosage de CK dans le sérum.

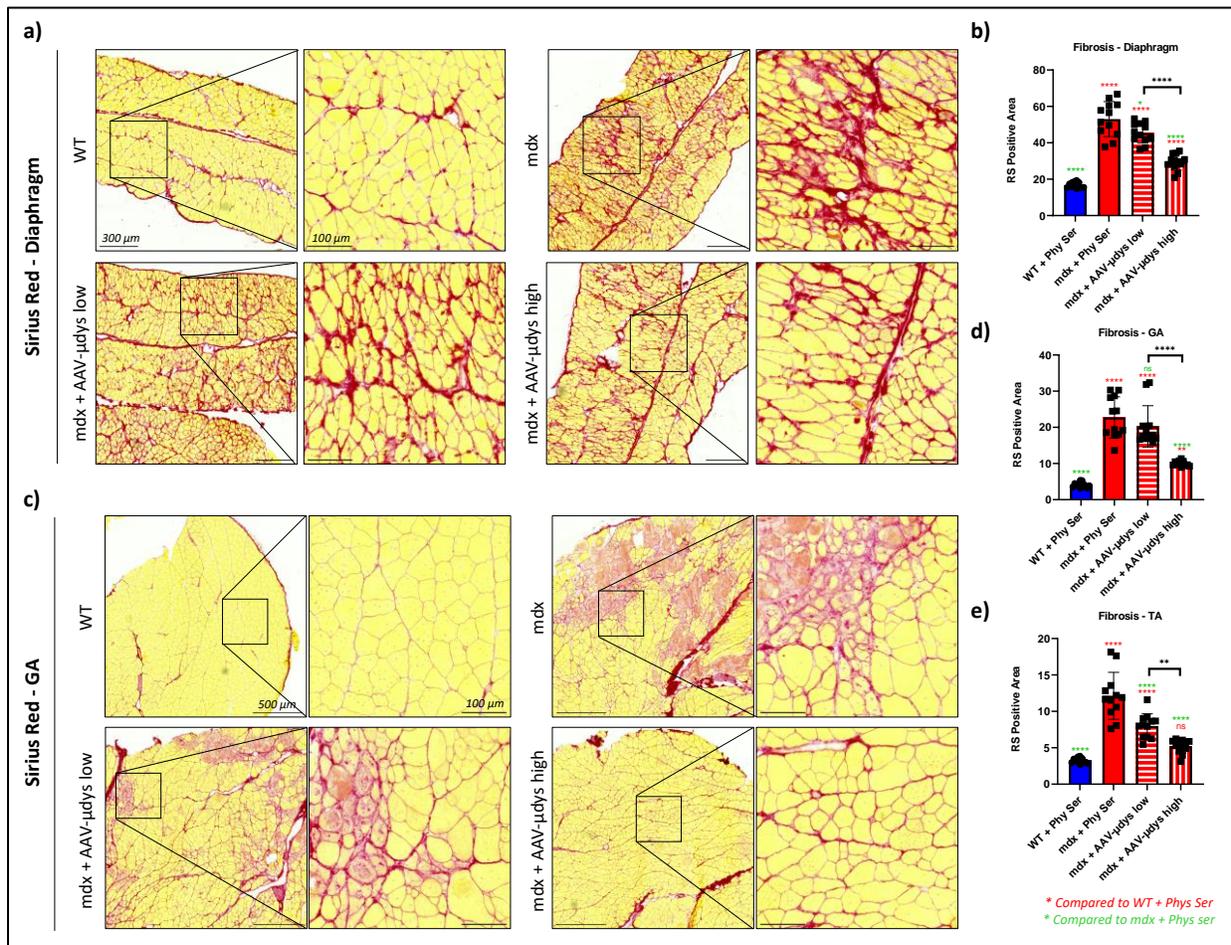


Figure 45. La thérapie génique avec la microdystrophine réduit la fibrose musculaire chez les souris Dmd^{mdx} . a & c) Marquage au rouge Sirius sur des coupes transversales de diaphragme et de GA. b-d-e) Quantification de la fibrose dans le diaphragme, le GA et le TA.

Ces données montrent que la thérapie génique avec l'AAV-microdystrophine permet l'amélioration des différents paramètres dystrophiques, sans avoir une correction totale du phénotype, même avec la dose relativement haute qui permet une transduction presque totale des fibres musculaires. Cela nous laisse suggérer que l'expression de la microdystrophine, même dans une grande partie des fibres d'un muscle, ne soit pas suffisante pour reverser la pathologie de la DMD.

Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'effet de la microdystrophine sur les dérégulations métaboliques, notamment le métabolisme du cholestérol et les défauts lysosomaux.

Le marquage du cholestérol libre dans le muscle GA avec le filipin, ainsi que la quantification du cholestérol libre dans les extraits lipidiques du muscle, ont montré une accumulation du cholestérol chez les souris *Dmd^{mdx}* par rapport aux souris WT, comme attendu (**Figure 46a-b**). Le traitement des souris dystrophiques avec une faible dose d'AAV-microdystrophine permet une petite réduction, mais non significative du cholestérol. Cette réduction est plus importante avec la haute dose d'AAV, où une différence non significative des souris WT est obtenue. Nous avons aussi évalué l'expression de deux gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol. *Abca1* (qui code pour un transporteur membranaire de cholestérol) et *ApoE* (qui code pour une lipoprotéine permettant le transport du cholestérol entre les organes) sont régulés à la hausse chez les souris *Dmd^{mdx}* par rapport aux contrôles WT. Le traitement avec l'AAV-microdystrophine à faible dose n'a pas montré un effet significatif sur l'expression de ces deux gènes par rapport aux souris non traitées. Cependant, les souris traitées avec la haute dose de l'AAV ont montré une restauration au niveau d'expression des contrôles WT pour ces deux gènes. Cela confirme le fait que la teneur en cholestérol dans le muscle est réduite après traitement avec la haute dose de microdystrophine.

Il semble qu'une haute expression de la microdystrophine permettra de restaurer plusieurs paramètres dérégulés du métabolisme du cholestérol, notamment en réduisant significativement son accumulation dans le muscle.

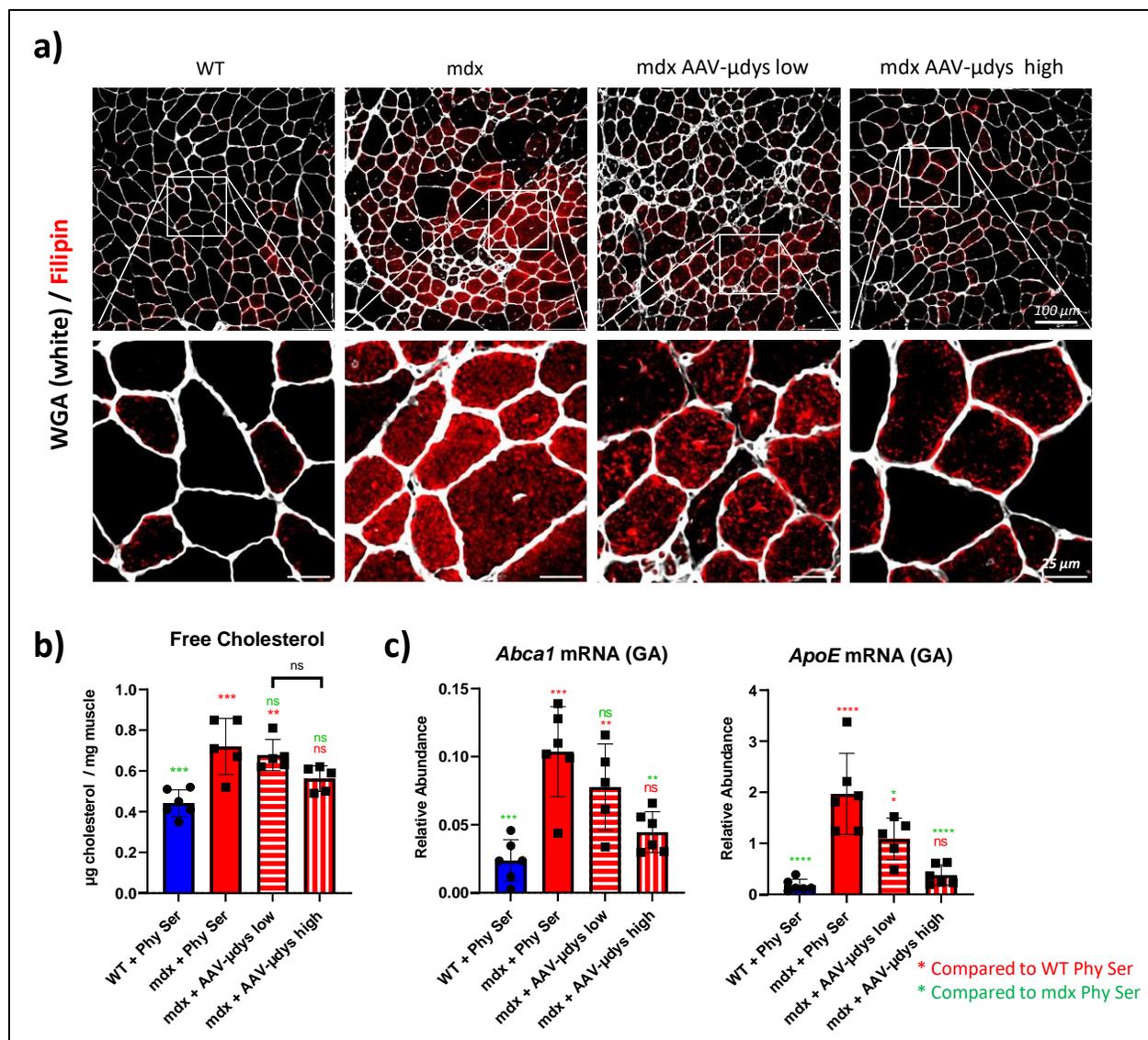


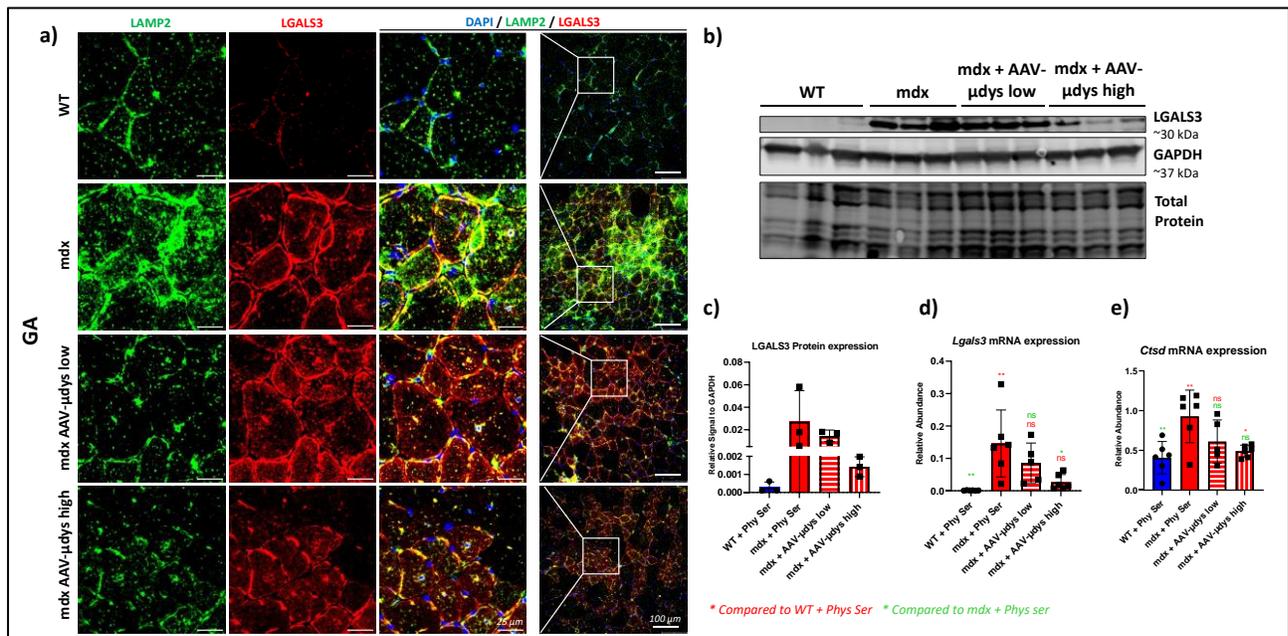
Figure 46. Restauration des dérégulations du cholestérol après le transfert de la microdystrophine. **a)** Marquage du muscle GA avec le filipin (cholestérol libre) et la WGA (membranes plasmique et nucléaire). **b)** Quantification de cholestérol libre dans les extraits lipidiques du muscle GA. **c)** RT-qPCR de *Abca1* et *ApoE* dans le muscle GA.

Nous avons ensuite étudié le degré de la perméabilisation de la membrane lysosomale dans différents muscles après transfert de la microdystrophine. L'immunomarquage de LGALS3/LAMP2 sur coupes transversales de GA a montré une légère réduction de spots LAMP2+/LGALS3+ après traitement avec la haute dose de microdystrophine par rapport aux souris non traitées. Cette réduction est plus marquante au niveau de l'expression de galectine-3 en protéines et en ARNm. Cela pourrait en fait être dû à une réduction importante de l'inflammation, et donc de cellules immunitaires exprimant galectine-3 (**Figure 47**). En revanche, le niveau d'expression de *Ctsb*, qui est élevé chez les souris *Dmd^{mdx}*, n'a pas été restauré au niveau des souris WT, même chez les souris traitées avec la dose haute d'AAVr.

Une réduction des puncta LAMP2+/LGALS3+ a été détectée avec la haute dose d'AAVr dans le diaphragme, mais pas avec la dose suboptimale. En ce qui concerne le TA, la dose suboptimale semble avoir un effet plus important que dans les autres muscles, où une réduction des puncta LAMP2/LGALS3 est détectée.

Ces résultats pris en ensemble montrent que le traitement avec la microdystrophine, à haute dose, permet de réduire, mais pas complètement, les lésions de la membrane lysosomale. La dose suboptimale de microdystrophine ne semble pas suffisante pour corriger les dégâts lysosomaux.

En ensemble, il semble que la thérapie génique par transfert de microdystrophine permet, à haute dose, de corriger partiellement les dérégulations métaboliques étudiées. La haute dose d'AAV-microdystrophine permet en effet de réduire l'accumulation du cholestérol dans le muscle. Cependant, les dommages lysosomaux ne semblent pas être entièrement corrigés par le transfert de la microdystrophine. Il serait donc intéressant de cibler les dommages lysosomaux en combinaison avec le transfert de la microdystrophine à dose suboptimale.



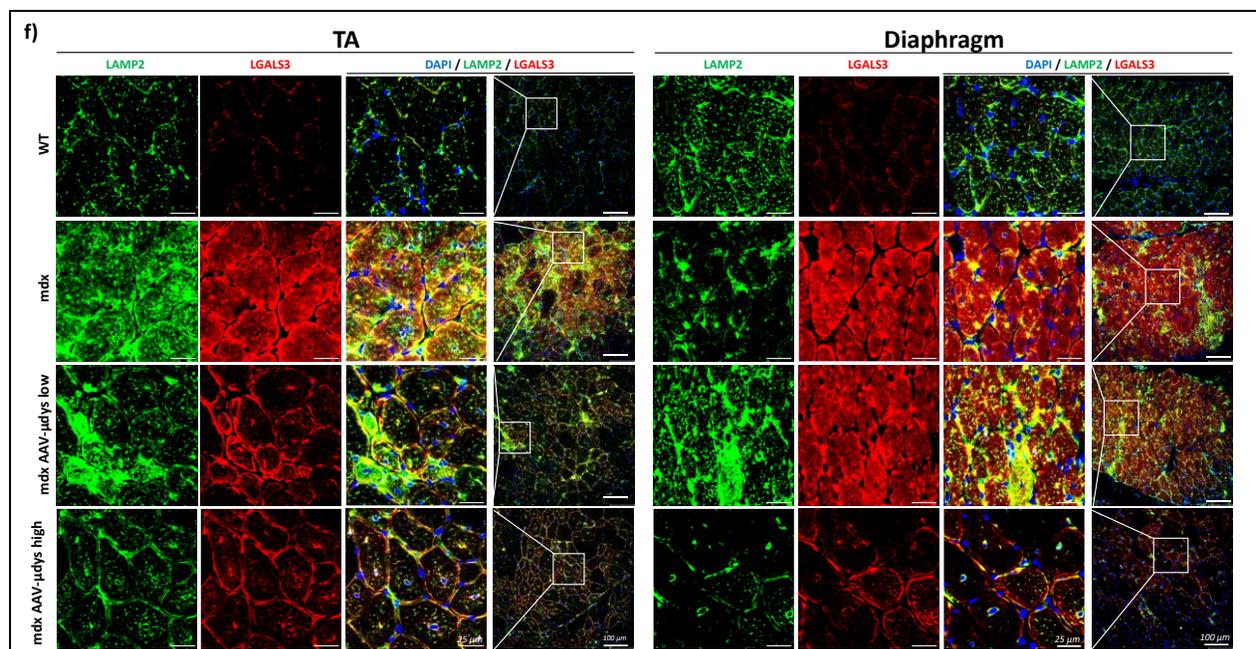


Figure 47. La microdystrophine réduit légèrement les dégâts lysosomaux à haute dose. a-f) Co-immunomarquage de LAMP2/LGALS3 sur des coupes transversales de GA, de TA et de diaphragme. **b)** WB pour galectine-3 dans le muscle GA et quantification des bandes **(c).** **d)** Expression de *Lgals3* dans le GA. **e)** Expression de *Ctsd* dans le GA.

II- Le développement d'une approche de thérapie combinée pour la DMD

Le but de cette partie du projet était de développer une thérapie combinée pour le traitement de la DMD. Après avoir identifié la dérégulation du métabolisme de cholestérol dans la DMD, et les résultats préliminaires montrant des effets bénéfiques de la simvastatine chez les souris *Dmd^{mdx}* [179], nous avons testé la simvastatine en combinaison avec l'AAV-microdystrophine [329]. Cependant, la combinaison de la simvastatine à la thérapie génique par microdystrophine n'a pas montré un effet bénéfique. En effet, l'un des effets secondaires communs des statines est la myopathie liée aux statines [109,110]. Chez les souris *Dmd^{mdx}*, la simvastatine semblait augmenter la perméabilisation des fibres musculaires et les rendaient plus susceptibles à la nécrose [329].

Cette étude nous a permis cependant de développer une preuve de concept pour la thérapie combinée, avec une forme optimisée de microdystrophine, des moyens d'évaluations fonctionnelles, histologiques et moléculaires de l'efficacité du traitement.

L'identification des dérégulations du système endolysosomal et leur corrélation avec l'accumulation du cholestérol et la dérégulation de son métabolisme dans le muscle dystrophique, nous a offert une nouvelle piste thérapeutique. Dans ce sens, nous avons voulu identifier de molécules capables de dégager le cholestérol spécifiquement des lysosomes dans le muscle. Pour cela, plusieurs molécules ont été testées tout d'abord *in vitro*, avant d'évaluer un candidat en combinaison avec l'AAV-microdystrophine chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}*.

II-1 Développement d'un système de screening *in vitro* de molécules candidates pour thérapie combinée

Le but de cette partie du projet était de développer une méthode d'évaluation de molécules candidates *in vitro*, et qui pourrait être adaptée éventuellement à un système de criblage à haut débit. L'objectif est de sélectionner de molécules capables de dégager le cholestérol accumulé dans les lysosomes. Pour cela, une lignée de myoblastes immortalisée a été utilisée, dans laquelle nous avons induit l'accumulation du cholestérol dans le lysosome, en inhibant le transporteur de cholestérol lysosomal NPC1 (**Figure 48**).

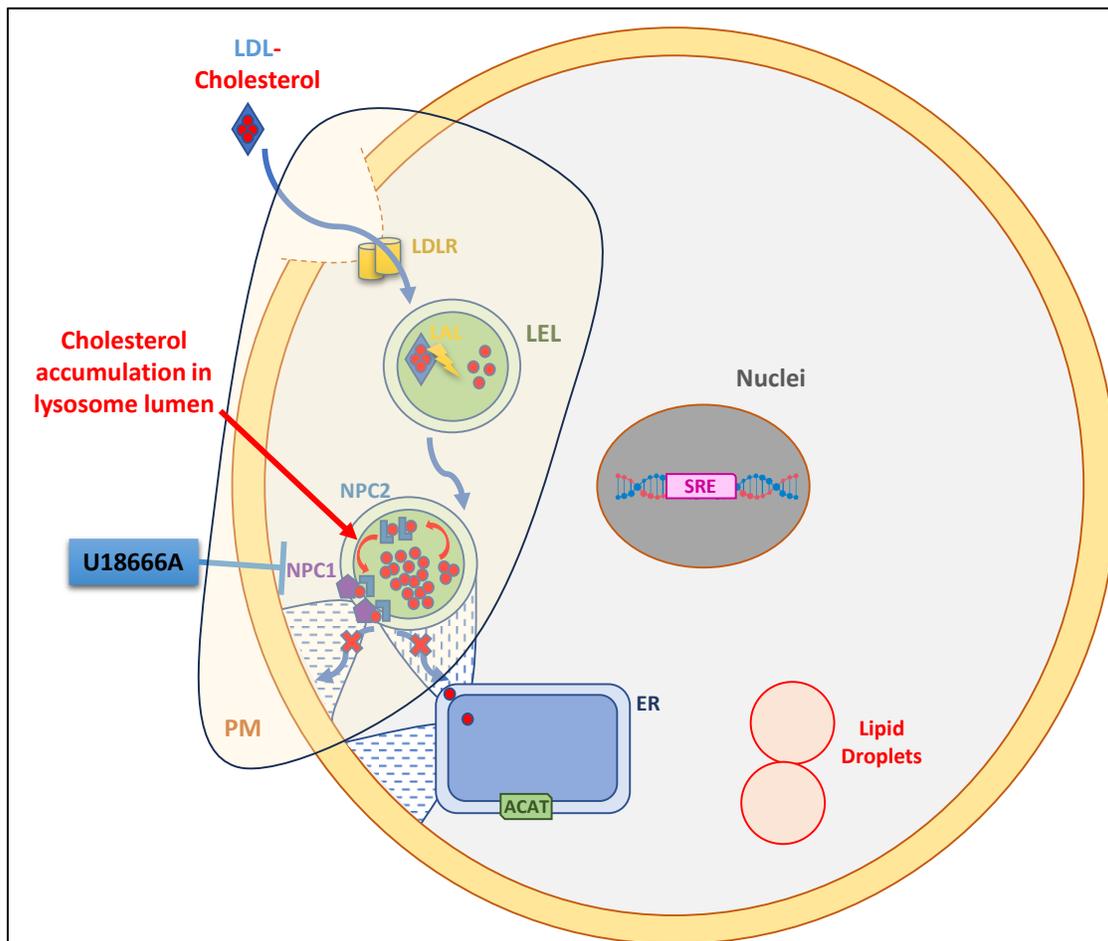


Figure 48. Principe du système de criblage *in vitro*. L'inhibition du transporteur lysosomal de cholestérol NPC1 avec l'inhibiteur pharmacologique U18666A permet de cribler des molécules éliminant le cholestérol du lysosome.

- **Validation du système d'évaluation *in vitro* :**

Tout d'abord, des myoblastes ont été chargés avec du cholestérol soluble (conjugué au β -cyclodextrine) et de dextrane TMRM (qui permet de marquer les lysosomes), en présence ou non d'un inhibiteur pharmacologique de NPC1 (appelé U18666A) (**Figure 49b**). Ensuite, les cellules ont été fixées et marquées au filipin, la colocalisation entre le cholestérol libre (filipin) et les lysosomes (Dextrane TMRM) est ainsi

quantifiée. Le traitement des cellules avec le cholestérol soluble pendant 24h a montré une augmentation nette du marquage filipin, comme attendu. Néanmoins, en calculant le ratio de filipin colocalisé avec les lysosomes, les cellules traitées avec U18666A montraient un ratio plus important, signifiant une accumulation plus spécifique du cholestérol dans les lysosomes pour ces cellules. En plus, l'analyse de la corrélation croisée entre les deux signaux a montré une corrélation étroite entre le cholestérol libre et les lysosomes chez les cellules traitées avec U18666A par rapport aux cellules non traitées (le pic de la courbe proche de 0 signifie une superposition des deux signaux, alors qu'un décalage sur l'axe dx indique le décalage des pixels entre les deux signaux).

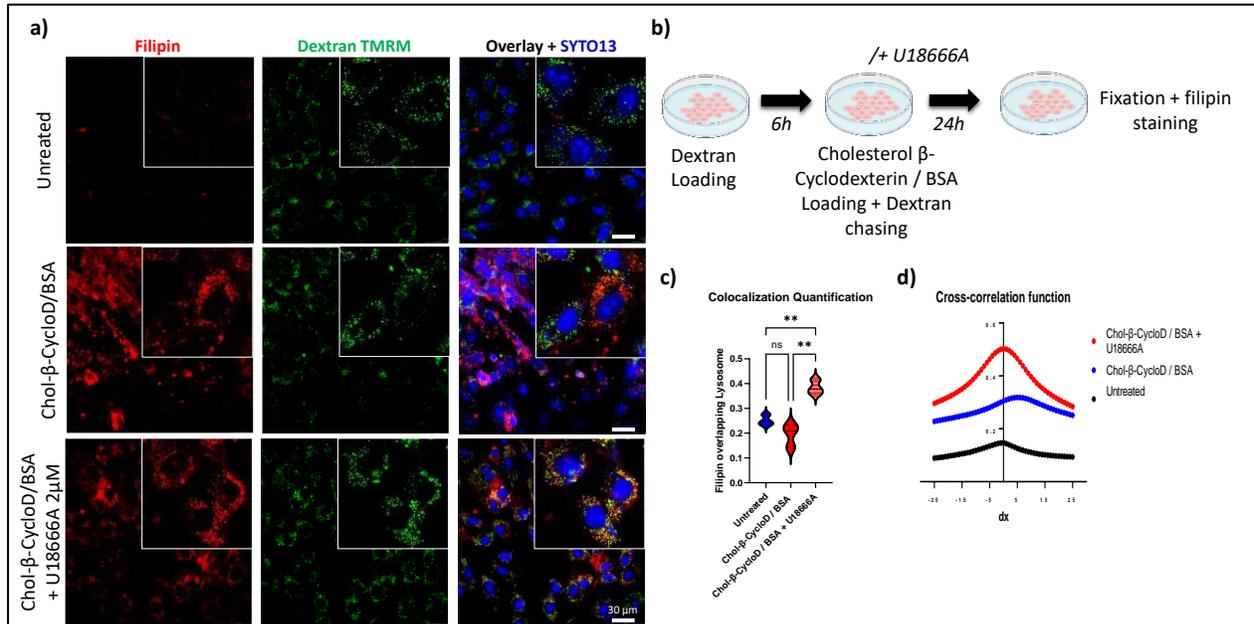


Figure 49. L'inhibition de NPC1 par U18666A induit une accumulation spécifique du cholestérol dans le lysosome des myoblastes. **a)** Images de fluorescences montrant le marquage au filipin (cholestérol libre) et le conjugué fluorescent du dextrane (TMRM) marquant les lysosomes. **b)** Des myoblastes immortalisés ont été chargés avec un conjugué fluorescent de dextrane qui empreinte la voie d'endocytose pour entrer dans la cellule, puis les cellules sont chargées ou non avec du cholestérol conjugué au β-cyclodextrine et dilué dans de la BSA, et traitées ou non avec l'inhibiteur U18666A pendant 24h. Les dextrans sont donc chassés jusqu'au lysosome. Ensuite les myoblastes sont fixés et marqués au filipin. **c-d)** Analyse de la colocalisation entre le signal du filipin (cholestérol) et du dextrane TMRM (lysosomes).

L'effet de U18666A sur l'accumulation du cholestérol dans le lysosome a aussi été confirmé avec un analogue fluorescent du cholestérol (NBD-cholestérol). Le traitement des myoblastes avec U18666A a montré une meilleure colocalisation entre le NBD-cholestérol et la sonde marquant les lysosomes (LysoTracker Red DND) (Figure 50).

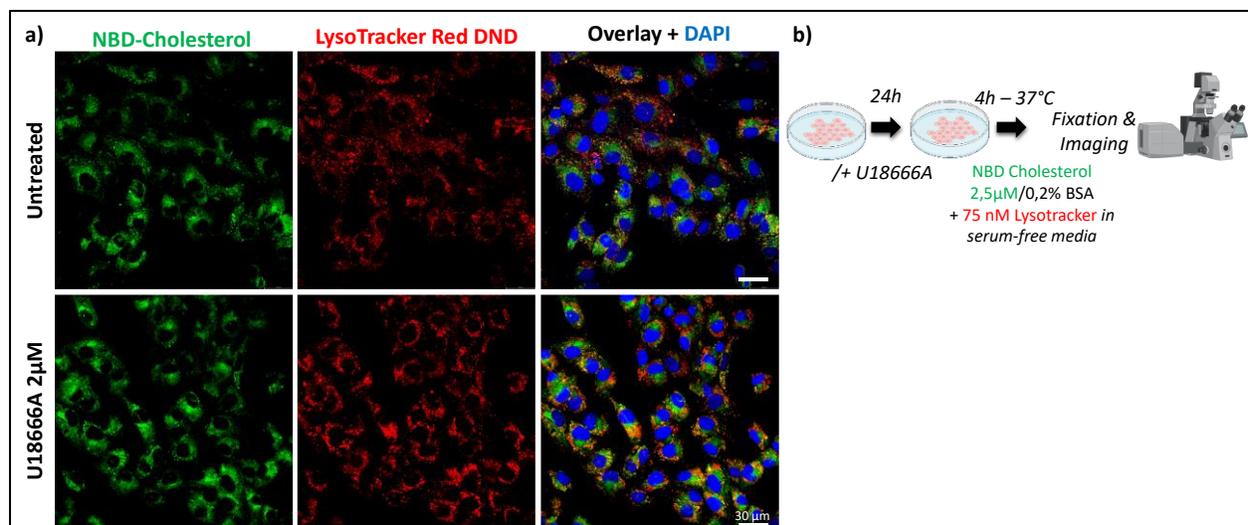


Figure 50. Le NBD-cholestérol s'accumule dans les lysosomes des myoblastes après traitement avec U18666A. **a)** Images fluorescents montrant l'analogue fluorescent du cholestérol (NBD-cholestérol) et la sonde spécifique des lysosomes (LysoTracker Red DND). **b)** Les cellules ont été prétraitées avec U18666A pour 24h, puis chargées avec le NBD-cholestérol et le LysoTracker pour 4h avant d'être fixées et imagées au confocal.

- **Evaluation de molécules activatrices du système endolysosomal :**

Nous avons ensuite évalué l'effet de plusieurs molécules activatrices du système endolysosomal sur l'efflux de cholestérol dans des myoblastes humains. Un système en plaque de 96 puits a été développé. Les cellules ont été traitées avec U18666A et les drogues à tester pendant 24 heures, avant d'être chargées avec l'analogue fluorescent du cholestérol (NBD-cholestérol). La fluorescence est ensuite mesurée dans les culots cellulaires de chaque puit ainsi que dans le milieu, ce qui permet de calculer le taux d'efflux de cholestérol (le cholestérol qui sort des cellules) (**Figure 51a**). Plusieurs molécules agissant sur l'activation des lysosomes ont été testées, et ont montré un taux d'efflux significativement plus élevé que les cellules traitées uniquement avec U18666A (**Figure 51b**), ainsi qu'une charge cellulaire réduite de cholestérol (**Figure 51c**).

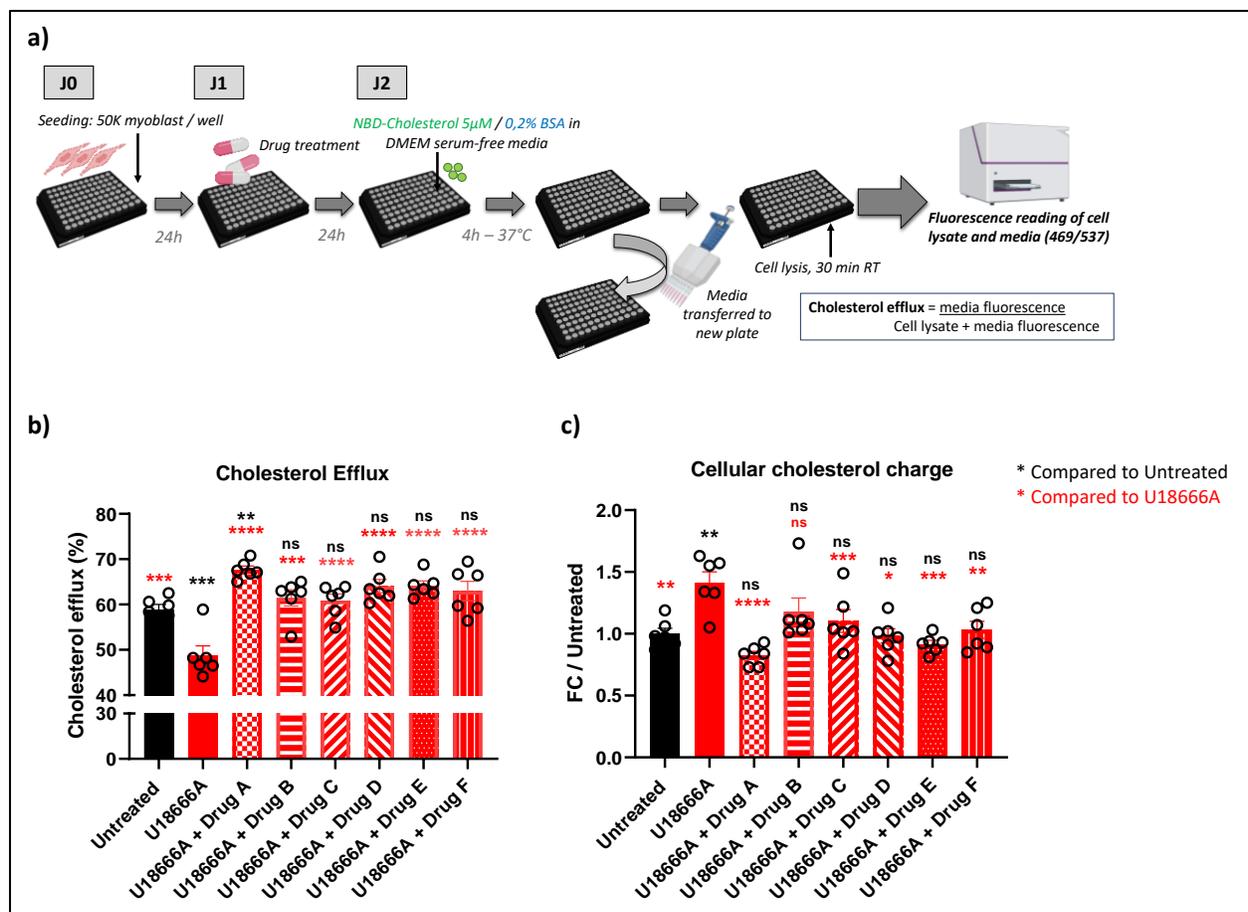


Figure 51. Criblage de molécules éliminant le cholestérol des myoblastes humains. **a)** Des myoblastes humains immortalisés sont cultivés dans une plaque de 96 puits, traités pendant 24h avec l'inhibiteur de NPC1 (U18666A) + les drogues à tester. Ensuite, le NBD-cholestérol est chargé dans les puits pendant 4 heures. Le milieu est transféré dans une nouvelle plaque, et les cellules sont lysées avec un tampon de lyse pendant 30 minutes. Les fluorescences des deux plaques contenant le milieu et les culots cellulaires sont quantifiées avec un lecteur de plaque. **b)** Taux d'efflux de cholestérol calculé à partir de la fluorescence du milieu et de la fluorescence totale (milieu + cellules). **c)** Charge cellulaire en cholestérol calculée à partir de la fluorescence des culots cellulaires.

Les mêmes drogues ont été aussi testées sur des myotubes différenciés. Le même principe de criblage a été utilisé, mais les cellules ont été fixées et imagées au microscope confocal (**Figure 52a-b**). La quantification de la fluorescence cellulaire totale corrigée des myotubes corrélait avec les premiers résultats obtenus dans les myoblastes (**Figure 52c**).

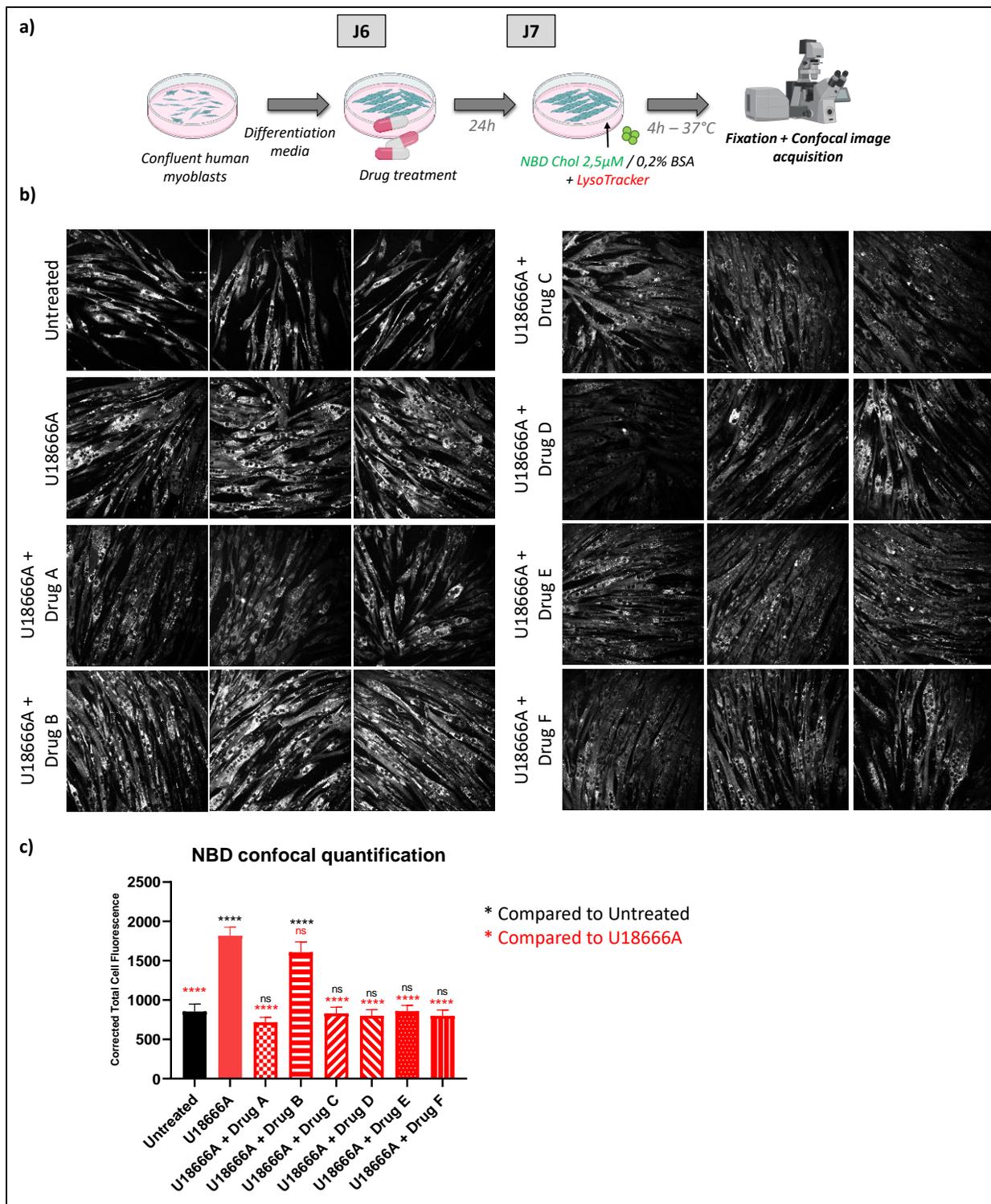


Figure 52. Criblage de molécules éliminant le cholestérol des myotubes humains. *a)* Des myoblastes humains immortalisés sont différenciés en myotubes pendant 6 jours dans des plaques de microscopie à fond clair. Ensuite, les cellules sont traitées pendant 24h avec U18666A + les drogues à tester, chargées avec le NBD-cholestérol + LysoTracker pendant 4h, fixées et imagées au microscope confocal. *b)* Images prises au confocal montrant le signal du NBD-cholestérol dans les myotubes. *c)* Quantification de la fluorescence totale corrigée dans au moins 180 myotubes par condition.

A la suite des premiers résultats obtenus *in vitro*, nous avons sélectionné une molécule (Drug D, appelée Drug X dans la partie suivante) à tester chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. Bien que plusieurs molécules testées aient montrées des effets similaires *in vitro*, nous avons choisi cette drogue pour son profil pharmaceutique déjà connu, sa sécurité et sa facilité d'administration chez les animaux et les hommes.

II-2 Thérapie combinée chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$

Après la sélection de la drogue X, nous avons réalisé une étude préliminaire *in vivo* dans le but de savoir si la drogue aura un effet bénéfique sur l'amélioration du phénotype dystrophique chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$, seule et en combinaison avec une dose suboptimale d'AAV-microdystrophine. Pour cela, 5 groupes de souris males ont été inclus dans cette étude (**Figure 53**). La drogue X a été diluée dans l'eau de biberons des souris et administrée à partir de 3 semaines et jusqu'à la fin de l'étude. L'AAV-microdystrophine a été injecté par voie intra-vénale (IV) à 4 semaines d'âge (une semaine après le début de traitement avec la drogue X pour le groupe ayant la thérapie combinée).

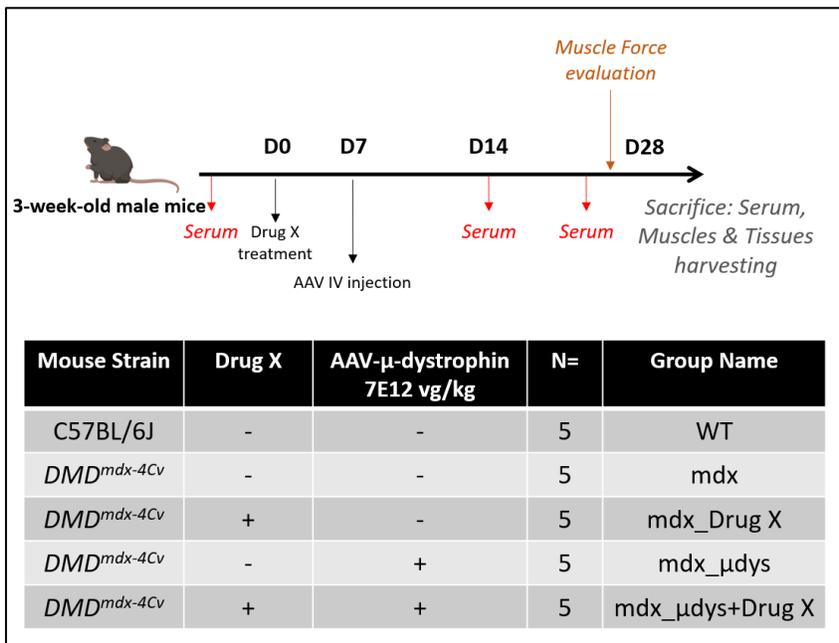


Figure 53. Expérimentation d'une thérapie combinée chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. Des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ et des contrôles WT ont été incluses dans l'étude à 3 semaines d'âge. Un groupe a été traité avec la drogue X (diluée dans l'eau de biberon), un groupe a été injecté avec l'AAV-microdystrophine à 4 semaines, et un groupe a reçu la thérapie combinée (drogue X à partir de 3 semaines et tout au long du protocole + injection AAV-microdystrophine à 4 semaines). Les souris ont été soumises à une évaluation de la fonction musculaire par test d'échappement à 7 semaines d'âge avant leur sacrifice et la collecte des tissus et des muscles pour les analyses histologiques et moléculaires.

Pour commencer, nous voulions voir si le traitement avec la drogue X influençait l'expression du transgène délivré par AAVr. Pour cela, le taux d'expression d'ARNm de microdystrophine a été évalué dans les muscles TA et GA. Aucune différence significative n'a été détectée au niveau de l'expression de la microdystrophine (**Figure 54b-c**). Aussi, il n'y avait pas de différence au niveau de l'expression protéique de la microdystrophine évaluée par immunofluorescence sur des coupes transversales de muscle TA (**Figure 54a**).

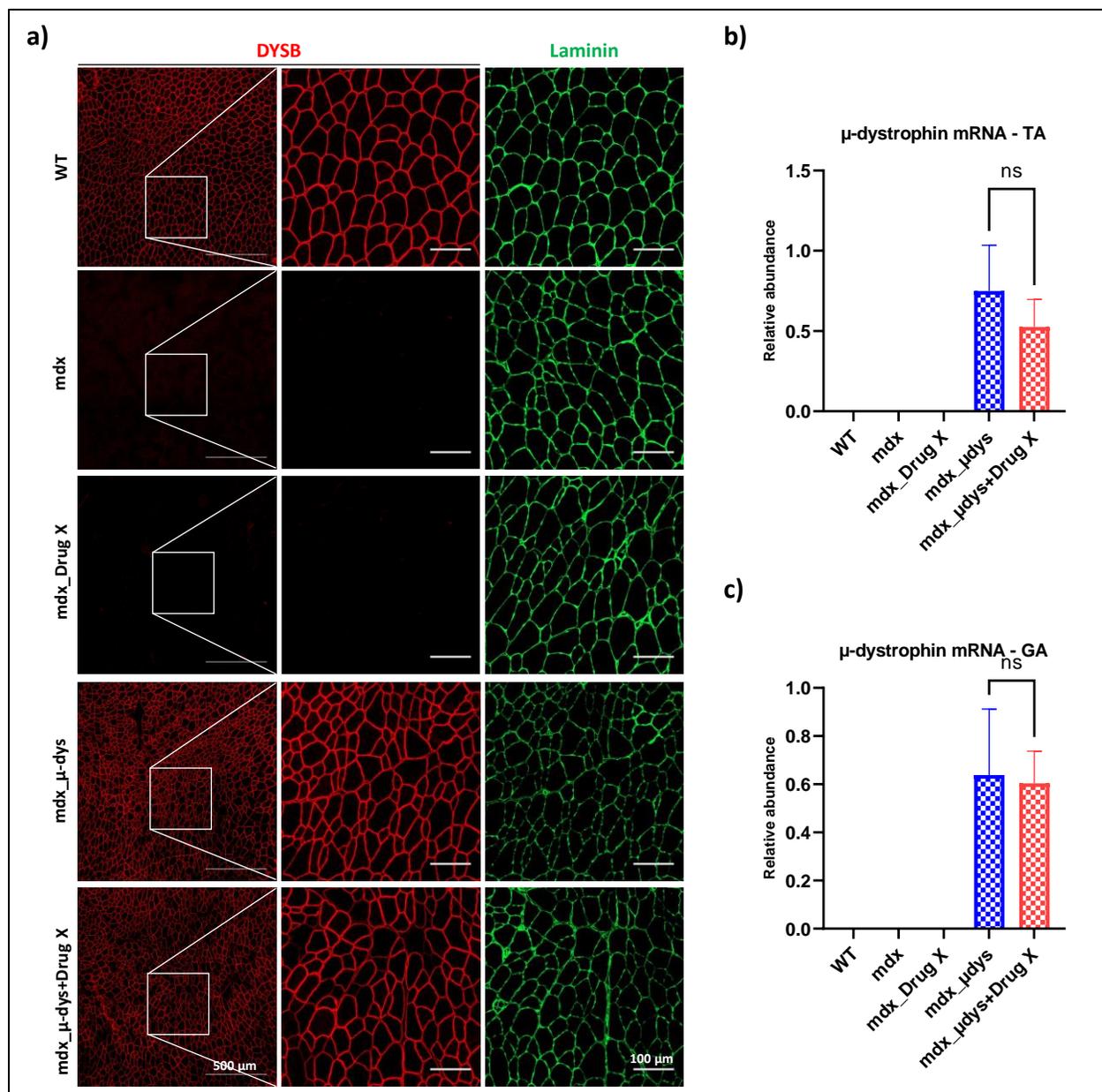


Figure 54. La combinaison de la drogue X avec la thérapie génique n'influence pas le taux d'expression de la microdystrophine. a) Immunomarquage de la dystrophine (anticorps reconnaissant le domaine N-terminal) sur des coupes transversales de muscles TA. **b-c)** Expression de transcrits de microdystrophine quantifiée par RT-qPCR dans le TA et le GA.

La force musculaire a été évaluée avec un test d'échappement à J28. Les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ avaient significativement moins de force musculaire que les contrôles WT. Une légère amélioration de la force musculaire par rapport aux souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ est observée chez les souris traitées avec la drogue X seule ou l'AAV-microdystrophine seul, mais celle-ci n'est pas significative. Seulement les souris traitées avec la drogue X et l'AAV-microdystrophine ont montré une amélioration significative de la force musculaire par rapport aux souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ non traitées.

Nous avons aussi évalué deux biomarqueurs circulants pendant le protocole et avant l'évaluation fonctionnelle. Les souris *Dmd*^{mdx-4Cv} traitées avec la drogue X ont montré une diminution significative des fragments de MYOM3 circulants après 25 jours de traitement, bien que pas au niveau des souris WT (**Figure 55c**). Les souris traitées avec l'AAV-microdystrophine et l'AAV-microdystrophine combiné à la drogue X ont montré une réduction plus importante de MYOM3 après 25 jours, mais toujours pas au niveau WT. Cependant, une tendance à la normalisation est observée au cours du protocole (**Figure 55e**) et nécessitera probablement une analyse au plus long terme. En ce qui concerne la CK, seulement les souris traitées avec la combinaison de la drogue X et la microdystrophine ont montré une réduction significative par rapport aux souris *Dmd*^{mdx-4Cv} non traitées à la fin de l'étude.

Ces données montrent que la drogue X ait un effet bénéfique sur l'amélioration du phénotype dystrophique des souris *Dmd*^{mdx-4Cv}, tant au niveau de la fonction motrice qu'au niveau des biomarqueurs circulants, mais elle reste moins efficace que le traitement avec l'AAV-microdystrophine. Toutefois, ce qui est le plus intéressant est l'effet bénéfique additif de l'AAV-microdystrophine et de la drogue X, au niveau de la fonction motrice et de niveaux de CK dans le sérum.

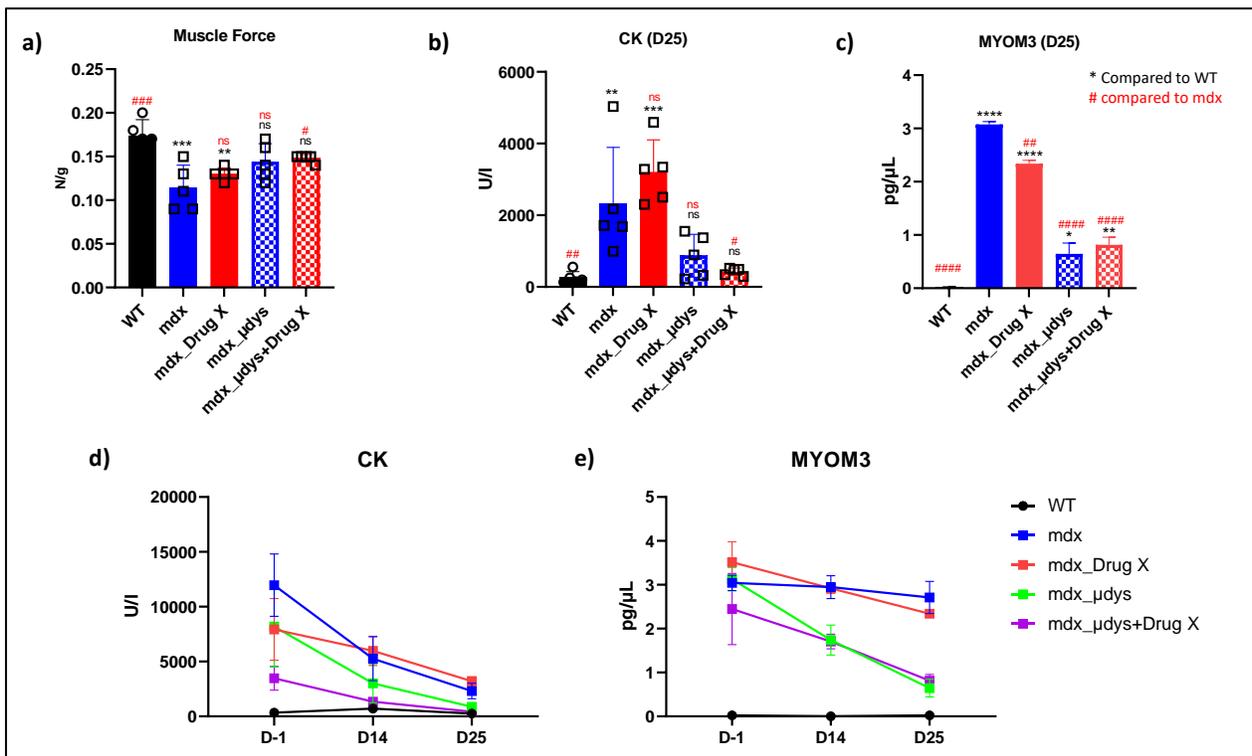


Figure 55. Amélioration de la fonction musculaire et des biomarqueurs sériques chez les souris traitées avec la thérapie combinée. a) Test d'échappement effectué chez les souris avant sacrifice et permettant de calculer la force musculaire globale. b-d) Dosage de CK dans le sérum. c-e) Dosage des fragments de MYOM3 dans le sérum par test ELISA.

Ensuite nous avons fait une analyse histologique des coupes musculaires transversales. L'analyse histologique du muscle GA, un des muscles les plus atteints chez la souris *Dmd*^{mdx-4Cv}, a montré une atteinte dystrophique typique chez les souris malades, caractérisée par : une infiltration de cellules immunitaires (agrégats de noyaux entre les fibres), une infiltration fibro-adipeuse (espace blanc), une centronuléation

caractéristique des fibres régénérées, une distribution asymétrique de la taille des fibres. Les souris traitées avec la drogue X ont montré une amélioration histologique, avec notamment une réduction de l'inflammation et de la centronuléation. Les souris traitées uniquement avec l'AAV-microdystrophine ont aussi montré une amélioration histologique, mais pas une correction totale du phénotype dystrophique. De façon intéressante, le muscle des souris traitées avec la combinaison des deux traitements a été semblable au muscle sain.

La thérapie combinée semble être la plus efficace pour inverser l'atteinte dystrophique évaluée au niveau histologique du muscle GA chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$.

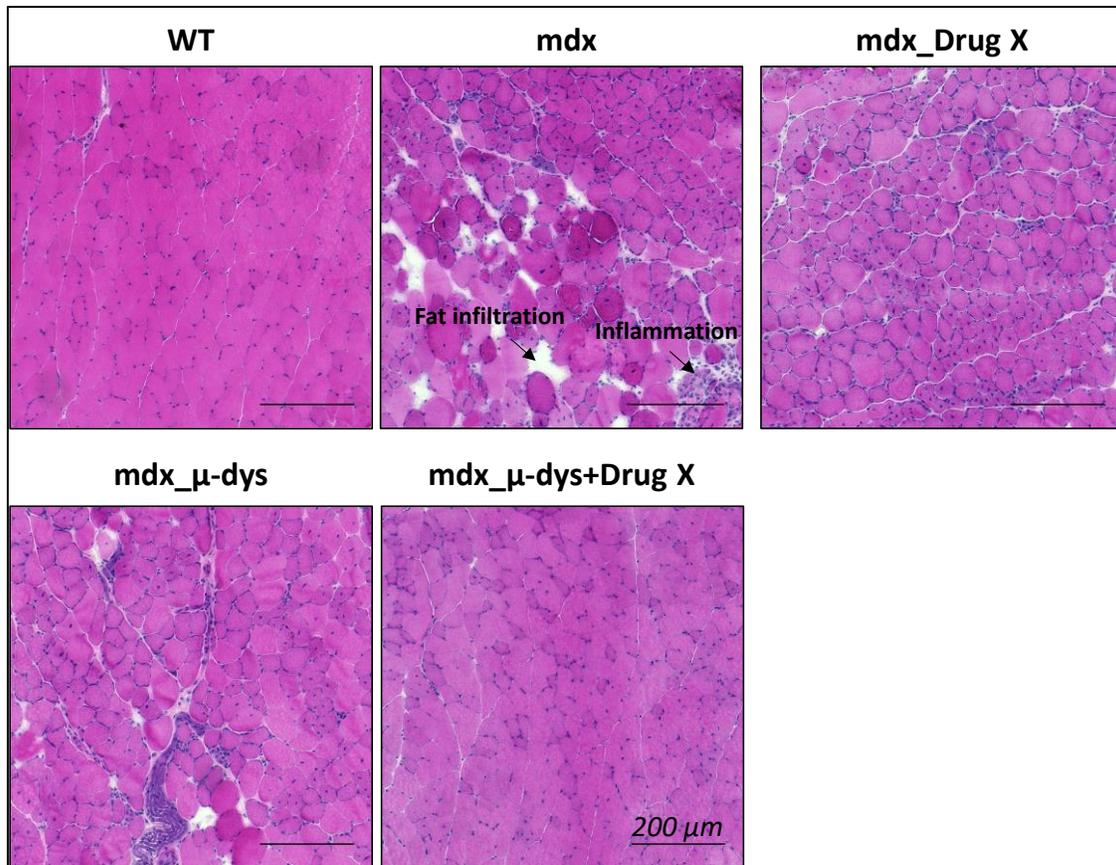


Figure 56. La combinaison de la drogue X à l'AAV-microdystrophine chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ restaure les paramètres histologiques du muscle GA. Marquage H&E sur coupes transversales de muscles GA.

Une évaluation de la fibrose a aussi été faite dans le diaphragme et le GA par marquage au rouge Sirius (**Figure 57**). Les souris traitées avec la drogue X seule ou l'AAV-microdystrophine ont montré une légère diminution par rapport aux souris non traitées, bien que non significative. De façon intéressante, seulement les souris traitées avec la thérapie combinée ont montré une réduction significative de la fibrose dans le diaphragme (et différence non significative par rapport au muscle WT). En ce qui concerne la fibrose dans le muscle GA, le traitement avec la drogue X a permis d'avoir une réduction significative par rapport aux souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ non traitées, mais pas jusqu'au niveau du muscle sain. L'AAV-microdystrophine et l'AAV-microdystrophine combiné à la drogue X semblaient avoir un effet similaire sur la réduction de la fibrose dans le GA.

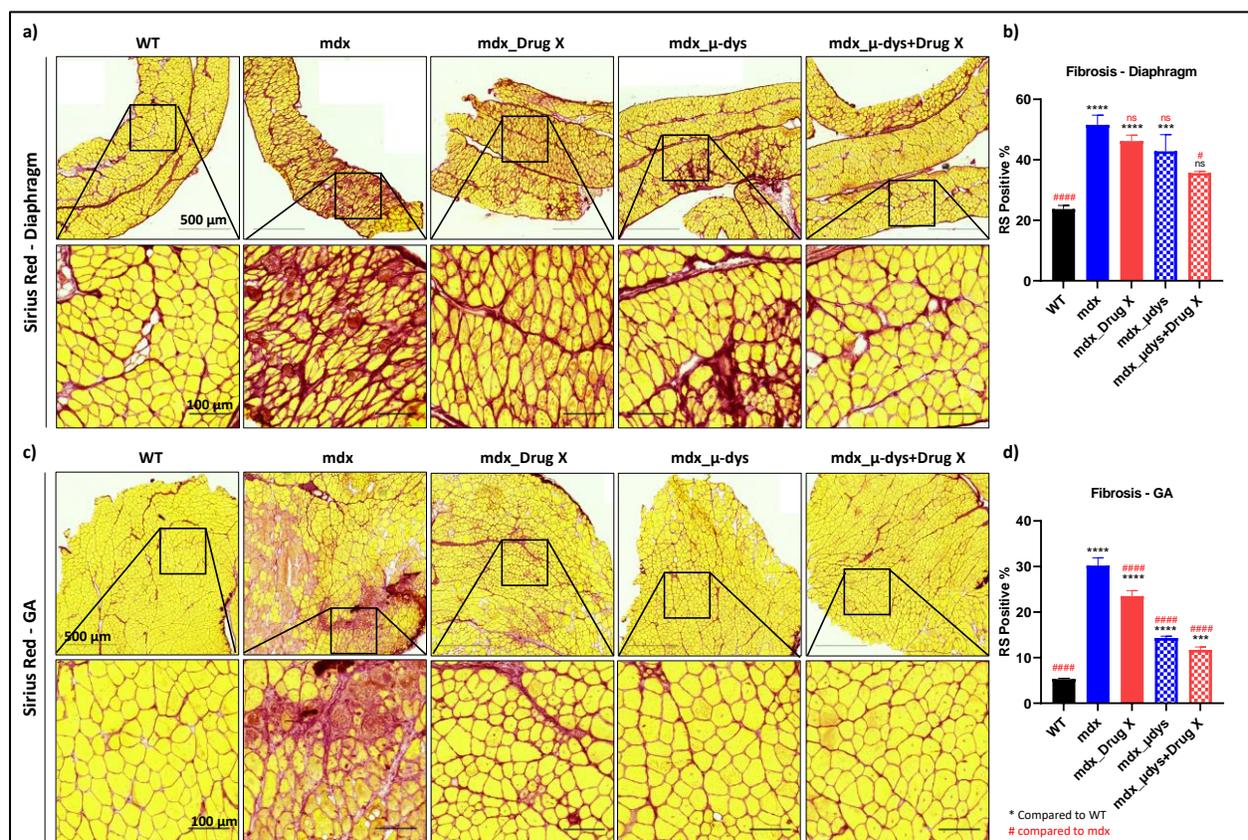


Figure 57. La thérapie combinée réduit la fibrose dans le diaphragme et le GA. a-c) Marquage au rouge Sirius sur des coupes transversales de diaphragme et de GA. b-d) Quantification de la fibrose dans le diaphragme et le GA.

Après avoir constaté un effet bénéfique de la thérapie combinée de l'AAV-microdystrophine et la drogue X, nous voulions savoir si l'effet bénéfique additif de la drogue X est lié à une amélioration du système endolysosomal. Pour cela, un immunomarquage LGALS3/LAMP2 a été fait sur des coupes transversales de TA pour évaluer les lésions de la membrane lysosomale. Une augmentation nette des spots LAMP2+/LGALS3+ a été détectée chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}* comme attendu (**Figure 58a**), ce qui corrélait avec une augmentation de la surface LGALS3+ quantifiée sur plusieurs coupes musculaires (**Figure 58b**). Le traitement avec l'AAV-microdystrophine seule n'a pas montré une réduction importante des spots LAMP2+/LGALS3+ dans le TA, alors que la drogue X seule a permis de corriger presque complètement les dégâts lysosomaux. Le groupe traité par la combinaison des deux traitements a aussi montré une restauration au niveau des souris WT.

Il faut noter que la correction des dommages lysosomaux est le seul paramètre corrigé mieux par la drogue X seule que par l'AAV-microdystrophine seul. Il est donc possible que l'effet additif bénéfique de la drogue X à la thérapie génique soit médié en partie par la correction des lésions lysosomales.

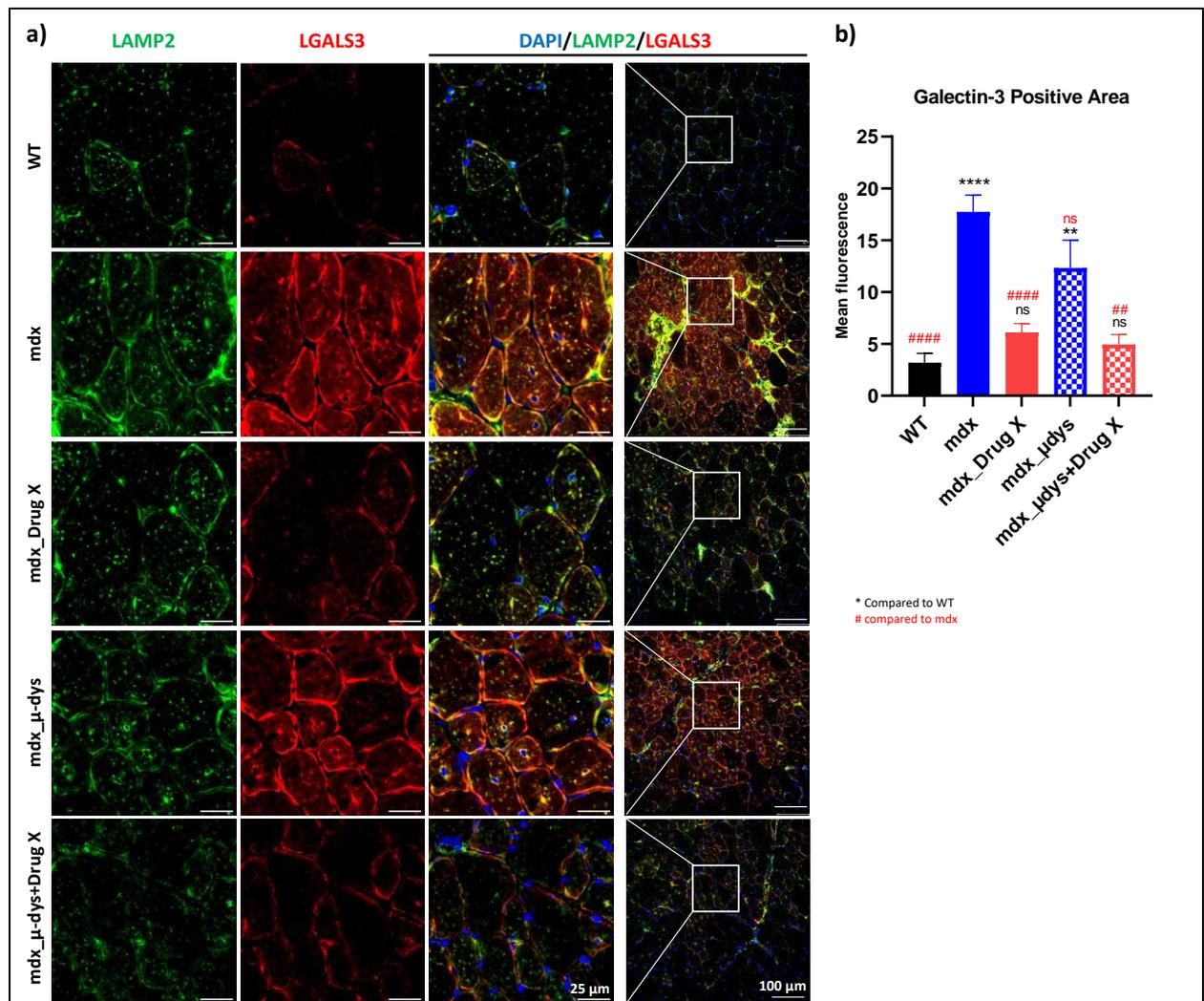


Figure 58. 'Galectin Puncta Assay' sur des coupes transversales de TA. a) Co-immunomarquage de LAMP2 et LGALS3 sur des coupes transversales de TA. **b)** Quantification de la surface positive de LGALS3 sur plusieurs coupes de souris différentes.

DISCUSSION

Nous avons précédemment montré que le métabolisme du cholestérol dans le muscle est dérégulé chez les patients DMD et chez les souris *Dmd^{mdx}* [179]. Cela se manifeste notamment par une accumulation de cholestérol dans les fibres musculaires. Le traitement des souris *Dmd^{mdx}* avec la simvastatine permet de réduire cette charge en cholestérol dans le muscle, et d'alléger quelques paramètres dystrophiques. La question majeure que nous nous sommes posée à la suite de cette étude était comment l'excès de cholestérol dans le muscle dystrophique participe à l'avancement de la pathologie dans le muscle DMD. Le groupe de P. Bernatchez a proposé que la DMD puisse être une dyslipidémie primaire [176], et que l'excès de cholestérol et de lipides circulants aggraverait la maladie [176,177] et représenterait une cible thérapeutique intéressante [330]. Néanmoins, très peu d'études se sont intéressées à l'effet du cholestérol dans le muscle, à part son implication dans la structure des fibres et l'effet conséquent sur l'excitation/contraction musculaire [316].

Un raisonnement comparatif avec d'autres pathologies, notamment les maladies neurodégénératives et les maladies de surcharge lysosomale, nous a laissé hypothétiser que le système endolysosomal pourrait être impliqué dans les dérégulations de cholestérol dans le muscle. Des perturbations du système endolysosomal dans DMD ont déjà été proposées, mais très peu étudiées. Pour vérifier cette hypothèse d'une implication lysosomale, nous avons voulu évaluer le marqueur de dommage lysosomal, galectine-3, dans le contexte du muscle dystrophique. A notre surprise, la surrégulation de galectine-3 dans la DMD était déjà rapportée, mais mal interprétée. Nous avons alors confirmé que la galectine-3 est bien un marqueur de lésions de membranes lysosomales dans le muscle dystrophique, et corrèle avec des altérations de la structure et la fonction du lysosome. Ces lésions de la membrane lysosomale sont communes à d'autres myopathies.

Nous avons en outre montré une corrélation étroite entre l'accumulation du cholestérol dans le muscle, les lésions de la membrane lysosomale, et l'aggravation du phénotype dystrophique. Nous avons ainsi pu prédire que le système endolysosomal pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le contexte des dystrophies musculaires, et nous avons validé cette hypothèse en testant une molécule agissant directement sur l'activation du système endolysosomal chez des souris modèles de la DMD. La combinaison de cette molécule à la thérapie génique a amélioré l'effet de celle-ci et a permis la correction de certains paramètres fonctionnels, histologiques et moléculaires de la maladie.

Nous discutons en détail ci-dessous les différentes parties des résultats.

Les dégâts lysosomaux contribuent à la pathogenèse des dystrophies musculaires

Dans la première partie de ce projet, nous avons démontré que la galectine-3 est surexprimée significativement dans le muscle dystrophique. Cette surexpression est due à l'infiltration de cellules immunitaires dans le muscle dystrophique, mais aussi à des dégâts importants des lysosomes. En adaptant l'essai des puncta de galectines, indicatif de la perméabilisation de membrane lysosomale [295], aux coupes transversales musculaires, nous détectons une localisation de LGALS3 à la membrane des lysosomes élargis à l'intérieur des myofibrilles. Cela est indicatif d'une perméabilisation de la membrane lysosomale dans le muscle DMD. Ces dégâts lysosomaux ont été identifiés chez plusieurs animaux modèles de DMD, et sur des

biopsies musculaires de patients DMD et LGMDR5. Les dégâts lysosomaux se sont montrés les plus importants dans le muscle d'un jeune patient de la maladie de Pompe, maladie lysosomale caractérisée par des altérations importantes du lysosome, confirmant ainsi la spécificité de l'essai pour détecter l'atteinte lysosomale dans le muscle. L'essai de puncta de galectine-3 pourrait donc servir pour évaluer le degré des dégâts lysosomaux dans différentes myopathies, et corrèle avec la sévérité de celles-ci. La surexpression de galectine-3 dans la DMD, déjà montrée ^[296], et corrèle avec le niveau d'expression de la dystrophine ^[297]. Cependant, cette surrégulation était surtout attribuée à l'infiltration de cellules immunitaires dans le muscle dystrophique ^[300]. Notre identification de galectine-3 comme un indicateur des dommages lysosomaux dans les dystrophies musculaires offre une nouvelle application comme biomarqueur, et surtout indique un nouveau mécanisme contribuant à la pathogenèse de la DMD. Toutefois, une quantification des protéines ou de l'ARNm ne permettra pas de prédire les dégâts lysosomaux, car une surexpression serait aussi déterminante du degré de l'inflammation. Pour cela, des quantifications spécifique des spots de LAMP2+/LGALS3+ à l'intérieur des fibres musculaires doivent être faites.

De plus, nous avons montré une surrégulation de la cathepsine B ainsi que sa diffusion dans le cytosol des fibres dystrophiques. Cela est indicatif d'une fuite des protéases lysosomales à la suite de la dégradation de la membrane lysosomale, et confirme ainsi la perméabilisation de la membrane lysosomale détectée par l'essai des puncta de galectine. Bien que la surexpression des cathepsines dans les myofibres du muscle dystrophique était déjà montrée ^[161,163,164], les mécanismes causant cette dérégulation n'étaient pas identifiés. Nos résultats supportent l'hypothèse que la fuite des cathepsines dans le cytosol est secondaire à une rupture de la membrane lysosomale. Cette surcharge de cathepsine dans le cytosol des myofibres pourrait être délétère pour les fibres musculaires. En effet, la fuite des cathepsines dans le cytosol serait impliquée dans la mort cellulaire dans plusieurs tissus ^[331]. L'identification de la fuite des cathepsines dans le cytosol comme étant secondaire à des lésions de la membrane lysosomale dans la DMD pourra aider à mieux comprendre la dégénérescence des myofibres dans les dystrophies musculaires, et offrira potentiellement de nouvelles pistes thérapeutiques. Il est cependant nécessaire de mieux caractériser les conséquences de la fuite des cathepsines dans le muscle tout particulièrement, et de caractériser davantage d'autres protéases lysosomales qui seraient libérées par les lysosomes endommagés, et qui participeront potentiellement à la mort cellulaire ^[332].

L'endommagement des lysosomes est connu pour causer une activation des voies de contrôle de la qualité des lysosomes ^[322]. Pour cela, nous avons voulu évaluer les différentes voies de remplacement, d'élimination et de réparation des lysosomes dans le muscle DMD. Tout d'abord, nous avons vérifié la localisation du facteur de transcription TFEB, régulateur principal de la biogenèse lysosomale et de l'autophagie. Une translocation de TFEB dans le noyau des fibres musculaires, et des myoblastes de souris *Dmd*^{mdx-4Cv} a été détectée, corrélant avec la surrégulation de certains gènes impliqués dans la structure et la fonction lysosomale, dont les cathepsines. Cela indique que la voie de remplacement des lysosomes endommagés est activée dans le muscle dystrophique. Cependant, cette translocation est surtout perceptible dans les fibres centronuclées dans le muscle des souris *Dmd*^{mdx-4Cv} (fibres régénératives). Il serait donc intéressant d'étudier la différence d'activation de la biogenèse lysosomale entre les fibres régénératives et les fibres pré-nécrotiques (ou fibres en cours de dégénération).

Nous avons aussi évalué la voie ESCRT impliquée dans la réparation de la membrane lysosomale. Un recrutement de CHMP4B, protéine du complexe ESCRT, a été observé au niveau des lysosomes dans le muscle des souris *Dmd^{mdx-4Cv}*. Toutefois, il est difficile de conclure sur le degré d'activation et la pertinence de cette voie dans le muscle dystrophique. En effet, la voie ESCRT permet surtout la réparation de petits dommages de la membrane lysosomale [292,326,333]. Il semble que dans le muscle des souris *Dmd^{mdx-4Cv}*, les dommages lysosomaux indiqués par le recrutement de galectine-3 soient considérables, et dans ce cas les voies de remplacement et d'élimination des lysosomes altérés seront probablement plus sollicitées.

En ce qui concerne l'élimination des lysosomes endommagés, nous avons voulu évaluer le processus d'autophagie sélective des lysosomes (ou lysophagie). Dans le muscle des souris *Dmd^{mdx-4Cv}*, nous avons observé une colocalisation entre les lysosomes endommagés (LAMP2+/LGALS3+) et le marqueur des autophagosomes LC3B. Ces spots positifs marquent des lysosomes élargis séquestrés par des doubles membranes d'autophagosome. Toutefois, des analyses plus profondes seront nécessaires pour évaluer la fonctionnalité de la lysophagie. En effet, il est logique que l'efficacité de la lysophagie soit corrélée au flux autophagique. Or, dans le muscle DMD, des défauts d'autophagie sont connus [150-152], et pourraient causer une altération de dégradation des lysosomes endommagés. Nous avons d'ailleurs montré une accumulation de SQSTM1 (p62), un substrat autophagique, dans le diaphragme et le TA des souris *Dmd^{mdx-4Cv}*, indiquant une réduction du flux autophagique. Cependant, il est intéressant de noter que les défauts d'autophagie dans DMD n'ont jamais été attribués à un défaut lysosomal primaire, mais plutôt à une perturbation de la signalisation de mTOR [150,152].

Or, l'autophagie nécessite la fusion des autophagosomes avec des lysosomes acidiques [154]. La perméabilisation de la membrane lysosomale cause une basification du pH des lysosomes [334]. Une faible acidification des lysosomes est la cause de défauts d'autophagie dans les maladies non liées aux protéines d'autophagie [335-337]. Ainsi, les défauts d'autophagie dans la DMD pourraient être secondaires aux altérations lysosomales. Une autre argumentation dans ce sens est la pathogenèse de la maladie de Pompe, où l'accumulation du glycogène dans les lysosomes active la lysophagie pour éliminer les lysosomes endommagés, ce qui mène à une surcharge autophagique et un défaut de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, endommageant encore davantage la fonction lysosomale et causant un stress cellulaire [338]. Cela contribue directement à l'évolution de la maladie de Pompe dans le muscle, avec la mise en place d'un stress oxydatif et d'une réponse inflammatoire [338].

Il est donc possible de raisonner que les défauts lysosomaux dans la DMD peuvent être la cause du blocage autophagique, et impliqués ainsi dans plusieurs mécanismes pathologiques de la maladie. Ces questions nécessiteront des études plus profondes et permettront de mieux comprendre la pathogenèse dans le muscle DMD.

Les dérégulations de cholestérol dans le muscle DMD corrélient avec les dégâts lysosomaux et exacerbent le phénotype dystrophique

Nous avons précédemment démontré que le métabolisme du cholestérol est dérégulé dans le muscle DMD [179], avec notamment une accumulation de cholestérol dans le muscle des patients DMD et des souris *Dmd^{mdx}*, ainsi que l'activation de la voie SREBP responsable de la biosynthèse et de l'absorption de cholestérol.

Dans la suite de cette investigation, et de la démonstration de dégâts lysosomaux importants dans le muscle DMD, nous avons émis l'hypothèse que le cholestérol pourrait s'accumuler dans les lysosomes endommagés. Effectivement, en chargeant un analogue de cholestérol dans des myotubes dérivés de cellules iPS de patients DMD, une accumulation spécifique du cholestérol a été détectée dans les lysosomes des myotubes DMD, contre une distribution plus homogène dans les myotubes contrôles. Cela est indicatif d'un défaut de trafic intracellulaire du cholestérol.

Ces résultats supportent les indications liant le cholestérol aux dérégulations du système endolysosomal. La question était alors d'étudier aussi l'effet du cholestérol sur le muscle en général. Cette question a été en partie abordée par les travaux de P. Bernarchez, qui ont montré qu'une augmentation du cholestérol et des lipides participe à l'exacerbation du phénotype dystrophique dans des modèles de DMD et de dystrophie des ceintures (LGMDR2). Cependant, dans ces études, les souris dystrophiques étaient croisées avec des souris KO pour le gène *ApoE* qui participe à l'efflux du cholestérol des tissus périphériques [330,339-341]. Or, le gène *ApoE* est surrégulé dans le muscle des souris *Dmd^{mdx}*, des chiens GRMD et des patients DMD (Figure 33). Cette surexpression de *ApoE* est probablement due à un mécanisme cellulaire de compensation pour éliminer l'excès de cholestérol dans le muscle. Ainsi, l'extinction de ce gène chez la souris *Dmd^{mdx}*, bien qu'exacerbant le phénotype, génère un modèle biaisé qui ne représente pas précisément les dérégulations du métabolisme du cholestérol dans la DMD.

Pour étudier l'effet du cholestérol sur le muscle dans un contexte physiologique et pathologique, ainsi que son effet sur le système endolysosomal, des souris WT et *Dmd^{mdx-4Cv}* ont été mises sous une diète lipidique riche en cholestérol. Une augmentation de la fibrose musculaire a été détectée seulement chez les souris dystrophiques sous diète riche en cholestérol, indiquant une exacerbation du phénotype dystrophique avec cette diète. Ensuite, nous avons étudié l'accumulation du cholestérol dans le muscle. Conformément à ce que nous avons montré précédemment [179], le muscle dystrophique s'est avéré présenter une charge plus importante de cholestérol, augmentant encore chez les souris sous diète riche en cholestérol. Et surtout, cette accumulation de cholestérol est localisée dans les lysosomes chez les souris dystrophiques mais pas chez les souris WT.

Également, nous avons évalué l'effet de la diète riche en cholestérol sur les dégâts lysosomaux. Une augmentation significative des lésions lysosomales a été détectée chez les souris *Dmd^{mdx-4Cv}* sous diète riche en cholestérol, visibles par essai de puncta de galectine mais aussi au niveau de l'expression de la galectine-3 en protéine et en ARNm. De façon intéressante, quelques puncta ont été détectés aussi chez les souris WT sous diète lipidique. Ces résultats indiquaient que le cholestérol est accumulé dans les lysosomes endommagés du muscle dystrophique, et que l'excès de cholestérol participe à l'augmentation de ces dégâts lysosomaux.

Bien que l'accumulation de cholestérol et de lipides dans le muscle dystrophique ait été décrite auparavant [171-173], l'origine et les conséquences de ces dérégulations dans les dystrophies musculaires sont encore non élucidées. Ici, nous montrons que le cholestérol est accumulé surtout dans le lumen des lysosomes du muscle dystrophique. Ce serait la cause d'une dérégulation du trafic intracellulaire du cholestérol. La dérégulation du trafic du cholestérol peut influencer plusieurs voies métaboliques, notamment la voie médiée par les facteurs de transcriptions SREBP. Ces facteurs se localisent dans le RE, et leur activation et leur translocation dans le noyau dépend du niveau de cholestérol dans le RE. Ainsi, une accumulation de

cholestérol dans le lysosome et une dérégulation de son trafic pourraient être la cause de l'activation de la voie SREBP observée dans le muscle des souris *Dmd^{mdx}* [179], et donc de l'activation de la biosynthèse endogène et l'absorption de cholestérol. En outre, l'accumulation du cholestérol dans le lysosome pourrait causer une altération du flux autophagique [342,343].

Nous montrons aussi que l'accumulation de cholestérol corrèle avec une perméabilisation de la membrane lysosomale. Cependant, il reste à déterminer si l'accumulation du cholestérol est la cause des dégâts lysosomaux, ou si les lésions de la membrane lysosomale surviennent avant. En effet, l'accumulation du cholestérol et d'autres lipides dans le compartiment lysosomal pourrait être indicative d'une altération de la dégradation et du transport des lipides, à la suite d'un défaut du système endolysosomal, comme est le cas dans plusieurs maladies de surcharge lysosomale [344]. Mais l'accumulation de cholestérol et d'autres lipides dans les tissus périphériques pourrait aussi causer une lipotoxicité ayant des effets délétères sur de nombreux mécanismes cellulaires, comme le stress oxydatif, le mécanisme énergétique, l'activation du système immunitaire [345] et aussi le stress lysosomal [318].

Les dérégulations de cholestérol et les dommages lysosomaux ne sont pas entièrement corrigés par la thérapie génique par microdystrophine

L'approche de thérapie génique par transfert de microdystrophine est actuellement la piste thérapeutique la plus prometteuse pour le traitement de la DMD. Cependant, les premiers résultats cliniques ont montré des effets moins efficaces que chez les animaux modèles. Pour cette raison, nous avons voulu évaluer si le transfert de la microdystrophine permettait de restaurer les dérégulations métaboliques et cellulaires dans le muscle, surtout les perturbations du métabolisme du cholestérol et les dégâts lysosomaux.

Deux doses d'AAV9 (5×10^{12} vg/kg et 3×10^{13} vg/kg) délivrant la séquence codante de la microdystrophine ont été administrées chez des souris *Dmd^{mdx}*. Un effet dose a été observé, comme attendu, au niveau de la correction de la fonction musculaire et des différents paramètres biomoléculaires et histologiques. Une réduction significative du cholestérol musculaire n'a été obtenue qu'avec la haute dose d'AAVr.

En ce qui concerne les dommages lysosomaux détectés par l'essai de puncta de galectine, le degré de correction est variable selon le muscle. Toutefois, des dégâts lysosomaux restent détectables même avec une dose haute d'AAVr qui permet la transduction de toutes les fibres musculaires. Cela est par exemple le cas pour le muscle TA, dans lequel la microdystrophine est exprimée uniformément dans toutes les fibres à haute dose, mais où d'importants dégâts lysosomaux sont toujours visibles. Ces résultats indiquent que l'expression de la microdystrophine ne serait pas suffisant pour la correction des lésions de la membrane lysosomale. Il serait donc intéressant de combiner la thérapie génique à un traitement ciblant ces dérégulations du système endolysosomal.

Le cholestérol lysosomal est une cible thérapeutique dans la DMD

Dans la deuxième partie de ce projet, notre but était de développer de nouvelles approches thérapeutiques combinées. Après avoir identifié une accumulation du cholestérol dans le lysosome du muscle DMD, et sa corrélation avec des dégâts lysosomaux, nous avons voulu identifier des molécules capables d'éliminer le cholestérol des lysosomes.

Pour cela, nous avons sélectionné dans la littérature plusieurs molécules qui activent le système endolysosomal. Les molécules sélectionnées ont un profil de sécurité connu chez l'Homme, et certaines sont déjà approuvées par les agences réglementaires pour l'utilisation chez l'Homme.

Avant de tester un candidat médicament *in vivo*, nous avons voulu valider l'effet de ces molécules *in vitro*. Pour cela, un système de criblage *in vitro* a été développé. Le principe est d'induire l'accumulation de cholestérol spécifiquement dans le lysosome. Pour cela, un inhibiteur pharmacologique du transporteur lysosomal de cholestérol NPC1 a été utilisé (U18666A). Le traitement des myoblastes immortalisés avec du cholestérol soluble ou avec un analogue fluorescent du cholestérol (NBD-Cholestérol) a montré une localisation spécifique du cholestérol dans les lysosomes des cellules traitées avec U18666A, comme attendu ^[346]. L'inhibition de NPC1 dans le muscle cause donc une accumulation de cholestérol dans le lysosome.

Ensuite, nous avons adapté les essais d'efflux de cholestérol ^[347,348] en utilisant le NBD-cholestérol et une lignée cellulaire myogénique. Le principe consiste à traiter des myoblastes immortalisés avec U18666A plus la molécule à tester, et à évaluer la sortie du cholestérol des myoblastes, en mesurant la fluorescence des cellules et du milieu. La plupart des molécules testées ont montré une augmentation significative du taux d'efflux de cholestérol, ainsi qu'une réduction de la charge cellulaire en cholestérol. L'effet des drogues a aussi été confirmé dans des myotubes différenciés et par microscopie confocale. Ces résultats nous ont permis de valider que le ciblage du système endolysosomal permet aussi d'agir sur l'accumulation du cholestérol intracellulaire. En effet, en agissant sur le système endolysosomal, nous cherchons à améliorer le trafic intracellulaire du cholestérol et d'autres lipides ^[327], ce qui permettrait en même temps de normaliser le métabolisme cellulaire du cholestérol médié par la voie SREBP. De cette façon, nous évitons d'inhiber directement la voie SREBP par des molécules comme les statines, qui peuvent avoir des effets secondaires sur le muscle ^[349] et qui n'ont pas montré un effet bénéfique en combinaison avec la microdystrophine ^[329].

Il faut cependant noter que le système utilisé reste un système artificiel, avec une modulation pharmacologique de cellules contrôles. Bien qu'il permette de recapituler le phénotype observé avec des myotubes dérivés d'iPS de patients DMD en termes d'accumulation de cholestérol, il reste un système limité qui ne représente pas complètement les dérégulations métaboliques de la DMD. En plus, ce système ne permet pas d'identifier des molécules qui inhibent l'accumulation de cholestérol, mais uniquement les molécules qui accélèrent l'élimination du cholestérol.

A la suite des résultats *in vitro*, nous avons sélectionné une drogue (drogue X) pour la tester dans le contexte d'une thérapie combinée chez les souris $Dmd^{mdx-4Cv}$. Cette drogue a été sélectionnée pour son profil de sécurité très bien connu, et pour son autorisation d'administration chez les patients par les autorités réglementaires. Des souris $Dmd^{mdx-4Cv}$ ont été traitées avec une dose suboptimale d'AAV-microdystrophine, avec la drogue X, ou avec une succession des deux (un pré-traitement avec la drogue X 7 jours avant l'injection du vecteur). Un effet positif de la drogue X seule a été observé sur le phénotype dystrophique des souris (légère augmentation de la force musculaire, diminution du biomarqueur MYOM3, réduction de la fibrose dans le GA). Toutefois, la microdystrophine seule semble avoir un effet bénéfique plus important que la drogue X seule. Le plus intéressant est l'effet additif bénéfique de la microdystrophine et de la drogue X. En fait, la thérapie combinée a permis une augmentation significative de la force

musculaire, une restauration des biomarqueurs sériques ainsi qu'une correction de la fibrose dans le diaphragme. Cela indique que la combinaison de la drogue X à la thérapie génique par microdystrophine améliore son effet, même pendant une période de traitement assez courte.

Surtout, le traitement avec la drogue X ne semble pas influencer le niveau d'expression de la microdystrophine, ce qui signifie que l'effet additif de la drogue X est indépendant de l'expression de la microdystrophine. L'évaluation des dégâts lysosomaux chez les souris traitées a montré une correction presque complète avec le traitement avec la drogue X seule et avec la thérapie combinée, mais pas avec la microdystrophine seule. Cela indique clairement que l'effet apporté par la drogue X est médié, au moins en partie, par la correction des lésions de la membrane lysosomale, qui ne sont pas corrigées par la thérapie génique par la microdystrophine à dose suboptimale.

Ces résultats préliminaires montrent que le système endolysosomal est une cible thérapeutique intéressante dans le cadre des dystrophies musculaires, qui à notre connaissance n'a jamais été étudiée encore comme cible thérapeutique dans la DMD. Il faut cependant noter que cette étude a été réalisée chez des souris jeunes et pendant une période courte. Il serait donc nécessaire de valider ces résultats sur une durée de traitement plus longue. D'autres analyses de cette étude sont encore en cours, notamment l'évaluation des dérégulations métaboliques et d'autres critères dystrophiques (comme l'inflammation, la nécrose, la régénération musculaire et l'évaluation des voies de lysosome et de cholestérol).

CONCLUSION

Dans la première partie de ce projet, nous avons pu acquérir de nouvelles connaissances ayant des implications diagnostiques et thérapeutiques dans la myopathie de Duchenne, mais aussi dans d'autres myopathies. En effet, l'identification des dommages spécifiques de la membrane des lysosomes dans le muscle dystrophique est inédite. L'essai de puncta de galectine représente une méthode efficace et rapide pour identifier les dégâts lysosomaux sur des coupes de muscles, et peut servir comme un biomarqueur des dégâts lysosomaux dans les myopathies (**Demande de brevet européen n° EP23194414.1**). Une méthode de quantification et d'analyse spécifique des spots de LGALS3+/LAMP2+ est en cours de développement. Le but serait de quantifier précisément, de façon automatisée, le nombre de spots par fibre musculaire sur un large nombre de fibres. Cela permettra d'évaluer l'effet des interventions thérapeutiques sur la correction des dégâts lysosomaux dans les maladies musculaires.

La détection des dégâts lysosomaux par essai de puncta de galectine-3 a aussi été réalisée dans d'autres modèles animaux de dystrophies des ceintures et d'autres myopathies (résultats non présentés). La survenue de lésions lysosomales serait donc un mécanisme commun à plusieurs myopathies, et participera probablement à la dégénérescence musculaire. Ainsi, l'identification de ces lésions de la membrane lysosomale dans le muscle, et d'une méthode pour les détecter et les quantifier, représente une avancée importante dans la compréhension de la pathogenèse des myopathies. Des études plus profondes sur l'impact de ces lésions sur le muscle seront nécessaires pour permettre de déterminer leur importance parmi les autres mécanismes pathologiques.

Nous avons aussi progressé dans notre compréhension des dérégulations du métabolisme du cholestérol dans la DMD. Le cholestérol serait surtout accumulé dans le lumen des lysosomes dans le muscle dystrophique, perturbant le trafic lipidique intracellulaire. La supplémentation en cholestérol dans la diète d'animaux dystrophiques cause une augmentation des lésions du lysosome et une exacerbation du phénotype dystrophique. Ces nouvelles connaissances permettent d'avoir une meilleure compréhension de la dérégulation du cholestérol dans la myopathie de Duchenne, et permettront le développement de meilleures stratégies thérapeutiques et de modèles plus représentatifs de la pathologie observée chez les patients.

En outre, ces connaissances nous ont permis de développer un système de criblage simple, rapide et efficace. En détectant l'efflux du cholestérol lysosomal en dehors des cellules, nous avons pu sélectionner une molécule et faire une preuve de concept *in vivo*.

Le système d'évaluation des molécules *in vitro* pourrait être adapté pour un criblage haut débit, et adapté à d'autres pathologies. Notamment, ce système pourrait être utilisé pour le criblage de médicaments pour les maladies de surcharge lysosomale.

Les données préliminaires de la thérapie combinée de l'AAV-microdystrophine et de la drogue X constituent une preuve de concept inédite pour l'utilité de la correction des lésions lysosomales en combinaison avec la thérapie génique dans la DMD (**Demande de brevet européen n° EP23194612.0**). Une des limites actuelles de la thérapie génique par AAVr est l'importance des doses nécessaires pour obtenir l'effet

thérapeutique souhaité chez les patients. Cela représente une cause fréquente de toxicité hépatique et rénale, ainsi que de réponse immunitaires sévère. La combinaison de la thérapie génique avec des traitements complémentaires efficaces et sans effets indésirables majeurs, permettra potentiellement de réduire les doses des vecteurs utilisées en clinique, tout en conservant l'effet thérapeutique voulu.

MATERIELS ET METHODES

I- Expérimentation Animale

Les souris *Wild-Type* (WT) C57BL/10J et C57BL/6J, et les souris *Dmd^{mdx}* (C57BL/10ScSn-*Dmd^{mdx}*/J), *Dmd^{mdx-4Cv}* (B6Ros.Cg-*Dmd^{mdx-4Cv}*/J) ont été fournies par *Charles Rivers Laboratories*, Miserey-France. Elles sont élevées en cage avec des cycles réguliers de 12 heures de jours/12 heures de nuit, dans une installation barrière exempte d'organismes pathogènes spécifiques (E.O.P.S), avec eau et nourriture *ad libitum*. Toutes les procédures d'expérimentations animales ont été conduites selon les directives françaises et européennes pour les soins et l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales. Les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique de Généthon et le ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'innovation selon les numéros APAFIS #19736 (DAP2018-024-B) et #35896 (DAP2022-004-C). Seulement des souris males ont été utilisées pour nos études.

La diète riche en cholestérol pour les souris WT et *Dmd^{mdx-4Cv}* a été fournie par SAFE (diète 260HF supplémentée avec 20g cholestérol / kg).

La drogue 'X' a été fournie par sigma sous forme de poudre, et dissoute dans l'eau de biberons des souris, qui est changée deux fois par semaine.

Le vecteur AAV-microdystrophine a été dilué dans du sérum physiologique selon le titre de chaque protocole et injecté par voie intraveineuse dans la queue des souris.

I-1 Evaluation de la fonction musculaire

Les procédures d'évaluation de la fonction musculaire étaient réalisées en suivant les recommandations de TREAT NMD pour les modèles animaux de la DMD [350].

I-1-1 Test d'échappement :

Le test d'échappement permet de mesurer la force musculaire globale exercée par l'animal à la suite d'un stimulus. La souris est placée dans un tube de 30 cm de long aux deux extrémités ouvertes. Sa queue est reliée à un capteur de force et est pincée afin d'induire l'échappement de l'animal. La force déployée est alors mesurée par le capteur de force. L'opération a été réalisée 5 fois, la moyenne des 5 forces mesurées a été normalisée au poids de l'animal.

I-1-2 Test d'agrippement :

Le test d'agrippement permet d'évaluer surtout la force des membres (antérieurs et/ou postérieurs), permettant de surveiller la progression de la maladie. La souris est suspendue par sa queue sur une barre métallique fixée à un transducteur de force, et la force produite lors de la traction sur la barre peut être mesurée de manière répétée. Trois mesures ont été faites, et la force maximale des pattes antérieures a été normalisée au poids de la souris.

I-2 Prélèvements et Sacrifice

Pour les prélèvements sanguins, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane, ou un mix de kétamine (100mg/kg) / xylazine (10mg/kg), et le sang de la veine retro-orbitale a été récupéré sur des capillaires secs puis centrifugé à 8000rpm pendant 10 minutes. Le sérum est ensuite récupéré et stocké à -80°C jusqu'au moment des analyses.

Les souris ont été sacrifiées par élongation cervicale à la fin de l'étude, et des prélèvements de muscles et de tissus pour les analyses biomoléculaires et histologiques ont été faits. Pour cela, les muscles ont été disséqués, disposés transversalement sur des bouchons de liège et congelés dans de l'isopentane refroidi dans l'azote liquide, ou congelés directement dans l'azote liquide dans des tubes. Les prélèvements sont conservés à -80°C jusqu'au moment des analyses.

II- Génération du vecteur AAV-microdystrophine

II-1 Construction microdystrophine

La construction de microdystrophine utilisée dans les études *in vivo* a été déjà décrite [329]. Aussi appelée **OH-MD1- μ Dys**, cette construction est notre version optimisée de la microdystrophine développée par les laboratoires de Jeffrey Chamberlain (H2mDys) et George Dickson (MD1 μ Dys) [275] qui est utilisée dans les études précliniques de Généthon chez le modèle canin [269]. Cette version de microdystrophine manque le domaine C-terminale et les répétitions de spectrine 4-20 (**μ Dys- Δ 4-23 Δ Ct**). Notre séquence inclut en plus une optimisation supplémentaire des codons (pour l'Homme), une suppression des sites de méthylation CpG, une suppression des cadres de lecture ouverts (*ORF*) antisens et des *ORF* sens supérieurs à 100 pb. Cette séquence a été insérée dans une cassette de transcription sous le contrôle du promoteur musculaire Spc5.12, et encapsidée dans un vecteur AAV de sérotype 9 ciblant les muscles squelettique et cardiaque.

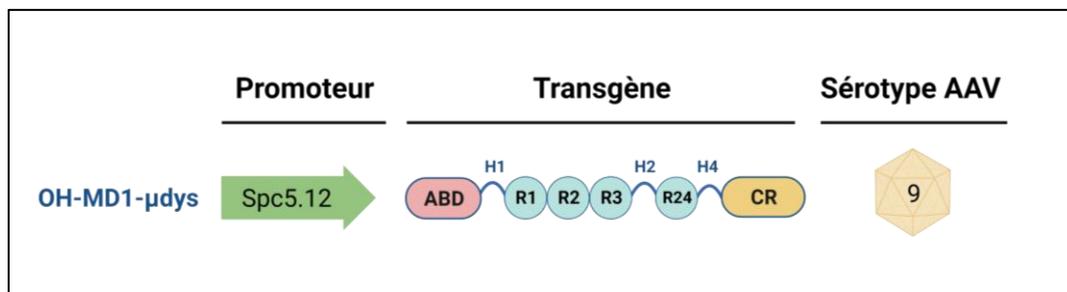


Figure 59. Construction de microdystrophine utilisée dans les études *in vivo*.

II-2 Production du vecteur AAV recombinant

Des cellules HEK293-T ont été cultivées en suspension (ensemencées à $0,25 \times 10^6$ cellules/mL) sous agitation à 37°C et à 5% CO₂ en atmosphère humide dans du milieu Freestyle F17 (Life technologies, réf. A13835-01), supplémenté avec : GlutaMAX-I à 4nM (Life technologies, réf. 35050-038), Pluronic F-68 à 0,08% (Life technologies, réf. 24040-032), *Anti-clumping agent* (Life technologies, réf. 01-0057AE). Trois jours après l'ensemencement des cellules, elles ont été transfectées avec trois plasmides codant pour les protéines auxiliaires de l'adénovirus (*pAd Helper*), les protéines Rep et Cap de l'AAV et la cassette d'expression du

transgène flanquée d'ITRs. Trois jours après la transfection, les cellules sont récoltées, lysées chimiquement, traitées avec de la benzonase (Millipore) et filtrées. Les capsides virales ont été purifiées par chromatographie d'affinité, formulées dans du PBS stérile, et le stock de vecteurs a été stocké à -80°C.

Les titres des stocks de vecteurs AAV ont été déterminés à l'aide d'analyses quantitatives en temps réel (qPCR). Pour cela, l'ADN viral a été extrait avec le MagNA Pure 96 DNA et le kit *viral NA small volume* (Roche Diagnostics) selon les instructions du fabricant. La PCR a été réalisée avec un mélange Absolute ROX (Taqman, Thermo Fisher Scientific), en utilisant les amorces spécifiques à l'ITR, sens 5'-CTCCATCACTAGGGGTTCCCTTG- 3', antisens 5'-GTAGATAAGTAGCATGGC- 3' et la sonde VIC 5'-TAGTTAATGATTAACCC-3'.

III- Culture cellulaire

III-1 Culture de cellules dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPS)

Les cellules iPS humaines ont été cultivées sur des plaques recouvertes de matrigel (Corning) dans du milieu mTeSRplus (Stem Cell Tech) et passées à l'aide de ReleSR (Stem Cell Tech). La génération des cellules iPS et leur différenciation en cellules musculaires ont été réalisées en adaptant une méthode basée sur l'expression d'un transgène décrite précédemment ^[351,352]. Brièvement, les cellules iPS expriment les transgènes Baf60c et MyoD inductibles avec l'ajout de doxycycline dans le milieu. Ensuite, les cellules exprimant le transgène sont dissociées et ensemencées à 60 000 cellules / cm². Pour la différenciation, les cellules dites engagées sont conservées dans un milieu de croissance (SKM2, AMSbiokit) supplémenté avec 200ng/mL de doxycycline pendant 2 jours, puis passées dans un milieu de différenciation (SKM03 plus, AMSbiokit) supplémenté avec 200 ng/mL de doxycycline pendant 5 jours supplémentaires.

III-2 Culture de myoblastes humains immortalisés

Les lignées de myoblastes immortalisés sont cultivées en adhérence dans des flasques dans un milieu de croissance de muscle squelettique (Promocell, réf. C-23060), complété avec un mix de suppléments (Promocell réf. C-39365), 15% de sérum de veau fœtal (Gibco 10270-106), 1% de GlutaMAX (Thermo Scientific, réf. 35050061) et 1% de gentamycine (Life technologies, réf. 15750-037). Les myoblastes sont passés à une confluence entre 60-70%.

Pour la différenciation en myotubes, les myoblastes sont ensemencés dans des plaques de 6 puits ou des plaques de 35 mm pour microscopie (Ibidi, réf. 81158). Une fois les cellules confluentes, le milieu de croissance est remplacé par un milieu de différenciation (Promocell, réf. C-23061), et les analyses sont faites 6-7 jours après.

Lignée cellulaire	Reference/Source
Human iPSC – Control	AG08C5 dérivé de fibroblastes sains (AG08498 – Coriell Institute)
Human iPSC – DMDdEx45	Coriell GM25313

Human immortalized myoblasts – Healthy donor	C25 – Institut de Myologie
--	----------------------------

Tableau 5. Lignées cellulaires utilisées.

III-3 Détection de puncta de galectine-3 par traitement avec LLOMe

200K myoblastes humains immortalisés sont placés sur une boîte à fond transparent pour microscopie (~60 000 cellules/cm²), dans un milieu de croissance de muscle squelettique (Promocell, réf. C-23060) complété par 10% de sérum bovin fœtal. L'essai est effectué le jour suivant lorsque les cellules sont à 60-70% de confluence, ou sont laissées à croître jusqu'à confluence, puis le milieu est remplacé par un milieu de différenciation (Promocell, réf. C-23061) et les cellules sont laissées se différencier pendant 7 jours en changeant le milieu tous les deux jours. Les cellules sont traitées avec une solution de LLOMe (Santacruz, réf. sc-285992) à une concentration finale de 2,5 mM dans le milieu, pendant 20 min à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées brièvement 2 fois avec un tampon HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, calcium & magnesium, Gibco), puis fixées avec une solution de PFA à 4% (Thermo Scientific, réf. 28906) pendant 15 minutes, lavées avec du PBS 3 fois et perméabilisées pendant 10 minutes avec du Triton à 0,25%. Les cellules sont lavées avec du PBS 3 fois et bloquées avec du sérum de chèvre à 10% (Agilent, réf. X090710) pendant 40 minutes à température ambiante. L'incubation avec l'anticorps primaire anti-LGALS3 est réalisée pendant la nuit à 4°C (SantaCruz, réf. sc32790, Dilution au 1/50^e dans 1% de sérum de chèvre). Ensuite, les cellules sont lavées 3 fois avec une solution de TBST (Tween20 0,1%, *Tris-buffered saline*) et incubées avec une solution d'anticorps secondaire pendant 2 heures à 4°C (Molecular Probes GAM-IgG1 594, réf. A21125, dilution au 1/200^e dans 1% de sérum de chèvre). Enfin, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS et du DAPI-Fluormount-G est ajouté à la boîte. Les cellules sont imagées avec un microscope confocal LEICA TCS-SP8 (Leica, Allemagne) en utilisant un objectif 63x APO CS2 1.4 NA. Les images sont acquises à l'aide du logiciel LAS X et traitées avec ImageJ pour les figures finales.

III-4 Essais de fluorescence *in vitro*

Pour les essais incluant des sondes fluorescentes, les cellules sontensemencées dans des plaques spécifiques pour microscopie (Ibidi, Réf-81158 ou Mattek P35G-1.5-14-C). Les sondes sont diluées dans le milieu selon les concentrations indiquées dans le **Tableau 6**. Ensuite, les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4% (Thermo Scientific, réf-28906) pendant 15 minutes, lavées avec du PBS puis montées avec du Fluoromount-G avec ou sans DAPI (Southern Biotech, réf. 0100-20 et 0100-01). Les images ont été acquises avec un microscope confocal spectral LEICA TCS SP9 (Leica, Allemagne) fonctionnant avec le logiciel LASX (Leica, Allemagne), à l'aide d'objectifs HCL PL APO CS2 40X 1.30 NA (ou 63X 1.40 NA) à immersion d'huile.

Sonde	Fournisseur	Référence	Concentration finale dans le milieu	Temps d'incubation à 37°C
NBD cholestérol	Invitrogen	N1148	2,5 µM ou 5 µM	4h
LysoTracker Red DND 99	Invitrogen	L7528	75 nM	30 min - 4h

Dextran TMRM	Invitrogen	D1817	100 µg/mL	6 heures de chargement dans le milieu puis 18 heures de 'chasing'
Magic Red Cathepsin B assay,	Immunochemistry Technologies	SKU-937	1X	30 minutes

Tableau 6. Sondes utilisées pour les essais de fluorescence in vitro.

III-5 Criblage de drogues par efflux de cholestérol

50 000 cellules ont étéensemencées par puits dans une plaque noire de 96 puits (Falcon, 353376), dans un milieu de croissance musculaire des myoblastes (Promocell, réf. C-23060). Le lendemain, les cellules sont traitées par les drogues, diluées dans du milieu frais. 24 heures plus tard, 1 lavage de PBS est fait, et un mélange de NBD-cholestérol (Invitrogen, réf. N1148) conjugué à une solution de BSA (*bovine serum albumine*) est rajouté (5mM NBD-cholestérol - 0,2% BSA). Pour la préparation de cette solution, le NBD-cholestérol est dilué au 1/20^e dans une solution à 4% de BSA, le mélange est vortexé vigoureusement pendant 1 minute, ensuite cette solution est diluée au 1/20^e dans un milieu DMEM (Gibco, Réf. 11966-025) sans sérum, supplémenté avec 1% de gentamycine (Life Technologies, Réf.15750-037). La plaque est incubée 4h à 37°C, ensuite le milieu est transféré dans une nouvelle plaque noire (Perkin Elmer, 6005270) et la fluorescence de la plaque est lue à l'aide d'un lecteur de plaque (PerkinElmer Enspire, émission/excitation = 469/537nm). Pour la lyse des cellules, une incubation est faite avec un tampon de lyse (Qiagen, ref. 158906) pendant 30 minutes sur un agitateur à température ambiante. Le lysat est ensuite homogénéisé à l'aide d'une pipette et la fluorescence est acquise à l'aide du lecteur de plaque.

IV- Analyses moléculaires

IV-1 Extraction des protéines et Western Blot

Les muscles congelés sont découpés à l'aide d'un cryostat en des coupes de 10µm d'épaisseur. Un tampon de lyse RIPA (ThermoFisher Scientific, Réf-89901) est ajouté et les échantillons sont lysés à l'aide de l'appareil Beadmill 24 (Fisherbrand) pendant 40 secondes à 6m/s. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 2000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré et traité avec une solution de DNase (1/1000, Millipore) et un inhibiteur de protéases PIC (*Protease Inhibitor Cocktails*, Roche) pendant 30 minutes. La concentration totale des protéines est mesurée en utilisant le kit *Pierce® BCA Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, réf. 23225). Des quantités égales de protéines (entre 15 et 25 µg) sont chargées et séparées sur des gels pré-coulés de 4-12% bis Tris (Thermo Fisher Scientific). Ensuite, les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose à l'aide du système *iBlot 2 Dry Blotting* (Thermo Fisher Scientific), et une quantification des protéines totales est faite en utilisant le kit *Revert Total protein Stain* (Li-Cor). Après rinçage, les membranes sont incubées avec une solution de blocage (Odyssey Blocking Buffer, Li-Cor) pendant 1h à température ambiante, puis avec une solution contenant les anticorps primaires dilués dans 50% de solution de blocage à 4°C pendant la nuit (les détails des anticorps utilisés

sont présentés dans le **Tableau 7**). Les membranes sont ensuite lavées 3 fois avec une solution de TBST (Tween 20 0,1%, *Tris-buffered saline*), et incubées avec les solutions des anticorps secondaires dilués au 1/10000 (IRDye, Li-Cor). Les membranes sont scannées à l'aide de l'appareil Odyssey CLx (Li-Cor), et les images sont analysées avec le logiciel Image studio Lite (Li-Cor). Pour cela, les pixels des bandes d'intérêt sont quantifiés, et le signal est normalisé au signal d'une protéine de référence (GAPDH) ou aux protéines totales de l'échantillon.

Anticorps Primaire	Fournisseur	Référence	Espèce	Dilution
Anti-GAPDH	Sigma	PLA03023	Chèvre polyclonal	1/1000
Anti-GAPDH	Sigma	G9545	Lapin polyclonal	1/1000
Anti-CTSB	Cell signaling	31718	Lapin monoclonal	1/1000
Anti-LGALS3	R&D	AF1197	Chèvre polyclonal	1/1000
Anti-TFEB	ThermoFisher Scientific	A303-673A	Lapin polyclonal	1/1000
Anti-LAMP2	Abcam	Ab13524	Rat monoclonal	1/1000
Anti-SQSTM1	Sigma	P0067	Lapin polyclonal	1/1000
Anti-CHMP4B	PTG	13683-1-P	Lapin polyclonal	1/500

Tableau 7. Anticorps primaires utilisés en WB.

IV-2 Extraction des ARN totaux et RT-qPCR

Les ARN totaux sont extraits à partir de prélèvements ou des coupes de muscles préalablement congelés. Pour cela, 400µL de solution de Nucléozol (Macherey-Nagel réf.740404) sont ajoutés par échantillon, et les tissus sont broyés à l'aide de l'appareil BeadMill 24 (Fisherbrand) à une vitesse de 6m/s pendant 40 secondes. Ensuite, 160µL d'eau DNase/RNase free est rajoutée, et les tubes sont mélangés vigoureusement puis incubés à température ambiante pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 20°C. L'extraction de l'ARN total est faite de façon semi-automatisée en utilisant l'appareil Ideal-32 (ID solutions) à l'aide de billes magnétiques (Macherey-Nagel, Réf. 744503.12). Les échantillons d'ARN sont ensuite traités et purifiés avec la DNase pendant 30 minutes à 37°C (TURBO DNA-free kit, ThermoFisher Scientific). Les concentrations des ARN sont mesurés à l'aide d'un appareil Nanodrop, et 1 µg d'ARN est utilisé par échantillon pour la transcription inverse en ADN complémentaire (ADNc), faite à l'aide du kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis* (ThermoFisher Scientific, K1632) selon le programme suivant : 10 minutes à 25°C – 1h15 à 42°C – 10 minutes à 70°C. Les échantillons de cDNA sont dilués au 1/9^e et stockés à -20°C jusqu'à l'analyse par PCR quantitative (qPCR).

La PCR quantitative était faite en utilisant un LightCycler 480° (Roche) avec les essais PCR SYBR Green (ThermoFisher Scientific, réf.4309155). Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le **Tableau 8**. Chaque réaction était faite en duplicata, et les résultats obtenues pour *Rplp0* sont utilisés pour la normalisation de l'expression des gènes selon la méthode de dérivative secondaire de Livak ^[353].

	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>Rplp0</i>	AGATTCGGGATATGCTGTTGGC	TCGGGTCCTAGACCAGTGTTTC

Lgals3	AGACAGCTTTTCGCTTAACGA	GGGTAGGCACTAGGAGGAGC
Tfeb	GCAGCCACCTGAACGTGTA	TGTTAGCTCTCGCTTCTGAGT
Lamp2	TGTATTTGGCTAATGGCTCAGC	TATGGGCACAAGGAAGTTGTC
Ctsd	GCTTCCGGTCTTTGACAACCT	CACCAAGCATTAGTTCTCCTCC
Ctsb	TCCTTGATCCTTCTTTCTTGCC	ACAGTGCCACACAGCTTCTTC
Atp6v1h	GGATGCTGCTGTCCCAACTAA	TCTCTTGCTTGTCCTCGGAAC
Abca1	TGGTGATGCGGAAGTTTCTG	TTGTCACAACCTGGCTTCAGG
Apoe	TGCTGTTGGTCACATTGCTG	TAATCCCAGAAGCGGTTTCAGG
μ-dystrophin	GATTGAGAAGCTGCTGGACC	TCTGGTGGTGTAGCTGGAAG

Tableau 8. Amorces d'oligonucléotides utilisées pour les essais de PCR quantitative par essais SYBR Green. Des solutions mères d'amorces sens + anti-sens de 4 μ M sont préparées. Une concentration finale de 0,2 μ M est utilisée par réaction.

IV-3 Extraction ADN et quantification de VGCN

L'ADN génomique (ADNg) est extrait à partir des prélèvements ou des coupes de muscles et d'organes préalablement congelés. Les coupes de tissus sont lysées à l'aide de l'appareil FisherBrand avec une solution de RIPA (ThermoFisher Scientific, réf. 89901) pendant 40 secondes (vitesse =6 m/s). Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 2000 g à 4°C et le surnageant est récupéré. L'ADN est extrait avec le kit d'extraction NucleoMag Pathogen (Macherey-Nagel, réf. 744210.4) à l'aide de l'appareil KingFisher (ThermoFisher Scientific, réf. 5400640). La concentration de l'ADN est quantifiée à l'aide de l'appareil Nanodrop, et les échantillons sont dilués à une concentration de 10 ng/ μ L pour la quantification des VGCN par PCR quantitative, à l'aide des essais SYBR Green (ThermoFisher Scientific, réf.4309155). Les amorces pour μ -dystrophin et *Rplp0* (**Tableau 8**) sont utilisées pour la quantification du nombre de vecteurs et la normalisation.

IV-4 Analyse de Lipidomique

Des muscles GA de souris ont été broyés dans une solution de PBS et dilués à 5 mg de tissu /mL (n=4 par groupe). L'analyse lipidomique dite '*shotgun*' a été faite par Lipotype (Dresden, Allemagne). Cette technique comprend l'extraction automatisée des échantillons, une perfusion directe automatisée des échantillons et la spectrométrie de masse à haute résolution qui saisit des étalons internes spécifiques aux classes lipidiques. Brièvement, l'extraction des lipides a été faite en utilisant du chloroforme et du méthanol ^[354]. Les échantillons ont été dopés avec des étalons internes spécifiques aux classes de lipides avant l'extraction. Après séchage et remise en suspension dans le mélange d'acquisition de spectrométrie de masse, les extraits lipidiques ont été soumis à une analyse par spectrométrie de masse. Les spectres de masse ont été acquis sur un spectromètre de masse hybride quadripôle/Orbitrap équipé d'une source d'ions *nano-flow electrospray* automatisée en mode d'ions positifs et négatifs. Le logiciel '*LipotypeXplorer*' est utilisé pour l'identification des lipides sur les spectres de masse. Le traitement et l'analyse des données sont effectués à l'aide du système d'information et de gestion de Lipotype et du logiciel web LipotypeZoom.

IV-5 Quantification du cholestérol libre dans des biopsies musculaires

Des coupes de muscles sont pesées (entre 10-20 mg) puis broyées en utilisant un mix de chloroforme/Isopropanol/NP-40 (7 :11 :0,1) pendant 1 minute à l'aide de l'appareil Beadmill 24 (Fisherbrand). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 15000 g pendant 10 minutes. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes, séchés à 50°C puis centrifugés à vide pendant 30 min. Le culot est alors re-suspendu dans le tampon du kit de quantification de cholestérol à concentration de 20 µg/µL, et vortexé fortement. La quantification du cholestérol libre est faite en duplicata en utilisant le kit Amplex Red Cholesterol (Invitrogen, réf. A12216), en suivant les instructions du fournisseur. Les concentrations de cholestérol sont normalisées au poids du tissu pour chaque échantillon.

IV-6 Analyses de transcriptome

Pour l'analyse de transcriptome des souris *Dmd^{mdx}*, l'ARN a été extrait du diaphragme de souris de 5 semaines et de contrôles WT. La qualité de l'ARN des échantillons a d'abord été vérifiée à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent). Les échantillons dont l'indice d'intégrité de l'ARN était supérieur à 8 ont ensuite été utilisés pour le séquençage de l'ARN (Genewiz). Le Stranded Total RNA Library Prep Kit (Illumina) a été utilisé pour créer les bibliothèques de séquençage, qui ont été séquencées selon le protocole Illumina sur l'instrument NovaSeq (Illumina), ce qui a permis d'obtenir environ 20 millions de lectures paires par bibliothèque. Les lectures en paires ont été filtrées et soumises à un contrôle de qualité à l'aide de fastp. Ils ont ensuite été cartographiés sur le génome GRCm38/mm10 à l'aide de HISAT2 et des tableaux de comptage ont été générés à l'aide de htseq-count.

Pour les transcriptomes du GRMD et de patients DMD, les données ont été collectées sur la base de données de NCBI (chiens GRMD de 6 mois, muscle GA medial, réf. GSE68626 - patients DMD < 7 ans, réf. GSE38417).

IV-7 Quantification de CK dans le sérum

La quantification de la créatine kinase (CK) dans le sérum a été réalisée à l'aide d'un analyseur FUJI DRI-Chem nx500 (DMV Imaging). 10 µL de sérum dilués ont été déposés sur les plaquettes FUJI DRI-CHEM CPK-PIII (DMV Imaging, réf.15809463), et les concentrations de CK ont été générées automatiquement en unités internationales par litre de sérums (U/L).

IV-8 Quantification de fragments de MYOM3 par test ELISA

Des fragments de la protéine structurelle myofibrillaire myoméline-3 (MYOM3) ont été identifiés comme étant anormalement présents dans les sérums de modèles animaux dystrophiques ^[355]. Pour quantifier ces fragments dans le sérum des souris, un test immuno-enzymatique (ELISA) de type Meso Scale Discovery (MSD) a été réalisé. Contrairement à un ELISA classique, le MSD-ELISA, utilise une électrochemiluminescence (ECL) comme technique de détection, par opposition à une réaction colorimétrique classique, ce qui permet un intervalle de détection plus large et sensible.

L'anticorps de capture polyclonal anti-MYOM3 (Proteintech Lab, réf. 17692-1-AP) est ajouté dans les puits d'une plaque Multi-Array contenant des électrodes (MSD, réf. L15XA-3), et la plaque est incubée à 4°C

pendant une nuit. La plaque est ensuite lavée 4 fois avec une solution de lavage (PBS + 0,05% de Tween 20), et la saturation des puits est effectuée avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 3% pendant 1 heure à température ambiante. Après 3 lavages, les sérums dilués sont ajoutés (dilution au 1/50^e dans une solution de BSA à 1%) et la plaque est incubée 2h à température ambiante sous agitation. Une gamme standard du peptide MYOM3 a également été utilisée pour le calcul des concentrations. La révélation se fait à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris (Anti-51r20, conçu chez Proteogenix©) couplé à un sulfo-tag (Mesoscale, réf. R31AA-2). La plaque est incubée encore 2 heures sous agitation, puis lavée 3 fois. Enfin, 150 µL le tampon de lecture MSD-Gold (MSD, réf. R92TG-2) sont ajoutés et la lecture de l'électro-chemiluminescence est réalisée avec l'automate MESO QuickPlex SQ 120 (MSD). Les concentrations de MYOM3 sont calculées à l'aide de la gamme standard de MYOM3, et exprimées en pg/µL.

IV-9 Quantification de LGALS3 par test ELISA

La quantification de LGALS3 dans le sérum des souris a été faite à l'aide du kit ELISA de galectin-3 murin (Invitrogen, réf. EMLGALS3), selon les instructions du fournisseur. Les sérums ont été dilués au 1/50^e et les concentrations de LGALS3 dans les sérums des souris sont mesurées en dupliqua.

V- Histologie et Immunofluorescence

Les muscles ont été disséqués, fixés sur de bouchons en liège et congelés dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide, puis stockés à -80°C. Des cryosections transversales (8µm d'épaisseur) ont été préparées à partir des muscles congelés, séchées à l'air et conservées à -80°C.

V-1 Colorations histochimiques

- **La coloration H&E** a été réalisée conformément aux procédures standards. Cette coloration associe une coloration nucléaire par l'hématoxyline à une coloration cytoplasmique par l'éosine.
- **La coloration Oil Red O** permet d'identifier les lipides hydrophobes en phase liquide. Le corps coloré appelé Lysochrome, se déplace du solvant dans lequel il se trouve vers le lipide tissulaire, et les gouttelettes lipidiques sont colorées en rouge et les noyaux en bleu ^[356].
- **La coloration Rouge Sirius** permet d'évaluer la fibrose d'un tissu en associant une coloration rouge pour les fibres de collagène à une coloration jaune pour le cytoplasme. Brièvement, les lames ont été traitées à l'acétone pendant 1 heure, fixées au formol pendant 5 minutes, puis incubées dans la solution de Bouin pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite rincées à l'eau deux fois et colorées dans une solution de Rouge Sirius (Sigma, réf. 365548) (dilué dans 0,1% de l'acide picrique) pendant 1 heure, lavées à l'eau et déshydratées à l'éthanol (70% 1 min, 95% 1 min, 100% pendant 2 min) et puis éclaircies en bain de xylène (2 lavages pendant 1 min). Les lames sont montées dans un milieu de montage et séchées à l'air.

Les images des colorations histologiques à champ clair ont été numérisées à l'aide d'un scanner de lames Axioscan Z1 (Zeiss, Allemagne) sous un objectif sec Zeiss Plan-Apochromat 10X/0,45 M27 (ZEISS, Allemagne). Les images du scanner en tuiles ont été reconstruites avec le logiciel ZEN (ZEISS, Allemagne). La quantification de la zone positive de fibrose a été réalisée à l'aide du logiciel QuPath.

V-2 Immunohistochimie fluorescente

- **Essai de puncta de Galectin-3 sur des coupes transversales de muscles**

Les lames sont séchées à température ambiante pendant 10 minutes. Un stylo PAP est utilisé pour dessiner des cercles autour des sections musculaires, et les lames sont réhydratées dans du PBS pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite fixées dans du paraformaldéhyde à 4 % (Thermo Scientific, réf-28906) froid pendant 3 minutes et lavées 2 fois dans du PBS. Les lames sont ensuite perméabilisées dans un gradient de méthanol glacé (10 min 70% ; 10 min 95%, 20 min 100%). Après 3 lavages avec du PBS (5min), une solution de sérum de chèvre de 10% (Agilent, réf. X090710) est utilisée pour le blocage à température ambiante pendant 30 min. Une deuxième solution de blocage '*Mouse-on-Mouse*' (Invitrogen, réf. R37621) est ensuite utilisée pour bloquer la liaison endogène aux immunoglobulines de souris (30 min à température ambiante). Les lames sont incubées avec la solution d'anticorps primaires anti-LAMP2 et anti-LGALS3 à 4°C pendant la nuit (**Tableau 9**). Les lames sont après lavées dans une solution de TTBS 3 fois pendant 5 minutes, puis incubées 2h à 4°C dans une solution d'anticorps secondaires dilués au 1/200^e dans 1% de sérum de chèvre (Molecular Probes, Alexa GARat 488 réf. A11006, Alexa GAMIgG1 594 réf. A21125). Enfin, les lames sont lavées dans une solution de PBS 3 fois pendant 5 minutes, rincées dans de l'eau milliQ et montées avec un milieu de montage DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, réf. 0100-20). Une fois les lames séchées, elles sont imagées au microscope confocal spectral LEICA TCS SP8 (Leica, Allemagne) fonctionnant sous le logiciel LASX (Leica, Allemagne) à l'aide d'un objectif sec HC PL APO CS2 20X 0,75 NA. Les images acquises sont traitées avec Fiji ImageJ pour les figures finales.

- **Autres immunomarquages**

Les lames sont séchées à température ambiante pendant 10 minutes. Un stylo PAP est utilisé pour dessiner des cercles autour des sections musculaires, et les lames sont réhydratées dans du PBS pendant 5 minutes. Ensuite, les lames sont fixées pendant 10 minutes avec une solution de PFA sans méthanol à 4% (Thermo Scientific, réf-28906), perméabilisées dans du Triton à 0,1 % pendant 5 minutes et bloquées 45 minutes dans une solution de sérum de chèvre de 10 % (Agilent, réf. X090710). Pour les marquages utilisant des anticorps primaires de souris, un blocage additionnel pendant 30 minutes est fait avec la solution '*mouse on mouse*' (Invitrogen R37621). Les lames sont ensuite incubées avec la solution d'anticorps primaire à 4°C pendant la nuit (détails des anticorps indiquées dans le **Tableau 9**, les anticorps sont dilués dans 1/10^e de la solution de blocage). Les lames sont ensuite lavées 3 fois dans du PBS et incubés 2h à 4°C avec une solution d'anticorps secondaire (la gamme Alexa de *Molecular Probes* est utilisée, les anticorps sont dilués dans 1% de la solution de blocage au 1/200^e). Les lames sont après lavées trois fois avec du PBS et montées dans du DAPI Fluoromount-G (Southern Biotech, réf. 0100-20).

Une fois les lames séchées, elles sont imagées au microscope confocal spectral LEICA TCS SP8 (Leica, Allemagne) fonctionnant sous le logiciel LASX (Leica, Allemagne) à l'aide d'un objectif sec HC PL APO CS2 20X 0,75 NA. Les images acquises sont éditées avec Fiji ImageJ pour les figures finales.

Pour le marquage de la dystrophine, les images ont été numérisées à l'aide du scanner de lames Axioscan Z1 (Zeiss, Allemagne) sous un objectif sec Zeiss Plan-Apochromat 10X/0,45 M27 (Zeiss, Allemagne) et à l'aide d'une caméra numérique CMOS ORCA-Flash4.0 (Hamamatsu, Japon). Les images du scanner en tuiles ont été reconstruites avec le logiciel ZEN (ZEISS, Allemagne), et la taille d'un pixel est de 0,65 µm.

- **Détection de cholestérol libre par marquage au filipin**

La détection du cholestérol libre a été faite avec le fluorophore filipin (Sigma, Réf. SAE008). Le filipin est incubé avec la solution des anticorps secondaires à une concentration de 100µg/mL.

La 'wheat germ agglutinin' conjuguée à l'Alexa fluor 488 (Invitrogen, W11261) est également incubée avec les anticorps secondaires et diluée au 1/500^e.

Anticorps Primaire	Fournisseur	Référence	Espèce	Dilution
Anti-LGALS3	Santacruz	Sc-32790	Souris monoclonal IgG1	1/50
Anti-LAMP2	Abcam	Ab13524	Rat monoclonal	1/200
Anti-LAMININ	Invitrogen	PA1-1673	Lapin polyclonal	1/500
Anti-CD11B	BD Pharmingen	550282	Rat monoclonal	1/40
Anti-TFEB	ThermoFisher Scientific	A303-673A	Lapin polyclonal	1/100
Anti-CTSB	Cell Signaling	31718	Lapin monoclonal	1/400
Anti-LC3B	Sigma	L7543	Lapin polyclonal	1/100
Anti-CHMP4B	PTG	13683-1-AP	Lapin polyclonal	1/200
Anti-DMD	Leica	NCL-DYSB	Souris monoclonal IgG1	1/50

Tableau 9. Liste d'anticorps primaires utilisés pour les essais d'immunofluorescence.

VI- Statistiques et Analyses d'Images

- **Analyses Statistiques**

Toutes les données ont été analysées avec Graphpad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Il a été considéré que les variances sont égales et que les valeurs suivent une distribution normale. Un test de Student a été utilisé pour la comparaison de la moyenne de deux groupes. Un test ANOVA à une variable a été utilisé pour la comparaison de 3 groupes ou plus, accompagné d'un test de comparaison multiple de Tukey. Les barres d'erreur sur les graphs représentent l'écart-type. Les valeurs de la p.value des tests statistiques ont été représentées sur les graphs de la façon suivante : * : p≤0,05 ; ** : p≤0,01 ; *** : p≤0,001, **** : p≤0,0001.

- **Analyse de la fluorescence cellulaire totale corrigée**

La quantification de la fluorescence cellulaire totale corrigée a été faite avec le logiciel Fiji Image J, en suivant la procédure décrite par Marwaha & Sharma ^[357]. La quantification a été faite sur des cellules de plusieurs images acquises sur des champs multiples. Le nombre de cellules quantifiées est indiqué pour chaque figure.

- **Analyse de colocalisation**

Le plug-in JaCOP d'ImageJ a été utilisé pour l'analyse de la colocalisation par calcul des coefficients de Manders. Ces coefficients indiquent la fraction de la fluorescence du signal d'un canal localisé dans les pixels de fluorescence d'un deuxième canal.

La fonction de corrélation croisée a été aussi calculée avec le plugin JaCOP. Cette fonction est plus compatible avec les images à haute résolution et permet de mesurer la corrélation entre deux signaux sur une distance plus élargie (les pixels n'ont pas besoin de se chevaucher).

BIBLIOGRAPHIE

1. Janssen, I., Heymsfield, S. B., Wang, Z. & Ross, R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *Journal of Applied Physiology* **89**, 81–88 (2000).
2. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* **96**, 183–195 (2015).
3. Wolfe, R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease². *The American Journal of Clinical Nutrition* **84**, 475–482 (2006).
4. Fernando, R., Drescher, C., Nowotny, K., Grune, T. & Castro, J. P. Impaired proteostasis during skeletal muscle aging. *Free Radical Biology and Medicine* **132**, 58–66 (2019).
5. DeFronzo, R. A., Gunnarsson, R., Björkman, O., Olsson, M. & Wahren, J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* **76**, 149–155 (1985).
6. DeFronzo, R. A. & Tripathy, D. Skeletal Muscle Insulin Resistance Is the Primary Defect in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **32**, S157–S163 (2009).
7. Ferrannini, E. *et al.* The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism* **37**, 79–85 (1988).
8. Reaven, G. M. THE INSULIN RESISTANCE SYNDROME: Definition and Dietary Approaches to Treatment. *Annual Review of Nutrition* **25**, 391–406 (2005).
9. DeFronzo, R. A., Bonadonna, R. C. & Ferrannini, E. Pathogenesis of NIDDM: A Balanced Overview. *Diabetes Care* **15**, 318–368 (1992).
10. Merz, K. E. & Thurmond, D. C. Role of Skeletal Muscle in Insulin Resistance and Glucose Uptake. *Compr Physiol* **10**, 785–809 (2020).
11. Bonetto, A. & Bonewald, L. F. Chapter 16 - Bone and Muscle. in *Basic and Applied Bone Biology (Second Edition)* (eds Burr, D. B. & Allen, M. R.) 317–332 (Academic Press, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813259-3.00016-6.
12. Hoppeler, H., Lüthi, P., Claassen, H., Weibel, E. R. & Howald, H. The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. *Pflugers Arch.* **344**, 217–232 (1973).
13. Bailey, K. Myosin and adenosinetriphosphatase. *Biochemical Journal* **36**, 121–139 (1942).
14. Jayasinghe, I. D. & Launikonis, B. S. Three-dimensional reconstruction and analysis of the tubular system of vertebrate skeletal muscle. *Journal of Cell Science* **126**, 4048–4058 (2013).
15. Al-Qusairi, L. & Laporte, J. T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skeletal Muscle* **1**, 26 (2011).
16. Lambole, C. R., Murphy, R. M., McKenna, M. J. & Lamb, G. D. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **592**, 1381–1395 (2014).
17. Galpin, A. J. *et al.* Human skeletal muscle fiber type specific protein content. *Analytical Biochemistry* **425**, 175–182 (2012).
18. Rebeck, R. T. *et al.* Skeletal muscle excitation–contraction coupling: Who are the dancing partners? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **48**, 28–38 (2014).
19. Goubel, F. & Lensele-Corbeil, G. *Biomécanique: éléments de mécanique musculaire*. (Masson, 2003).
20. Huxley, H. & Hanson, J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* **173**, 973–976 (1954).
21. Huxley, A. F. & Niedergerke, R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* **173**, 971–973 (1954).
22. Romijn, J. A. *et al.* Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **265**, E380–E391 (1993).
23. Chandel, N. S. Amino Acid Metabolism. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **13**, a040584 (2021).
24. Mauro, A. SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* **9**, 493–495 (1961).

25. Yablonka-Reuveni, Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: Still Young and Fascinating at 50. *J Histochem Cytochem* **59**, 1041–1059 (2011).
26. Feige, P., Brun, C. E., Ritso, M. & Rudnicki, M. A. Orienting Muscle Stem Cells for Regeneration in Homeostasis, Aging, and Disease. *Cell Stem Cell* **23**, 653–664 (2018).
27. Rosenberg, I. H. Sarcopenia: Origins and Clinical Relevance¹. *The Journal of Nutrition* **127**, 990S–991S (1997).
28. Reid, K. F. *et al.* Longitudinal decline of lower extremity muscle power in healthy and mobility-limited older adults: influence of muscle mass, strength, composition, neuromuscular activation and single fiber contractile properties. *Eur J Appl Physiol* **114**, 29–39 (2014).
29. Nishikawa, H., Asai, A., Fukunishi, S., Nishiguchi, S. & Higuchi, K. Metabolic Syndrome and Sarcopenia. *Nutrients* **13**, 3519 (2021).
30. Alway, S. E., Myers, M. J. & Mohamed, J. S. Regulation of Satellite Cell Function in Sarcopenia. *Frontiers in Aging Neuroscience* **6**, (2014).
31. Deschenes, M. R. Effects of Aging on Muscle Fibre Type and Size. *Sports Med* **34**, 809–824 (2004).
32. Chen, M., Wang, Y., Deng, S., Lian, Z. & Yu, K. Skeletal muscle oxidative stress and inflammation in aging: Focus on antioxidant and anti-inflammatory therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**, (2022).
33. Broskey, N. T. *et al.* Skeletal Muscle Mitochondria in the Elderly: Effects of Physical Fitness and Exercise Training. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **99**, 1852–1861 (2014).
34. Steffl, M. *et al.* Relationship between sarcopenia and physical activity in older people: a systematic review and meta-analysis. *CIA* **12**, 835–845 (2017).
35. Alkner, B. A. & Tesch, P. A. Knee extensor and plantar flexor muscle size and function following 90 days of bed rest with or without resistance exercise. *Eur J Appl Physiol* **93**, 294–305 (2004).
36. Parry, S. M. & Puthuchery, Z. A. The impact of extended bed rest on the musculoskeletal system in the critical care environment. *Extreme Physiology & Medicine* **4**, 16 (2015).
37. Trappe, S. *et al.* Human single muscle fibre function with 84 day bed-rest and resistance exercise. *The Journal of Physiology* **557**, 501–513 (2004).
38. Cohen, S., Nathan, J. A. & Goldberg, A. L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 58–74 (2015).
39. Graham, Z. A. *et al.* Mechanisms of exercise as a preventative measure to muscle wasting. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **321**, C40–C57 (2021).
40. Claeys, K. G. Congenital myopathies: an update. *Developmental Medicine & Child Neurology* **62**, 297–302 (2020).
41. Campbell, K. P. Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* **80**, 675–679 (1995).
42. Shin, J., Tajrishi, M. M., Ogura, Y. & Kumar, A. Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **45**, 2266–2279 (2013).
43. Iyadurai, S. J. P. & Kissel, J. T. The Limb-Girdle Muscular Dystrophies and the Dystrophinopathies: *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology* **22**, 1954–1977 (2016).
44. Hoffman, E. P., Brown, R. H. & Kunkel, L. M. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919–928 (1987).
45. Ervasti, J. M. & Sonnemann, K. J. Chapter Five - Biology of the Striated Muscle Dystrophin–Glycoprotein Complex. in *International Review of Cytology* (ed. Jeon, K. W.) vol. 265 191–225 (Academic Press, 2008).
46. Ervasti, J. M. & Campbell, K. P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* **66**, 1121–1131 (1991).
47. Ozawa, E. Our trails and trials in the subsarcolemmal cytoskeleton network and muscular dystrophy researches in the dystrophin era. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**, 798–821 (2010).
48. Straub, V. *et al.* 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies – Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17–19 March 2017. *Neuromuscular Disorders* **28**, 702–710 (2018).
49. Fanin, M., Pegoraro, E., Matsuda-Asada, C., Brown, R. H. & Angelini, C. Calpain-3 and dysferlin protein screening in patients with limb-girdle dystrophy and myopathy. *Neurology* **56**, 660–665 (2001).
50. Vainzof, M. *et al.* Sarcoglycanopathies are responsible for 68% of severe autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in the Brazilian population. *Journal of the Neurological Sciences* **164**, 44–49 (1999).
51. Mendell, J. R. *et al.* Evidence-based path to newborn screening for duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology* **71**, 304–313 (2012).

52. Moat, S. J., Bradley, D. M., Salmon, R., Clarke, A. & Hartley, L. Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *Eur J Hum Genet* **21**, 1049–1053 (2013).
53. Angelini, C. Chapter 31 Muscular dystrophy. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Aminoff, M. J., Boller, F. & Swaab, D. F.) vol. 95 477–488 (Elsevier, 2009).
54. Koenig, M. *et al.* Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**, 509–517 (1987).
55. Koenig, M., Monaco, A. P. & Kunkel, L. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**, 219–228 (1988).
56. Duan, D., Goemans, N., Takeda, S., Mercuri, E. & Aartsma-Rus, A. Duchenne muscular dystrophy. (2021).
57. Mercuri, E., Bönnemann, C. G. & Muntoni, F. Muscular dystrophies. *The Lancet* **394**, 2025–2038 (2019).
58. Ferrier, P., Bamatter, F. & Klein, D. Muscular Dystrophy (Duchenne) in a Girl with Turner’s Syndrome. *Journal of Medical Genetics* **2**, 38–46 (1965).
59. Chelly, J. *et al.* De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* **74**, 193–196 (1986).
60. Satre, V., Monnier, N., Devillard, F., Amblard, F. & Lunardi, P. J. Prenatal diagnosis of DMD in a female foetus affected by Turner syndrome. *Prenatal Diagnosis* **24**, 913–917 (2004).
61. Chen, J.-J. *et al.* A Chinese girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy: diagnosis and management of this “dual diagnosis”. *Chinese Medical Journal* **134**, 743 (2021).
62. Takeshita, E. *et al.* Duchenne muscular dystrophy in a female with compound heterozygous contiguous exon deletions. *Neuromuscular Disorders* **27**, 569–573 (2017).
63. Battini, R. *et al.* Cognitive profile in Duchenne muscular dystrophy boys without intellectual disability: The role of executive functions. *Neuromuscular Disorders* **28**, 122–128 (2018).
64. Toussaint, M., Chatwin, M. & Soudon, P. Review Article: Mechanical ventilation in Duchenne patients with chronic respiratory insufficiency: clinical implications of 20 years published experience. *Chron Respir Dis* **4**, 167–177 (2007).
65. Ryder, S. *et al.* The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **12**, 79 (2017).
66. Kieny, P. *et al.* Evolution of life expectancy of patients with Duchenne muscular dystrophy at AFM Yolaine de Kepper centre between 1981 and 2011. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* **56**, 443–454 (2013).
67. Quak, Z. X. *et al.* A manifesting female carrier of Duchenne muscular dystrophy: importance of genetics for the dystrophinopathies. *Singapore Medical Journal* **64**, 81 (2023).
68. Song, T.-J., Lee, K.-A., Kang, S.-W., Cho, H. & Choi, Y.-C. Three Cases of Manifesting Female Carriers in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *Yonsei Medical Journal* **52**, 192–195 (2011).
69. Ishizaki, M., Kobayashi, M., Adachi, K., Matsumura, T. & Kimura, E. Female dystrophinopathy: Review of current literature. *Neuromuscular Disorders* **28**, 572–581 (2018).
70. Cheeran, D. *et al.* Predictors of Death in Adults With Duchenne Muscular Dystrophy–Associated Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association* **6**, e006340.
71. Van Ruiten, H. J. A. *et al.* Why are some patients with Duchenne muscular dystrophy dying young: An analysis of causes of death in North East England. *European Journal of Paediatric Neurology* **20**, 904–909 (2016).
72. Sanyal, S. K., Johnson, W. W., Thapar, M. K. & Pitner, S. E. An ultrastructural basis for electrocardiographic alterations associated with Duchenne’s progressive muscular dystrophy. *Circulation* **57**, 1122–1129 (1978).
73. Schultz, T. I., Raucci, F. J. & Salloum, F. N. Cardiovascular Disease in Duchenne Muscular Dystrophy. *JACC: Basic to Translational Science* **7**, 608–625 (2022).
74. Bladen, C. L. *et al.* The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Human Mutation* **36**, 395–402 (2015).
75. Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J. C. T., Fokkema, I. F., Van Ommen, G.-J. B. & Den Dunnen, J. T. 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 (2006).
76. Magri, F. *et al.* Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *J Neurol* **258**, 1610–1623 (2011).
77. Garcia, S. *et al.* Identification of *de novo* Mutations of Duchènnè/Becker Muscular Dystrophies in Southern Spain. *International Journal of Medical Sciences* **11**, 988–993 (2014).

78. Kesari, A. *et al.* Integrated DNA, cDNA, and protein studies in Becker muscular dystrophy show high exception to the reading frame rule. *Human Mutation* **29**, 728–737 (2008).
79. Nakamura, A. *et al.* Comparison of the phenotypes of patients harboring in-frame deletions starting at exon 45 in the Duchenne muscular dystrophy gene indicates potential for the development of exon skipping therapy. *J Hum Genet* **62**, 459–463 (2017).
80. Nakamura, A. *et al.* Deletion of exons 3–9 encompassing a mutational hot spot in the DMD gene presents an asymptomatic phenotype, indicating a target region for multiexon skipping therapy. *J Hum Genet* **61**, 663–667 (2016).
81. Chelly, J. *et al.* Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* **344**, 64–65 (1990).
82. Górecki, D. C. *et al.* Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Human Molecular Genetics* **1**, 505–510 (1992).
83. Doorenweerd, N. *et al.* Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep* **7**, 12575 (2017).
84. D'Souza, V. N. *et al.* A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Human Molecular Genetics* **4**, 837–842 (1995).
85. Lidov, H. G. W., Selig, S. & Kunkel, L. M. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human Molecular Genetics* **4**, 329–335 (1995).
86. Byers, T. J., Lidov, H. G. W. & Kunkel, L. M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* **4**, 77–81 (1993).
87. Hugnot, J. P. *et al.* Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 7506–7510 (1992).
88. Tinsley, J. M., Blake, D. J. & Davies, K. E. Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet* **2**, 521–524 (1993).
89. García-Pelagio, K. P., Bloch, R. J., Ortega, A. & González-Serratos, H. Biomechanics of the sarcolemma and costameres in single skeletal muscle fibers from normal and dystrophin-null mice. *J Muscle Res Cell Motil* **31**, 323–336 (2011).
90. Blaauw, B. *et al.* Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy. *Journal of Applied Physiology* **108**, 105–111 (2010).
91. Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M. & Sweeney, H. L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 3710–3714 (1993).
92. Amann, K. J., Renley, B. A. & Ervasti, J. M. A Cluster of Basic Repeats in the Dystrophin Rod Domain Binds F-actin through an Electrostatic Interaction *. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 28419–28423 (1998).
93. Prins, K. W. *et al.* Dystrophin is a microtubule-associated protein. *Journal of Cell Biology* **186**, 363–369 (2009).
94. Nelson, D. M. *et al.* Rapid, redox-mediated mechanical susceptibility of the cortical microtubule lattice in skeletal muscle. *Redox Biology* **37**, 101730 (2020).
95. Lai, Y. *et al.* Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest* **119**, 624–635 (2009).
96. Lai, Y., Zhao, J., Yue, Y. & Duan, D. $\alpha 2$ and $\alpha 3$ helices of dystrophin R16 and R17 frame a microdomain in the $\alpha 1$ helix of dystrophin R17 for neuronal NOS binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 525–530 (2013).
97. Thomas, G. Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Frontiers in Physiology* **4**, (2013).
98. Duan, D. Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy* **26**, 2337–2356 (2018).
99. Li, D., Yue, Y., Lai, Y., Hakim, C. H. & Duan, D. Nitrosative stress elicited by nNOS μ delocalization inhibits muscle force in dystrophin-null mice. *The Journal of Pathology* **223**, 88–98 (2011).
100. Duan, D. Micro-Dystrophin Gene Therapy Goes Systemic in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Human Gene Therapy* **29**, 733–736 (2018).
101. Huang, X. *et al.* Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with β -dystroglycan. *Nat Struct Mol Biol* **7**, 634–638 (2000).

102. Anderson, J. T., Rogers, R. P. & Jarrett, H. W. Ca²⁺-Calmodulin Binds to the Carboxyl-terminal Domain of Dystrophin (*). *Journal of Biological Chemistry* **271**, 6605–6610 (1996).
103. Moradi, F. *et al.* Calmodulin-Binding Proteins in Muscle: A Minireview on Nuclear Receptor Interacting Protein, Neurogranin, and Growth-Associated Protein 43. *Int J Mol Sci* **21**, 1016 (2020).
104. Zhao, J. *et al.* Dystrophin contains multiple independent membrane-binding domains. *Human Molecular Genetics* **25**, 3647–3653 (2016).
105. Constantin, B. Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1838**, 635–642 (2014).
106. Dreyfus, J.-C., Schapira, G. & Schapira, F. Serum Enzymes in the Physiopathology of Muscle. *Annals of the New York Academy of Sciences* **75**, 235–249 (1958).
107. Moser, H. Duchenne muscular dystrophy: Pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* **66**, 17–40 (1984).
108. Richard, I. *et al.* Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* **81**, 27–40 (1995).
109. Yorgev, Y. *et al.* Limb girdle muscular disease caused by HMGR mutation and statin myopathy treatable with mevalonolactone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **120**, e2217831120 (2023).
110. Morales-Rosado, J. A. *et al.* Bi-allelic variants in HMGR cause an autosomal-recessive progressive limb-girdle muscular dystrophy. *The American Journal of Human Genetics* **110**, 989–997 (2023).
111. Liu, J. *et al.* Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* **20**, 31–36 (1998).
112. Mokri, B. & Engel, A. G. Duchenne dystrophy: Electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* **25**, 1111–1111 (1975).
113. Haycock, J. W., Neil, S. M., Jones, P., Harris, J. B. & Mantle, D. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *NeuroReport* **8**, 357 (1996).
114. Terrill, J. R. *et al.* Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *The FEBS Journal* **280**, 4149–4164 (2013).
115. Kim, J.-H., Kwak, H.-B., Thompson, L. V. & Lawler, J. M. Contribution of oxidative stress to pathology in diaphragm and limb muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Muscle Res Cell Motil* **34**, 1–13 (2013).
116. Grounds, M. D. *et al.* Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Disease Models & Mechanisms* **13**, dmm043638 (2020).
117. Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Froehner, S. C. & Allen, D. G. Skeletal Muscle NADPH Oxidase Is Increased and Triggers Stretch-Induced Damage in the mdx Mouse. *PLOS ONE* **5**, e15354 (2010).
118. Khairallah, R. J. *et al.* Microtubules Underlie Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy. *Science Signaling* **5**, ra56–ra56 (2012).
119. Prosser, B. L., Ward, C. W. & Lederer, W. J. X-ROS Signaling: Rapid Mechano-Chemo Transduction in Heart. *Science* **333**, 1440–1445 (2011).
120. Williams, I. A. & Allen, D. G. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **293**, H1969–H1977 (2007).
121. Wells, K. E. *et al.* Relocalization of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a marker for complete restoration of the dystrophin associated protein complex in skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders* **13**, 21–31 (2003).
122. Rando, T. A., Disatnik, M.-H., Yu, Y. & Franco, A. Muscle cells from mdx mice have an increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscular Disorders* **8**, 14–21 (1998).
123. Turner, P. R., Westwood, T., Regen, C. M. & Steinhardt, R. A. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature* **335**, 735–738 (1988).
124. Culligan, K. & Ohlendieck, K. Abnormal Calcium Handling in Muscular Dystrophy. in (2002).
125. Mallouk, N., Jacquemond, V. & Allard, B. Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 4950–4955 (2000).
126. Altamirano, F. *et al.* Increased Resting Intracellular Calcium Modulates NF-κB-dependent Inducible Nitric-oxide Synthase Gene Expression in Dystrophic mdx Skeletal Myotubes*. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 20876–20887 (2012).

127. Allen, D. G., Whitehead, N. P. & Froehner, S. C. Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev* **96**, 253–305 (2016).
128. Murphy, S. *et al.* Proteomic analysis of the sarcolemma-enriched fraction from dystrophic mdx-4cv skeletal muscle. *Journal of Proteomics* **191**, 212–227 (2019).
129. Zabłocka, B., Górecki, D. C. & Zabłocki, K. Disrupted Calcium Homeostasis in Duchenne Muscular Dystrophy: A Common Mechanism behind Diverse Consequences. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 11040 (2021).
130. Bellinger, A. M. *et al.* Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* **15**, 325–330 (2009).
131. Kushnir, A., Wajsberg, B. & Marks, A. R. Ryanodine receptor dysfunction in human disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1865**, 1687–1697 (2018).
132. Hyatt, H. W. & Powers, S. K. The Role of Calpains in Skeletal Muscle Remodeling with Exercise and Inactivity-induced Atrophy. *Int J Sports Med* **41**, 994–1008 (2020).
133. Phillips, M. F. & Quinlivan, R. Calcium antagonists for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2008) doi:10.1002/14651858.CD004571.pub2.
134. Sander, M. *et al.* Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 13818–13823 (2000).
135. Hood, D. A., Memme, J. M., Oliveira, A. N. & Triolo, M. Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. *Annu Rev Physiol* **81**, 19–41 (2019).
136. Budzinska, M., Zimna, A. & Kurpisz, M. The role of mitochondria in Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol Pharmacol* **72**, (2021).
137. Kuznetsov, A. V. *et al.* Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Mol Cell Biochem* **183**, 87–96 (1998).
138. Schuh, R. A., Jackson, K. C., Khairallah, R. J., Ward, C. W. & Spangenburg, E. E. Measuring mitochondrial respiration in intact single muscle fibers. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **302**, R712–R719 (2012).
139. Rybalka, E., Timpani, C. A., Cooke, M. B., Williams, A. D. & Hayes, A. Defects in Mitochondrial ATP Synthesis in Dystrophin-Deficient Mdx Skeletal Muscles May Be Caused by Complex I Insufficiency. *PLOS ONE* **9**, e115763 (2014).
140. Vu Hong, A. *et al.* Dlk1-Dio3 cluster miRNAs regulate mitochondrial functions in the dystrophic muscle in Duchenne muscular dystrophy. *Life Sci. Alliance* **6**, e202201506 (2023).
141. Sanson, M. *et al.* miR-379 links glucocorticoid treatment with mitochondrial response in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Rep* **10**, 9139 (2020).
142. Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335–344 (2003).
143. Babu, D. *et al.* Mitochondria and NADPH oxidases are the major sources of TNF- α /cycloheximide-induced oxidative stress in murine intestinal epithelial MODE-K cells. *Cellular Signalling* **27**, 1141–1158 (2015).
144. Hughes, M. C. *et al.* Early myopathy in Duchenne muscular dystrophy is associated with elevated mitochondrial H₂O₂ emission during impaired oxidative phosphorylation. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **10**, 643–661 (2019).
145. Pauly, M. *et al.* ER stress disturbs SR/ER-mitochondria Ca²⁺ transfer: Implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1863**, 2229–2239 (2017).
146. Moorwood, C. & Barton, E. R. Caspase-12 ablation preserves muscle function in the mdx mouse. *Human Molecular Genetics* **23**, 5325–5341 (2014).
147. Sandri, M. Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Letters* **584**, 1411–1416 (2010).
148. Sandri, M., Coletto, L., Grumati, P. & Bonaldo, P. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *Journal of Cell Science* **126**, 5325–5333 (2013).
149. Malicdan, M. C. V. & Nishino, I. Autophagy in Lysosomal Myopathies. *Brain Pathology* **22**, 82–88 (2012).
150. De Palma, C. *et al.* Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis* **3**, e418–e418 (2012).
151. De Palma, C., Perrotta, C., Pellegrino, P., Clementi, E. & Cervia, D. Skeletal Muscle Homeostasis in Duchenne Muscular Dystrophy: Modulating Autophagy as a Promising Therapeutic Strategy. *Front. Aging Neurosci.* **6**, (2014).

- 152.Pal, R. *et al.* Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* **5**, 4425 (2014).
- 153.Pauly, M. *et al.* AMPK Activation Stimulates Autophagy and Ameliorates Muscular Dystrophy in the mdx Mouse Diaphragm. *The American Journal of Pathology* **181**, 583–592 (2012).
- 154.Yim, W. W.-Y. & Mizushima, N. Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov* **6**, 1–12 (2020).
- 155.Bajaj, L. *et al.* Lysosome biogenesis in health and disease. *Journal of Neurochemistry* **148**, 573–589 (2019).
- 156.Reddy, A., Caler, E. V. & Andrews, N. W. Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes. *Cell* **106**, 157–169 (2001).
- 157.Xiong, J. & Zhu, M. X. Regulation of lysosomal ion homeostasis by channels and transporters. *Sci. China Life Sci.* **59**, 777–791 (2016).
- 158.Thelen, A. M. & Zoncu, R. Emerging Roles for the Lysosome in Lipid Metabolism. *Trends in Cell Biology* **27**, 833–850 (2017).
- 159.Gelman, B. B., Davis, M. H., Morris, R. E. & Gruenstein, E. Structural changes in lysosomes from cultured human fibroblasts in Duchenne’s muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology* **88**, 329–337 (1981).
- 160.Kominami, E., Kunio, I. & Katunuma, N. Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. *Am J Pathol* **127**, 461–466 (1987).
- 161.Whitaker, J. N., Bertorini, T. E. & Mendell, J. R. Immunocytochemical studies of cathepsin D in human skeletal muscle. *Annals of Neurology* **13**, 133–142 (1983).
- 162.Duguez, S. *et al.* Dystrophin deficiency leads to disturbance of LAMP1-vesicle-associated protein secretion. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 2159–2174 (2013).
- 163.Tjondrokoesoemo, A. *et al.* Cathepsin S Contributes to the Pathogenesis of Muscular Dystrophy in Mice*. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 9920–9928 (2016).
- 164.Sano, M. *et al.* Immunolocalization of cathepsins B, H and L in skeletal muscle of X-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol* **75**, 217–225 (1988).
- 165.Spitali, P. *et al.* Autophagy is Impaired in the Tibialis Anterior of Dystrophin Null Mice. *PLoS Curr* **5**, ecurrents.md.e1226cefa851a2f079bbc406c0a21e80 (2013).
- 166.Whitehead, N. P. Enhanced autophagy as a potential mechanism for the improved physiological function by simvastatin in muscular dystrophy. *Autophagy* **12**, 705–706 (2016).
- 167.Spaulding, H. R. *et al.* Autophagic dysfunction and autophagosome escape in the mdx mus musculus model of Duchenne muscular dystrophy. *Acta Physiologica* **222**, e12944 (2018).
- 168.Myerowitz, R., Puertollano, R. & Raben, N. Impaired autophagy: The collateral damage of lysosomal storage disorders. *EBioMedicine* **63**, 103166 (2021).
- 169.Call, J. A. & Nichenko, A. S. Autophagy: an essential but limited cellular process for timely skeletal muscle recovery from injury. *Autophagy* **16**, 1344–1347 (2020).
- 170.Ikeda, S. *et al.* YAP plays a crucial role in the development of cardiomyopathy in lysosomal storage diseases. *J Clin Invest* **131**, (2021).
- 171.Saini-Chohan, H. K., Mitchell, R. W., Vaz, F. M., Zelinski, T. & Hatch, G. M. Delineating the role of alterations in lipid metabolism to the pathogenesis of inherited skeletal and cardiac muscle disorders. *Journal of Lipid Research* **53**, 4–27 (2012).
- 172.Tahallah, N., Brunelle, A., De La Porte, S. & Laprévotte, O. Lipid mapping in human dystrophic muscle by cluster-time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging. *Journal of Lipid Research* **49**, 438–454 (2008).
- 173.Srivastava, N. K., Yadav, R., Mukherjee, S., Pal, L. & Sinha, N. Abnormal lipid metabolism in skeletal muscle tissue of patients with muscular dystrophy: In vitro, high-resolution NMR spectroscopy based observation in early phase of the disease. *Magnetic Resonance Imaging* **38**, 163–173 (2017).
- 174.Srivastava, N. K., Pradhan, S., Mittal, B. & Gowda, G. A. N. High resolution NMR based analysis of serum lipids in Duchenne muscular dystrophy patients and its possible diagnostic significance. *NMR in Biomedicine* **23**, 13–22 (2010).
- 175.Srivastava, N. K., Mukherjee, S. & Sinha, N. Alteration of phospholipids in the blood of patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD): in vitro, high resolution ³¹P NMR-based study. *Acta Neurol Belg* **116**, 573–581 (2016).
- 176.White, Z. *et al.* High prevalence of plasma lipid abnormalities in human and canine Duchenne and Becker muscular dystrophies depicts a new type of primary genetic dyslipidemia. *Journal of Clinical Lipidology* **14**, 459–469.e0 (2020).

- 177.Sun, Z. *et al.* Dyslipidemia in Muscular Dystrophy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Neuromuscular Diseases* **10**, 505–516 (2023).
- 178.Tsonaka, R., Seyer, A., Aartsma-Rus, A. & Spitali, P. Plasma lipidomic analysis shows a disease progression signature in mdx mice. *Sci Rep* **11**, 12993 (2021).
- 179.Amor, F. *et al.* Cholesterol metabolism is a potential therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **12**, 677–693 (2021).
- 180.Whitehead, N. P., Kim, M. J., Bible, K. L., Adams, M. E. & Froehner, S. C. A new therapeutic effect of simvastatin revealed by functional improvement in muscular dystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, 12864–12869 (2015).
- 181.Kim, M. J. *et al.* Simvastatin provides long-term improvement of left ventricular function and prevents cardiac fibrosis in muscular dystrophy. *Physiological Reports* **7**, e14018 (2019).
- 182.Evans, N. P., Misyak, S. A., Robertson, J. L., Bassaganya-Riera, J. & Grange, R. W. Immune-Mediated Mechanisms Potentially Regulate the Disease Time-Course of Duchenne Muscular Dystrophy and Provide Targets for Therapeutic Intervention. *PM&R* **1**, 755–768 (2009).
- 183.Langen, R. C. J., Schols, A. M. W. J., Kelders, M. C. J. M., Wouters, E. F. M. & Janssen-Heininger, Y. M. W. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor- κ B. *The FASEB Journal* **15**, 1169–1180 (2001).
- 184.Villalta, S. A., Deng, B., Rinaldi, C., Wehling-Henricks, M. & Tidball, J. G. IFN- γ Promotes Muscle Damage in the mdx Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy by Suppressing M2 Macrophage Activation and Inhibiting Muscle Cell Proliferation. *The Journal of Immunology* **187**, 5419–5428 (2011).
- 185.Theret, M., Saclier, M., Messina, G. & Rossi, F. M. V. Macrophages in Skeletal Muscle Dystrophies, An Entangled Partner. *Journal of Neuromuscular Diseases* **9**, 1–23 (2022).
- 186.Spencer, M. J., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K. & Tidball, J. G. Helper (CD4+) and Cytotoxic (CD8+) T Cells Promote the Pathology of Dystrophin-Deficient Muscle. *Clinical Immunology* **98**, 235–243 (2001).
- 187.Spencer, M. J., Walsh, C. M., Dorshkind, K. A., Rodriguez, E. M. & Tidball, J. G. Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J Clin Invest* **99**, 2745–2751 (1997).
- 188.Tidball, J. G., Welc, S. S. & Wehling-Henricks, M. Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. in *Comprehensive Physiology* 1313–1356 (John Wiley & Sons, Ltd, 2018). doi:10.1002/cphy.c170052.
- 189.Tidball, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**, R345–R353 (2005).
- 190.Gorospe, J. R. M., Sharp, M., Demitsu, T. & Hoffman, E. P. Dystrophin-deficient myofibers are vulnerable to mast cell granule-induced necrosis. *Neuromuscular Disorders* **4**, 325–333 (1994).
- 191.Gorospe, J. R. M., Sharp, M. D., Hinckley, J., Kornegay, J. N. & Hoffman, E. P. A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy: Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. *Journal of the Neurological Sciences* **122**, 44–56 (1994).
- 192.Kirschner, J. *et al.* Treatment of Duchenne muscular dystrophy with ciclosporin A: a randomised, double-blind, placebo-controlled multicentre trial. *The Lancet Neurology* **9**, 1053–1059 (2010).
- 193.Iannitti, T., Capone, S., Feder, D. & Palmieri, B. Clinical Use of Immunosuppressants in Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Clinical Neuromuscular Disease* **12**, 1 (2010).
- 194.Sacco, A. *et al.* Short Telomeres and Stem Cell Exhaustion Model Duchenne Muscular Dystrophy in mdx/mTR Mice. *Cell* **143**, 1059–1071 (2010).
- 195.Souza, G. T. de *et al.* Satellite Cells: Regenerative Mechanisms and Applicability in Muscular Dystrophy. *Stem Cells International* **2015**, e487467 (2015).
- 196.Chang, N. C. *et al.* The Dystrophin Glycoprotein Complex Regulates the Epigenetic Activation of Muscle Stem Cell Commitment. *Cell Stem Cell* **22**, 755–768.e6 (2018).
- 197.Lumeng, C. *et al.* Interactions between β 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* **2**, 611–617 (1999).
- 198.Dumont, N. A. *et al.* Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med* **21**, 1455–1463 (2015).
- 199.Dumont, N. A. & Rudnicki, M. A. Targeting muscle stem cell intrinsic defects to treat Duchenne muscular dystrophy. *npj Regen Med* **1**, 1–7 (2016).
- 200.Kodippili, K. & Rudnicki, M. A. Satellite cell contribution to disease pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Front. Physiol.* **14**, 1180980 (2023).

201. Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* **18**, 1028–1040 (2012).
202. Zhou, L. & Lu, H. Targeting Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **69**, 771–776 (2010).
203. Serrano, A. L. *et al.* Chapter seven - Cellular and Molecular Mechanisms Regulating Fibrosis in Skeletal Muscle Repair and Disease. in *Current Topics in Developmental Biology* (ed. Pavlath, G. k.) vol. 96 167–201 (Academic Press, 2011).
204. Molina, T., Fabre, P. & Dumont, N. A. Fibro-adipogenic progenitors in skeletal muscle homeostasis, regeneration and diseases. *Open Biol* **11**, 210110 (2021).
205. Contreras, O., Rebolledo, D. L., Oyarzún, J. E., Olguín, H. C. & Brandan, E. Connective tissue cells expressing fibro/adipogenic progenitor markers increase under chronic damage: relevance in fibroblast-myofibroblast differentiation and skeletal muscle fibrosis. *Cell Tissue Res* **364**, 647–660 (2016).
206. Lemos, D. R. *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* **21**, 786–794 (2015).
207. Chen, W., You, W., Valencak, T. G. & Shan, T. Bidirectional roles of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors in homeostasis and disease. *Ageing Research Reviews* **80**, 101682 (2022).
208. Ceco, E. & McNally, E. M. Modifying muscular dystrophy through transforming growth factor- β . *The FEBS Journal* **280**, 4198–4209 (2013).
209. Wynn, T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology* **214**, 199–210 (2008).
210. Bernasconi, P. *et al.* Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest* **96**, 1137–1144 (1995).
211. Heydemann, A. *et al.* Latent TGF- β -binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice. *J Clin Invest* **119**, 3703–3712 (2009).
212. Zhou, L. *et al.* Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF- β 1, 2, 3 and T β RI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. *Neuromuscular Disorders* **16**, 32–38 (2006).
213. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
214. Leask, A. & Abraham, D. J. TGF- β signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal* **18**, 816–827 (2004).
215. Runyan, C. E., Schnaper, H. W. & Poncelet, A.-C. Smad3 and PKC δ mediate TGF- β 1-induced collagen I expression in human mesangial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **285**, F413–F422 (2003).
216. Border, W. A. & Noble, N. A. Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis. *New England Journal of Medicine* **331**, 1286–1292 (1994).
217. Sun, G. *et al.* Connective tissue growth factor is overexpressed in muscles of human muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences* **267**, 48–56 (2008).
218. Hinz, B. Tissue stiffness, latent TGF- β 1 Activation, and mechanical signal transduction: Implications for the pathogenesis and treatment of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* **11**, 120–126 (2009).
219. Smith, L., Cho, S. & Discher, D. E. Mechanosensing of matrix by stem cells: From matrix heterogeneity, contractility, and the nucleus in pore-migration to cardiogenesis and muscle stem cells in vivo. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **71**, 84–98 (2017).
220. Fischer, M., Rikeit, P., Knaus, P. & Coirault, C. YAP-Mediated Mechanotransduction in Skeletal Muscle. *Frontiers in Physiology* **7**, (2016).
221. Desguerre, I. *et al.* Endomysial Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy: A Marker of Poor Outcome Associated With Macrophage Alternative Activation. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **68**, 762–773 (2009).
222. Birnkrant, D. J. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *The Lancet Neurology* **17**, 251–267 (2018).
223. Birnkrant, D. J. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *The Lancet Neurology* **17**, 347–361 (2018).
224. Birnkrant, D. J. *et al.* Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 3: primary care, emergency management, psychosocial care, and transitions of care across the lifespan. *The Lancet Neurology* **17**, 445–455 (2018).

- 225.Zhang, T. & Kong, X. Recent advances of glucocorticoids in the treatment of Duchenne muscular dystrophy (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine* **21**, 1–7 (2021).
- 226.Dichiaro, M., McMahon, M., Horn, P., Petersen, A. & Wong, B. L. P4.2 Duchenne Muscular Dystrophy and corticosteroids: Timed motor performance predictive of time to loss of ambulation. *Neuromuscular Disorders* **21**, 704–705 (2011).
- 227.Schreiber, A. *et al.* Corticosteroids in Duchenne muscular dystrophy: impact on the motor function measure sensitivity to change and implications for clinical trials. *Developmental Medicine & Child Neurology* **60**, 185–191 (2018).
- 228.McDonald, C. M. *et al.* Longitudinal pulmonary function testing outcome measures in Duchenne muscular dystrophy: Long-term natural history with and without glucocorticoids. *Neuromuscular Disorders* **28**, 897–909 (2018).
- 229.Sanchez, M. J., Scott, W., Pessana, F., Castro, D. & Ramaciotti, C. Comparison of the effect of three steroid regimens on cardiac function in Duchenne muscular dystrophy. *Progress in Pediatric Cardiology* **67**, 101557 (2022).
- 230.Kinali, M. *et al.* Predictive factors for the development of scoliosis in Duchenne muscular dystrophy. *European Journal of Paediatric Neurology* **11**, 160–166 (2007).
- 231.Matthews, E., Brassington, R., Kuntzer, T., Jichi, F. & Manzur, A. Y. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2016) doi:10.1002/14651858.CD003725.pub4.
- 232.Zambon, A. A. *et al.* Respiratory Function and Sleep Disordered Breathing in Pediatric Duchenne Muscular Dystrophy. *Neurology* **99**, e1216–e1226 (2022).
- 233.Duboc, D. *et al.* Effect of perindopril on the onset and progression of left ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of the American College of Cardiology* **45**, 855–857 (2005).
- 234.Duboc, D. *et al.* Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *American Heart Journal* **154**, 596–602 (2007).
- 235.McNally, E. M. *et al.* Contemporary Cardiac Issues in Duchenne Muscular Dystrophy. *Circulation* **131**, 1590–1598 (2015).
- 236.Aartsma-Rus, A. *et al.* Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Human Mutation* **30**, 293–299 (2009).
- 237.Alfano, L. N. *et al.* Long-term treatment with eteplirsen in nonambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. *Medicine* **98**, e15858 (2019).
- 238.Mendell, J. R. *et al.* Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology* **79**, 257–271 (2016).
- 239.Frank, D. E. *et al.* Increased dystrophin production with golodirsen in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **94**, e2270–e2282 (2020).
- 240.Roshmi, R. R. & Yokota, T. Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drugs Today (Barc)* **55**, 627–639 (2019).
- 241.Wagner, K. R. *et al.* Safety, tolerability, and pharmacokinetics of casimersen in patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 45 skipping: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-titration trial. *Muscle & Nerve* **64**, 285–292 (2021).
- 242.Heo, Y.-A. Golodirsen: First Approval. *Drugs* **80**, 329–333 (2020).
- 243.Komaki, H. *et al.* Viltolarsen in Japanese Duchenne muscular dystrophy patients: A phase 1/2 study. *Annals of Clinical and Translational Neurology* **7**, 2393–2408 (2020).
- 244.Iannaccone, S. *et al.* P.132 Casimersen in patients with Duchenne muscular dystrophy amenable to exon 45 skipping: Interim results from the Phase 3 ESSENCE trial. *Neuromuscular Disorders* **32**, S102 (2022).
- 245.Mercuri, E. *et al.* Safety and effectiveness of ataluren: comparison of results from the STRIDE Registry and CINRG DMD Natural History Study. *Journal of Comparative Effectiveness Research* **9**, 341–360 (2020).
- 246.McDonald, C. M. *et al.* Ataluren delays loss of ambulation and respiratory decline in nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy patients. *Journal of Comparative Effectiveness Research* **11**, 139–155 (2021).
- 247.Atchison, R. W., Casto, B. C. & Hammon, W. McD. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754–756 (1965).
- 248.Blacklow, N. R., Hoggan, M. D. & Rowe, W. P. Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **58**, 1410–1415 (1967).

249. Hermonat, P. L. & Muzyczka, N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 6466–6470 (1984).
250. Ylä-Herttua, S. Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Molecular Therapy* **20**, 1831–1832 (2012).
251. Miraldi Utz, V., Coussa, R. G., Antaki, F. & Traboulsi, E. I. Gene therapy for RPE65-related retinal disease. *Ophthalmic Genetics* **39**, 671–677 (2018).
252. Hoy, S. M. Onasemnogene Apeparovovec: First Global Approval. *Drugs* **79**, 1255–1262 (2019).
253. Srivastava, A., Lusby, E. W. & Berns, K. I. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *Journal of Virology* **45**, 555–564 (1983).
254. McLaughlin, S. K., Collis, P., Hermonat, P. L. & Muzyczka, N. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *Journal of Virology* **62**, 1963–1973 (1988).
255. Yan, Z., Zak, R., Zhang, Y. & Engelhardt, J. F. Inverted Terminal Repeat Sequences Are Important for Intermolecular Recombination and Circularization of Adeno-Associated Virus Genomes. *Journal of Virology* **79**, 364–379 (2005).
256. Gao, G. *et al.* Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues. *Journal of Virology* **78**, 6381–6388 (2004).
257. Li, C. & Samulski, R. J. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **21**, 255–272 (2020).
258. Flotte, T. R. Gene Therapy Progress and Prospects: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* **11**, 805–810 (2004).
259. Kotterman, M. A. & Schaffer, D. V. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* **15**, 445–451 (2014).
260. Dong, J.-Y., Fan, P.-D. & Frizzell, R. A. Quantitative Analysis of the Packaging Capacity of Recombinant Adeno-Associated Virus. *Human Gene Therapy* **7**, 2101–2112 (1996).
261. Wang, D., Tai, P. W. L. & Gao, G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 358–378 (2019).
262. Belova, L., Kochergin-Nikitsky, K., Erofeeva, A., Lavrov, A. & Smirnikhina, S. Approaches to purification and concentration of rAAV vectors for gene therapy. *BioEssays* **44**, 2200019 (2022).
263. Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J. M. Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *The Journal of Infectious Diseases* **199**, 381–390 (2009).
264. Colella, P., Ronzitti, G. & Mingozzi, F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* **8**, 87–104 (2018).
265. Birch, S. M. *et al.* Assessment of systemic AAV-microdystrophin gene therapy in the GRMD model of Duchenne muscular dystrophy. *Science Translational Medicine* **15**, eabo1815 (2023).
266. Mingozzi, F. & High, K. A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**, 23–36 (2013).
267. Wang, B., Li, J. & Xiao, X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *PNAS* **97**, 13714–13719 (2000).
268. Scott, J. M. *et al.* Viral vectors for gene transfer of micro-, mini-, or full-length dystrophin. *Neuromuscular Disorders* **12**, S23–S29 (2002).
269. Le Guiner, C. *et al.* Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* **8**, 16105 (2017).
270. Muntoni, F., Torelli, S. & Ferlini, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *The Lancet Neurology* **2**, 731–740 (2003).
271. Koo, T., Popplewell, L., Athanasopoulos, T. & Dickson, G. Triple Trans-Splicing Adeno-Associated Virus Vectors Capable of Transferring the Coding Sequence for Full-Length Dystrophin Protein into Dystrophic Mice. *Human Gene Therapy* **25**, 98–108 (2014).
272. Kodippili, K. *et al.* Dual AAV Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy with a 7-kb Mini-Dystrophin Gene in the Canine Model. *Human Gene Therapy* **29**, 299–311 (2018).
273. Albini, S. *et al.* Assessment of Therapeutic Potential of a Dual AAV Approach for Duchenne Muscular Dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 11421 (2023).
274. Yuasa, K., Ishii, A., Miyagoe, Y. & Takeda, S. [Introduction of rod-deleted dystrophin cDNA, delta DysM3, into mdx skeletal muscle using adenovirus vector]. *Nihon Rinsho* **55**, 3148–3153 (1997).

- 275.Foster, H. *et al.* Codon and mRNA Sequence Optimization of Microdystrophin Transgenes Improves Expression and Physiological Outcome in Dystrophic mdx Mice Following AAV2/8 Gene Transfer. *Molecular Therapy* **16**, 1825–1832 (2008).
- 276.Mullard, A. Sarepta's DMD gene therapy falls flat. *Nature Reviews Drug Discovery* **20**, 91–91 (2021).
- 277.Chamberlain, J. S. *et al.* Microdystrophin Expression as a Surrogate Endpoint for Duchenne Muscular Dystrophy Clinical Trials. *Human Gene Therapy* **34**, 404–415 (2023).
- Mendell, J. R. *et al.* Assessment of Systemic Delivery of rAAVrh74.MHCK7.micro-dystrophin in Children With Duchenne Muscular Dystrophy: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Neurology* **77**, 1122–1131 (2020).
- 279.Mendell, J. R. *et al.* Expression of SRP-9001 dystrophin and stabilization of motor function up to 2 years post-treatment with delandistrogene moxeparovec gene therapy in individuals with Duchenne muscular dystrophy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **11**, (2023).
- 280.Greg. Summary of Pfizer Phase 1 Microdystrophin Gene Therapy Trial. *CureDuchenne* <https://cureduchenne.org/blog/summary-of-pfizer-phase-1-microdystrophin-gene-therapy-trial/> (2019).
- 281.Solid Biosciences Inc. *A Randomized, Controlled, Open-label, Single-ascending Dose, Phase I/II Study to Investigate the Safety and Tolerability, and Efficacy of Intravenous SGT-001 in Male Adolescents and Children With Duchenne Muscular Dystrophy*. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03368742> (2023).
- 282.Bönnemann, C. G. *et al.* Dystrophin Immunity after Gene Therapy for Duchenne's Muscular Dystrophy. *New England Journal of Medicine* (2023) doi:10.1056/NEJMc2212912.
- 283.Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346**, 1258096 (2014).
- 284.Adli, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* **9**, 1911 (2018).
- 285.Chemello, F., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. Correction of muscular dystrophies by CRISPR gene editing. *J Clin Invest* **130**, 2766–2776 (2020).
- 286.Min, Y.-L. *et al.* CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy exon 44 deletion mutations in mice and human cells. *Science Advances* **5**, eaav4324 (2019).
- 287.Zhang, Y., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. CRISPR-Cas9 Correction of Duchenne Muscular Dystrophy in Mice by a Self-Complementary AAV Delivery System. in *Muscular Dystrophy Therapeutics: Methods and Protocols* (eds. Maruyama, R. & Yokota, T.) 411–425 (Springer US, 2023). doi:10.1007/978-1-0716-2772-3_21.
- 288.Ousterout, D. G. *et al.* Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* **6**, 6244 (2015).
- 289.Duchêne, B. L. *et al.* CRISPR-Induced Deletion with SaCas9 Restores Dystrophin Expression in Dystrophic Models In Vitro and In Vivo. *Molecular Therapy* **26**, 2604–2616 (2018).
- 290.Sengupta, K. *et al.* Genome Editing-Mediated Utrophin Upregulation in Duchenne Muscular Dystrophy Stem Cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **22**, 500–509 (2020).
- 291.Lek, A. *et al.* Unexpected Death of a Duchenne Muscular Dystrophy Patient in an N-of-1 Trial of rAAV9-delivered CRISPR-transactivator. 2023.05.16.23289881 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2023.05.16.23289881> (2023).
- 292.Jia, J. *et al.* Galectin-3 Coordinates a Cellular System for Lysosomal Repair and Removal. *Developmental Cell* **52**, 69–87.e8 (2020).
- 293.Papadopoulos, C., Kravic, B. & Meyer, H. Repair or Lysophagy: Dealing with Damaged Lysosomes. *Journal of Molecular Biology* **432**, 231–239 (2020).
- 294.Barral, D. C. *et al.* Current methods to analyze lysosome morphology, positioning, motility and function. *Traffic* **23**, 238–269 (2022).
- 295.Aits, S. *et al.* Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy* **11**, 1408–1424 (2015).
- 296.Marotta, M. *et al.* Muscle genome-wide expression profiling during disease evolution in mdx mice. *Physiological Genomics* **37**, 119–132 (2009).
- 297.Van Putten, M. *et al.* The Effects of Low Levels of Dystrophin on Mouse Muscle Function and Pathology. *PLoS ONE* **7**, e31937 (2012).
- 298.'t Hoen, P. A. *et al.* Gene expression profiling to monitor therapeutic and adverse effects of antisense therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Pharmacogenomics* **7**, 281–297 (2006).
- 299.Henderson, N. C. & Sethi, T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunological Reviews* **230**, 160–171 (2009).

300. Coulis, G. *et al.* Single-cell and spatial transcriptomics identify a macrophage population associated with skeletal muscle fibrosis. *SCIENCE ADVANCES* (2023).
301. Cerri, D. G., Rodrigues, L. C., Alves, V. M., Machado, J. & Bastos, V. A. F. Endogenous galectin-3 is required for skeletal muscle repair.
302. Rancourt, A. *et al.* Galectin-3 and N-acetylglucosamine promote myogenesis and improve skeletal muscle function in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *The FASEB Journal* **32**, 6445–6455 (2018).
303. Cox, B. E., Griffin, E. E., Ullery, J. C. & W. Gray, J. Effects of cellular cholesterol loading on macrophage foam cell lysosome acidification. *Journal of Lipid Research* **48**, 1012–1021 (2007).
304. Folts, C. J., Scott-Hewitt, N., Pröschel, C., Mayer-Pröschel, M. & Noble, M. Lysosomal Re-acidification Prevents Lysosphingolipid-Induced Lysosomal Impairment and Cellular Toxicity. *PLoS Biol* **14**, e1002583 (2016).
305. Shen, D. *et al.* Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. *Nat Commun* **3**, 731 (2012).
306. Rocha, N. *et al.* Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150Glued and late endosome positioning. *Journal of Cell Biology* **185**, 1209–1225 (2009).
307. Sobo, K. *et al.* Late Endosomal Cholesterol Accumulation Leads to Impaired Intra-Endosomal Trafficking. *PLOS ONE* **2**, e851 (2007).
308. Fraldi, A. *et al.* Lysosomal fusion and SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders. *The EMBO Journal* **29**, 3607–3620 (2010).
309. Strauss, K. *et al.* Exosome Secretion Ameliorates Lysosomal Storage of Cholesterol in Niemann-Pick Type C Disease*. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 26279–26288 (2010).
310. Liao, G. *et al.* Cholesterol Accumulation Is Associated with Lysosomal Dysfunction and Autophagic Stress in Npc1^{-/-} Mouse Brain. *The American Journal of Pathology* **171**, 962–975 (2007).
311. Rodriguez-Navarro, J. A. & Cuervo, A. M. Dietary lipids and aging compromise chaperone-mediated autophagy by similar mechanisms. *Autophagy* **8**, 1152–1154 (2012).
312. Xie, Y., Li, J., Kang, R. & Tang, D. Interplay Between Lipid Metabolism and Autophagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, (2020).
313. Cheng, C., Deng, X. & Xu, K. Increased expression of sterol regulatory element binding protein-2 alleviates autophagic dysfunction in NAFLD. *International Journal of Molecular Medicine* **41**, 1877–1886 (2018).
314. Davis, O. B. *et al.* NPC1-mTORC1 Signaling Couples Cholesterol Sensing to Organelle Homeostasis and Is a Targetable Pathway in Niemann-Pick Type C. *Developmental Cell* **56**, 260-276.e7 (2021).
315. Wheeler, S. & Sillence, D. J. Niemann–Pick type C disease: cellular pathology and pharmacotherapy. *Journal of Neurochemistry* **153**, 674–692 (2020).
316. Barrientos, G., Sánchez-Aguilera, P., Jaimovich, E., Hidalgo, C. & Llanos, P. Membrane Cholesterol in Skeletal Muscle: A Novel Player in Excitation-Contraction Coupling and Insulin Resistance. *Journal of Diabetes Research* **2017**, e3941898 (2017).
317. Barondes, S. H. *et al.* Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell* **76**, 597–598 (1994).
318. Lakpa, K. L., Khan, N., Afghah, Z., Chen, X. & Geiger, J. D. Lysosomal Stress Response (LSR): Physiological Importance and Pathological Relevance. *J Neuroimmune Pharmacol* **16**, 219–237 (2021).
319. Uchimoto, T. *et al.* Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester. *Apoptosis* **4**, 357–362 (1999).
320. Braulke, T. & Bonifacio, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**, 605–614 (2009).
321. Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A. & Shiri-Sverdlov, R. The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. *Cells* **9**, 1679 (2020).
322. Yang, H. & Tan, J. X. Lysosomal quality control: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Trends in Cell Biology* **33**, 749–764 (2023).
323. Sardiello, M. *et al.* A Gene Network Regulating Lysosomal Biogenesis and Function. *Science* **325**, 473–477 (2009).
324. Palmieri, M. *et al.* Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Human Molecular Genetics* **20**, 3852–3866 (2011).
325. Mansueto, G. *et al.* Transcription Factor EB Controls Metabolic Flexibility during Exercise. *Cell Metabolism* **25**, 182–196 (2017).
326. Skowrya, M. L., Schlesinger, P. H., Naismith, T. V. & Hanson, P. I. Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science* **360**, eaar5078 (2018).

327. Juhl, A. D. & Wüstner, D. Pathways and Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux—Insight From Imaging. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 834408 (2022).
328. Steen, M. S., Adams, M. E., Tesch, Y. & Froehner, S. C. Amelioration of Muscular Dystrophy by Transgenic Expression of Niemann-Pick C1. *MBoC* **20**, 146–152 (2009).
329. Bourg, N. *et al.* Co-Administration of Simvastatin Does Not Potentiate the Benefit of Gene Therapy in the mdx Mouse Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 2016 (2022).
330. White, Z. *et al.* Cholesterol absorption blocker ezetimibe prevents muscle wasting in severe dysferlin-deficient and mdx mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **13**, 544–560 (2022).
331. Wang, F., Gómez-Sintes, R. & Boya, P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic* **19**, 918–931 (2018).
332. Gómez-Sintes, R., Ledesma, M. D. & Boya, P. Lysosomal cell death mechanisms in aging. *Ageing Research Reviews* **32**, 150–168 (2016).
333. Radulovic, M. *et al.* ESCRT-mediated lysosome repair precedes lysophagy and promotes cell survival. *The EMBO Journal* **37**, e99753 (2018).
334. Kim, M. *et al.* Nanosensor-based monitoring of autophagy-associated lysosomal acidification in vivo. *Nat Chem Biol* 1–10 (2023) doi:10.1038/s41589-023-01364-9.
335. Inami, Y. *et al.* Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **412**, 618–625 (2011).
336. Colacurcio, D. J. & Nixon, R. A. Disorders of lysosomal acidification—The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease. *Ageing Research Reviews* **32**, 75–88 (2016).
337. Luciani, A. *et al.* Impaired Lysosomal Function Underlies Monoclonal Light Chain–Associated Renal Fanconi Syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* **27**, 2049 (2016).
338. Kohler, L., Puertollano, R. & Raben, N. Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. *Neurotherapeutics* **15**, 928–942 (2018).
339. Milad, N. *et al.* Increased plasma lipid levels exacerbate muscle pathology in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle* **7**, 19 (2017).
340. Donen, G. S. *et al.* Thermoneutral Housing and a Western Diet Combination Exacerbates DYSFERLIN-DEFICIENT Muscular Dystrophy. *Muscle and Nerve* **66**, 513–522 (2022).
341. Sellers, S. L. *et al.* Increased nonHDL cholesterol levels cause muscle wasting and ambulatory dysfunction in the mouse model of LGMD2B. *Journal of Lipid Research* **59**, 261–272 (2018).
342. Maharjan, Y. *et al.* Intracellular cholesterol transport inhibition Impairs autophagy flux by decreasing autophagosome–lysosome fusion. *Cell Communication and Signaling* **20**, 189 (2022).
343. Elrick, M. J., Yu, T., Chung, C. & Lieberman, A. P. Impaired proteolysis underlies autophagic dysfunction in Niemann-Pick type C disease. *Hum Mol Genet* **21**, 4876–4887 (2012).
344. Platt, F. M., d’Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F. & Tiffet, C. J. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 27 (2018).
345. Nishi, H., Higashihara, T. & Inagi, R. Lipotoxicity in Kidney, Heart, and Skeletal Muscle Dysfunction. *Nutrients* **11**, 1664 (2019).
346. Lu, F. *et al.* Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection. *eLife* **4**, e12177 (2015).
347. Pastor-Ibañez, R., Arnedo, M. & Tort, O. High-throughput Nitrobenzoxadiazole-labeled Cholesterol Efflux Assay. *JoVE* 58891 (2019) doi:10.3791/58891.
348. Hessvik, N. P. *et al.* LXR β is the dominant LXR subtype in skeletal muscle regulating lipogenesis and cholesterol efflux. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **298**, E602–E613 (2010).
349. Tomaszewski, M., Stępień, K. M., Tomaszewska, J. & Czuczwar, S. J. Statin-induced myopathies. *Pharmacological Reports* **63**, 859–866 (2011).
350. Putten, M. van *et al.* Update on Standard Operating Procedures in Preclinical Research for DMD and SMA Report of TREAT-NMD Alliance Workshop, Schiphol Airport, 26 April 2015, The Netherlands. *Journal of Neuromuscular Diseases* **5**, 29–34 (2018).
351. Albini, S. *et al.* Epigenetic Reprogramming of Human Embryonic Stem Cells into Skeletal Muscle Cells and Generation of Contractile Myospheres. *Cell Reports* **3**, 661–670 (2013).

352. Caputo, L. *et al.* Acute conversion of patient-derived Duchenne muscular dystrophy iPSC into myotubes reveals constitutive and inducible over-activation of TGF β -dependent pro-fibrotic signaling. *Skeletal Muscle* **10**, 1–11 (2020).
353. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
354. Surma, M. A. *et al.* Mouse lipidomics reveals inherent flexibility of a mammalian lipidome. *Sci Rep* **11**, 19364 (2021).
355. Rouillon, J. *et al.* Serum proteomic profiling reveals fragments of MYOM3 as potential biomarkers for monitoring the outcome of therapeutic interventions in muscular dystrophies. *Human Molecular Genetics* **24**, 4916–4932 (2015).
356. Mehlem, A., Hagberg, C. E., Muhl, L., Eriksson, U. & Falkevall, A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc* **8**, 1149–1154 (2013).
357. Marwaha, R. & Sharma, M. DQ-Red BSA Trafficking Assay in Cultured Cells to Assess Cargo Delivery to Lysosomes. *BIO-PROTOCOL* **7**, (2017).

RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS

La myopathie de Duchenne (DMD) est une maladie musculaire dégénérative, rare et progressive, qui touche principalement les jeunes garçons. Elle est due à des mutations dans le gène *DMD* codant pour la protéine dystrophine. Il n'existe pas de traitement curatif pour la DMD actuellement. L'approche thérapeutique la plus prometteuse est la thérapie génique qui consiste à transférer une version raccourcie de la dystrophine (μ -dys) par vecteurs adéno-associés recombinants (AAVr). Toutefois, cette approche a montré une efficacité limitée chez les patients, ainsi qu'une toxicité liée aux doses importantes d'AAVr injectés. Le but du travail présenté est de caractériser les troubles métaboliques et cellulaires dans la DMD, et de développer de thérapies combinées, associant la thérapie génique à un traitement complémentaire ciblant les troubles identifiés. Nous avons identifié une dérégulation du métabolisme du cholestérol dans la DMD, qui corrèle avec une accumulation de cholestérol dans le compartiment endolysosomal du muscle. De plus, une surexpression et un recrutement de galectine-3 au niveau des lysosomes ont indiqué des lésions de la membrane lysosomale dans le muscle dystrophique. Ensuite, nous avons identifié une molécule (Drogue X) capable d'éliminer le cholestérol lysosomal du muscle. La drogue a permis de corriger les lésions lysosomales chez des souris modèles de la DMD, et d'améliorer le phénotype dystrophique. L'association de la drogue X à la thérapie génique par μ -dys a permis d'améliorer son effet, car administrée seule, celle-ci ne corrige pas les dégâts lysosomaux. L'identification des dégâts lysosomaux dans la DMD offre ainsi de nouvelles pistes thérapeutiques.

TITRE DE LA THESE EN ANGLAIS

Dysregulations of cholesterol trafficking and of the endolysosomal system in Duchenne Muscular Dystrophy: towards combined approaches

RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a rare, progressive muscular dystrophy that affects mainly young boys. It is caused by mutations in the *DMD* gene coding for the dystrophin protein. To date, there is no cure for DMD. The most promising therapeutic approach is gene therapy, which consists of delivering a shortened version of dystrophin (μ -dys) using recombinant adeno-associated viruses (rAAV). However, μ -dys gene therapy showed limited efficacy in patients and toxicity issues linked to high doses of injected vectors. The aim of the work presented here is to first improve our understanding of the metabolic and cellular perturbations in DMD, and secondly to develop combined therapies approaches, associating gene therapy to treatments of identified dysregulations. We have identified that cholesterol metabolism is dysregulated in DMD muscle, which correlated with a high cholesterol accumulation in the endolysosomal compartment. An overexpression and recruitment of galectine-3 (LGALS3) to lysosomes indicated significant lysosome damage in DMD muscle. Moreover, we have identified a drug (Drug X) capable of removing lysosomal cholesterol from muscle. This drug corrected lysosome damage in a mouse model of DMD (*Dmd^{mdx}*) and reduced some of the dystrophic features. The combination of this drug to μ -dys gene therapy improved the efficacy of gene therapy, which did not correct lysosome damage alone. The identification of lysosomal damage in DMD offers new therapeutic approaches for DMD.

MOTS-CLES

Myopathie de Duchenne, DMD, Muscle, Lysosome, Cholestérol, galectine-3, Thérapie Génique, Vecteurs adéno-associés recombinants, Microdystrophine, Thérapie Combinée.