



ÉCOLE DOCTORALE : *DES GÉNOMES AUX ORGANISMES*  
UNIVERSITÉ D'ÉVRY VAL D'ESSONNE

**THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES**

*Mention biologie cellulaire et moléculaire*

***Evaluation de régulateurs positifs de la  
croissance musculaire chez un modèle  
dystrophique murin***

Présentée par

**Simon GUIRAUD**

Soutenue le 18 novembre 2011 devant le jury composé de :

**Monsieur le Professeur Francis QUETIER**

**Monsieur le Docteur Marc BARTOLI**

**Monsieur le Docteur Christian PINSET**

**Madame le Docteur Sabine De La PORTE**

**Monsieur le Docteur Antoine KICHLER**

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Examinateur**

**Directeur de Thèse**

*Numéro national de thèse : 2011EVRY0008*

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de Thèse : le Professeur Francis Quétier d'en avoir accepté la Présidence, le Docteur Sabine de la Porte, le Docteur Marc Bartoli et le Docteur Christian Pinset pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Antoine Kichler pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce Doctorat. Je le remercie de m'avoir prodigué ses conseils avisés, pour l'autonomie qu'il m'a laissée, d'avoir guidé mon travail tout au long de ces 4 années de Thèse et pour sa présence et son soutien lors de l'écriture de ce manuscrit.

Je souhaite remercier le CNRS et l'ANR pour avoir financé ce sujet de Doctorat et le laboratoire Généthon qui offre aux Doctorants un cadre idéal pour mener à bien leurs projets de recherche.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux aux membres de l'équipe Administration - Vectorisation qui par leur sympathie et leurs conseils ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Merci à Christian pour sa gentillesse et sa disponibilité à tout instant, merci aux « Anciens » Thésards, Gilles en tête, pour leurs conseils et pour le temps pris à répondre à mes nombreuses questions et interrogations. Merci également à l'ensemble des services de Généthon à qui je n'aurai pas manqué de faire appel. Je pense au service de Bio-Expérimentation et notamment à Laetitia qui m'aura accompagné, avec patience et gentillesse, lors de mes premiers protocoles *in vivo* à l'animalerie. Merci au service de Zootechnie, d'Evaluation fonctionnelle et d'Histologie de Généthon, autant pour leur sympathie que pour leur sérieux. Un grand merci à Emilie Bertil et Christophe Georger pour les nombreux marquages HPS/Laminine/Shiff. Merci à Jérôme Denard et Jérémy Rouillon du service Protéomique pour leur aide lors des études de Western Blot et pour les discussions sur les possibles et (im)probables structures 3D que pouvaient avoir la décorine et ses peptides dérivés.

Merci à Xavier, Ludivine, Philippe, Stéphanie et Fatima pour leur agréable compagnie aux pauses déjeuner. Merci à Philippe et Jérémy pour nos nombreuses discussions « stratégiques » et à Jérôme pour avoir su me faire rire à grand recours de blagues profondes. Bien évidemment, un grand merci à Xavier pour sa sympathie et sa simplicité ainsi que pour sa présence lors des trop nombreux trajets en RER. Au-delà du collègue de bureau, c'est avant tout le véritable ami que je souhaite remercier.

Je ne saurais oublier ma famille, en particulier mes parents, de m'avoir toujours soutenu et encouragé sur cette voie et durant la phase difficile qu'est l'écriture de Thèse. Je ne saurai également assez remercier Lucie, ma femme, pour sa présence et son soutien de tout instant lors de ces 4 années de Doctorat. Merci à elle pour sa patience et ses nombreuses lectures et relectures de ce manuscrit.

Enfin, j'adresse ma gratitude aux chercheurs, techniciens, thésards et étudiants de Généthon que j'ai côtoyé au cours de ces 4 années de Doctorat.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
1. La myostatine .....	2
1.1 Le caractère culard .....	2
1.2 Locus <i>mh</i> , GDF-8 et myostatine .....	3
1.3 La myostatine : un membre de la famille des TGF- $\beta$ .....	5
1.3.1 Le gène .....	5
1.3.2 La protéine .....	6
1.3.3 Expression et localisation .....	7
1.4 Myostatine : voies de signalisation et mécanismes .....	9
1.4.1 Voie de signalisation des Smads .....	9
1.4.2 Voie de signalisation MAPK/ERK1/2 .....	10
1.5 Champs d'action de la myostatine .....	12
1.5.1 Myostatine et régulation de la prolifération cellulaire .....	12
1.5.2 Myostatine et régulation de la différenciation cellulaire .....	14
1.5.3 MSTN et activation des cellules satellites .....	16
1.5.4 MSTN, hyperplasie et régulation de la balance hypertrophie/atrophie .....	18
1.5.4.1 Hyperplasie et/ou hypertrophie .....	18
1.5.4.2 Mécanismes impliqués dans l'hypertrophie .....	19
1.5.5 La MSTN et son impact sur le type de fibres .....	21
1.5.6 Autres rôles de la myostatine. ....	22
1.6 Approches anti-myostatine : champs d'applications .....	22
1.7 Les différentes stratégies anti-myostatine .....	24
1.7.1 Anticorps anti-myostatine .....	25
1.7.2 Dérivés de myostatine .....	26
1.7.2.1 Pro-peptide .....	26
1.7.2.2 Pro-peptide muté .....	27
1.7.2.3 Myostatine tronquée .....	28
1.7.3 Autres approches anti-myostatine .....	29
1.7.3.1 La follistatine .....	29
1.7.3.2 Récepteur soluble de l'activine II .....	30
1.7.3.3 Autres approches .....	31
1.8 Myostatine et surplus de force .....	34
2. La décorine : un membre de la famille des SLRPs .....	36
2.1 Les protéoglycanes .....	36

2.1.1	Classes, biosynthèse et fonctions .....	36
2.1.2	La matrice extracellulaire (MEC) .....	38
2.2	La famille des SLRPs .....	39
2.3	La décorine .....	42
2.3.1	Organisation, gène et protéine .....	42
2.3.2	Biosynthèse .....	43
2.3.3	Structure de la décorine et rôle du zinc .....	45
2.3.3.1	Structure .....	45
2.3.3.2	La décorine : une métalloprotéine .....	46
2.3.4	Niveaux d'expression et localisation de la décorine .....	48
2.4	Rôles de la décorine .....	52
2.4.1	Actions sur la matrice extracellulaire .....	52
2.4.2	Actions sur le muscle squelettique .....	54
2.4.3	La décorine : un inhibiteur de la croissance tumorale .....	60
2.4.4	La décorine dans la cornée .....	61
2.4.5	Autres rôles de la décorine .....	61
2.5	Décorine et myostatine .....	61
2.5.1	Profil d'expression spatio-temporelle .....	62
2.5.2	Etude <i>in vitro</i> de l'interaction décorine - myostatine et rôle du zinc .....	64
2.5.3	Effets anti-myostatine de la décorine sur la prolifération et la différenciation cellulaire .....	66
2.5.4	Etude <i>in vivo</i> de l'effet de la décorine .....	69
2.5.5	Les autres membres de la famille des SLRPs .....	71
3.	Modèles murins .....	72
3.1	Modèle murin <i>mdx</i> .....	72
3.2	Modèle murin Gamma-sarcoglycan <sup>-/-</sup> .....	74
4.	Les virus adéno-associés (AAV) .....	75
	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>78</b>
	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>80</b>
1.	Etudes <i>in vitro</i> de l'inhibition de la myostatine .....	81
1.1	La construction plasmidique pGL3-(CAGA) <sub>12</sub> -firefly luciférase .....	81
1.2	Evaluation de l'activité anti-myostatine de la décorine murine .....	82
1.3	Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide 31-71 mDCN .....	83
1.4	Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide 31-71 mDCN muté .....	85

1.5	Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide mDCN 31-61.....	86
1.6	Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide 42-71 mDCN.....	87
1.7	Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide 31-71 hDCN.....	88
2.	Etudes de l'interaction décorine - myostatine.....	89
2.1	Définition de la quantité minimale saturante de myostatine .....	89
2.2	Etude des interactions myostatine - peptide 31-71 mDCN .....	90
3.	Etudes <i>in vivo</i> des effets d'une injection de décorine et de ses dérivés peptidiques sur le muscle squelettique.....	91
3.1	Etude préliminaire chez la souris <i>mdx</i> .....	92
3.2	Etude des effets de la décorine sur la croissance musculaire chez la souris <i>mdx</i> .....	92
3.2.1	Décorine et augmentation de la masse musculaire .....	92
3.2.2	Hyperplasie et hypertrophie.....	94
3.3	Etude cinétique de l'effet de la mDécorine chez la souris <i>mdx</i> .....	96
3.4	Effets de la mDCN sur la croissance musculaire de souris gamma-sarcoglycan <sup>-/-</sup> ....	98
3.5	Peptides mDCN et effets sur la croissance musculaire .....	101
3.5.1	Etude <i>in vivo</i> du peptide 31-71 mDCN chez <i>mdx</i> .....	101
3.5.2	Etudes <i>in vivo</i> des peptides 31-61 mDCN, 42-71 mDCN et 31-71 mDCN muté chez <i>mdx</i> .....	105
4.	Etudes fonctionnelles : Décorine, peptide 31-71 mDCN et tests de force.....	106
4.1	Etudes de l'effet de la décorine et du peptide 31-71 mDCN sur muscles isolés .....	106
4.2	Etudes de l'effet de la décorine et du peptide 31-71 mDCN sur la loge entière (TA + EDL) 110	
5.	Effets de la décorine sur des myoblastes/myotubes ainsi que sur la voie de signalisation Akt/GSK.....	112
5.1	Effets de la mDCN sur la différenciation et la prolifération cellulaire .....	112
5.1.1	Effets de la mDCN sur les myoblastes .....	112
5.1.2	Effets de la mDCN sur des myotubes .....	113
5.2	Voie de signalisation Akt et GSK.....	114
5.3	Effets de la mDCN et de la MSTN sur l'activation/inactivation des kinases Akt et GSK-3 .....	116
5.3.1	Effets de la mDCN et de la MSTN sur les myoblastes.....	116
5.3.2	Effets de la mDCN et de la MSTN sur les myotubes .....	118
5.4	Etude cinétique de l'effet de la mDCN sur la synthèse de glycogène.....	121
6.	Utilisation de la mDCN pour essayer d'améliorer la prise de greffe de cellules myogéniques.....	124
6.1	Cellules précurseurs MYO-B6.....	125
6.2	Etudes <i>In Vivo</i> et rôle de la mDCN dans la prise de greffe.....	125
7.	La famille des SLRP : Fibromoduline, bByglycan et autres membres .....	127
7.1	La Fibromoduline .....	128

7.1.1	Etude <i>in vitro</i> de l'activité anti-myostatine des peptides 69-101 Fmod biotine et 69-101 Fmod muté biotine .....	128
7.1.2	Etude de l'interaction entre la myostatine et les peptides fibromoduline .....	130
7.1.3	Etudes <i>In Vivo</i> des effets du peptide 69-101 Fmod sur la croissance musculaire de souris <i>mdx</i> .....	131
7.2	Biglycan, Lumican et mPRELP .....	133
7.3	Alignements de séquences et études des structures .....	136
7.3.1	Comparaison des séquences .....	136
7.3.2	Structures secondaires et tridimensionnelles .....	137
8.	Approches de transfert de gènes .....	141
8.1	Construction de la cassette pGG2 - MSTN tronquée .....	141
8.2	Plasmide pGG2 - MSTN tronquée / propeptide muté .....	144
8.3	La construction pGG2 - mDécorine .....	147
8.4	Approches AAV.....	149
<b>DISCUSSION.....</b>		<b>155</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>		<b>167</b>
1.	Biologie cellulaire.....	168
1.1	Cellules et conditions de cultures .....	168
1.2	Dosage des activités biologiques .....	169
1.2.1	Dosage luciférase .....	169
1.2.2	Dosage protéique.....	169
1.2.3	Dosage de la mSeAP.....	170
1.3	Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité anti-myostatine.....	170
1.3.1	Cassette d'expression pGL3-(CAGA) <sub>12</sub> -Luc .....	170
1.3.2	Production de pGL3-(CAGA) <sub>12</sub> -Luc .....	171
1.3.3	Liste des protéines et peptides utilisés lors des études pGL3-(CAGA) <sub>12</sub> -Luc .	172
1.3.4	Etude <i>in vitro</i> de l'inhibition de la Myostatine.....	173
1.3.5	Mise en évidence de la liaison MSTN/peptides DCN et MSTN/peptides Fmod	173
1.3.6	Etude par Western blot de l'activation de la voie Akt/GSK.....	175
1.4	Suivi de la prise de greffe par un dosage mSeAP .....	176
2.	Biologie moléculaire : Plasmides et AAV .....	177
2.1	Broyage, extraction, purification et transcription reverse .....	177
2.2	La cassette pGG2 - mMSTN tronquée .....	179
2.2.1	Clonage de la mMSTN tronquée dans le vecteur intermédiaire pCR2.1 Topo	179

2.2.2	Sous clonage de la mMSTN tronquée dans le vecteur final pGG2.....	183
2.3	La cassette pGG2 - mMSTN tronquée / propeptide muté.....	185
2.3.1	Mutagenèse dirigée et création de la mutation D76A.....	185
2.4	La cassette pGG2 – mDCN.....	187
2.5	Production des vecteurs AAV.....	190
2.5.1	Culture et tri-transfection.....	190
2.5.2	Purification du vecteur AAV.....	191
2.5.3	Titration des productions AAV.....	192
3.	Expérimentation animale.....	193
3.1	Souris.....	193
3.2	Anesthésie.....	194
3.3	Injections.....	194
3.4	Electroporation.....	194
3.5	Prélèvements de sang.....	195
3.6	Prélèvement et préparation des tissus.....	196
3.7	Évaluation fonctionnelle.....	196
3.7.1	Études de force sur muscle isolé EDL.....	196
3.7.2	Études de force sur la loge antérieure (EDL + TA).....	199
4.	Histologie.....	201
4.1	Préparation des échantillons.....	201
4.2	Coloration HPS.....	202
4.3	Marquages histo-enzymatiques de la mSeAP.....	202
4.4	Immuno-marquage.....	202
4.4.1	Marquage Laminine.....	202
4.4.2	Coloration P.A.S (Réactif de Schiff).....	203
4.4.3	Coloration Lugol.....	203
5.	Acquisition et analyse d'images de microscopie.....	204
5.1	Acquisition.....	204
5.2	Analyses morphométriques.....	204
6.	Statistiques.....	205
	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>206</b>
	<i>Publications</i> .....	<b>238</b>
	<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>239</b>

# ABRÉVIATIONS

<b>Aa</b>	Acide aminé
<b>AAV</b>	Virus adéno-associé
<b>ActIIB</b>	Récepteur activine IIb
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AON</b>	Oligonucléotide antisens :
<b>ARNi</b>	ARN interférence
<b>ARNm</b>	ARN messenger
<b>B10</b>	Souris C57BL/10ScSn
<b>BBB</b>	Bovin Blanc Bleu Belge
<b>BEH<sup>ec</sup></b>	Berlin High mouse line compact
<b>BMD</b>	Dystrophie musculaire de Becker
<b>BrdU</b>	Bromo-desoxy-uridine
<b>CK</b>	Créatine kinase
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CS</b>	Chondroïtine sulfate
<b>Da</b>	Dalton
<b>DCN</b>	Décorine
<b>DMD</b>	Dystrophie musculaire de Duchenne
<b>DMEM</b>	Milieu essentiel minimum d'Eagle modifié par Dulbecco
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DS</b>	Dermatane sulfate
<b>EDLD</b>	Extensor Digitorum Longus droit
<b>EDLG</b>	Extensor Digitorum Longus gauche
<b>FSHD</b>	Dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>GDF</b>	Growth differentiation Factor
<b>GM</b>	Muscle gastrocnemius
<b>HEK-293</b>	Cellules embryonnaires humaines de rein clone 293
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IM</b>	Intramusculaire
<b>IP</b>	Intrapéritonéale
<b>ITR</b>	Séquences inversées répétées
<b>IV</b>	Intraveineuse
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinase
<b>k<sub>a</sub></b>	Constante d'association
<b>k<sub>d</sub></b>	Constante de dissociation
<b>LAP</b>	Latency Associated Peptide
<b>LGMD</b>	Myopathies des ceintures
<b>LH</b>	Hormone lutéinisante
<b>LRRs</b>	Leucine Rich Repeats
<b>KO</b>	Knock-out
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b><i>mdx</i></b>	Modèle murin de la maladie de Duchenne
<b><i>mh</i></b>	Muscle hypertrophy
<b>miRNA</b>	Micro ARN
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire

<b>MOI</b>	Multiplicité d'infection
<b>MS</b>	Muscle masséter
<b>MSTN</b>	Myostatine
<b>mSeAP</b>	Phosphatase alcaline sécrétée murine
<b>MyHC</b>	Myosin heavy chain
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ B
<b>QUADD</b>	Quadriceps droit
<b>QUADG</b>	Quadriceps gauche
<b>PBS</b>	Tampon Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PEI</b>	Polyéthylènimine
<b>PG</b>	Protéoglycane
<b>PS</b>	Pénicilline/streptomycine
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositide-3'-kinase
<b>RBS</b>	Rep binding site de l'ITR
<b>Rb</b>	Rétinoblastome
<b>RLU</b>	Relative light units
<b>RT-PCR</b>	PCR quantitative en temps réel
<b>SAC</b>	Stretch-activated channel
<b>SLRP</b>	Small leucine-rich proteoglycans
<b>SVF</b>	Sérum de veau fœtal
<b>T</b>	Témoin
<b>TA</b>	Température ambiante
<b>TAD</b>	Muscle tibialis antérieur droit
<b>TAG</b>	Muscle tibialis antérieur gauche
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>TLR</b>	Récepteur toll
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>TNF-R</b>	Récepteur du TNF
<b>vg</b>	Génomes viraux
<b>3'UTR</b>	Région 3' non transcrite
<b><math>\gamma</math>sg<sup>-/-</sup></b>	Souris Gamma-sarcoglycane déficiente

# INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

## Par ordre d'apparition :

Figure 1 : Bovin Blanc Bleu Belge (BBB) et le caractère culard .....	2
Figure 2 : La myostatine régule négativement la croissance musculaire chez la souris.....	4
Figure 3 : La déficience en myostatine conduit à une hypertrophie musculaire prononcée chez le chien.....	4
Figure 4 : Photographies d'un enfant déficient pour la myostatine à 6 jours (A), 7 mois (B) et 4,5 ans (C).....	5
Figure 5 : Organisation du gène de la myostatine humaine .....	6
Figure 6 : Structure et maturation de la forme précurseur de la myostatine en dimère actif .....	6
Figure 7 : Expression de la protéine myostatine dans différents muscles squelettiques de souris C57/BL6J .....	8
Figure 8 : Voie de signalisation Smads activée par la myostatine.....	10
Figure 9 : Les différentes voies de signalisation induites par la liaison de la myostatine à son récepteur .....	11
Figure 10 : Inhibition de la prolifération de myoblastes C2C12 (A) et de myoblastes primaires (B) par la myostatine.....	13
Figure 11 : Effet de la myostatine sur la progression du cycle cellulaire de cellules C2C12 ..	13
Figure 12 : Modèle expliquant le rôle de la myostatine sur la prolifération cellulaire.....	14
Figure 13 : La surexpression de la myostatine inhibe la formation des myotubes dans les cellules C2C12 .....	15
Figure 14 : Modèle de la régulation de la prolifération et de la différenciation myogénique..	15
Figure 15 : Pourcentage de noyaux positifs au BrdU chez des souris de MSTN <sup>+/+</sup> et MSTN <sup>-/-</sup> de 4, 6 et 24 sem.....	17
Figure 16 : Modèle de la régulation négative du stock de maintien des cellules satellites par la myostatine.....	17
Figure 17 : Mutations de la myostatine et conséquences sur la croissance musculaire .....	18
Figure 18 : Chez la souris MSTN <sup>-/-</sup> , la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTor/FoxO1 contribue à l'hypertrophie musculaire.....	20
Figure 19 : Composition en type de fibre de muscles squelettiques de souris sauvage et de souris MSTN <sup>-/-</sup> .....	22
Figure 20 : Truite transgénique déficiente pour la myostatine.....	24
Figure 21 : Les différentes voies d'inhibition de l'activité de la myostatine .....	25
Figure 22 : Conséquence du blocage de la myostatine par le propeptide sur la croissance musculaire de la souris <i>mdx</i> .....	27
Figure 23 : Illustration schématique de la forme Msnt-ant1 tronquée.....	28
Figure 24 : La stratégie ant-MSTN permet une meilleure régénération du muscle lacéré.....	29
Figure 25 : Comparaison d'une souris C57BL/6 contrôle et d'une souris C57BL/6 transgénique sur-exprimant la follistatine .....	30
Figure 26 : Comparaison d'une souris C57BL/6 contrôle et d'une souris C57BL/6 transgénique sur-exprimant une forme dominante négative pour le récepteur Activin IIB .....	31
Figure 27 : Représentation schématique de l'approche antimyostatine ACE-031 .....	33
Figure 28 : Augmentation de la force musculaire chez la souris <i>mdx</i> suite à l'injection de propeptide MSTN.....	34
Figure 29 : Structure et organisation d'un protéoglycane .....	36
Figure 30 : Localisation des PGs .....	37
Figure 31 : Schéma simplifié de la biosynthèse et de la dégradation des PGs .....	38

Figure 32 : Représentation schématique de la MEC du cartilage .....	39
Figure 33 : Les domaines structuraux des SLRPs.....	40
Figure 34 : Analyse phylogénétique et organisation chromosomique des 5 classes de SLRPs humains.....	40
Figure 35 : Structure et organisation protéique des SLRPs.....	41
Figure 36 : Illustration de l'association de la décorine avec les fibrilles de collagène.....	42
Figure 37 : Structure du gène de la décorine humaine et des 2 transcrits DCN.....	42
Figure 38 : Structure de la protéine décorine .....	43
Figure 39 : Assemblage de l'amorce tétra-saccharidique des chaînes de GAG et extension vers les voies de biosynthèse des CS/DS.....	44
Figure 40 : Modélisation de la structure de la décorine humaine et d'une triple hélice de collagène de type I .....	45
Figure 41 : Structure du Décoron.....	46
Figure 42 : Le domaine de liaison au zinc a été localisé dans le domaine N-terminal de la décorine.....	47
Figure 43 : Le zinc est nécessaire à la décorine pour interagir avec différentes protéines .....	47
Figure 44 : Expression de l'ARNm de décorine au cours du temps dans le muscle squelettique de rats .....	48
Figure 45 : Localisation de la décorine dans le muscle squelettique de rat .....	49
Figure 46 : Augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique de la décorine chez la souris <i>mdx</i> .....	50
Figure 47 : Niveaux d'ARNm de décorine dans le muscle masséter (MS) et tibialis antérieur (TA) chez des souris <i>mdx</i> de 2, 3 et 4 semaines.....	51
Figure 48 : Schéma simplifié de l'interaction entre les molécules de collagène et décorine...	52
Figure 49 : La décorine active la voie de signalisation PI3K/Akt par interaction avec le récepteur IGF-1R et conduit à des réponses types cellulaires spécifiques .....	53
Figure 50 : Effet de la décorine sur la différenciation cellulaire.....	54
Figure 51 : La décorine stimule la différenciation <i>in vitro</i> .....	55
Figure 52 : Comparaison par Western blot de l'expression de différents facteurs chez des cellules CD exprimant la décorine et des cellules C2C12 témoins.....	55
Figure 53 : Modèle de l'effet potentiel de la décorine sur la différenciation cellulaire et la régénération musculaire.....	56
Figure 54 : La surexpression de la décorine promeut la prolifération des myoblastes C2C12	57
Figure 55 : La surexpression de la décorine retarde la sortie des cellules du cycle cellulaire et stimule la formation de myotubes .....	58
Figure 56 : La décorine régule l'activité du TGF- $\beta$ durant la différenciation du muscle squelettique.....	59
Figure 57 : Expression de l'ARNm de décorine (A) et de myostatine (B) au cours du temps dans le muscle squelettique de rats .....	62
Figure 58 : Localisation de la décorine et de la myostatine dans le muscle squelettique tibialis antérieur de foetus de rat de 18 jours.....	63
Figure 59 : Analyses Western blot de la myostatine et de la décorine dans le muscle masseter et le tibialis antérieur de souris <i>mdx</i> mâles de 2, 3 et 4 semaines .....	63
Figure 60 : Localisation de la myostatine et de la décorine dans le muscle masseter et tibialis antérieur de souris <i>mdx</i> mâles de 4 semaines .....	64
Figure 61 : Analyses de résonance plasmonique de surface de l'interaction de la décorine (A) et du core protéique de décorine (B) avec la myostatine en fonction de la concentration de Zn <sup>2+</sup> .....	65
Figure 62 : Analyses de résonance plasmonique de surface de l'interaction entre la myostatine et différentes concentration de décorine (A) et de core protéique de décorine (B) .....	66

Figure 63 : La décorine bloque l'effet inhibiteur de la myostatine sur la prolifération de cellules C2C12 .....	67
Figure 64 : La surexpression de la décorine atténue l'activité de la myostatine endogène synthétisée par les myoblastes C2C12.....	68
Figure 65 : La décorine bloque les effets de la myostatine dans les fibroblastes PP1 et les myoblastes C2C12 .....	69
Figure 66 : Etat et cicatrisation d'un muscle contrôle ou traité à l'IGF-1 et/ou à la décorine, 4 semaines après une blessure par lacération .....	70
Figure 67 : Le traitement à la décorine entraîne un surplus de force permettant de restaurer les capacités fonctionnelles d'un muscle lacéré.....	71
Figure 68 : Analyses de résonance plasmonique de surface de l'interaction entre la myostatine et différentes concentrations de fibromoduline (A), de keratocan (B) et de biglycan.....	71
Figure 69 : Immunomarquages de la dystrophie dans le muscle d'une souris saine B10 (A) et d'une souris <i>mdx</i> (B).....	72
Figure 70 : Analyses histologiques d'un quadiceps de souris sauvage et de souris $\gamma$ -sarcoglycane <sup>-/-</sup> .....	74
Figure 71 : Insertion d'un gène d'intérêt dans un vecteur AAV .....	76
Figure 72 : Suivi de l'activité de la myostatine par la production de luciférase. ....	81
Figure 73 : Inhibition de l'activité de la myostatine par la mDécorine dans des cellules 293T. ....	82
Figure 74 : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 31-71 mDCN dans des cellules 293T. ....	84
Figure 75 : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 31-71 mDCN muté dans des cellules 293T. ....	85
Figure 76 : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 31-61 mDCN dans des cellules 293T. ....	86
Figure 77 : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 42-71 mDCN dans des cellules 293T. ....	87
Figure 78 : Inhibition de l'activité de la MSTN par le peptide 31-71 hDCN dans des cellules 293T. ....	88
Figure 79 : Caractérisation de la quantité saturante de myostatine. ....	89
Figure 80 : Etudes de l'interaction directe entre la myostatine et les peptides 31-71 mDCN biotine (en présence et absence de zinc) et le peptide 31-71 mDCN muté biotine.....	90
Figure 81 : Comparaison du TAG/EDLG injecté mDCN avec le TAD/EDLD contrôle. ....	92
Figure 82 : Prise de poids des souris <i>mdx</i> suite à l'injection de mDécorine dans le TAG. ....	93
Figure 83 : Coupes HPS des TAG (injecté mDécorine) et TAD (Témoin) de la souris <i>mdx</i> N°1. ....	93
Figure 84 : Analyse morphométrique de coupes laminines de TAG (injecté mDCN) et TAD (contrôle) de la souris <i>mdx</i> N°1.....	94
Figure 85 : Données d'hyperplasie chez la souris <i>mdx</i> suite à l'injection de mDécorine (TAG). ....	95
Figure 86 : Données d'hypertrophie chez la souris <i>mdx</i> suite à l'injection de mDécorine (TAG).....	95
Figure 87 : Comparaison des largeurs (A) et des surfaces (B) moyennes des fibres musculaires ( $\mu\text{m}^2$ ) entre un TAG injecté mDCN et un TAD contrôle. ....	96
Figure 88 : Paramètres d'hypertrophie chez la souris <i>mdx</i> suite à l'injection de mDécorine (TAG).....	96
Figure 89 : Cinétique de l'effet de la mDécorine chez la souris <i>mdx</i> . ....	98
Figure 90 : Structure du complexe Sarcoglycane - .....	99

Figure 91 : Coupes HPS d'un TAG (injecté mDCN) et d'un TAD (Témoin) de souris Gamma-sarcoglycan <sup>-/-</sup> .....	100
Figure 92 : Prise de poids, hyperplasie et hypertrophie chez la souris gamma-sarcoglycan <sup>-/-</sup> suite à l'injection de mDécorine (TAG).....	101
Figure 93 : Comparaison du TAG5 et TAD5 18 jours après injection du peptide 31-71 mDCN.....	102
Figure 94 : Coupes HPS du muscle TAG1 injecté avec 40 µg (A) et 65 µg (B) de peptide 31-71 mDCN et de son contrôle TAD.....	103
Figure 95 : Représentation graphique des prises de poids, d'hyperplasie et d'hypertrophie constatés lors d'une injection de peptide 31-71 chez la souris <i>mdx</i> .....	104
Figure 96 : Comparaison de la surface et du nombre de fibres musculaires du TAG6 injecté peptide 42-71 mDCN (gris clair, courbe rouge) et du TAD6 témoin (gris foncé, courbe orange).....	106
Figure 97 : Photographie d'un EDL gauche injecté mDCN et d'un EDL droit témoin.....	108
Figure 98 : Myoblastes non traités.....	113
Figure 99 : Myoblastes 24h après avoir été mis en contact avec 30 µg de mDCN.....	113
Figure 100 : Myotubes témoins.....	114
Figure 101 : Myotubes 24 h après avoir été traité avec 30 µg de mDCN.....	114
Figure 102 : Voie de signalisation d'Akt.....	115
Figure 103 : Voie de signalisation d'Akt et de GSK-3.....	116
Figure 104 : Western Blots Akt-P, Akt-T et tableau avec valeurs normalisées.....	117
Figure 105 : Western Blots GSK-P, GSK-T et tableau avec valeurs normalisées.....	118
Figure 106 : Résultats de Western Blot pour Akt-P, Akt-T et tableau avec valeurs normalisées.....	119
Figure 107 : Résultats de Western Blot pour GSK-P, GSK-T et tableau avec valeurs normalisées.....	120
Figure 108 : Effets de la mDCN sur la synthèse de glycogène à différents temps après injection.....	122
Figure 109 : Marquage Shiff du TAG9 injecté avec de la mDCN et d'un TAD9 contrôle, 33 jours après injection.....	122
Figure 110 : Suivi du taux de glycogène suite à l'injection de mDCN.....	123
Figure 111 : Marquage Shiff d'un TAG injecté 65 µg de peptide 42-71 mDCN et de son TAD contrôle latéral, 20 jours après injection.....	123
Figure 112 : Coloration Lugol d'un TAG injecté avec le peptide 42-71 mDCN et d'un TAD contrôle.....	124
Figure 113 : Suivi des niveaux de mSeAP dans le sang.....	126
Figure 114 : Alignement de séquences de la partie N-terminale des SLRPs.....	128
Figure 115 : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 69-101 Fmod dans des cellules HEK293T.....	129
Figure 116 : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 69-101 Fmod biotine et 69-101 Fmod biotine muté dans des cellules HEK293T.....	130
Figure 117 : Etude de l'interaction entre les peptides 69-101 Fmod, 69-101 Fmod muté et la MSTN.....	131
Figure 118 : Coupes HPS des muscles TAG (injecté peptide Fmod) et TAD Témoins de souris <i>mdx</i> .....	132
Figure 119 : Evaluation du potentiel d'inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 54-86 bBiglycan dans des cellules HEK293T.....	134
Figure 120 : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 30-62 mLumican dans des cellules HEK293T.....	135

Figure 121 : Test d'inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 62-94 mPRELP dans des cellules HEK293T.....	136
Figure 122 : Structure secondaire de la décorine bovine et localisation du domaine contenant le cluster de cystéines - Cn3D 4.1 (A) et Swiss-Pdb Viewer 4.02 (B). ....	138
Figure 123 : Prédiction de structure des peptides 31-71 mDCN (A) et 31-71 mDCN muté (B). ....	139
Figure 124 : Modèle théorique du peptide 31-71 mDCN - Réalisé avec Pymol. ....	139
Figure 125 : Structures tridimensionnelles des peptides 31-71 mDCN (A) et 31-71 mDCN muté (B). ....	140
Figure 126 : Structure tridimensionnelle du peptide 54-86 bBiglycan.....	140
Figure 127 : Photographie (dorsale et ventrale) du TAG6 injecté 25 µg de pGG2-MSTN tronquée / 35 µl NaCl 150 mM après 19 jours de traitement et du contrôle TAD6. ....	143
Figure 128 : Coupes HPS du TAG6 injecté 25 µg de pGG2-MSTN tronquée / 35 µl NaCl 150 mM après 19 jours de traitement et du contrôle TAD6. ....	144
Figure 129 : Comparaison du TAD3 (flèche rouge) 18 jours après injection de la construction pGG2-MSTN tronquée / propeptide muté et du TAG3 contrôle. ....	146
Figure 130 : Coupes HPS de TAD injecté avec 25 µg de pGG2-MSTN tronquée – propeptide muté / 35 µl NaCl 150 mM après 18 jours de traitement et du contrôle TAG injecté 35 µl NaCl 150 mM.....	146
Figure 131 : Photographies des TAG/TAD des 5 souris <i>mdx</i> impliquées dans l'étude. ....	148
Figure 132 : Schéma des 2 cassettes AAV. ....	149
Figure 133 : Inhibition de l'activité de la myostatine par l'AAV1-MSTN tronquée et l'AAV1-mDCN.....	150
Figure 134 : Augmentation moyenne de la masse corporelle de souris <i>mdx</i> après 31 jours de traitement. ....	151
Figure 135 : Photographie de la patte gauche d'une souris <i>mdx</i> témoin (à gauche) et de la patte gauche d'une souris <i>mdx</i> injectée AAV1-MSTN tronquée (à droite). ....	151
Figure 136 : Photographie des TAG5/TAD5 (A) et TAG6/TAD6 (B : face dorsale, C : face ventrale) suite au traitement de 31 jours par AAV1-MSTN tronquée dans le TAG. ....	152
Figure 137 : Photographie (A : face dorsale, B : face ventrale) des quadriceps gauche et droit de la souris N°4 suite au traitement de 31 jours par AAV1-MSTN tronquée dans le TAG. .	152
Figure 138 : Structure de la décorine murine et définition du domaine d'interaction avec la myostatine.....	159
Figure 139 : Digestions contrôles (HindIII/BamH1) de 8 clones pGL3-(CAGA) <sub>12</sub> -Luc.....	171
Figure 140 : Oligonucléotides utilisés pour le séquençage de la construction pGL3-(CAGA) <sub>12</sub> -Luc. ....	171
Figure 141 : FastPrep FP 12. ....	177
Figure 142 : Résultat de la migration électrophorétique de la mMSTN tronquée. ....	179
Figure 143 : Principe du « TA Cloning ». ....	180
Figure 144 : Le Nanodrop. ....	181
Figure 145 : Carte plasmidique (Vector NTI 11) de la construction pCR2.1-Topo mMSTN tronquée. ....	181
Figure 146 : Digestions contrôles de la construction pCR2.1-Topo mMSTN tronquée. ....	182
Figure 147 : Carte plasmidique (Vector NTI 11) du vecteur pGG2. ....	183
Figure 148 : Purification de l'insert mMSTN tronquée suite à la digestion par les enzymes EcoRV et BamH1.....	183
Figure 149 : Digestion du vecteur pGG2 suite à la digestion par les enzymes EcoRV et BamH1 .....	183
Figure 150 : Digestions contrôles de la construction pGG2-mMSTN tronquée.....	184
Figure 151 : Principe et étapes de la mutagenèse dirigée. ....	185

Figure 152 : Digestions contrôles de la construction pGG2-mMSTN tronquée / propeptide muté par les enzymes BamHI et EcoRV. ....	187
Figure 153 : Résultats du séquençage de la construction pGG2-mMSTN Tronquée / propeptide muté. ....	187
Figure 154 : La construction pGG2-mDCN. ....	187
Figure 155 : Amplification et purification de la mDécorine. ....	189
Figure 156 : Double digestion du vecteur pGG2 par les enzymes BamHI et XhoI. ....	189
Figure 157 : Digestions BamHI/XhoI et PstI/NotI des clones 1 et 2. ....	190
Figure 158 : Exemple de résultat obtenu en « dot blot ». ....	192
Figure 159 : Schéma de la technique d'électrotransfert appliquée au muscle. ....	195
Figure 160 : Dispositif expérimental de mesure des propriétés mécaniques du muscle isolé. ....	197
Figure 161 : Secousse musculaire. ....	197
Figure 162 : Myogramme des tests <i>in vitro</i> sur muscle isolé. ....	198
Figure 163 : Dispositif complet du Dynamomètre. ....	200
Figure 164 : Fixation de l'axe tibial au dispositif Dynamomètre et application de l'électrode bipolaire provoquant la contraction musculaire. ....	201

Tableau 1 : Tableau des caractéristiques des fibres musculaires ....	21
Tableau 2 : Interaction entre la décorine et la myostatine et entre le core protéique de décorine et la myostatine. ....	65
Tableau 3 : Etudes <i>in vivo</i> de l'effet de la mDécorine chez la souris <i>mdx</i> . ....	92
Tableau 4 : Etude de la cinétique de l'effet de la mDécorine chez <i>mdx</i> . ....	97
Tableau 5 : Prise de poids, hyperplasie et hypertrophie chez des souris <i>mdx</i> à J7, J14, J21 et J33 suite à l'injection de mDCN dans le TAG. ....	97
Tableau 6 : Etude de l'effet de la mDécorine chez la souris gamma-sarcoglycan <sup>-/-</sup> . ....	99
Tableau 7 : Données de prise de poids, d'hyperplasie et d'hypertrophie chez les 4 souris gamma-sarcoglycan <sup>-/-</sup> suite à l'injection de mDécorine (TAG). ....	100
Tableau 8 : Etude de l'effet du peptide 31-71 mDCN chez la souris <i>mdx</i> . ....	102
Tableau 9 : Prise de poids, hyperplasie et hypertrophie chez des souris <i>mdx</i> suite à l'injection de peptide 31-71 mDCN (40 ou 65 µg dans le TAG). ....	104
Tableau 10 : Etude de l'effet des peptides 31-61 et 42-71 mDCN sur la croissance musculaire chez des souris <i>mdx</i> . ....	105
Tableau 11 : Prise de poids, hyperplasie et hypertrophie chez des souris <i>mdx</i> suite à l'injection de peptide 31-61 mDCN (souris 2 à 4) et de peptide 42-71 mDCN (souris 5 à 7). ....	105
Tableau 12 : Injection de peptide 31-71 mDCN muté dans le TAG de souris <i>mdx</i> . ....	106
Tableau 13 : Résultats des différents tests de force suite à l'injection de mDCN dans l'EDLG. ....	108
Tableau 14 : Résultats des tests de force suite à l'injection de peptide 31-71 mDCN dans l'EDLG. ....	109
Tableau 15 : Résultats des différents tests de forces réalisés sur la loge gauche. ....	111
Tableau 16 : Protocole <i>in vivo</i> permettant d'évaluer l'effet de la mDécorine sur la prise de greffe. ....	126
Tableau 17 : Protocole <i>in vivo</i> pour évaluer l'effet du peptide 69-101 Fmod chez la souris <i>mdx</i> . ....	131
Tableau 18 : Effets de l'injection intramusculaire de 50 µg de peptide Fmod sur les muscles. ....	132
Tableau 19 : Alignement des séquences des différents peptides. ....	137

Tableau 20 : Alignement des séquences de la décorine murine et de la décorine bovine.....	138
Tableau 21 : Etude de l'efficacité de la construction pGG2-MSTN tronquée chez <i>mdx</i> après injection IM. ....	142
Tableau 22 : Résultats <i>in vivo</i> obtenus après administration de pGG2-MSTN tronquée. ....	143
Tableau 23 : Etude de l'efficacité de la construction pGG2-MSTN tronquée / propeptide muté chez <i>mdx</i> . ....	145
Tableau 24 : Effets de la stratégie MSTN tronquée - propeptide muté sur la croissance musculaire de souris <i>mdx</i> de 6 semaines. ....	147
Tableau 25 : Protocole <i>in vivo</i> de l'efficacité de la cassette pGG2-mDCN sur la croissance musculaire de souris <i>mdx</i> . ....	147
Tableau 26 : Résultats obtenus avec la cassette pGG2-mDCN chez <i>mdx</i> . ....	148
Tableau 27 : Etude de l'efficacité des AAV1-MSTN tronquée et AAV1-mDCN chez la souris <i>mdx</i> . ....	150
Tableau 28 : Résumé des résultats <i>in vivo</i> obtenu avec les 2 stratégies AAV1. ....	153
Tableau 29 : Prise de poids et moyennes de poids des quadriceps et du muscle cardiaque. ..	153
Tableau 30: Mix reverse transcriptase. ....	178
Tableau 31 : Composition du MIX PCR « mDCN ». ....	188
Tableau 32 : Sondes et amorces de Q-PCR. ....	193
Tableau 33 : Titre obtenu pour les 2 productions AAV1. ....	193

## PREFACE

Ce manuscrit de thèse a pour but de présenter les travaux effectués sur différents régulateurs positifs de la croissance musculaire chez un modèle dystrophique murin.

En 1997, des mutations dans le gène de la myostatine (MSTN) sont montrées comme responsables du caractère culard - c'est-à-dire un phénotype hypermusclé - chez le bovin. L'inactivation de ce membre de la famille des *Transforming Growth Factor* (TGF) a ensuite été montré comme conduisant à une augmentation de la masse musculaire médiée par des phénomènes d'hypertrophie et/ou d'hyperplasie chez d'autres espèces, y compris chez l'Homme. L'identification de ce facteur et des conséquences de son invalidation sur le développement musculaire a ainsi ouvert de nombreuses perspectives en médecine humaine, notamment chez les personnes atteintes de myopathies, de cachexie ou encore de sarcopénie. Au cours de la dernière décennie de nombreuses approches anti-myostatine ont été développées et des essais cliniques de phase I/II ont été conduits.

La décorine (DCN), membre de la famille des *Small Leucine Rich Proteoglycan* (SLRP), est un petit protéoglycane, composant de la matrice extracellulaire (MEC), que l'on retrouve principalement dans la peau, les os et le muscle squelettique. Cette métalloprotéine liant le zinc, joue un rôle important dans l'organisation de la MEC. De plus, selon le contexte musculaire, la décorine peut, suite à la séquestration du TGF- $\beta$  dans la MEC, promouvoir la prolifération et la différenciation cellulaire et permettre la myogenèse. En 2006, Miura et al. montrent que la DCN interagit avec la myostatine de façon dose et zinc dépendante et qu'elle présente *in vitro* la capacité de contrecarrer les effets négatifs de la myostatine sur la croissance cellulaire. Enfin, une étude *in vivo* a montré que le traitement d'un muscle lacéré de souris sauvage avec de la DCN aboutissait à de l'hypertrophie et hyperplasie musculaire corrélées à un surplus de force.

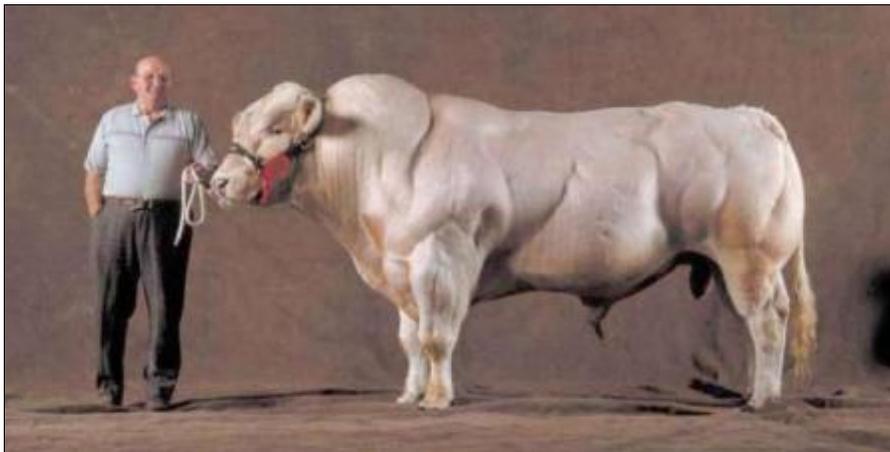
A la connaissance de ces éléments, nous avons décidé d'évaluer l'action de la décorine comme régulateur positif de la masse musculaire dans un contexte dystrophique. A travers différentes études *in vitro* et *in vivo* chez la souris *mdx* et *gamma-sarcoglycan*<sup>-/-</sup>, nous avons souhaité caractériser la relation DCN-MSTN et nous avons étudié le potentiel thérapeutique de la décorine.

# **INTRODUCTION**

## 1. La myostatine

### 1.1 Le caractère culard

Depuis sa première description par Culley en 1807, le caractère culard, une augmentation généralisée de la masse des muscles squelettiques, a été observé chez plusieurs races de bovins [1, 2]. Tantôt considéré comme une tare congénitale, tantôt comme un caractère économiquement avantageux, c'est dans la race bovine Blanc Bleu Belge (BBB) que ce caractère a probablement été le plus intensivement sélectionné (Fig. 1).



**Figure 1 :** Bovin Blanc Bleu Belge (BBB) et le caractère culard - D'après builtreport.com.

Ces animaux diffèrent de leurs congénères « normaux » tant au niveau anatomique, que physiologique et biochimique. La différence anatomique la plus notable est une augmentation de la masse musculaire au niveau de la région proximale des membres : 20,7% pour les quartiers avant (8,4 à 51,4% pour les muscles individuels), 22,7% pour les quartiers arrière (9,1 à 33,8% pour les muscles individuels) et 18,7% pour le mono-costal (septième côte) [3]. Cette augmentation globale de la masse musculaire est principalement liée à un nombre accru de fibres musculaires (hyperplasie) et non à une augmentation de leur taille (hypertrophie). Une étude faite sur le muscle semi-tendineux de quatre races bovines montre que ce muscle contient deux fois plus de fibres musculaires chez le BBB que chez les trois autres races étudiées (German Augys, Galloway et Holstein-Friesian). L'augmentation du nombre de fibres musculaires est due à une prolifération plus importante des cellules de seconde génération correspondant aux fibres rapides glycolytiques (fibres de type IIb) au cours de la vie fœtale [4]. En conséquence de cette plus grande proportion de fibres de type IIb, dites « blanches », et d'une faible teneur de leurs muscles en collagène [5, 6], les bovins culards présentent une viande maigre, pâle et tendre [7]. En outre, la viande des bovins culards présente une moindre flaveur du fait de faibles dépôts de gras intramusculaire [5]. Il est à noter que cette importante augmentation de la masse musculaire s'accompagne d'une

réduction de la masse de tous les autres organes, à savoir la peau (19,7%), les os (de 2,9 à 9,6%), la graisse (21,5% pour la graisse péri-rénale) et les organes internes (de 9,8% pour les glandes surrénales à 51,1% pour le thymus). Une réduction des dimensions de la carcasse (longueur, profondeur de la poitrine, hauteur et largeur du bassin) est également observée [8].

Les différences remarquées sur le plan biochimique sont une diminution de la créatine plasmatique et musculaire, de l'hématocrite, des taux plasmatiques de LH (*Luteinizing Hormone*) et de la testostérone jusqu'à l'âge de un an, ainsi que de l'insuline et des taux musculaires en hydroxyproline et en lipides totaux. Au contraire, les bovins culards font état d'une augmentation de la créatinine plasmatique et d'un meilleur indice de conversion alimentaire. Au niveau physiologique, les bovins culards présentent une fatigabilité accrue à l'effort et une grande susceptibilité aux maladies respiratoires ainsi qu'une fertilité réduite. En outre, le recours à la césarienne est quasi systématique en raison non seulement de la conformation du veau mais aussi d'une réduction de la taille de la filière pelvienne chez la mère.

Malgré ces caractéristiques défavorables, les spécificités anatomiques rendent le caractère culard économiquement plus rentable pour la production de viande en comparaison d'une race conventionnelle.

## 1.2 Locus *mh*, GDF-8 et myostatine

En 1985, Hanset et Michaux démontrent, suite à des croisements en retour de femelles F1 (BBB X Holstein) avec des mâles BBB et d'appréciations purement quantitatives du phénotype, que le caractère culard est dû à un gène majeur autosomal, caractérisé par un allèle sauvage « + » et un allèle « *mh* » récessif [9]. Le locus *mh* (*muscle hypertrophy*) fut ensuite localisé sur l'extrémité subcentromérique du chromosome 2 bovin à l'aide d'études de liaison génétique au moyen de 213 marqueurs microsatellites [10].

En 1997, McPherron et al. [11] démontrent, à l'aide d'études de KO (*knock-out*) chez la souris, que l'inactivation du gène myostatine (MSTN), un facteur de croissance de la famille des TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ), induit un phénotype hyper-musclé (Fig. 2) comparable au caractère culard observé chez les bovins BBB. Ce phénotype est lié à la fois à une hyperplasie et une hypertrophie des fibres musculaires. La localisation du gène de la myostatine et celle du locus *mh*, tous deux liés au chromosome 2, a été montrée par fluorescence et hybridation *in situ*, comme identique [12].



**Figure 2** : La myostatine régule négativement la croissance musculaire chez la souris - D'après McPherron et al., 1997.

Fig. 2A : Comparaison entre une souris sauvage (à gauche) et une souris myostatine déficiente (à droite). Fig. 2B : Muscle antérieur de souris sauvage. Fig. 2C : Muscle antérieur de souris  $MSTN^{-/-}$ .

De nombreuses mutations entraînant la perte de fonction de la myostatine et associées à une hypertrophie musculaire ont été décrites par la suite chez les bovins [1, 12, 13, 14, 15]. Ces mutations « perte de fonction » ont été identifiées dans les 3 exons de la région codante du gène de la myostatine [12, 16, 17]. Ces dernières correspondent à des délétions telles que la délétion nt8212(del111) de 11 paires de bases des nucléotides dans l'exon 3 du gène de la MSTN des bovins BBB, ou encore des changements d'acides aminés tels que la mutation de C313Y dans l'exon 3 du gène de la myostatine de vaches Piémontaise et Gasconne. Ces mutations conduisent à la synthèse d'une forme tronquée ou d'une forme complète non fonctionnelle de myostatine qui, dans les 2 cas, est dépourvue de son effet négatif sur la croissance musculaire.

D'autres mutations du gène de la myostatine chez d'autres espèces ont également été recensées. En 1998, Szabo et al., identifient une délétion dans le gène de la myostatine de souris « compact », alors sélectionnées pour leur masse musculaire et leur haute teneur en protéines [17]. Plus récemment, des mutations « perte de fonction » de la MSTN ont été décrites chez le chien [18] (Fig. 3), le mouton [19, 20] ou encore le porc [21, 22].



**Figure 3** : La déficience en myostatine conduit à une hypertrophie musculaire prononcée chez le chien - D'après itthing.com.

Fig. 3A : Lévrier Whippet déficient MSTN. Fig. 3B : Lévrier Whippet déficient MSTN (en noir) et normal (marron).

En 2004, Schuelke et al. ont décrit le cas d'un enfant présentant une hypertrophie musculaire très prononcée (Fig. 4), conséquence d'une mutation homozygote dans la séquence du gène myostatine [23]. Cette mutation ( $g \rightarrow a$ ) du gène de la myostatine conduit à la synthèse d'une protéine MSTN tronquée et non fonctionnelle. Aujourd'hui âgé de 5 ans et demi, l'enfant ne présente ni retard mental ni problèmes cardiaques et fait état d'un métabolisme très actif et d'une masse musculaire de 40% supérieure à celle d'un enfant du même âge. En outre, l'enfant déficient pour la myostatine présente peu de graisse et fait preuve d'une force remarquable puisqu'il est capable de porter des poids de 3 kilos à bout de bras (Fig. 4).



**Figure 4** : Photographies d'un enfant déficient pour la myostatine à 6 jours (A), 7 mois (B) et 4,5 ans (C) - D'après Schuelke et al., 2004 (A, B) et axolot.info (C).

Ainsi, le caractère culard découle de mutations induisant une perte de fonction de la myostatine. Ce régulateur négatif de la croissance musculaire, que l'on retrouve principalement dans les muscles squelettiques, le cœur et les tissus gras, est très conservé chez différents mammifères.

### 1.3 La myostatine : un membre de la famille des TGF- $\beta$

#### 1.3.1 Le gène

Le gène de la myostatine, est localisé sur le chromosome 2 chez l'Homme [15] et le bovin [12, 24] et sur les chromosomes 15 chez le porc [25], 7 chez le poulet [26], 1 chez la souris [17] et 9 et 22 chez le zebafish [27, 28]. Caractérisé chez de nombreuses espèces de vertébrés par Rodgers et Garikipati en 2008 [29], le gène de la myostatine, long de 7,3 Kb chez l'Homme, présente une même organisation faite de 3 exons et de 2 introns (Fig. 5).

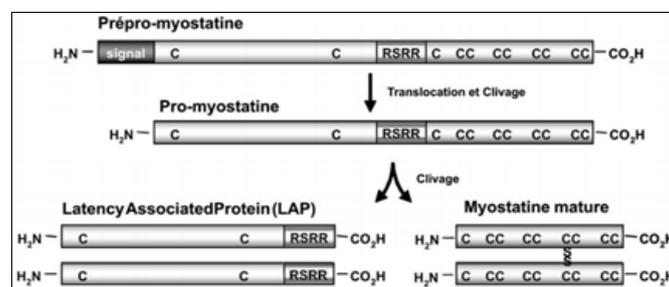


**Figure 5 :** Organisation du gène de la myostatine humaine - D'après Patel et Amthor, 2005.

Il est à noter que l'espacement entre les 2 introns, de 2 Kb, est conservé chez les vertébrés supérieurs tels que l'Homme, la souris et le poulet et que le haut niveau de conservation du gène de la myostatine chez les vertébrés n'est pas seulement observable dans la séquence codante mais également dans l'organisation elle-même du gène.

### 1.3.2 La protéine

La myostatine est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif de 376 acides aminés (52 kDa) comprenant une courte séquence signal amino-terminale pour la sécrétion (24 acides aminés), un pro-peptide de 243 acides aminés représentant environ 70% de la protéine totale non mature et une région carboxy-terminale qui est la région bioactive de la MSTN (codée par l'exon 3 ; Fig. 6). Cette dernière région présente 9 résidus cystéines, hautement conservés chez les membres de la famille des TGF- $\beta$ , permettant la formation d'une structure dimérique. Six de ces 9 cystéines forment 3 ponts disulfures intramoléculaires conférant une structure tridimensionnelle caractéristique des TGF- $\beta$  : le nœud de cystéines permettant l'homodimérisation.



**Figure 6 :** Structure et maturation de la forme précurseur de la myostatine en dimère actif - D'après Chelh et al., 2009.

Des études d'alignements des séquences protéiques de la myostatine ont permis de montrer que la protéine était globalement bien conservée au cours de l'évolution [30]. Le domaine bioactif de la myostatine présente un haut degré de conservation, de l'ordre de 88%, entre les séquences protéiques de la myostatine humaine et de celle du poisson, et est décrit par McPherron et Lee comme extraordinairement bien conservé chez toutes les espèces de vertébrés [1]. En effet, la séquence protéique du domaine carboxy-terminal est parfaitement identique chez l'Homme, la souris, le rat, le porc, le poulet et la dinde et ne présente que trois différences avec celle du babouin, du bovin et du mouton. Il est à noter que la partie pro-peptide est nettement moins bien conservée entre les espèces.

Le précurseur de la MSTN subit plusieurs clivages protéolytiques (Fig. 6) afin que la forme active de la myostatine soit libérée.

- Un premier clivage permet l'élimination du peptide signal de 24 aa, ce dernier contrôlant la sécrétion du précurseur inactif.
- Un second clivage protéolytique au niveau du site RSRR, 110 aa en amont du COOH-terminal, permet via la furine, une protéase de la famille des subtilisines, de libérer le domaine carboxy-terminal du pro-peptide amino-terminal N-glycosylé (26 kDa). Le domaine carboxy-terminal, alors sous la forme d'un homodimère, est le ligand biologiquement actif.
- Suite à ces deux clivages, le dimère de peptide inactif et le pro-peptide restent liés de manière non covalente sous la forme d'un complexe latent inactif (LAP) de 40 kDa. Une dégradation protéolytique du pro-peptide est nécessaire pour libérer la myostatine mature. *In vitro*, ce clivage est assuré par des métalloprotéinases de la famille des BMP-1/TLD (*bone morphogenetic protein-1/tolloid*) qui clivent le pro-peptide entre l'arginine 75 et l'asparagine 76, provoquant ainsi la dissociation du complexe latent pro-peptide/dimère actif [31]. Ce mécanisme a récemment été confirmé *in vivo* par Lee [32]. Ce troisième et dernier clivage protéolytique permet donc la libération de la myostatine mature (26 kDa) se présentant sous la forme d'un dimère.

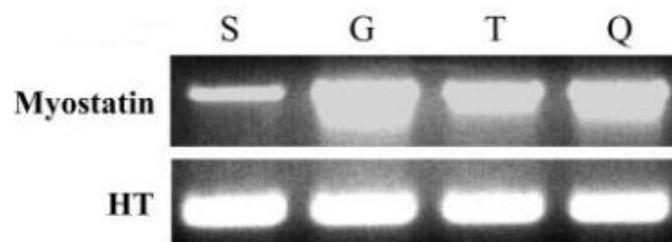
### 1.3.3 Expression et localisation

L'expression de la myostatine, contrairement à la majorité des gènes codants pour les membres de la famille des TGF- $\beta$ , n'est pas ubiquitaire mais essentiellement restreinte au muscle squelettique [11, 33, 34]. On retrouve également un faible taux d'expression de la myostatine dans le tissu adipeux [11] ou encore dans le cœur de la souris et de mouton [34] où seule la forme non mature de la protéine est détectée.

Chez la souris, le transcrite de myostatine est détecté dans le myotome, au niveau des somites, dès neuf jours et demi de gestation. On retrouve donc de la myostatine dans les muscles au cours du développement embryonnaire. Ce facteur reste détectable, bien que faiblement, au stade adulte où le transcrite de myostatine est essentiellement confiné au muscle squelettique. Chez le bovin, l'expression de la MSTN est détectable, très faiblement, à partir de 16 jours de gestation et augmente à partir de 30 jours [1] au moment de la mise en place des premières générations de cellules musculaires [35]. L'expression de la myostatine connaît un pic à 90-110 jours de gestation et se maintient ensuite à un niveau peu élevé au cours du dernier tiers de gestation [36, 37], caractérisé par une importante phase de différenciation contractile et métabolique. Après la naissance, l'expression de la myostatine chute à un niveau très faible [17]. Chez le bovin [36, 37] mais également chez le porc [33] et le poulet [38], l'expression de ce gène est donc régulée au cours de la myogenèse et semble chuter avec la différenciation

myogénique, ce qui est cohérent avec la présence, dans le promoteur de la myostatine, de séquences consensus pour des éléments de contrôle tels que les boîtes E qui sont des sites de fixation de facteurs myogéniques ou encore des séquences de fixation du complexe AP-1 ou MEF-2 [39, 16].

De nombreuses études réalisées par Mendler et al., [40], Kocamis et al., [41], Rios et al., [42] et Deveaux et al., [37] ont montré qu'*in vitro*, le gène de la myostatine n'était pas ou très faiblement exprimé lors de la prolifération cellulaire. L'expression de ce gène augmente lors de la différenciation de cellules C2C12 et atteint un pic trois jours après induction, au moment de la fusion des myoblastes [40, 41]. Ce pic d'expression est observé lors du processus de fusion de cellules satellites ou en culture primaire de myoblastes fœtaux [41, 37], l'abondance des transcrits chutant ensuite avec la progression de la différenciation. A ce stade, l'expression n'est jamais localisée dans les myotubes matures [37], ce qui est cohérent avec les travaux *in vivo* avançant une chute de l'expression pendant la différenciation terminale. *In vitro*, l'expression du gène de la myostatine est donc transitoire et sa diminution est consécutive à l'entrée en différenciation. Afin de localiser l'expression du gène de la myostatine, des expériences d'hybridation *in situ* ont été conduites par Ji et al., en 1998 [33] et Deveau et al., en 2003 [37]. Chez le fœtus bovin, les ARN messagers myostatine sont détectés dans les cellules myogéniques exprimant des isoformes de chaîne lourde de myosine (MyHC). Il est à noter que l'on ne retrouve ces transcrits d'ARNm myostatine que dans les cellules les plus en retard dans leur différenciation contractile [37]. En fin de vie fœtale, l'expression est restreinte aux fibres de type IIa [37]. Chez le porc [33] et les rongeurs, l'expression du gène myostatine est plus élevée dans les muscles rapides que dans les muscles lents [43, 44], avec une corrélation positive entre le nombre de fibres exprimant les isoformes de MyHC IIb et l'expression de ce gène [43, 45]. Comme le présente la *figure 7*, on retrouve un taux de protéine myostatine plus important dans les muscles à fort taux de fibres de types IIb tels que le gastrocnemius (G), tibialis antérieur (T) et quadriceps (Q) que dans le muscle solaire (S) composé en grande partie de fibres musculaires de type I [46].



**Figure 7** : Expression de la protéine myostatine dans différents muscles squelettiques de souris C57/BL6J - D'après Allen et al., 2006.

La myostatine présente donc une expression différente selon les espèces, le type de muscle mais aussi le stade de développement de l'animal. De plus, selon Mendler et al., [40] et Sakuma et al. [47], la distribution tissulaire des transcrits et de la protéine serait différente. Différentes études comme celles de Gonzalez-Cadavid et al., [15] et Wehling et al., [44] présentent des résultats contradictoires concernant l'abondance de la protéine selon le type de fibres. Ces conclusions contradictoires peuvent cependant être expliquées par l'utilisation d'anticorps qui peuvent reconnaître d'autres membres de la famille TGF- $\beta$  tels que GDF11 (90% d'homologie avec la myostatine au niveau du domaine carboxy-terminal) [1].

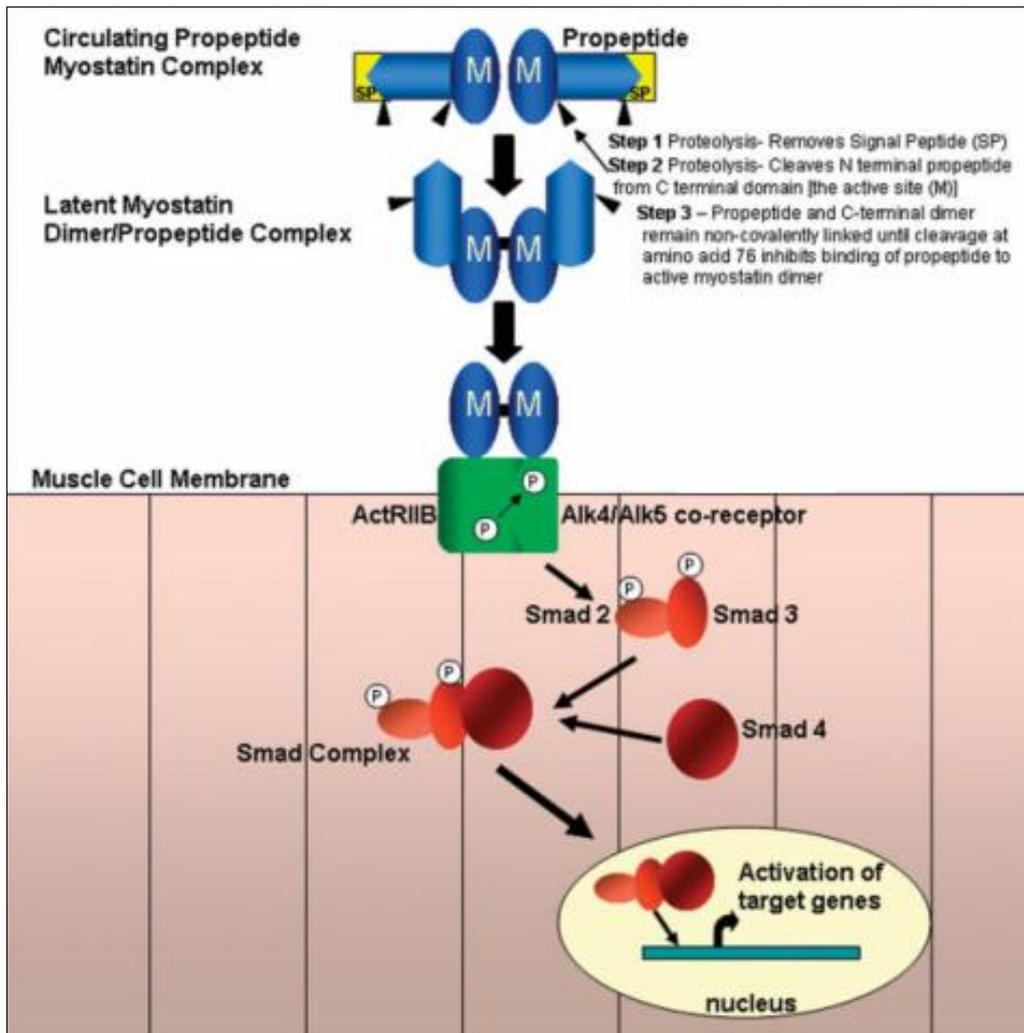
Un Western blot réalisé à partir d'une culture de myoblastes primaires différenciés de bovin montre que l'anticorps anti-myostatine reconnaît deux formes : la protéine entière immature majoritaire et la forme latente (40 kDa), alors qu'un western blot réalisé sur une biopsie de muscle squelettique de bovin met en évidence la forme latente et la myostatine mature majoritaire [48]. Ces observations poussent Thomas et al. à conclure que la myostatine est synthétisée et activée par protéolyse dans les myoblastes et que le peptide mature est ensuite secrété dans la circulation. Des études analogues ont été réalisées sur myoblastes primaires de bovins et myoblastes C2C12, en prolifération et en différenciation. Dans les myoblastes en différenciation, la forme immature est majoritaire alors qu'en prolifération, les formes dominantes de myostatine sont les versions mature et latente, ce qui confirme une régulation des différentes formes de myostatine au cours de la myogenèse.

#### 1.4 Myostatine : voies de signalisation et mécanismes

Les voies de signalisation de la myostatine ont été largement étudiées au cours de ces dernières années et peuvent être divisées en 2 groupes : la voie de signalisation médiée par les Smads et d'autres voies de signalisation faisant intervenir les MAPKinases.

##### 1.4.1 Voie de signalisation des Smads

Il a été montré qu'*in vitro*, suite à la formation du dimère de myostatine et aux 3 clivages protéolytiques permettant la libération du dimère actif de MSTN, la myostatine se fixait aux récepteurs activine de type IIA (ActRIIA) et IIB (ActRIIB) avec une plus grande affinité pour ce dernier type [49, 50]. Comme le présente la *figure 8*, la liaison de la myostatine à ActRIIB entraîne la phosphorylation et l'activation d'un récepteur activin-like kinase ALK (4 ou 5) ou récepteur de type I, ces derniers propageant le signal en phosphorylant des protéines Smad, notamment Smad 2 et Smad 3 [51, 52]. A l'état phosphorylé, ces protéines interagissent avec Smad 4 pour former des complexes Smad 2/4 et Smad 3/4 pouvant réguler l'expression de nombreux gènes tels que Akt, mTor ou encore la myogénine [53, 54].

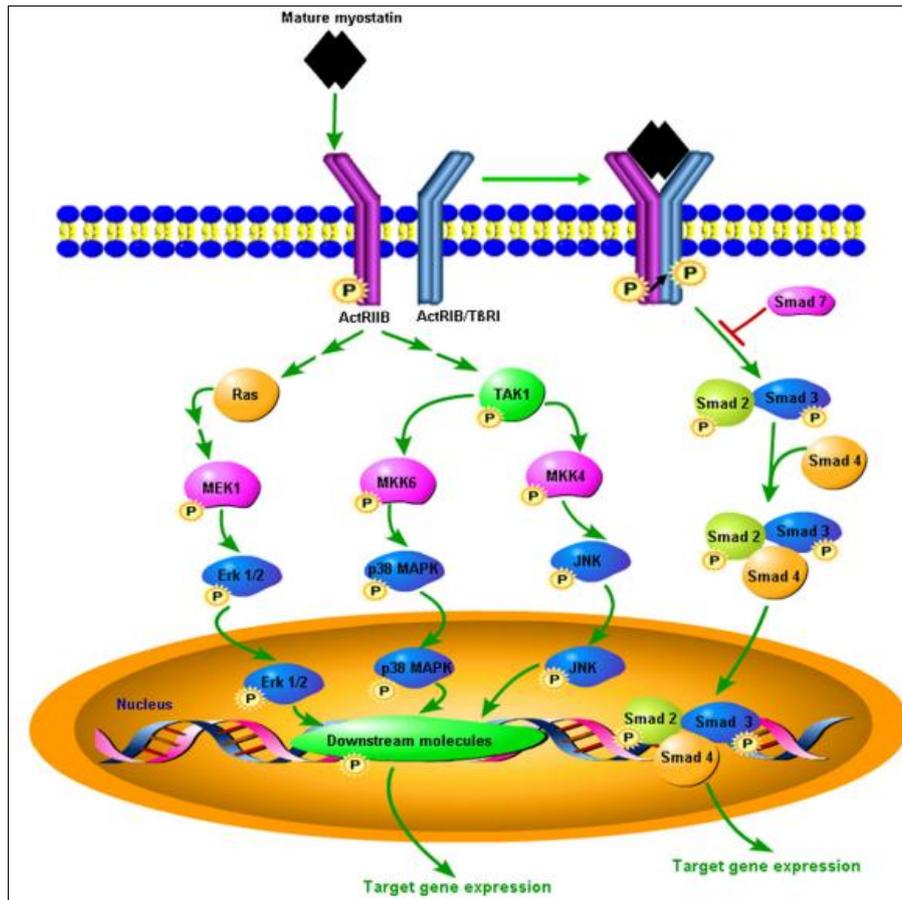


**Figure 8 :** Voie de signalisation Smads activée par la myostatine - D'après Rodino-Klapac et al., 2009.

Cette voie de signalisation peut être inhibée par Smad 7, un I-Smad pouvant s'associer avec le récepteur de type I et empêcher ainsi la phosphorylation de Smad 2 et Smad 3 [55] et par la même, toute la cascade précédemment décrite. Ainsi, il existe un inhibiteur de la signalisation induite par la myostatine [56, 57].

#### 1.4.2 Voie de signalisation MAPK/ERK1/2

Au-delà de la voie impliquant les Smads, d'autres voies de signalisation ont été montrées comme participant à la transduction du signal de la myostatine (Fig. 9) :



**Figure 9 :** Les différentes voies de signalisation induites par la liaison de la myostatine à son récepteur  
 - D'après Chen et al., 2011.

- Des études *in vitro* ont démontré l'implication de la voie de signalisation des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) dans les effets inhibiteurs de la myostatine sur la croissance [58, 59, 60, 61]. En 2005, Philip et al. découvrent que la myostatine peut activer la protéine p38, une MAPK, et apparaît alors comme indépendante de la voie de signalisation des Smads. En réalisant un traitement par un dominant négatif de MKK6, une kinase en amont de p38 ou par l'inhibiteur de p38 SB203580, il a été montré que l'activation de la transcription induite par la myostatine était inhibée. Philip et al. ont également montré que l'inhibition de la prolifération induite par la myostatine est liée à une régulation positive de la kinase inhibitrice des cyclines p21 induite par p38 MAPK. Ainsi, p38 joue un rôle important dans les fonctions inhibitrices de la croissance musculaire de la MSTN [58].
- En 2006, alors que la voie de signalisation Ras/Mek/Erk1/2 est décrite comme participant à la différenciation myogénique [59], Yang et al. mettent en avant le rôle des protéines Erk1/2, kinases de la famille des MAPKinases, dans la signalisation de la myostatine. Il est démontré que les protéines Erk1/2 sont suffisantes pour réprimer

la myogenèse lorsqu'elles sont sur-exprimées. Sur cellules C2C12 différenciées ou en prolifération, l'ajout de myostatine conduit à une forte activation d'Erk1/2 (x10). La kinase Mek1 en amont d'Erk1/2 est également activée par la myostatine (x3) et l'inhibition de Ras par un rétrovirus sur-exprimant une forme dominante négative de Ras (Ras17N) conduit, en présence de myostatine, à une réduction dramatique du niveau de phosphorylation basal d'Erk1/2. L'inhibition de Ras a donc permis un blocage de l'inhibition de la prolifération par MSTN. En utilisant un siRNA ciblant l'ARNm du récepteur ActRIIB, les auteurs ont montré qu'Erk1/2 n'était plus activé en présence de myostatine. Ces données suggèrent donc que le récepteur ActRIIB est crucial dans l'inhibition de la différenciation cellulaire par la myostatine médiée par activation de la voie Ras/Mek/Erk1/2.

- En 2007, Huang et al. montrent que la myostatine peut activer la voie de signalisation JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) dans des cellules C2C12 en prolifération et en différenciation [60]. En effet, à l'aide d'un siRNA ciblant l'ARNm du récepteur activine IIB, l'activation de la voie JNK est significativement réduite, indiquant que le récepteur ActRIIB est nécessaire pour une activation de JNK par la MSTN.

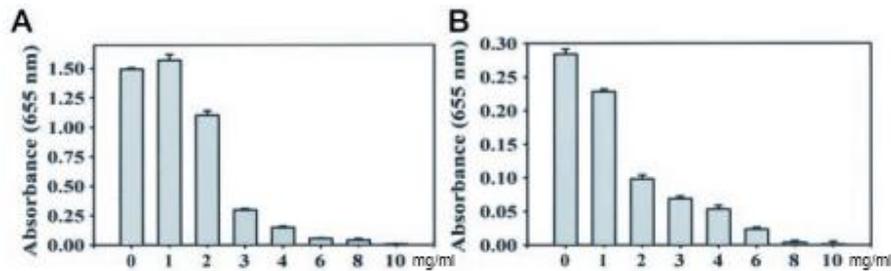
Comme nous venons de le décrire et comme le résume la *figure 9*, la transduction du signal de la myostatine est complexe et emprunte de multiples voies de signalisation.

## 1.5 Champs d'action de la myostatine

### 1.5.1 Myostatine et régulation de la prolifération cellulaire

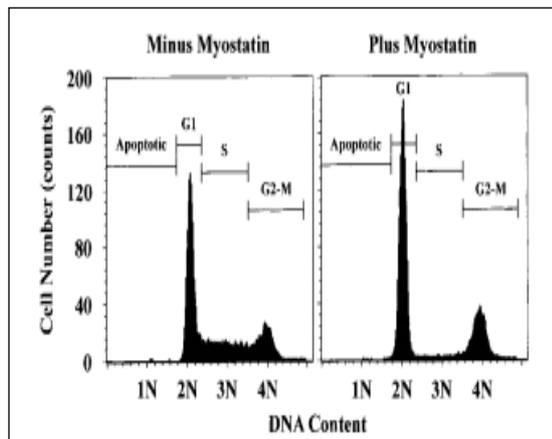
Comme nous l'avons précédemment vu, les différentes mutations du gène de la myostatine conduisent à une importante augmentation de la masse musculaire chez le bovin, la souris mais aussi chez l'Homme. Le caractère hyper-musclé constaté chez le bovin a été principalement décrit comme étant dû à un phénomène d'hyperplasie. Parce que cette augmentation du nombre de fibres musculaires chez un animal déficient en myostatine pourrait découler d'une importante activation de la prolifération cellulaire, de nombreuses études concernant le rôle de la myostatine dans ce processus ont été menées.

Les travaux de Thomas et al. ont mis en évidence les effets de la MSTN sur la prolifération [48]. Pour réaliser cette étude, des cultures de myoblastes ont été mises en présence de différentes concentrations de myostatine pendant 72 h et la prolifération cellulaire a ensuite été mesurée. Comme le présente la *figure 10*, plus la quantité de myostatine ajoutée aux myoblastes est importante et plus la prolifération est faible. La myostatine permet donc d'inhiber la prolifération cellulaire et ce de façon dose dépendante.



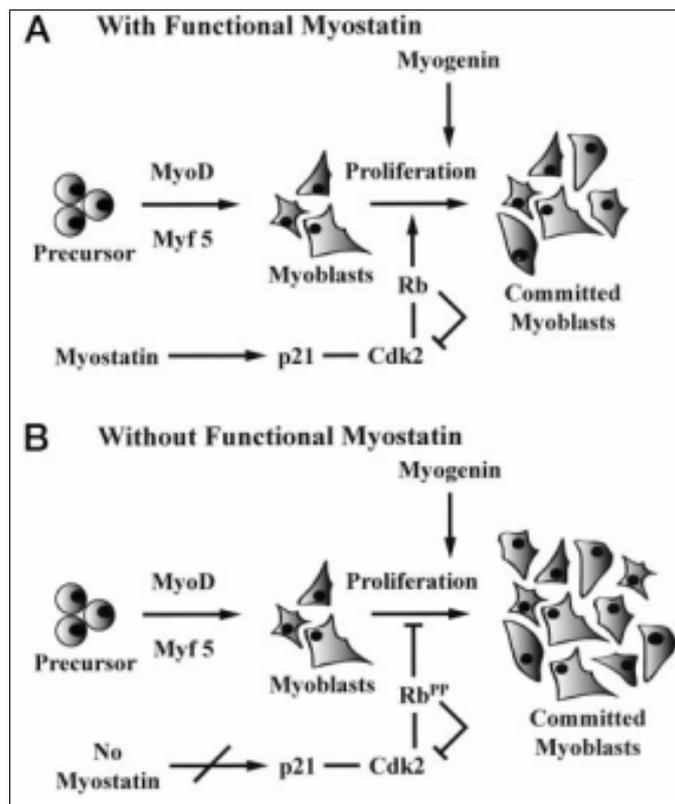
**Figure 10 :** Inhibition de la prolifération de myoblastes C2C12 (A) et de myoblastes primaires (B) par la myostatine - D'après Thomas et al., 2000.

La myostatine pourrait contrôler le nombre de myoblastes soit par régulation de la progression du cycle cellulaire, soit par apoptose. A l'aide du test TUNNEL, technique permettant de marquer les extrémités 3'OH laissées libres par les ADN fragmentés lors de l'apoptose, les auteurs ont pu montrer que suite à l'ajout de MSTN, la diminution du nombre de myoblastes n'était pas due à un phénomène d'apoptose. En étudiant par cytométrie en flux la répartition des myoblastes dans les différents stades du cycle cellulaire, il a été montré que suite à l'ajout de myostatine, les cellules C2C12 étaient majoritairement bloquées en phase G1 et que ces dernières n'entraient pas en phase S de synthèse d'ADN (Fig. 11). De plus, la myostatine affecte la progression des myoblastes à la phase G2-M.



**Figure 11 :** Effet de la myostatine sur la progression du cycle cellulaire de cellules C2C12 - D'après Thomas et al., 2000.

Thomas et al. ont aussi montré que la MSTN augmentait p21, régulateur de la progression des cellules de la phase G1 à S [48], ce qui conduit à une inactivation du complexe CyclinE-Cdk2 entraînant une hypo-phosphorylation de la protéine Rb qui est décrite comme pouvant se lier et réprimer l'activité de certains facteurs de transcription tels que le complexe hétérodimérique E2FzDP. La transcription des gènes de la phase S n'est donc pas active, ce qui a pour conséquence de maintenir les cellules myoblastes en phase de stase G1. Le modèle présenté à la figure ci-dessous indique que l'augmentation du nombre de fibres musculaires (hyperplasie) observée chez les bovins BBB et les souris  $MSTN^{-/-}$  est la résultante d'une augmentation de la prolifération des myoblastes.



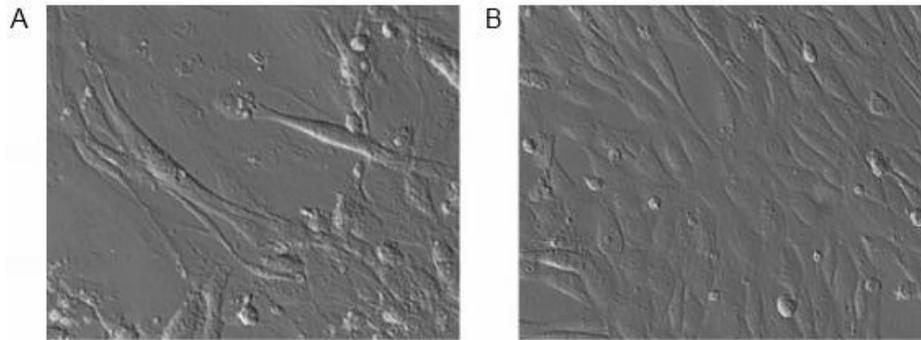
**Figure 12 :** Modèle expliquant le rôle de la myostatine sur la prolifération cellulaire - D'après Thomas et al., 2000.

Ces premiers résultats concernant les effets induits par la myostatine sur la prolifération cellulaire ont été confirmés par différents autres travaux (Taylor et al. [62] et Rios et al [42]).

### 1.5.2 Myostatine et régulation de la différenciation cellulaire

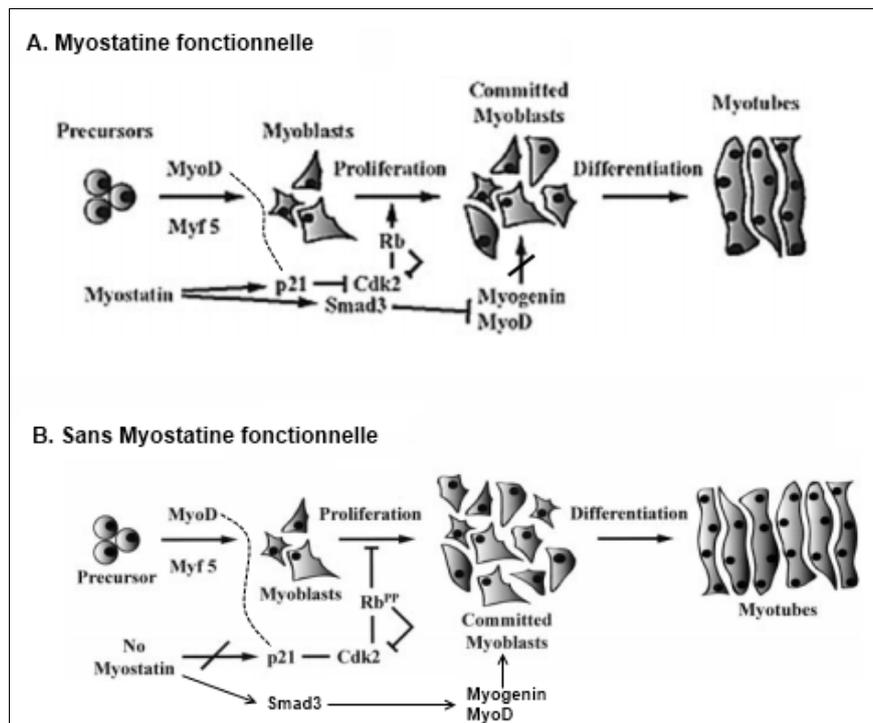
Durant la myogenèse, processus conduisant en plusieurs étapes à la formation des tissus musculaires [63, 64], différents facteurs de croissance tels que le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), TGF (*Transforming Growth Factor*) ou encore des facteurs de transcription spécifiques du muscle tels que MyoD, Myf5, myogénine interviennent. Différentes études ont été menées afin de déterminer le rôle potentiel et l'implication de la myostatine lors de ce processus de formation des tissus musculaires.

En 2002, Rios et al. démontrent que la transfection stable de l'ADNc de myostatine murine dans des cellules murines C2C12 inhibe la formation de myotubes multinuclées et réduit les niveau d'ARNm de MyoD et de myogénine [65]. Comme le présente la *figure 13*, la transfection du plasmide pcDNA-MSTN pendant cinq jours dans du milieu de différenciation conduit à la suppression de la formation de myotubes multinuclées (Fig. 13B) en comparaison d'un échantillon transfecté dans les mêmes conditions avec un plasmide contrôle où l'on peut observer la fusion des myoblastes en myotubes (Fig. 13A).



**Figure 13 :** La surexpression de la myostatine inhibe la formation des myotubes dans les cellules C2C12 - D'après Rios et al., 2001.

A l'aide d'études de RT-PCR, il a été montré que la surexpression de la MSTN conduisait à la réduction des ARNm de MyoD et de la myogénine et que cette réduction était réversible par inhibition de la MSTN. En 2002, Langley et al. ont confirmé la diminution du niveau d'expression de MyoD et de la myogénine lors d'une surexpression de la myostatine en précisant que Myf5, facteur de transcription impliqué dans l'initiation et le maintien de la différenciation musculaire, voyait également son niveau d'expression chuter [51].



**Figure 14 :** Modèle de la régulation de la prolifération et de la différenciation myogénique – D'après Langley et al., 2002 et Thomas et al., 2000.

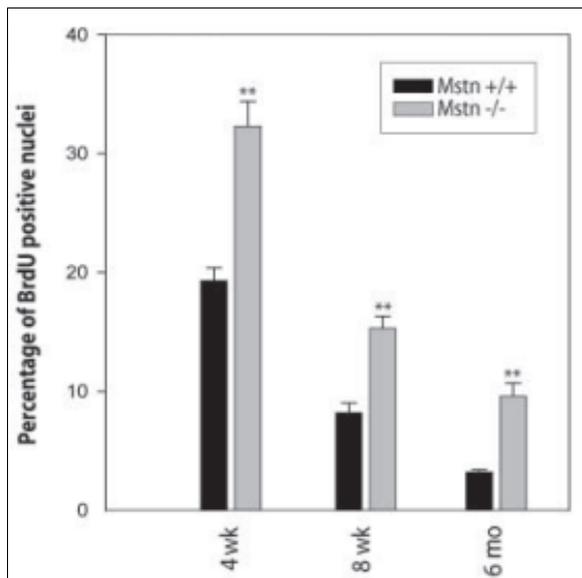
Comme nous l'avons précédemment décrit, l'expression de p21 est augmentée par la myostatine exogène dans les cultures de myoblastes en phase de prolifération. En condition de différenciation, l'expression de p21 a été notée comme largement diminuée. Or p21 est connu

pour être directement sous le contrôle de MyoD [66], ce qui confirme que l'inhibition de la différenciation par la myostatine agit par une baisse de l'expression de MyoD. La diminution de MyoD, initiée par Smad3, va donc induire une perte de l'expression de p21 et de la myogénine, et l'incapacité pour les cellules à quitter le cycle cellulaire et à entrer en phase de différenciation. La découverte de ce mécanisme est résumée par le modèle de Thomas et al., complété par Langley et al. (Figure 14).

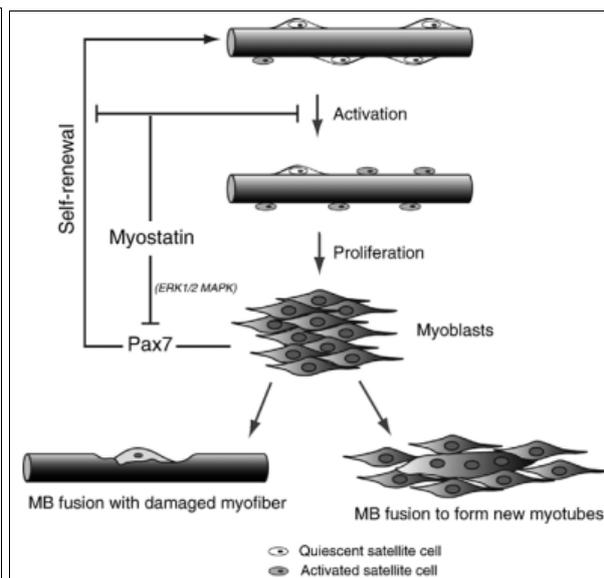
### 1.5.3 MSTN et activation des cellules satellites

Les cellules satellites sont des progéniteurs myogéniques responsables de la croissance musculaire post-natale. Ces cellules sont normalement quiescentes mais lorsqu'un muscle est endommagé, les cellules satellites sont activées, entrent dans le cycle cellulaire et expriment divers facteurs myogéniques. Il en résulte des myoblastes différenciés qui fusionnent afin de former de nouvelles myofibrilles [67]. Le nombre total de cellules satellites quiescentes reste constant au cours des cycles de dégénération/régénération, suggérant que la population de cellules satellites est maintenue par un auto-renouvellement [68, 69, 70]. De nombreux facteurs de croissance tels que les HGFs (*Hepatocyte growth factors*) [71] et les FGFs (*Fibroblast growth factors*) [72] ont été décrits comme affectant la croissance musculaire post-natale par contrôle de l'activation des cellules satellites. L'absence de myostatine conduit à une hypertrophie et à une augmentation de la croissance musculaire post-natale, deux phénomènes découlant de l'activité des cellules satellites [73, 74]. C'est pour cette raison qu'il a été spéculé que la myostatine régule l'activité des cellules satellites.

Suite à la découverte de la myostatine, Cornelison and Wold ont été les premiers, en 1997, à spéculer sur le fait que la myostatine était un important régulateur de l'état de quiescence des cellules satellites [75]. Trois ans plus tard, ces auteurs rapportent la présence d'ARNm de myostatine dans l'ARN total isolé de cellules satellites et assurent que lors de l'activation des cellules satellites, le niveau de myostatine est plus faible, suggérant que de forts niveaux de MSTN peuvent être impliqués dans la quiescence des cellules satellites [76]. En 2003, McCroskery et al. présentent les premiers travaux assurant qu'un défaut de myostatine chez la souris conduit à une augmentation du nombre de cellules satellites par unité de longueur de la fibre musculaire [77]. En effet, en utilisant un marquage au BrdU (*Bromo-desoxy-uridine*), ces auteurs ont constaté que chez les souris MSTN<sup>-/-</sup> un plus grand nombre de cellules satellites incorporaient du BrdU, indiquant ainsi que l'absence de myostatine conduisait à une augmentation du nombre de cellules satellites (Fig. 15). De plus, les cellules satellites issues de muscles de souris MSTN<sup>-/-</sup> migrent, prolifèrent et se différencient plus rapidement que les cellules satellites provenant des muscles d'animaux témoins. Ces données suggèrent qu'une des fonctions de la myostatine dans le tissu musculaire est donc de maintenir les cellules satellites dans un état de quiescence et de bloquer leur activation.



**Figure 15** : Pourcentage de noyaux positifs au BrdU chez des souris de  $MSTN^{+/+}$  et  $MSTN^{-/-}$  de 4, 6 et 24 sem - McCroskery et al., 2003.



**Figure 16** : Modèle de la régulation négative du stock de maintien des cellules satellites par la myostatine - D'après McFarlane et al., 2008.

Les résultats obtenus par McCroskery et al. ont été confirmés en 2005 par les travaux de Wagner et al. [78]. McFarlane et al. [79] montrent en 2007 que la myostatine - via un mécanisme impliquant Pax7 (*Paired box 7*) - régule le renouvellement des cellules satellites. A travers des études de Western blot, McFarlane et al. ont montré que la surexpression de la myostatine conduit à une chute importante du niveau d'expression de Pax7, un facteur de transcription impliqué dans le renouvellement du stock de cellules satellites [80, 81, 82]. Le modèle présenté à la *figure 16* résume les mécanismes induits par la myostatine : les précurseurs quiescents des fibres musculaires sont activés en réponse à une lésion du muscle, ce qui aboutit à une prolifération des myoblastes pouvant fusionner avec les fibres existantes ou se différencier en myotubes naissants. Une partie des myoblastes en prolifération peut retourner à l'état de cellules satellites quiescentes, maintenant ainsi constant le stock de cellules précurseurs. La myostatine agit en tant que régulateur négatif de la progression du cycle cellulaire. De hauts niveaux de MSTN dans les cellules satellites bloquent l'activation de ces cellules et maintiennent leur état de quiescence. Ce blocage se réalise via l'inhibition de l'expression de Pax7.

Pour conclure cette partie, mentionnons les résultats obtenus par Amthor et al. [83]. Après avoir vérifié, chez des souris  $MSTN^{-/-}$  et des souris  $BEH^{c/c}$  (*Berlin High mouse line compact* présentant une mutation naturelle sur le gène de la myostatine), que l'absence de myostatine conduisait à une importante hypertrophie, ces auteurs ont montré que dans le muscle EDL, le nombre de myonucléi par fibres était moins important chez les souris  $MSTN$  déficientes que chez des souris témoins. Des immunomarquages de Pax7 ont montré que les souris  $MSTN$  déficientes présentaient un niveau d'expression moins élevé de Pax7 que des souris contrôles.

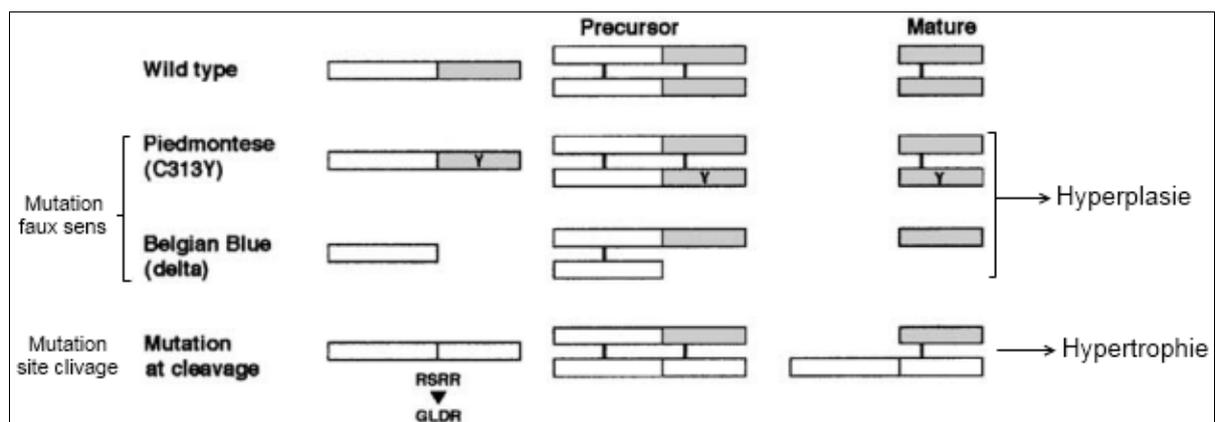
Les auteurs concluent que l'hypertrophie constatée lors d'une absence de myostatine ne requiert pas un recrutement de cellules satellites.

#### 1.5.4 MSTN, hyperplasie et régulation de la balance hypertrophie/atrophie

##### 1.5.4.1 Hyperplasie et/ou hypertrophie

Chez la vache Piémontaise, la mutation non-sens causant la substitution d'une cystéine en tyrosine au niveau de la région mature de la protéine MSTN conduit à un phénotype hypermusclé dû à une importante hyperplasie [1]. Cette observation est également faite chez le bovin Belgian Blue (BBB) où la séquence de la myostatine présente une délétion de 11 nucléotides conduisant à une mutation de type « frame-shift » [12]. En 1997, McPherron et al. montrent que le phénotype hypermusclé observé chez la souris  $MSTN^{-/-}$  est à la fois dû à une hypertrophie et à une hyperplasie - qui sont variables selon le muscle [11]. Par la suite, plusieurs études chez différents modèles murins ont permis de montrer que le phénomène d'hyperplasie ou d'hypertrophie étaient dépendant du type de mutation créé sur le gène de la myostatine. Ainsi, Nishi et al. font état, suite à la surexpression du gène de la myostatine portant la mutation faux-sens C313Y dans la région C-terminale, d'une masse musculaire deux fois supérieure à celle de souris contrôles uniquement due à une importante hyperplasie [84].

Au contraire, chez une souris sur-exprimant une myostatine présentant une altération sur le site de clivage RSRR, l'augmentation musculaire a été décrite comme étant la conséquence d'une importante hypertrophie sans qu'aucune hyperplasie ne soit observée [85].



**Figure 17 :** Mutations de la myostatine et conséquences sur la croissance musculaire - D'après Nishi et al., 2002.

Processus de maturation simplifié de la myostatine et de 2 formes mutantes. La mutation faux-sens C313Y correspond à celle trouvée naturellement chez la race bovine Piémontaise et la mutation Delta au niveau du site de clivage empêche la libération de la protéine mature.

L'hyperplasie et l'hypertrophie, au-delà d'être variables selon le type de muscles, sont donc des phénomènes qui dépendent du type de mutation présent sur le gène de la myostatine et du degré d'inhibition de l'activité de la myostatine (Fig. 17).

#### 1.5.4.2 Mécanismes impliqués dans l'hypertrophie

L'hypertrophie musculaire est caractérisée par une augmentation des diamètres des fibres musculaires ainsi que par une hausse du contenu protéique total dans ces fibres. Au contraire, un muscle atrophié est associé à une baisse de la synthèse protéique, une perte de la masse musculaire et une diminution de la taille des fibres musculaires. Une expression élevée de la myostatine a été observée lors d'une perte musculaire chez de jeunes patients immobilisés [86], mais aussi chez des adultes présentant une atrophie musculaire chronique [87], ou encore lors de la fonte des muscles due au vieillissement [88] ou en réponse à une maladie neurologique.

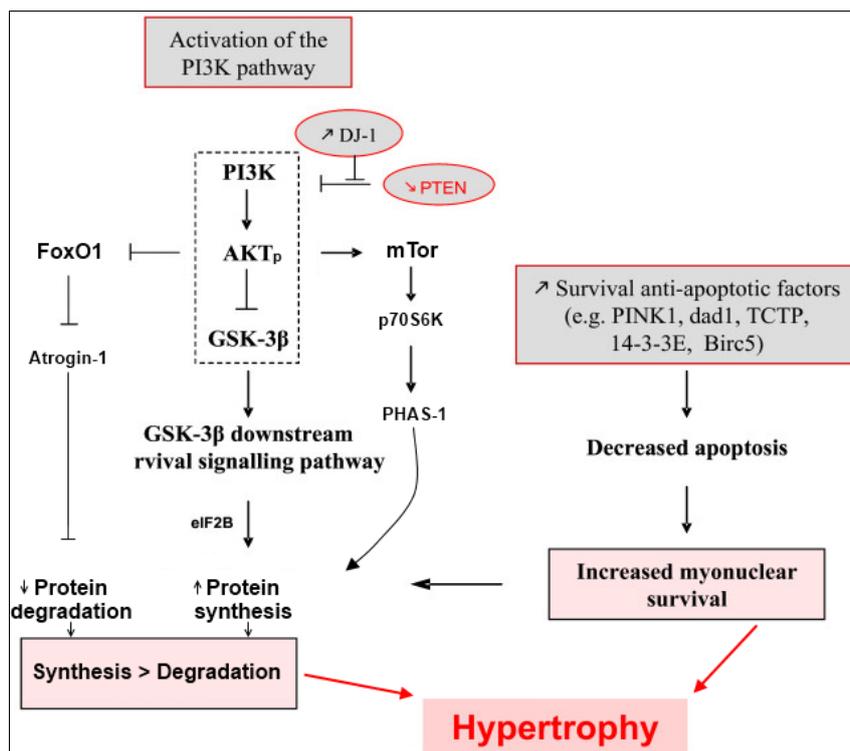
L'inhibition de la myostatine et ses conséquences en terme de signatures moléculaires (protéomes et transcriptomes) ont été décrites chez le bovin par Bouley et al., et Cassar-Malek et al., [89, 90] et chez la souris par de Steelman et al., [91] et Chelh et al., [92]. Ces travaux ont permis, d'une part, de confirmer les caractéristiques des muscles hypertrophiés telles que l'orientation glycolytique du métabolisme, la modification de la matrice extracellulaire ou encore la diminution du métabolisme lipidique intramusculaire, et, d'autre part, de révéler les cibles de la perte de fonction de la myostatine.

En 2009, Chelh et al. révèlent ainsi que l'inactivation de la myostatine est associée à une surexpression des gènes impliqués dans la conversion glycolytique des muscles. Ces mêmes auteurs ont montré que chez les souris déficientes en myostatine, la voie PI3kinase/Akt était activée [92]. Cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans la promotion de la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de la mort cellulaire [93, 94]. L'activation de la voie PI3K a été corrélée à une augmentation de la taille des fibres [95] et une activation d'Akt à l'hypertrophie musculaire [96, 97, 98]. De plus, l'activation d'Akt antagonise la perte de protéines musculaires [99]. La signalisation d'Akt fait également intervenir GSK-3 $\beta$ , mTOR et FoxO1, montrés comme étant associés aux processus d'hypertrophie/atrophie chez l'Homme [100].

L'un des effets primaires de l'inhibition de GSK-3 $\beta$  par Akt est de promouvoir la différenciation myogénique et il a été proposé que l'hypertrophie médiée par IGF impliquait une régulation négative de l'activité de GSK-3 $\beta$  [101]. En 2006, McFarlane et al. assurent que la myostatine inhibe la phosphorylation d'Akt, ce qui conduit à une augmentation des niveaux de FoxO1 - ce qui conduit à une augmentation de l'expression de différents gènes impliqués dans l'atrophie tels que l'atrogin-1 [102] permettant la dégradation de nombreux

substrats *via* le système protéolytique ubiquitine-protéasome. Chelh et al. révèlent également qu'en absence de myostatine, l'expression de plusieurs facteurs de survie cellulaire et anti-apoptotiques sont modifiée. En effet, alors que l'alpha crystallin-related B6, la protéine Heat shock 9A et PTEN - l'un des principaux régulateur négatifs de la survie cellulaire induit par PI3K - sont régulées négativement, Dad1 (*Defender against apoptotic death 1*), la survivine, et TCTP (*Translationally controlled tumor protein*), 14-3-3<sup>E</sup> sont sur-exprimés chez la souris MSTN<sup>-/-</sup>. Ces résultats suggèrent qu'en absence de myostatine, la survie cellulaire et les processus anti-apoptotiques sont augmentés.

En résumé, l'absence de myostatine conduit à une hypertrophie musculaire via une activation de la voie PI3K/Akt. L'activation de cette voie de signalisation aboutit à une augmentation de la synthèse protéique par inhibition de GSK-3 $\beta$ , à une augmentation de la survie cellulaire via des régulations positives de facteurs de survie et des régulations négatives de facteurs pro-apoptotiques et à une baisse de la dégradation protéique (par inhibition de FoxO1) (Fig. 18).



**Figure 18 :** Chez la souris MSTN<sup>-/-</sup>, la régulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTor/FoxO1 contribue à l'hypertrophie musculaire – Modifié d'après Chelh et al., 2009, McFarlane et al., 2006, Amirouches et al, 2009 et Trendelenburg et al., 2009.

Récemment, Amirouches et al., ainsi que Trendelenburg et ses collaborateurs, ont confirmé que la myostatine régulait négativement la voie de signalisation Akt/mTor [103, 104] et l'équipe d'Anne Bonniou a obtenu, en 2011, des résultats similaires à ceux obtenus par Chelh et al. [105].

### 1.5.5 La MSTN et son impact sur le type de fibres

Les myofibrilles de mammifères sont hétérogènes et présentent des propriétés morphologiques et contractiles différentes [106, 107]. Comme le détaille le *tableau 1*, plusieurs types de fibres, présentant des propriétés spécifiques, composent les faisceaux musculaires :

- Les fibres de type I sont lentes, de petite taille et d'une force faible mais elles ont une résistance à la fatigue qui est importante,
- Les fibres rapides de type IIa sont de taille, de force et de résistance intermédiaire à la fatigue,
- Les fibres rapides de type IIb sont de grande taille, de force importante et d'une résistance faible à la fatigue.

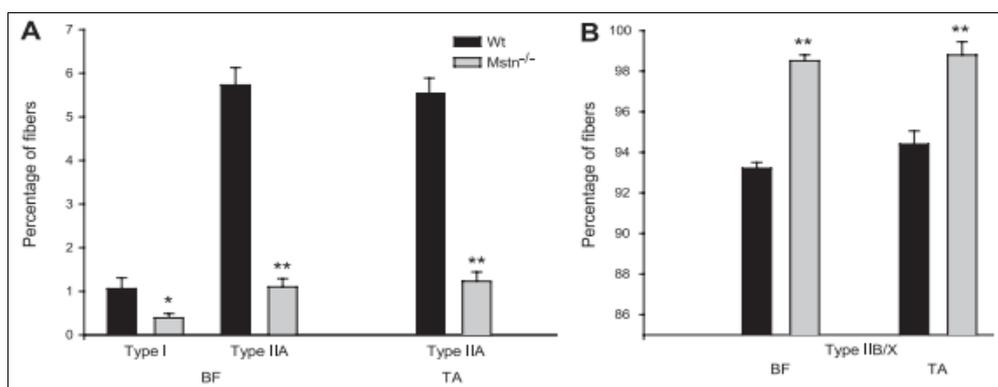
fibres	taille	force	résistance à la fatigue
LENTES ou I		 faible	 importante
IIa ↙ RAPIDES ou II		 moyenne	 moyenne
IIb ↘		 importante	 faible

**Tableau 1** : Tableau des caractéristiques des fibres musculaires - D'après Gilles Cometti.

Dans le muscle squelettique de mammifères, les fibres sont principalement classées en fibres glycolytiques ou en fibres oxydatives selon leur profil métabolique (Tableau 1). Chez la souris, les fibres rapides glycolytiques expriment l'isoforme MHC de type IIb alors que les fibres oxydatives expriment le MHC de type I (fibre lente) et le type IIa (fibres rapides). Des études ont montré que les fibres oxydatives pouvaient se transformer en fibres glycolytiques et vice et versa [108, 109]. De plus, il est à noter que les proportions et distribution de type de fibres varient en fonction des muscles [110].

En 2008, Hennebry et al. ont comparé la composition en fibres de muscles de souris *MSTN<sup>-/-</sup>* et de souris sauvage [111]. Il a été observé, dans un tibialis antérieur de souris myostatine déficiente, une diminution du nombre de fibres de type IIa (1% contre 6% dans une souris sauvage) et une augmentation (98% contre 94% dans la souris sauvage) des fibres de type IIb

(Fig. 19). Afin de vérifier le rôle de la myostatine dans la formation de fibres lentes (type I), des études immunohistochimiques ont été réalisées sur le biceps fémoral de souris sauvages et de souris  $MSTN^{-/-}$ . Comme le présente la *figure 19*, l'absence de myostatine aboutit à une baisse du pourcentage de fibres lentes (0,25% contre 1%). La diminution du nombre de fibres de type IIa et l'augmentation du nombre de fibres de type IIb/x a également été notée dans le biceps fémoral (BF) de souris déficiente en myostatine. En comparant la résistance à l'effort du biceps fémoral de souris sauvage et de souris  $MSTN^{-/-}$ , les auteurs ont constaté une résistance bien moins importante à la HFF chez la souris déficiente myostatine, indiquant une faible teneur en fibre musculaire de type I.



**Figure 19** : Composition en type de fibre de muscles squelettiques de souris sauvage et de souris  $MSTN^{-/-}$  - D'après, Hennebry et al., 2008.

A la vue de ces résultats, on peut donc conclure que l'absence de myostatine conduit à une modification de la composition en type de fibres musculaires.

### 1.5.6 Autres rôles de la myostatine.

Les différents phénotypes observés chez les bovins culards ou chez les souris déficientes en myostatine ont permis de prêter à la  $MSTN$  un rôle de régulateur de la croissance musculaire mais ont également soulevé de possibles autres implications, notamment sur le contrôle de la composition corporelle par régulation de l'ostéogenèse [112, 113, 114] et de l'adipogenèse [115, 116, 117].

### 1.6 Approches anti-myostatine : champs d'applications

L'identification de la myostatine en tant que régulateur négatif de la masse musculaire et des conséquences de son invalidation sur le développement musculaire ouvre de nombreuses perspectives en médecine humaine et dans bien d'autres domaines. Ci-dessous, une liste non exhaustive des possibles champs d'applications :

- Les maladies comme la myopathie de Duchenne ou les myopathies des ceintures telles que la LGMD (*Limb Girdle Muscular Dystrophy*) sont des maladies neuromusculaires qui conduisent à une perte progressive du muscle. En inhibant l'activité de la myostatine, montrée comme élevée chez des souris dystrophiques [118], il serait possible d'augmenter la masse musculaire et donc potentiellement d'améliorer la qualité de vie des malades. Idéalement, ce type de traitement devrait être associé à des approches telles que le saut d'exon car l'augmentation de la masse musculaire ne peut pas guérir les patients atteints de ces maladies.
- La cachexie, un affaiblissement général de l'organisme (perte de poids, atrophie musculaire), est l'une des manifestations les plus fréquentes au cours de l'évolution du Sida et de certains cancers (près de 50% des patients cancéreux présentent une cachexie) [119, 120]. Les concentrations de myostatine dans le sérum de patients atteints du Sida ont été rapportées comme anormalement hautes et inversement corrélées à l'index de masse grasseuse suggérant que le niveau de myostatine pourrait contribuer à la perte de poids constatée lors d'une infection au VIH [15]. Une diminution de l'expression de la myostatine pourrait donc, dans ce contexte, permettre de contribuer à réduire la cachexie.
- Différentes maladies nécessitent un traitement long terme avec des glucocorticoïdes. L'administration à fortes doses de ce type de médicaments peut causer des atrophies musculaires en inhibant la synthèse protéique et en activant la dégradation des protéines [121, 122]. En 2003, Ma et al. montrent que la myostatine est sur-exprimée de façon dose dépendante lors de la prise de dexaméthasone, un glucocorticoïde utilisé en médication humaine [123]. L'inhibition de l'activité de la myostatine pourrait donc réduire l'atrophie observée à la suite du traitement aux glucocorticoïdes [124].
- La vieillesse est accompagnée d'une fonte musculaire désignée sous le terme de sarcopénie. En moyenne, un homme perd environ 11 kg entre 30 et 80 ans engendrant perte de force et perte d'autonomie. Comme les travaux de Siriett et al. l'ont démontré, l'absence prolongée de myostatine permet de réduire la sarcopénie [125]. Ainsi, l'utilisation d'une stratégie anti-myostatine pourrait permettre de limiter la fonte musculaire liée à l'âge et les conséquences néfastes associées.
- Différents travaux font état d'une hausse du niveau d'expression de la myostatine chez des patients immobilisés lors de longues périodes [86]. L'utilisation ponctuelle d'une approche anti-myostatine peut donc être envisagée pour des personnes ayant eu une fonte musculaire suite à une immobilisation prolongée.

- L'implication de la myostatine dans la régulation du métabolisme du glucose [126, 127] et la résistance à l'obésité et à l'insulino-dépendance constatées chez des souris déficientes en myostatine [128, 129, 130] laissent entrevoir de nombreux espoirs pour combattre le diabète de type 2 touchant près de 90% des 347 millions de patients atteints [131].
- Le monde de l'industrie agro-alimentaire a été l'un des premiers champs d'investigation où l'Homme a su tirer avantage d'une absence de myostatine fonctionnelle. Récemment, Bradley et al. ont créé une truite transgénique déficiente pour la myostatine présentant un caractère hyper-musclé (Fig. 20). Sa croissance musculaire est de 20% supérieure à celle de ses congénères non génétiquement modifiés.

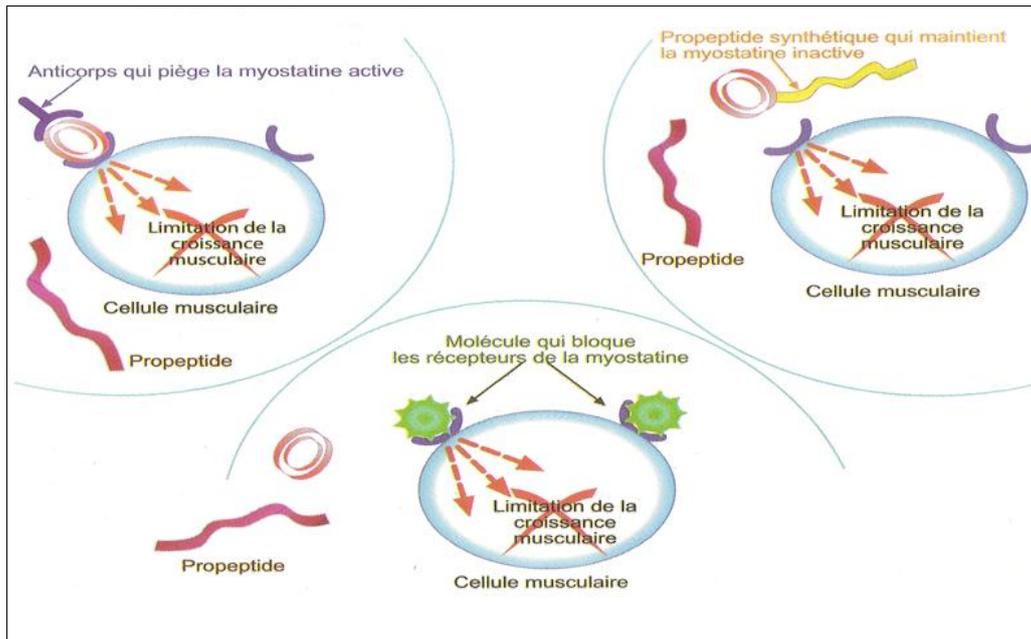


**Figure 20** : Truite transgénique déficiente pour la myostatine - D'après uri.edu.

- En 2004, Lee Sweeney pose la question du dopage génétique et par la même, de l'utilisation d'approches anti-myostatine dans le sport [132] et, de fait, des inhibiteurs de myostatine « certifiés sans effets secondaires » sont déjà en vente sur internet.

### 1.7 Les différentes stratégies anti-myostatine

Depuis la découverte en 1997 de la myostatine, de nombreux travaux visant à inhiber son activité ont été menés et ont conduit au développement de différentes stratégies anti-MSTN. Comme le présente la *figure 21*, l'activité de la myostatine peut être inhibée selon différentes voies :



**Figure 21** : Les différentes voies d'inhibition de l'activité de la myostatine - D'après afm-france.org.

Les principales approches anti-myostatine sont présentées ci-dessous :

### 1.7.1 Anticorps anti-myostatine

En 2002, Whitemore et al. présentent les résultats de l'inhibition du facteur myostatine par un anticorps chez la souris sauvage C57BL6 de 8 semaines [133]. Les auteurs démontrent que l'injection intra péritonéale d'une dose de 60 mg/kg/semaines de l'anticorps JA16 pour un traitement de 15 jours conduit à une prise de poids respective de 30 et 23% des muscles quadriceps et gastrocnemius. Une étude similaire conduite sur 4 semaines a permis de montrer que l'inhibition de l'activité de la myostatine par l'anticorps JA16 conduisait, dans l'EDL, à une prise de poids de l'ordre de 13% et une hypertrophie de 11%. Des études *in vivo* sur des souris de 24 semaines ayant reçu un traitement à l'anticorps JA16 pendant 5 semaines ont permis de montrer que cette approche anti-MSTN était également efficace chez des souris adultes ayant achevé leur croissance. Après 5 semaines de traitement à l'anticorps JA16, le quadriceps, le gastrocnemius et le triceps des 5 souris de 24 semaines ont vu leur masse musculaire respectivement croître de 13%, 11% et 12% contre 17%, 14% et 16% pour le quadriceps, le gastrocnemius et le triceps de souris âgées 8 semaines. L'ensemble de ces résultats a donc suggéré que l'inhibition de la myostatine par l'anticorps JA16 conduisait à une augmentation de la masse musculaire via un phénomène d'hypertrophie.

Bogdanovitch confirma ces premiers résultats en réalisant une étude similaire chez la souris *mdx* de 4 semaines. Un traitement de 3 mois avec l'anticorps JA16 (60 mg/kg/semaine) a permis d'obtenir une importante prise de masse musculaire du muscle EDL consécutive à une

hypertrophie [134]. De façon intéressante, la prise de poids du muscle EDL était supérieure à l'augmentation de la masse corporelle suggérant ainsi que le blocage de la myostatine permettait un meilleur effet au niveau musculaire qu'au niveau des organes de la souris *mdx*. Les auteurs ont également remarqué une baisse du taux de créatine kinase et de l'infiltration ainsi qu'une diminution de la fibrose impliquant ainsi la myostatine comme l'un des possibles facteurs responsable de la fibrose observée chez la souris *mdx*.

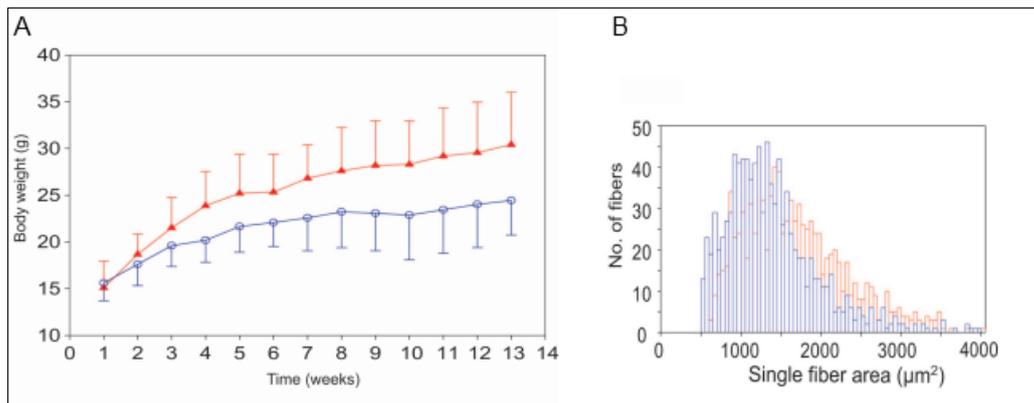
En 2008, les conclusions d'un essai clinique de phase I/II mené en 2005 et 2006 regroupant près de 116 patients atteints de dystrophie musculaire de Becker, de dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale et atteints de myopathies des ceintures, conduit avec l'anticorps monoclonal anti-myostatine MYO-029 (Wyeth Pharmaceuticals) ont été rendues publiques. Alors qu'une étude parallèle avec cet anticorps anti-myostatine avait au préalable montré une augmentation des propriétés contractiles des fibres musculaires chez 6 patients dystrophiques [135], cet essai clinique de phase I/II révéla l'incapacité de cette approche à améliorer les fonctions musculaires suite à un traitement de 9 mois et ce malgré l'évaluation de différentes doses (Cohorte 1 : 1mg/kg ; Cohorte 2 : 3mg/kg ; Cohorte 3 : 10 mg/kg ; Cohorte 4 : 30 mg/kg) [136]. Peu avant la publication des résultats, la société Wyeth Pharmaceuticals annonça mettre un terme au développement de cette approche anti-myostatine.

## 1.7.2 Dérivés de myostatine

### 1.7.2.1 Pro-peptide

Comme nous l'avons décrit précédemment aux pages 6 et 7, la maturation de la protéine myostatine se réalise en plusieurs étapes et fait intervenir différents clivages protéolytiques. Avant le troisième et dernier clivage protéolytique médié par une métalloprotéinase de la famille BMP-1/Tolloid et permettant la libération du dimère actif de myostatine mature, le pro-peptide et le domaine carboxy-terminal (forme mature) restent liés de manière non covalente pour former le LAP (*Latency Associated Peptide*).

En 2001, Ties et al. démontrent que la région propeptidique de la myostatine agit comme un inhibiteur de l'activité biologique de la MSTN [52]. Ces premières conclusions sont confirmées par Yang et al. qui observent, en 18 semaines, une augmentation du poids de la carcasse (48%) de souris transgénique sur-exprimant le pro-peptide de la myostatine [137]. Lee et McPherron ont constaté qu'une souris transgénique sur-exprimant le propeptide de la MSTN conduit à une importante augmentation de la masse musculaire via des phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie [138]. De nombreux autres travaux confirmèrent l'efficacité de l'approche anti-MSTN par le propeptide (Fig. 22) [139, 140].



**Figure 22 :** Conséquence du blocage de la myostatine par le propeptide sur la croissance musculaire de la souris *mdx* - D'après Bogdanovich et al., 2005.

A : Comparaison des courbes de croissances (poids du corps) pour la souris *mdx* injectée propeptide-Fc 10 mg/kg/semaine (courbe rouge) et pour la souris *mdx* contrôle peptide-Fc (courbe bleue). B : Représentation graphique de la répartition du nombre de fibres musculaires et de leur surface moyenne en  $\mu\text{m}^2$  pour la souris *mdx* injectée propeptide-Fc 10 mg/kg/semaine (histogramme rouge) et pour la souris *mdx* contrôle peptide-Fc (histogramme bleu).

### 1.7.2.2 Pro-peptide muté

En 2003, Wolfman et al. ont montré que le résidu Asp en position 76 était nécessaire pour observer une libération de la forme active de la myostatine. En réalisant une mutation D76A (remplacement de l'asparagine par une alanine en position 76) de ce site de clivage, une forme mutante du pro-peptide, résistante au clivage par les BMP-1/TLD metalloprotéinases, pu être développée [141].

Ce pro-peptide muté fut étudié *in vitro* et montré comme équivalent en terme d'efficacité d'inhibition à la stratégie pro-peptide non muté de la myostatine. Une étude chez la souris adulte BalB/c fut ensuite réalisée : une injection de 10 mg/kg/semaine de pro-peptide muté (D76A) conduisit à une prise de masse de l'ordre de 18-27%, soit près du double d'un traitement avec 60 mg/kg/semaine d'anticorps JA16 (10-16%). Il est à noter qu'une dose équivalente de 10 mg/kg/semaine de pro-peptide sauvage ne conduit à aucune augmentation de la masse musculaire. Ces résultats ont permis de montrer la supériorité de l'approche pro-peptide muté comparé au pro-peptide sauvage.

En 2007, Bartoli et al. ont entrepris d'étudier les effets du propeptide muté sur la pathophysiologie de deux modèles murins de myopathie des ceintures récessives à savoir la LGMD2A (*Limn-girdle muscular dystrophie 2A*) causée par des mutations dans le gène de la calpain 3 [143] et la LGMD2D due à des mutations dans le gène  $\alpha$ -sarcoglycan [144]. Une

première étude conduite sur souris 129SV révéla que l'injection intramusculaire de  $1,3 \cdot 10^6$  vg de vecteur adeno-associé 2/1 codant pour le propeptide muté (rAAV2/1-mSeAP-propmyoD76A) dans le TAG permettait, après 6 semaines de traitement, une augmentation de la masse musculaire de 60%. Seule une hypertrophie de 78% fut observée. De façon intéressante, il fût révélé que le contrôle latéral (TAD) de souris injectées rAAV2/1-mSeAP-propmyoD76A (dans le TAG) présentait une augmentation de 15% de sa masse par rapport au contrôle latéral TAD d'une souris rAAV2/1-mSeAP. Ces données indiquent que le propeptide diffuse dans le corps entier. Les analyses réalisées chez la souris  $\alpha$ -sarcoglycane déficiente (Sgca-null) et calpaïne 3 déficiente ont montré que cette approche anti-myostatine ne permettait une prise de masse musculaire (31%) que chez la souris calpaïne 3-déficiente [145].

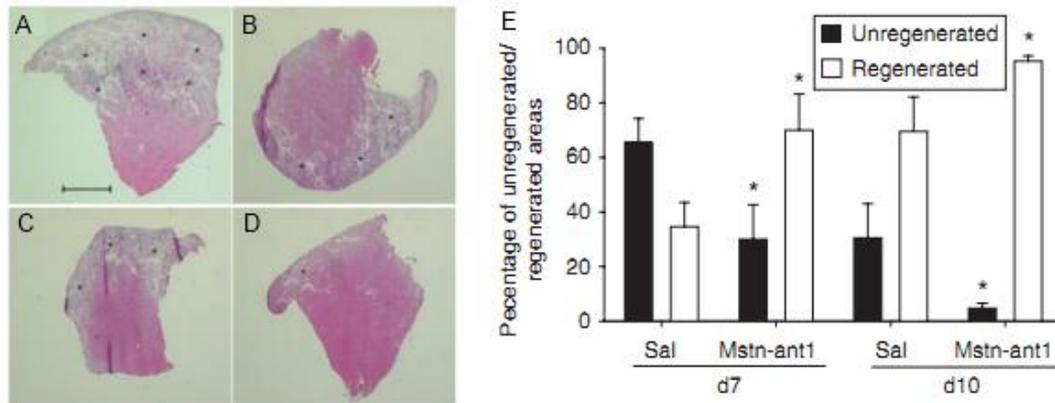
### 1.7.2.3 Myostatine tronquée

En 2007, Siriatt et al. mettent au point une stratégie visant à inhiber l'activité de la myostatine par une forme mature tronquée de ce facteur [145]. Ainsi, en entrant en compétition avec la myostatine endogène active pour les récepteurs spécifiques activine IIB, la forme tronquée de la MSTN a pour objectif de contrecarrer les effets de la myostatine active. Comme le présente la *figure 23*, la forme mature de la myostatine regroupe le domaine carboxy-terminal 266 à 375. Siriatt et al. ont généré une forme tronquée de la myostatine mature regroupant les acides aminés 266 à 350 dénommée Mstn-ant1.



**Figure 23 :** Illustration schématique de la forme Mstn-ant1 tronquée - D'après Siriatt et al., 2007.

Suite à l'injection de notexine chez la souris C57BL/10 adulte de 12 mois, il a été constaté que l'ajout de la protéine Mstn-ant1 permettait une régénération plus rapide du muscle lacéré (Figs 24 A-B-C et D). De plus, chez les souris traitées, les fibres régénérées présentaient, 28 jours après traitement, une surface plus importante que chez les souris témoins (Fig. 24E). Il fut montré par Western blot que cette stratégie conduisait, après 7, 10 et 42 jours de traitement, à une importante augmentation du niveau protéique de Pax7 et de MyoD, deux marqueurs de la myogenèse. Une activation des cellules satellites a également été observée suite au traitement par Mstn-ant1 pendant 6 semaines sur des fibres isolées de souris de 1 et 24 mois. Il est à noter que cette augmentation est plus marquée chez les fibres âgées de 1 mois.



**Figure 24** : La stratégie ant-MSTN permet une meilleure régénération du muscle lacéré - D'après Siriatt et al., 2007.

A : TA injecté solution saline (J7). B : TA injecté Mstn-ant1 (J7). C : TA injecté solution saline (J10). D : TA injecté Mstn-ant1 (J10). Scale bar = 1 mm. E : Pourcentage de zones régénérées et non régénérées suite à un traitement de 7 et 10 jours par Mstn-ant1 ou solution saline (n=4, \*P < 0.05).

Les auteurs ont également constaté qu'à partir de 3 jours de traitement, les muscles injectés Mstn-ant1 présentaient un pourcentage de noyaux positif à Mac1, marqueur des macrophages, plus faibles que les muscles traités avec de la solution saline. La myostatine étant décrite comme inhibiteur de la migration des myoblastes et des macrophages [147] et la réponse inflammatoire étant l'un des composants majeur du processus de régénération, ces résultats indiquent que la stratégie Mstn-ant1, en réprimant les effets de la myostatine, permet une meilleure migration des macrophages et un processus de réponse inflammatoire plus rapide. Avec Mstn-ant1, Siriatt et al. proposent une approche anti-myostatine innovante et efficace permettant la restauration des capacités régénératrices et myogéniques d'un muscle âgé.

### 1.7.3 Autres approches anti-myostatine

Comme illustré à la *figure 21*, l'utilisation de différents partenaires de la myostatine destinés à inhiber les effets de ce facteur ont été étudiés.

#### 1.7.3.1 La follistatine

Anciennement dénommée FSP (*FSH-suppressing protein*), la follistatine a été originellement identifiée dans le fluide ovarien folliculaire de porc et ainsi dénommée à cause de son action inhibitrice sur la synthèse et la sécrétion de l'hormone FSH (*follicle stimulating hormone*) [147, 148].

Lee et McPherron, après avoir vérifié que la follistatine pouvait réprimer la liaison du dimère C-terminal actif de la myostatine sur le récepteur activine IIB, étudièrent les effets de cette protéine en générant une souris C57BL/6 transgénique sur-exprimant la follistatine [149].



**Figure 25** : Comparaison d'une souris C57BL/6 contrôle et d'une souris C57BL/6 transgénique sur-exprimant la follistatine - D'après Lee et McPherron., 2001.

Comme le présente la *figure 25*, une souris sur-exprimant la follistatine présente une augmentation de la masse musculaire de 194-327% en comparaison d'une souris contrôle. Il est intéressant de mentionner que cette augmentation de la masse musculaire, médiée par une combinaison d'hyperplasie et d'hypertrophie, est 2 fois supérieure à celle observée chez les souris  $MSTN^{-/-}$  [11]. En 2007, Lee et al. rapportent qu'une souris déficiente en myostatine présente une augmentation de la masse musculaire d'environ 80-150% par rapport à une souris sauvage et que, chez la souris transgénique F66 sur-exprimant la follistatine, une augmentation de la masse musculaire pouvant atteindre près de 150%, due à une hyperplasie de 16% et une hypertrophie de 93%, est observée. De plus, chez la souris myostatine déficiente sur-exprimant la follistatine ( $MSTN^{-/-}$  F66), les 2 phénotypes semblent être additifs puisqu'une augmentation quadruplée de la masse musculaire est constatée [150]. Ces observations suggèrent que la follistatine agit non seulement sur la myostatine mais également au niveau d'autres régulateurs de la masse musculaire. En 2004, Amthor et al. démontrent que la myostatine et la follistatine présentent des patterns d'expression proches au cours du développement de l'embryon de poulet et qu'une interaction protéine-protéine est possible [151]. En 1998, Quixia Guo et al. ont montré que la surexpression de la follistatine murine causait d'importants défauts de reproduction chez la souris [152]. Depuis, des mutants de follistatine ayant moins d'effets secondaires ont été développés et étudiés chez la souris mais également chez le primate non humain [153, 154].

### 1.7.3.2 Récepteur soluble de l'activine II

En 2005, Lee et al. démontrent que l'administration d'une forme soluble du récepteur activine II, nommée ACVR2B (domaine extracellulaire du récepteur fusionné au domaine Fc d'une immunoglobuline), conduit à une importante augmentation de la masse musculaire chez la souris C57Bl/6 femelle de 6 semaines [149]. Suite à l'injection de 10 mg/kg/semaine d'ACVR2B et après un traitement de 4 semaines, une prise de masse musculaire rapide de l'ordre de 30-40% des muscles pectoraux, triceps, quadriceps et gastrocnemius, consécutive à une hypertrophie de 20%, fut constatée (Fig. 26). L'effet d'ACVR2B sur la croissance musculaire est qualifié de rapide et l'effet maximal est atteint après seulement 2 injections espacées d'une semaine. De manière intéressante, les auteurs ont noté que l'injection chez la souris *MSTN*<sup>-/-</sup> de 10 mg/kg d'ACVR2B pendant 4 semaines aboutissait également à une augmentation de la masse musculaire (15-26%) suggérant que d'autres ligands du récepteur activine IIB pouvaient réguler négativement la croissance musculaire.



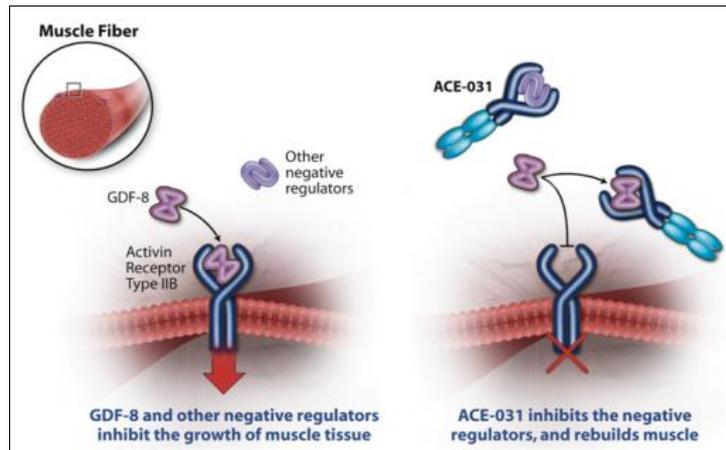
**Figure 26 :** Comparaison d'une souris C57Bl/6 contrôle et d'une souris C57Bl/6 transgénique sur-exprimant une forme dominante négative pour le récepteur Activin IIB - D'après Lee et McPherron., 2001.

### 1.7.3.3 Autres approches

Bon nombre d'autres approches ayant pour objectif de réprimer l'activité de la myostatine ont été développées. Brièvement, on peut mentionner :

- FLRG : FLRG pour *Follistatin Related Gene* est un homologue structural de la follistatine. A l'aide d'un test fonctionnel d'inhibition de l'activité de la myostatine (pGL3-CAGA<sub>12</sub> report) sur cellules, il fut montré que FLRG - au moins *in vitro* - était capable de réprimer l'activité de la MSTN de façon dose dépendante [155]. En 2007, Lee SJ confirma à l'aide souris transgéniques sur-exprimant FLRG, que cet homologue que de la follistatin pouvait induire une croissance musculaire de façon dose dépendante [150].

- GASP-1 : En 2003, Hill et al. démontrent que GASP-1 (*GDF-associated serum protein-1*) lie la myostatine dans le sérum [156]. Il a été montré que GASP-1 liait le propeptide ainsi que la forme mature de la myostatine et pouvait réprimer l'activité de la myostatine mature.
- Titine-cap : La Titine-cap est une protéine sarcomérique liant le domaine N-terminal de la titine, protéine élastique impliquée dans le contrôle de l'assemblage des protéines sarcomériques régulant l'élasticité du sarcomère. Des techniques de double-hybride ont montré que la Titine-cap se liait avec la myostatine mature dans les conditions physiologiques et que l'interaction était suffisamment forte pour empêcher la libération de la myostatine active [157]. Cette découverte d'une relation Titine-cap/Myostatine est fondamentale dans la compréhension de certaines maladies comme la LGMD2G marquée par une importante atrophie musculaire et associée à des mutations dans le gène de la Titine-cap [158].
- hSGT : En 2003, Wang et al. montrent, à l'aide d'études double hybride et par co-immunoprécipitation, que la protéine hSGT (*Human small glutamin-rich tetratricopeptide repeat-containing protein*) interagit avec la myostatine [159]. Différents mutants de hSGT ont permis de montrer que le domaine C-terminal (158-313aa) de hSGT était suffisant pour observer une interaction avec la myostatine dont le peptide signal N-terminal (1-21aa) est essentiel pour obtenir une association entre les 2 protéines. La protéine hSGT a été récemment décrite comme une molécule chaperone impliquée dans le « folding » et le « processing » des protéines, suggérant ainsi que hSGT pourrait ainsi jouer un rôle dans la sécrétion de la myostatine.
- Inhibiteurs de BMP-1/Tolloid : Lors de son processus de maturation, la protéine myostatine subit plusieurs clivages protéolytiques. En 2003, Wolfman et al. apportent la preuve que le 3<sup>ème</sup> et dernier clivage protéolytique est réalisé par des métalloprotéines de la famille des BMP-1/tolloid [31]. En utilisant des inhibiteurs de BMP-1, il est donc envisageable de diminuer l'activité de la myostatine.
- ACE031 : En 2009, la société Acceleron Pharma débute différentes études de phase I destinées à tester, chez 88 patients atteints de DMD, l'innocuité, la tolérance et la pharmacocinétique de différentes doses d'ACE-031, une protéine recombinante de fusion joignant une portion du récepteur activine IIB et une portion d'un anticorps humain anti-myostatine (Fig. 27). En 2011, l'interruption de ces études est annoncée suite à la survenue, chez certains participants, de saignements mineurs du nez et des gencives ainsi que des dilatations des vaisseaux sanguins de la peau. Des études complémentaires sur le rat et le singe ainsi que les analyses des données obtenues sur l'Homme et l'animal sont actuellement en cours.



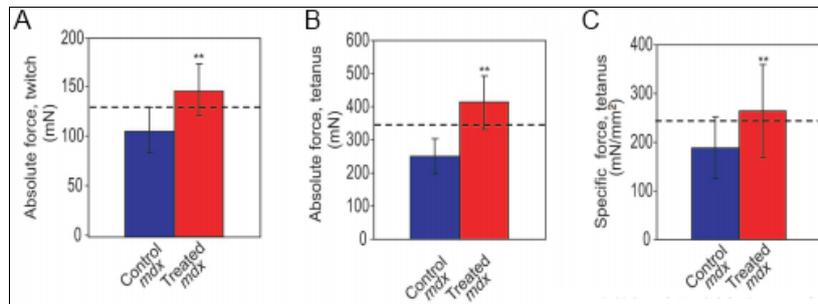
**Figure 27 :** Représentation schématique de l’approche antimyostatine ACE-031 - D’après Acceleron Pharma, 2009.

- L’ARN interférence (ARNi) : cette technologie permet de dégrader de manière spécifique un ARN messager donné [160]. En 2006, Magee et al. [161] ont injecté et électroporé dans le tibialis antérieur de rats une construction plasmidique contenant un shRNA ciblant le messenger de la myostatine. Après 2 semaines de traitement, les niveaux d’ARNm et de la protéine myostatine ont été montrés comme ayant respectivement diminués de 27% et de 48%. De plus, le poids du muscle injecté et la surface des fibres musculaires ont respectivement augmenté de 10 à 34%. Ces données indiquent que l’approche ARNi permet d’augmenter la masse musculaire.
- Saut d’exon : Dans le but de perturber l’épissage de l’ARNm et ainsi de générer une protéine non fonctionnelle, Kemaladewi et al. ont proposé d’utiliser une stratégie anti-myostatine par saut d’exon via l’utilisation d’oligonucléotides antisens (AON) [162]. Des études *in vitro* ont montré que différentes concentrations d’AONs permettait le saut de l’exon 2 de la MSTN et conduisait à une baisse (50-80%) de l’expression de la MSTN ainsi qu’à une augmentation de l’expression de facteurs régulateurs myogéniques tels que Myf5.
- miRNA : Les miRNA sont impliqués dans la régulation de l’expression des gènes au niveau post-transcriptionnel par liaison sur la région 3’ non transcrite des ARNm cibles [163]. En 2006, Clop et al. découvrent que la mutation d’un « G » en « A » dans la région 3’-UTR de la myostatine crée un site cible pour miR-1 et miR-206 induisant une inhibition de l’expression de la myostatine et contribuant ainsi au caractère hypertrophique du mouton Texel [164]. Allen et Loh ont fourni la preuve que miR-27b ciblait la région 3’-UTR de la myostatine et ont démontré que les mécanismes post-transcriptionnels impliquant miR-27 contribuaient à une diminution de l’ARNm de myostatine dans les muscles rapides [165]. miR-499 a été montré comme pouvant fixer efficacement la région 3’ de l’ARNm de myostatine et conduire à la suppression

de l'expression de ce facteur [166]. Inversement, la myostatine pourrait indirectement réguler l'expression de miRNAs comme l'atteste l'expression significativement élevée de miR-1, miR-133a/b et de miR-206 chez la souris *MSTN*<sup>-/-</sup> en comparaison de taux obtenus chez la souris Wild type [167]. Bien qu'aucune approche *in vivo* anti-myostatine utilisant les propriétés de ces miRNA n'ait été pour l'heure décrite, l'utilisation de ces miRNA constitue une voie thérapeutique possible.

### 1.8 Myostatine et surplus de force

Au cours de ces 10 dernières années, de nombreuses études portant sur la myostatine et les conséquences de son inactivation sur la masse musculaire, ainsi que sur les gains de force, ont été conduites. En 2010, des études sur les propriétés contractiles de muscles de souris déficientes en myostatine et de souris contrôles ont été menées par Personius et al. [168]. Il fut ainsi montré que l'absence de myostatine conduit à une augmentation de la masse musculaire de l'ordre de 20 à 40% des muscles gastrocnemius, quadriceps, tibialis antérieur, EDL, soleus et triceps. Alors que les souris déficientes en myostatine couvrent 19% moins de distance que leurs congénères sauvages, le Twitch et la force tétanique sont respectivement augmentées de 24% et 11% en absence de myostatine. En 2008, une étude utilisant un anticorps anti-myostatine (Myo29) révèle qu'un traitement de 6 mois à raison de 4 injections de 1 mg/kg de Myo-029 toutes les 2 semaines (ou 1 injection de 10 mg/kg toutes les 2 semaines) conduisait, chez 6 patients atteints de dystrophie musculaire de Becker (1 BMB), de dystrophie musculaire facio-scapulo-humérale (3 FSHD) et atteints de myopathies des ceintures (2 LGMD), à une augmentation des propriétés contractiles des fibres musculaires isolées [135]. Cette étude préliminaire prometteuse a conduit à un essai clinique de phase I/II regroupant 116 patients atteints de BMB, FSHD et LGMD. Les résultats de cet essai ont démontré l'incapacité de cette approche anti-myostatine à générer un gain de force sur muscle entier suite à un traitement de 9 mois [136]. En 2005, Bogdanovitch et al. démontrent que des souris *mdx* mâles de 4 semaines recevant une injection intrapéritonéale hebdomadaire de 10 mg/kg de propeptide de myostatine pendant 3 mois font état d'une augmentation de la force absolue (Figs. 28A et B) et d'une force spécifique normalisée par la masse du muscle (Fig. 28C) en comparaison de souris *mdx* non traitées [139].



**Figure 28 :** Augmentation de la force musculaire chez la souris *mdx* suite à l'injection de pro-peptide MSTN - D'après Bogdanovitch et al., 2005.

A : Forces absolues observées lors du test Twitch. B : Forces absolues observées lors du test Tétanos. C : Forces spécifiques obtenues lors du test du Tétanos. Les données pour la souris *mdx* injectée propeptide-Fc 10 mg/kg/semaine sont indiquées en rouge, les valeurs spécifiques à la souris *mdx* contrôle peptide-Fc sont précisées en bleu. n = 10/groupes; t test  $P \leq 0.01$ .

D'autres travaux décrivant des approches anti-myostatine telles que l'utilisation de myostatine tronquée [145], de pro-peptide myostatine [139] ou encore d'AAV-Follistatine [153, 154, 169, 170], ont conclu que l'inhibition de l'activité de la myostatine par ces moyens aboutissait à une augmentation de la masse musculaire et à une force plus importante.

Cependant, d'autres travaux ont conclu que la répression de l'activité de la myostatine n'engendrait aucun surplus de force. En 2007, l'équipe de Patel démontre, sur 2 modèles de souris myostatine déficiente ( $MSTN^{-/-}$  et  $BEH^{C/C}$ ), que l'augmentation de la masse musculaire engendrée n'est pas accompagnée de gain de force (force tétanique maximum) et que rapportée au poids du muscle, la force spécifique des souris myostatine déficiente est plus faible que la force spécifique de muscles témoins [171]. D'un point de vue histologique, une hypertrophie des fibres et une conversion des fibres avec diminution des fibres de type IIa et augmentation des fibres IIb sont notées, suggérant ainsi que le déficit en myostatine peut compromettre la production de force. Enfin, en 2010, Dumonceaux et al. présentent les résultats obtenus sur le modèle murin *mdx* en combinant deux approches jusqu'alors envisagées indépendamment : l'extinction de l'expression du récepteur de la myostatine par ARN interférence et le rétablissement de l'expression de la dystrophine par la méthode de saut d'exon. Trois mois après le double traitement, la force musculaire des souris est augmentée de 35% contre seulement 16% chez les souris traitées uniquement par saut d'exon. Aucun surplus de force n'est constaté chez les souris traitées uniquement par un inhibiteur de la myostatine et chez les souris non traitées [172].

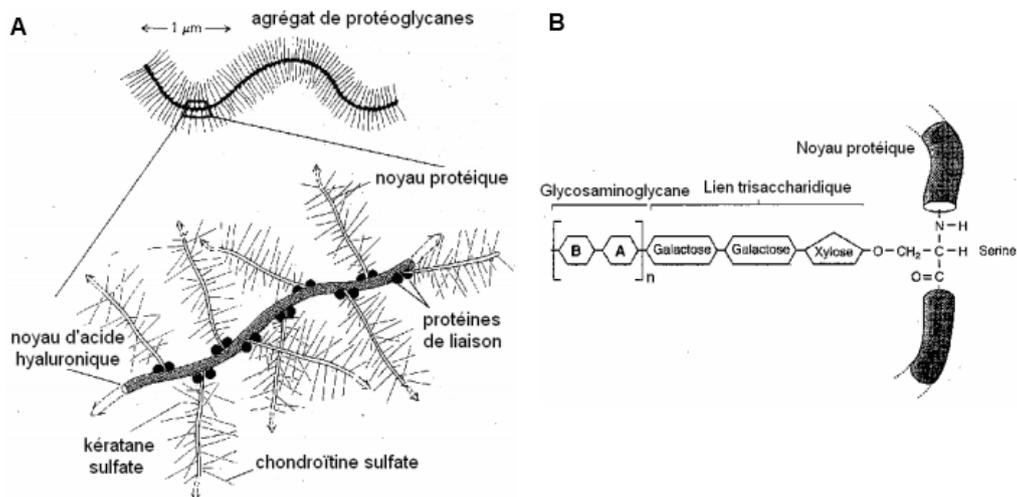
Il semblerait donc que, selon les équipes et/ou la méthode utilisée pour inhiber la myostatine, on observe une augmentation de la force spécifique ou non. De plus amples études ainsi qu'une homogénéisation des protocoles sont nécessaires pour pouvoir conclure sur cet aspect des approches anti-myostatine. Il est également important ici de préciser que, si pour le traitement de dystrophies musculaires il est indispensable que ce dernier aboutisse à une augmentation de la force normalisée par la masse du muscle, cela n'est pas le cas pour d'autres situations pathologiques telles que la cachexie induite par des maladies chroniques (cancer, SIDA) ou encore la fonte musculaire suite à une immobilisation prolongée ou à l'âge. En effet, dans ces situations, le fait d'augmenter la masse musculaire et donc de la force « brute » serait parfaitement thérapeutique.

## 2. La décorine : un membre de la famille des SLRPs

### 2.1 Les protéoglycane

#### 2.1.1 Classes, biosynthèse et fonctions

Les protéoglycane (PGs) sont des molécules hydrophiles majoritairement situées à la surface des cellules et dans les matrices extracellulaires [173]. Comme le présente la *figure 29*, les PGs, d'un poids moléculaire très variable (10 à 600 kDa), sont constitués d'un core protéique (5%) sur lequel est greffé un ou plusieurs polysaccharides (95%), principalement des glycosaminoglycane (GAGs). L'association entre les deux types de chaînes s'effectue essentiellement dans l'appareil de Golgi mais également au niveau du réticulum endoplasmique.



**Figure 29** : Structure et organisation d'un protéoglycane - D'après De Vernejoul.

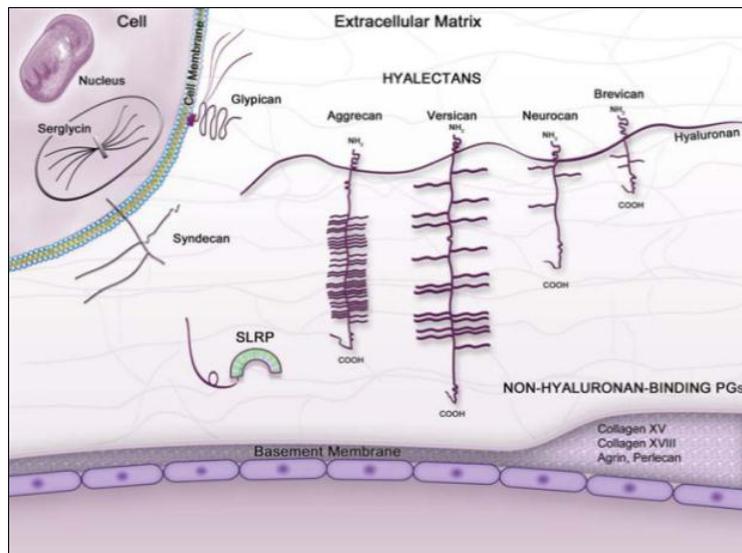
Fig. 1A : Représentation schématique d'un agrégat de protéoglycane. Fig. 1B : Organisation et structure d'un protéoglycane.

- Les GlycosAminoGlycane (GAGs) sont de longs polysaccharides non ramifiés, constitués par polymérisation d'unités répétitives de disaccharides. Ces disaccharides sont composés de deux oses (sucres simples non hydrolysables) qui sont reliés entre eux par une liaison osidique. Les disaccharides qui constituent les chaînes de GAGs, peuvent être plus ou moins sulfatés et, exception faite pour les kératane sulfates, sont composés de manière générale d'un acide hexuronique (soit un acide glucuronique (GlcA) ou un acide iduronique (IdoA)) et d'une hexosamine (soit une glucosamine (GlcN) ou une galactosamine (GalN)). Selon la nature de l'hexosamine, les termes de glucosaminoglycane ou de galactosaminoglycane peuvent être utilisés. Une des caractéristiques de ces chaînes d'oligosaccharides est leur importante hétérogénéité. En

effet, la longueur des chaînes de GAGs pouvant être très variable et les modifications structurales nombreuses (comme la sulfatation), le nombre de combinaisons de structures possibles pour une chaîne oligosaccharidique apparaît infini. Selon la nature des oses et la façon dont les disaccharides sont reliés entre eux, les GAGs peuvent être classés en différentes familles. On retrouve ainsi l'acide hyaluronique (AH), les kératanes sulfates (KS), l'héparine et les héparanes sulfates (Hp et HS), les chondroïtines sulfates (CS) et les dermatanes sulfate (DS). Les fonctions des PGs peuvent être exercées aussi bien par leur core protéique que par leurs chaînes oligosaccharidiques.

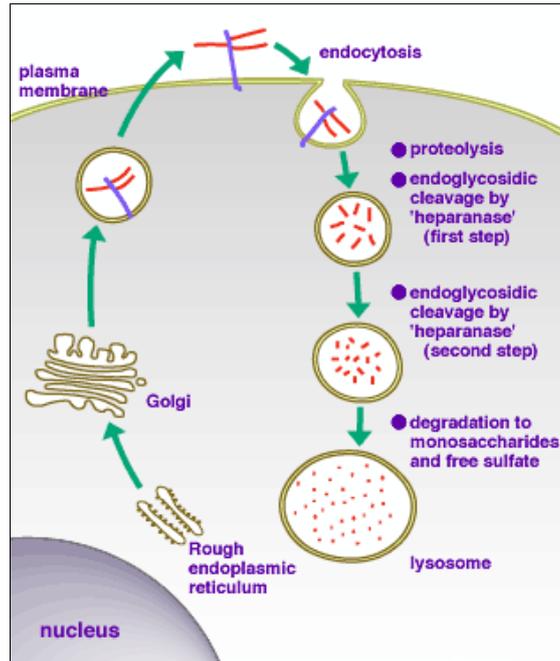
- Le core protéique constitue la structure de base des PGs et va principalement permettre l'initiation de la synthèse de GAGs qui lui sont spécifiques et la localisation des PGs. Les glycosaminoglycans interagissent avec diverses protéines comportant des domaines riches en acides aminés basiques, comme cela est le cas pour les chimiokines.

De par la nature du core protéique et des GAGs, il est possible de classer les PGs en 4 grandes familles que sont les PGs intracellulaires comme la serglycine, les PGs membranaires tels que le glypican et le syndecan, les PGs extracellulaires tels que la décorine, le biglycan ou encore la fibromoduline et enfin les PGs circulants. (Fig. 30).



**Figure 30** : Localisation des PGs - D'après Lilian Schaefer et Rolan Schaefer, 2009.

Les protéoglycans sont synthétisés dans l'appareil de Golgi à partir du core protéique et sont soit transportés à l'extérieur de la cellule par exocytose, s'intégrant alors à la matrice extracellulaire sous forme de chondroïtine-sulfate, kératan-sulfate, héparan-sulfate, dermatan-sulfate ou entrent dans la constitution de la membrane plasmique ou du glycocalyx, jouant alors un rôle dans les relations cellule-matrice (Fig. 31). La dégradation des PGs fait intervenir un processus d'endocytose et de protéolyses aboutissant à leur digestion par les lysosomes suite à différents clivages endoglycosidiques (Fig. 31).



**Figure 31** : Schéma simplifié de la biosynthèse et de la dégradation des PGs - D'après GlycoWorld.

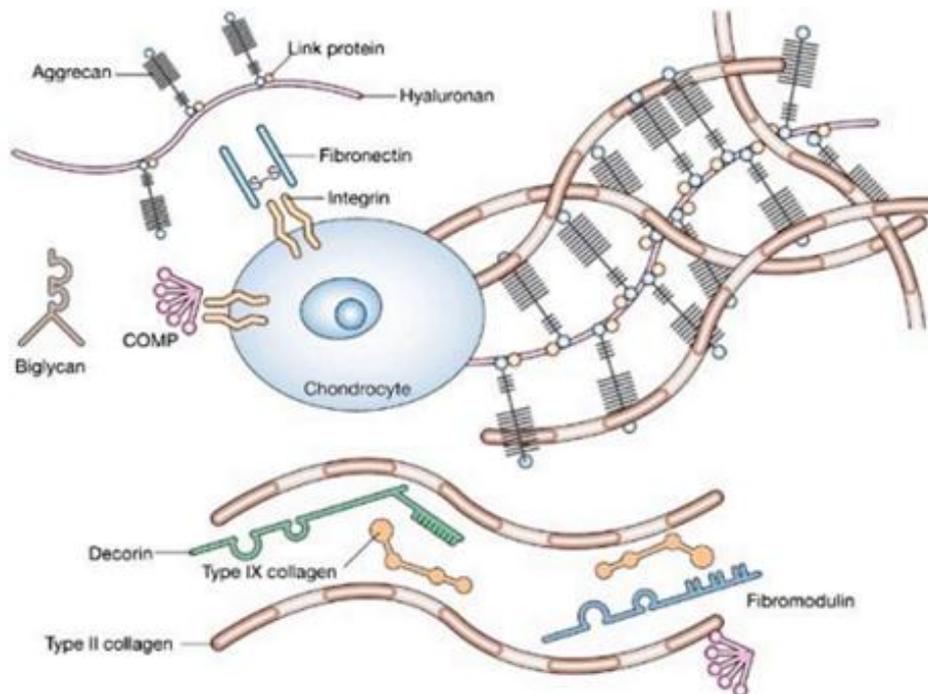
La gamme de partenaires protéiques avec lesquels les GAGs sont amenés à interagir est si large (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines, enzymes et autres protéines de la matrice extracellulaire) que les PGs jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire et sont impliqués dans de nombreux processus essentiels tels que la prolifération, le remodelage des matrices extracellulaires, la migration cellulaire, l'angiogénèse et bien d'autres phénomènes encore. Nombre de ces processus se trouvent être déréglés lors de maladies et notamment au cours du développement tumoral [174, 175, 176, 177, 178, 179, 180].

### 2.1.2 La matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire désigne l'ensemble des molécules extracellulaires du tissu conjonctif et des autres tissus. Elle est constituée en grande partie de glycoprotéines telles que le collagène, la fibronectine et la laminine, de protéines comme l'élastine et de protéoglycanes. Le modèle actuel de la MEC présente une structure faite d'un maillage de fibres de collagènes retenu par des filaments d'élastine. Sur ce maillage de collagène fibrillaire sont fixés des glycoprotéines d'adhérence (fibronectine en particulier) et du collagène globulaire. Entre les fibres de collagène, des glycosaminoglycanes permettent la création d'un gel hydrophile. Les constituants de la matrice extracellulaire ont de nombreux domaines de liaison avec les cellules, facilitant l'adhésion de celles-ci et leur organisation en tissus. La matrice extracellulaire joue un rôle dans le soutien structural, l'adhérence, le mouvement et la régulation de la cellule.

Il existe différents types de matrices extracellulaires :

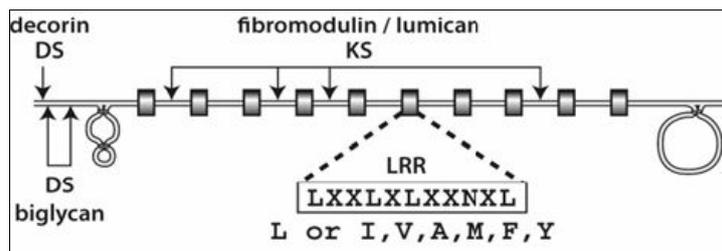
- La lame basale est un assemblage de protéines et glycoprotéines extracellulaires sur lequel reposent les cellules épithéliales et permettant l'adhérence de la cellule épithéliale au tissu conjonctif sous-jacent et constituant une interface majeure entre les cellules du tissu épithélial et l'extérieur.
- La matrice osseuse contenant essentiellement du collagène de type I et des sels minéraux tels que le phosphate de calcium et l'hydroxyapatite.
- La matrice cartilagineuse présentant une forte concentration en protéoglycane de grande (agrécan) et petite taille (biglycane, décorine, fibromoduline) et en collagène de type II. Des protéines non collagéniques telles que COMP (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*) ou encore la fibronectine sont également présentes (Fig. 32).



**Figure 32** : Représentation schématique de la MEC du cartilage - D'après Nature.com.

## 2.2 La famille des SLRPs

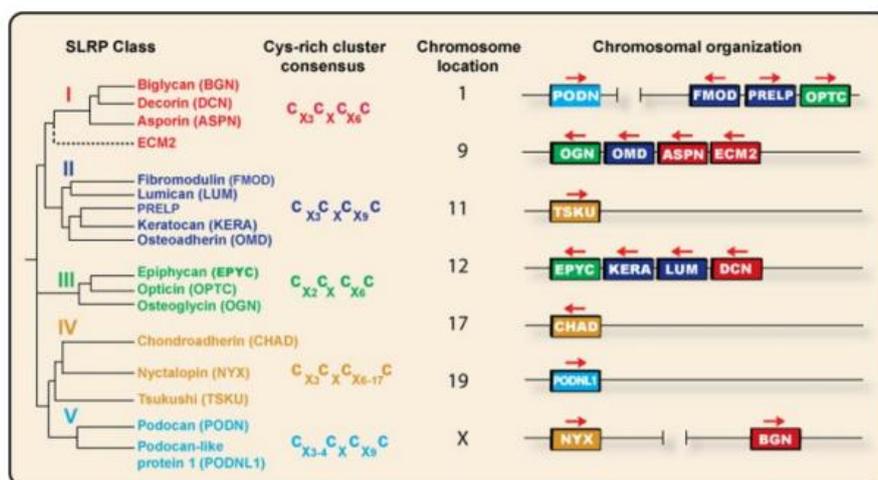
Les *small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs) sont une famille de PGs de la matrice extracellulaire dont le core protéique, d'environ 40 kDa, est composé de séquences riches en leucines (notées LRRs pour *Leucine Rich Repeats*), délimitées de chaque côté par des groupements de cystéines (Fig. 33) [181, 182].



**Figure 33 :** Les domaines structuraux des SLRPs - D'après P.J. Roughley, 2006.

Le core protéique des membres de la famille des SLRPs présente deux domaines riches en cystéines flanqués de répétitions riches en leucine, nommées LRR. Chaque domaine LRR est composé d'une séquence consensus LXXLXLXXNXL où les leucines sont prédominantes et où les autres acides aminés peuvent être des I, V, A, M, F ou Y, et X. La région protéique est capable de former des ponts disulfures et peut également être N-glycosylée. Une ou deux chaînes de chondroïtine/dermatane sulfate (DS) sont localisées sur la région amino-terminale (décorine, biglycan) et une ou quatre chaînes de keratane sulfate (KS) peuvent être présentes entre les domaines LRR (fibromoduline, lumican).

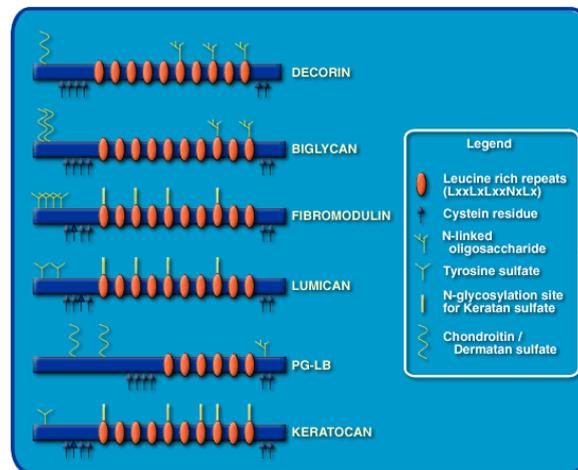
La famille SLRP, divisée en 5 classes distinctes, regroupe 17 protéoglycanes ayant en commun une organisation génique proche et une structure protéique homologue [183, 184, 185] (Fig. 34).



**Figure 34 :** Analyse phylogénétique et organisation chromosomique des 5 classes de SLRPs humains - D'après Schaefer et Iozzo, 2008.

- La classe I regroupe, entre autres, la décorine [186] et le biglycan [187], qui sont les deux SLRPs présentant la plus grande homologie (57% d'identité) parmi tous les SLRPs. Ces 2 SLRPs sont les seuls à présenter un pro-peptide. Ce dernier, hautement conservé entre les espèces, aurait pour fonction d'agir tel un signal de reconnaissance pour la xylosyltransférase, la première enzyme impliquée dans la synthèse de la chaîne de

glycosaminoglycane GAG [188, 189, 190]. La décorine et le biglycan contiennent un domaine N-terminal présentant une (décorine) ou deux (biglycan) chaîne(s) de chondroïtine/dermatane sulfate conférant des propriétés polyanioniques à ces 2 SLRPs (Fig. 35). Cette classe I de SLRPs est caractérisée par la présence de 10-12 LRRs et par une séquence consensus en N-terminal contenant 4 cystéines : CX3CXCX6C.



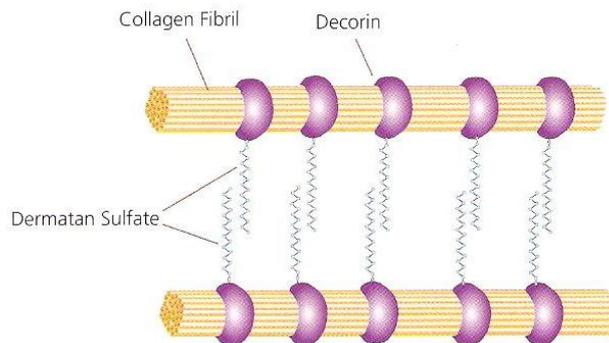
**Figure 35** : Structure et organisation protéique des SLRPs - D'après nci.nih.gov.

- La classe II regroupe 5 membres qui peuvent être divisés en 3 sous-familles. La fibromoduline [191] et le lumican [192, 193] constituent la première sous famille et présentent 48% d'identité au niveau de la séquence protéique. PRELP [195] et le keratocan [195] ont une identité protéique de 55% et composent la seconde sous-classe alors que l'ostéoadhérine [196] constitue une sous famille distincte présentant 37-42% d'identité protéique avec les membres des autres classes II. Ces 5 SLRPs présentent une région consensus riche en cystéines (CX3CXCX9C) et localisée avant les 10 LRRs.
- La classe III (épiphycan/PG-Lb [197, 198, 199] et le mimecan/ostéoglycine [200]) est caractérisée par la séquence CX2CXCX6C en position N-terminale et par la présence de seulement 6 LRRs.
- La classe IV est composée de la chondroadhérine, de la nyctalopine [201, 202] et du tsukushi [203]. Il peut être noté que le tsukushi partage des propriétés fonctionnelles avec les SLRPs de classe I [204, 205] et qu'il a été décrit comme un inhibiteur de BMP formant un complexe avec BMP et la chordine [203, 206].
- Le podocan et le podocan-like protein 1 constituent la 5<sup>ème</sup> et dernière classe des SLRPs. Ces protéines présentent 20 LRRs qui partagent certaines homologies avec les molécules de la classe I et II. Il est à noter aussi que le podocan a été décrit comme liant le collagène I et qu'il inhibe la croissance cellulaire via l'induction de p21 [207].

## 2.3 La décorine

### 2.3.1 Organisation, gène et protéine

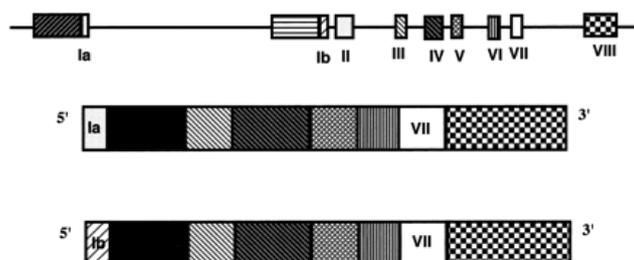
La décorine est un petit protéoglycane extracellulaire ubiquitaire de la famille des SLRPs de Classe I [185]. Connue aussi sous le nom de PG-S2 [205], *Bone proteoglycans-II*, *small leucine-rich protein-1b* ou encore *dermatan sulphase proteoglycan-II* [208], la dénomination Décorine (DCN) a été adoptée car associée au collagène, ce SLRP « décorait » les fibrilles de collagène (Fig. 36) [209, 210].



**Figure 36 :** Illustration de l'association de la décorine avec les fibrilles de collagène - D'après sigmaaldrich.com.

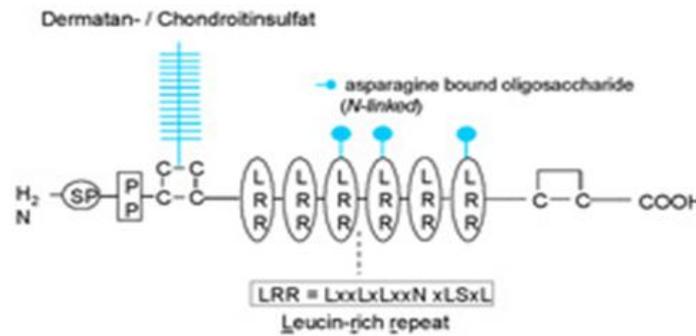
Le gène de la décorine est localisé sur le chromosome 12 (12q23) chez l'Homme et sur le chromosome 10 chez la souris. Le gène humain (DCN), long de 38 kb, présente 8 exons et de longs introns dont 2 ayant une taille comprise entre 5,4 et 13,2 Kb (Fig. 37). L'ARNm de la DCN humaine présente 1778 paires de bases et la protéine a 359 acides aminés. En 1993, Danielson et al., rapportent que 2 épissages alternatifs sont possibles, l'un incluant l'exon leader 1a et l'autre l'exon leader 1b de la région 5' non transcrite [211]. Il est à noter que les séquences de l'exon 1a et 1b sont hautement homologues [74-87%].

De plus, le gène de la décorine est très conservé chez de nombreuses espèces ce qui suggère un rôle important pour la protéine décorine.



**Figure 37 :** Structure du gène de la décorine humaine et des 2 transcrits DCN - D'après Wahab et al., 2000.

Comme le présente la *figure 38*, la protéine décorine, d'un poids moléculaire de 100 kDa, est composée d'un core protéique nommé décoron [212] de 36,5 kDa présentant 12 répétitions de LRRs.



**Figure 38** : Structure de la protéine décorine - D'après [www.tu-dresden.de](http://www.tu-dresden.de)

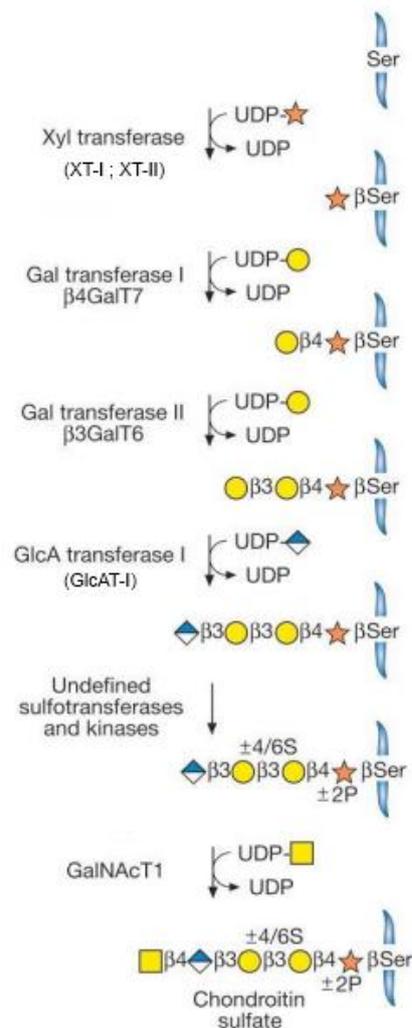
SP = Peptide signal ; PP = Pro-peptide ; C-C = Domaine riche en cystéines ; Dermatan- / Chondroitin sulfate = Chaîne GAG de chondroïtine/dermatane sulfate rattachée au core protéique au niveau d'un résidu sérine ; LRR = Domaine riche en leucines.

Les domaines LRRs sont composés d'une séquence LXXLXLXXNXL, où L désigne une leucine et X, n'importe quel autre acide aminé. Ces régions servent de motifs structuraux dans divers processus moléculaires tels que l'adhésion cellulaire et la transduction de signaux cellulaires médiée par les facteurs de croissance. Ces LRRs sont flanqués de domaines riches en cystéines dont le motif Cx3Cx6C de la coiffe N-terminale est conservé chez tous les SLRPs de classe I. Les 4 résidus cystéines de ce domaine forment un pont disulfure protégeant le core hydrophobique de LRR1 et permettant la stabilisation du domaine. Un autre pont disulfure est également présent au niveau du domaine C-terminal. La protéine est N-glycosylée et substituée par une chaîne unique de chondroïtine/dermatane sulfate (75% chondroïtine sulfate et 23% dermatane sulfate) de 50 kDa chargée négativement et rattachée au core protéique dans le domaine N-terminal au niveau d'une sérine [213]. Il est à noter que chez les mammifères, la décorine peut présenter 2 chaînes CS/CD et que le degré d'épimérisation de l'acide uronique en IdoA et la sulfatation de la chaîne de décorine varient d'un type tissulaire à l'autre. Enfin, sur les LRR 7, 9 et 11, 3 sites d'attache pour des oligosaccharides N-linkés sont présents, la glycosylation ayant été montrée comme permettant un meilleur repliement et une meilleure sécrétion de la protéine décorine [183].

### 2.3.2 Biosynthèse

La biosynthèse de la décorine débute par la formation de la région protéique sur laquelle viennent se greffer successivement quatre résidus glucidiques pour former une amorce tétra-saccharidique à partir de laquelle est ensuite polymérisée la chaîne de GAG par ajout

successif de motifs disaccharidiques synthétisés par la cellule (Fig. 39). L'élongation des chaînes GAG est catalysée par des CS-synthases [214, 215, 216] pour former des chaînes de CS/DS.



**Figure 39 :** Assemblage de l'amorce tétra-saccharidique des chaînes de GAG et extension vers les voies de biosynthèse des CS/DS - D'après Esko et al., 2009.

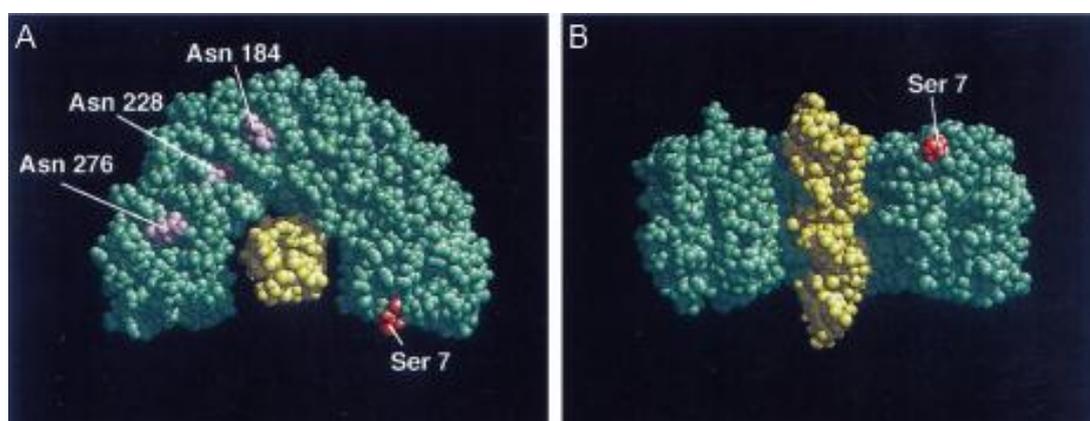
La synthèse de l'amorce tétra-saccharidique [Xylβ1,4Galβ1,3Galβ1,3GlcA] nécessite l'intervention successive de différentes glycosyltransférases : XT-I, XT-II, GalT-I (β4GalT7), GalT-II (β3GalT6) et GlcAT-I. C'est à partir de cette amorce que seront ensuite polymérisées les chaînes GAG.

Ces voies de biosynthèse nécessitent l'action de nombreuses enzymes (glycosyltransférases, épiméras, sulfotransférases) présentes au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi. Les 16 acides aminés du peptide signal de la décorine permettent l'engagement de la protéine naissante dans le réticulum endoplasmique. Le peptide signal est ensuite clivé et la pro-décorine qui en résulte présente un propeptide de 15 amino-acides régulant l'attachement de la chaîne de glycosaminoglycane.

### 2.3.3 Structure de la décorine et rôle du zinc

#### 2.3.3.1 Structure

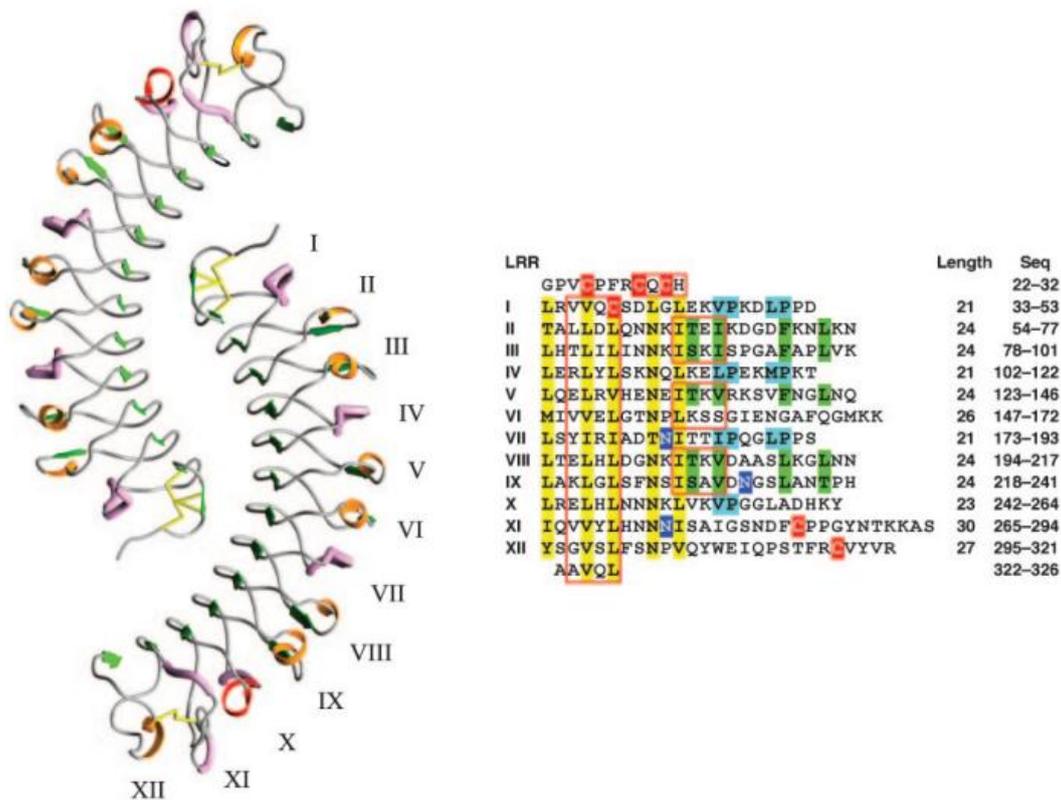
En 1996, Weber et al., [217] propose un modèle de structure de la décorine afin de comprendre le rôle et l'implication de ce SLRP dans la modulation des arrangements de molécules de collagène. Se basant sur les travaux de Kobe B et Deisenhofer J. [218, 219] décrivant pour la première fois la structure d'un inhibiteur de ribonucléase porcine (une protéine présentant des séquences riches en leucines), Weber et al., modélisent la structure de la décorine : les résultats suggèrent que la décorine est une protéine à la surface interne concave ayant la taille adaptée pour recevoir une triple hélice de collagène de 3 nm de longueur (Fig. 40).



**Figure 40** : Modélisation de la structure de la décorine humaine et d'une triple hélice de collagène de type I - D'après Irene T. Weber et al., 1996.

La décorine est représentée en vert, la triple hélice de collagène en jaune. Le site d'attachement du glycosaminoglycan est précisé en rouge (Ser7) et les 3 sites d'attachement du N-linked oligosaccharide en violet.

De nombreuses structures de domaines LRR ont été depuis identifiées [219, 221, 222, 223, 224]. Toutes adoptent une forme de bobine incurvée présentant un feuillet  $\beta$  parallèle formant la face interne concave. De nombreuses études de cristallisation des domaines LRR liés avec différents ligands ont abouti à la conclusion que cette surface concave contenait le site de fixation de ces mêmes ligands [219, 221, 225]. En 2004, l'équipe de Bella. J, présente les résultats de la cristallisation du dimère du core protéique de la décorine, nommé Décoron (Fig. 41), et associe la séquence protéique à chaque domaine de la protéine [226].

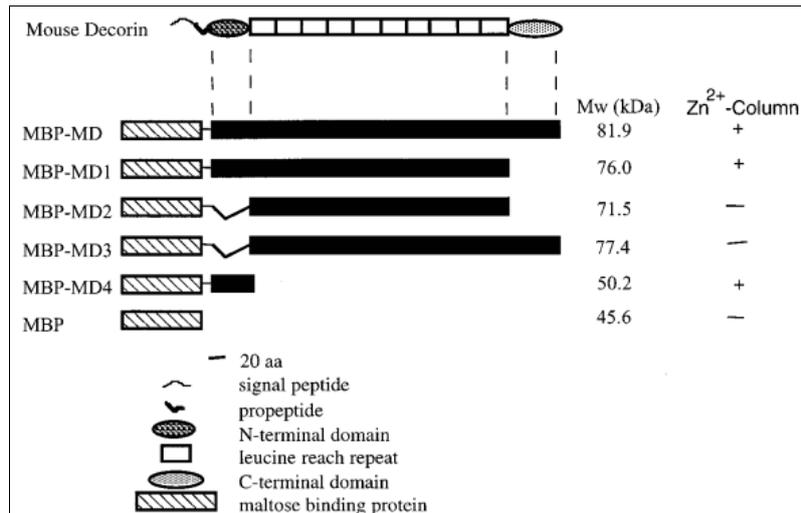


**Figure 41** : Structure du Décoron - D'après Paul G. Scott et al., 2004.

A ce jour, la forme fonctionnelle de la décorine n'est pas clairement définie. En effet, des analyses biophysiques ont démontré que la décorine se présentait sous une forme dimérique en solution et ont suggéré que cette surface concave était impliquée dans la dimérisation [227], étape décrite comme nécessaire à l'activité de ce facteur [228]. Au contraire, Weber et al. présentent la décorine sous sa forme monomérique comme capable de lier une molécule de collagène [217] et Goldoni et al. avancent que la décorine est biologiquement active en tant que monomère [229].

### 2.3.3.2 La décorine : une métalloprotéine

En 1999, Yang et al., décrivent la décorine comme une métalloprotéine liant le zinc au niveau de la région N-terminale du core protéique [230]. Ces auteurs ont réussi à identifier un peptide décorine long de 41 acides aminés issu de la partie N-terminale présentant une activité de liaison au  $Zn^{2+}$ . Comme le présente la *figure 42*, le peptide MBP-MD4 peut lier 2 ions  $Zn^{2+}$  avec une  $K_D$  de  $3.10^{-7}$  M.

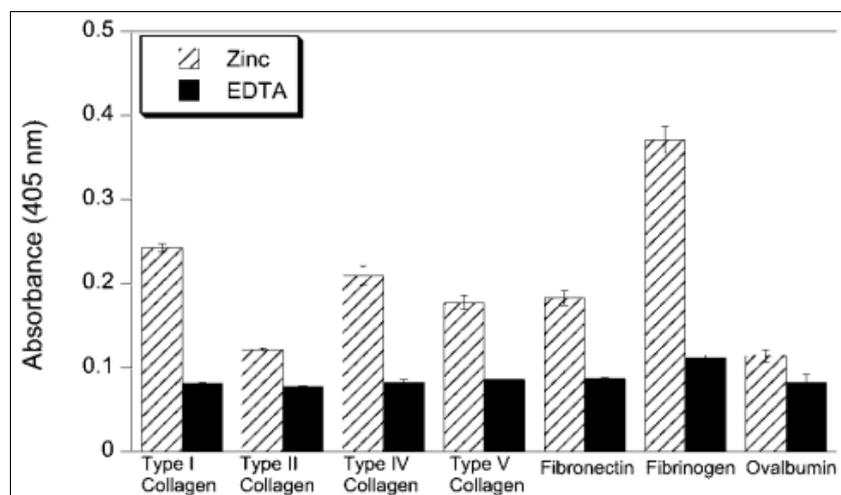


**Figure 42 :** Le domaine de liaison au zinc a été localisé dans le domaine N-terminal de la décorine - D'après Yang et al., en 1999.

Le schéma présente la structure des constructions de fragments du core protéique de décorine, leur poids moléculaire ( $M_w = \text{Molecular weight}$ ) et résume la capacité des différents fragments à lier du  $Zn^{2+}$ .

Point intéressant, les auteurs ont également montré en réalisant des études de dichroïsme circulaire qu'en présence de zinc, la structure secondaire du peptide DCN de 41 acides aminés était modifiée.

En 2003, Dungan et al, montrent à l'aide de tests ELISA que la présence de zinc est nécessaire afin que la décorine puisse se lier à différents partenaires tels que le collagène de type I, II, IV et V, la fibronectine et le fibrinogène [231] (Fig. 43).



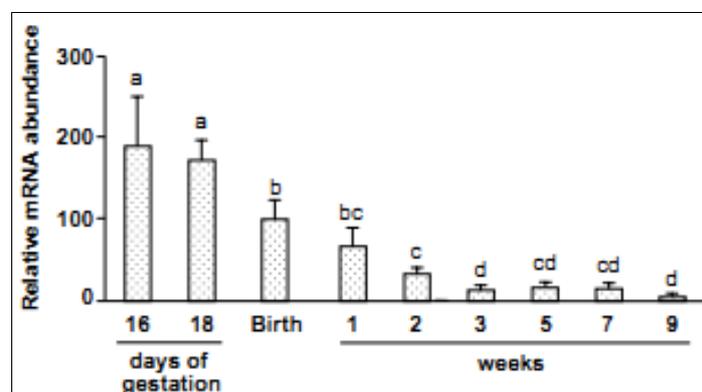
**Figure 43 :** Le zinc est nécessaire à la décorine pour interagir avec différentes protéines - D'après Dungan et al., 2003.

Le domaine de liaison de la décorine au fibrinogène se localise au niveau N-terminal du décoron ; ce dernier interagit avec le fragment D du fibrinogène ( $K_D = 1,7 \cdot 10^{-6} M$ ), une glycoprotéine plasmatique synthétisée par le foie, convertie en fibrine par la thrombine durant la coagulation du sang et impliquée dans le processus de réparation et la formation de caillots en cas de plaie et saignement. Cette étude, complétée par les travaux de Dungan et al. en 2007 [232], a mis en évidence que la décorine pouvait réguler la fibrine et a révélé un nouveau mécanisme par lequel les composants de la MEC pouvaient participer aux phénomènes de cicatrisation et de réparation. Il fut également montré par chromatographie d'exclusion moléculaire, qu'en présence de zinc, le domaine N-terminal (sous sa forme peptidique) s'auto-associait pour former des oligomères.

Il est important de mentionner ici que le mécanisme par lequel le zinc permet la liaison de la décorine à une variété de composants de la matrice extracellulaire reste complètement inconnu.

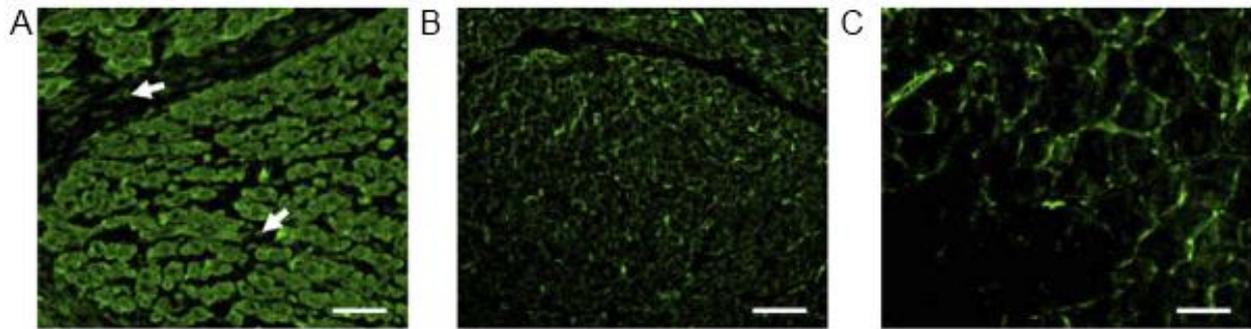
#### 2.3.4 Niveaux d'expression et localisation de la décorine

La décorine, synthétisée et sécrétée par les chondrocytes, les fibroblastes, les cellules du muscle lisse et de nombreuses autres cellules mésenchymateuses [233, 234]. Ce SLRP est présent dans la matrice extracellulaire (MEC) de nombreux tissus tels que les os, la peau [235, 236, 237, 238] ainsi que dans le muscle squelettique [239, 240]. En 2007, Nishimura et al. mesurent, à l'aide d'analyses RT-PCR, les niveaux d'ARNm de décorine dans le muscle squelettique de fœtus de rats et de rats adultes *Sprague-Dawley* [241]. Comme le présente la *figure 44*, l'ARNm DCN est abondant dans le muscle squelettique de fœtus de rats. De manière intéressante on peut noter que les niveaux déclinent drastiquement à la naissance pour atteindre un seuil très faible dès la semaine 2. La décorine est donc principalement exprimée lors de la période de gestation.



**Figure 44** : Expression de l'ARNm de décorine au cours du temps dans le muscle squelettique de rats  
- D'après Nishimura et al., 2007.

La distribution spatio-temporelle de la décorine lors du développement du muscle squelettique du rat a également été étudiée. A l'aide d'analyses immunohistochimiques réalisées sur le muscle *tibialis antérieur*, il fut ainsi montré que la décorine était localisée dans le cytoplasme des fibres musculaires chez un fœtus de 18 jours (Fig. 45A). La décorine est également localisée dans la matrice extracellulaire entre les fibres musculaires, alors que dans le muscle squelettique de rats nouveau-nés (Fig. 45B) et adultes (Fig. 45C), la décorine est principalement localisée à la périphérie des fibres musculaires.



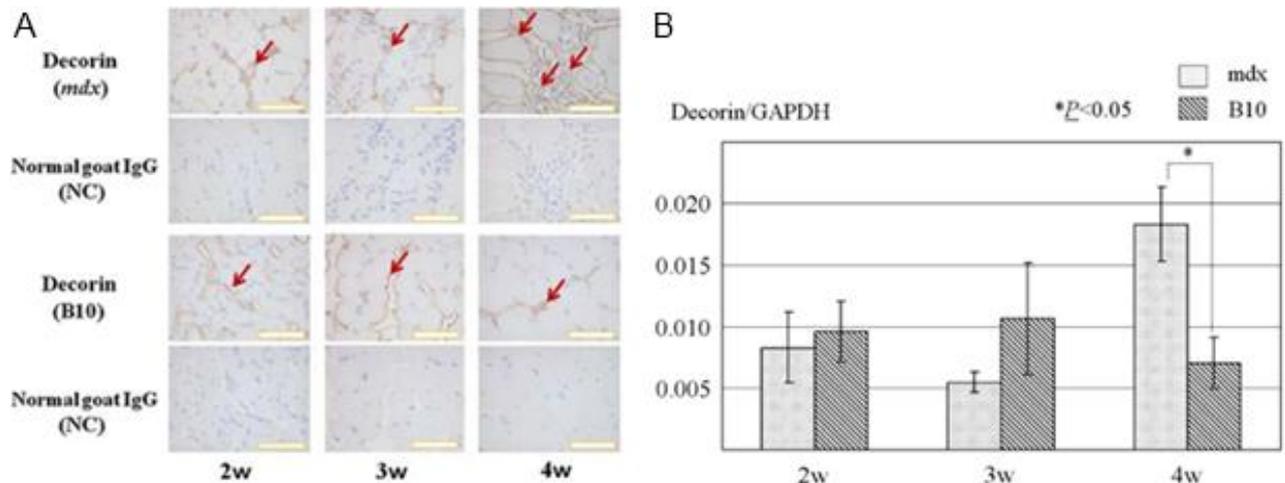
**Figure 45** : Localisation de la décorine dans le muscle squelettique de rat - D'après Nishimura et al., 2007.

A : Fœtus à 18 jours de gestation ; B : Nouveau-né ; C : Rat de 7 semaines. Les flèches représentent l'anticorps anti-décorine dans la matrice extracellulaire, Barre = 50  $\mu$ m.

Des résultats très comparables ont été obtenus par Nishimura et al. chez le bovin [242]. En effet, l'ARNm DCN est présent dès le 1er mois de développement du fœtus, la protéine décorine montrée comme existante dès 2,5 mois de développement fœtal et la distribution spatiotemporelle de la décorine est similaire à celle obtenue chez le rat. La chaîne GAG a été décrite comme plus longue lors des premiers stages de la vie fœtale que lors du développement postérieur alors que le décoron lui ne change pas de taille. Des études d'immunofluorescence ont montré que la décorine était localisée dans le périmysium, gaine de nature conjonctive séparant les différents faisceaux de muscles striés et non dans l'endomysium. A 2,5 mois du développement du fœtus, la structure du périmysium étant déjà formée, ces données suggèrent que la décorine contribue à la formation et stabilisation des fibres de collagènes dans le périmysium.

En 2009, Abe et al. étudient le niveau d'expression de la décorine chez la souris *mdx* [243], un modèle murin de la myopathie de Duchenne [244]. Il est important de mentionner ici que les muscles de la souris *mdx* subissent une importante nécrose 2-3 semaines après la naissance et cet évènement est immédiatement suivie d'un processus de régénération [245, 246, 247]. A l'aide de marquages immunohistochimiques, la localisation et l'expression de la décorine fut examinée à différents moments chez des souris B10 contrôles (saines) et *mdx*. Comme le

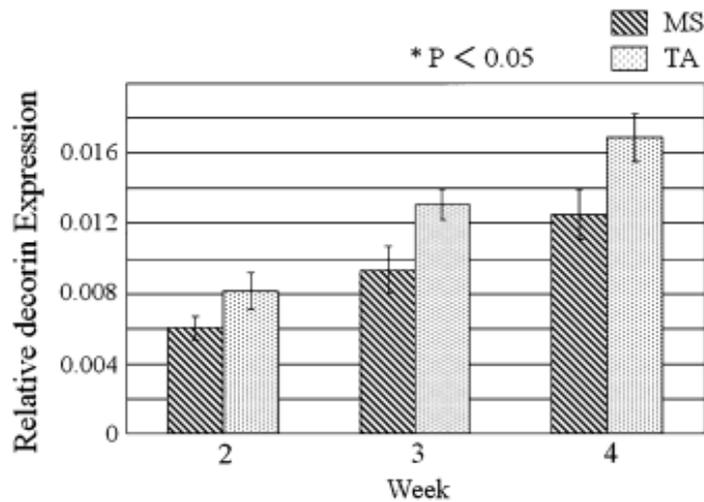
présente la *figure 46A*, à 2 et 3 semaines, les niveaux d'expression de la décorine chez les souris *mdx* et B10 sont identiques. A 4 semaines, une importante augmentation de l'expression de la décorine est détectée chez la souris *mdx*, notamment au niveau des cellules en régénération présentant un noyau central. A cette augmentation du taux protéique de décorine à 4 semaines fut corrélée une augmentation du nombre de transcrits d'ARNm décorine mise en évidence par RT-PCR (*Fig. 46B*). La décorine est donc sur-exprimée à 4 semaines chez la souris *mdx* lors du processus de régénération cellulaire.



**Figure 46** : Augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique de la décorine chez la souris *mdx* - D'après Abe et al., 2009.

A : Marquage immunohistochimique de la décorine dans le tibialis antérieur de souris *mdx* et B10 à 2, 3 et 4 semaines. Les flèches rouges représentent l'expression de la décorine. Les contrôles Normal goat IgG ne font état d'aucune réaction chez la souris B10 et *mdx*, suggérant ainsi une spécificité de l'anticorps anti-décorine utilisé. Barre = 50  $\mu$ m. B : Expression de l'ARNm de décorine dans le tibialis antérieur de souris *mdx* et B10 à 2, 3 et 4 semaines, \* $P < 0.05$ .

Ces premières données furent confirmées par les travaux d'Hiroki et al. qui observèrent chez la souris *mdx* de 4 semaines, une augmentation de l'expression de la protéine décorine dans le muscle tibialis antérieur (TA) et masséter (MS) [248] (*Fig. 47*). Il fut noté que l'augmentation du taux protéique de décorine était plus importante dans le TA que dans le muscle masséter et que la décorine était localisée autour des fibres musculaires en régénération à 4 semaines.



**Figure 47 :** Niveaux d'ARNm de décorine dans le muscle masséter (MS) et tibialis antérieur (TA) chez des souris *mdx* de 2, 3 et 4 semaines - D'après Hiroki et al. 2011.

De façon intéressante, les auteurs ont constaté qu'à 4 semaines, le muscle masséter présentait de petites aires de régénération alors que le tibialis antérieur subissait un intense processus de régénération faisant suite à un phénomène de nécrose à 3 semaines. Pour comprendre le processus de nécrose, deux théories ont été préalablement rapportées : le volume de nécrose fut montré comme dépendant a) du diamètre du muscle et/ou b) de l'origine du muscle [250]. Le TA dérivant des somites et le MS de l'arc branchial, les 2 muscles étudiés ne présentent pas la même origine ce qui peut expliquer les différences histologiques observées (cycles de nécrose/régénération décalés dans le temps) et, par la même, la différence de niveau d'expression de la décorine dans ces 2 muscles de souris *mdx* de 4 semaines. Ces résultats indiquent que la décorine est stimulée à 3 et 4 semaines de la vie d'une souris *mdx* lors du processus de nécrose/régénération.

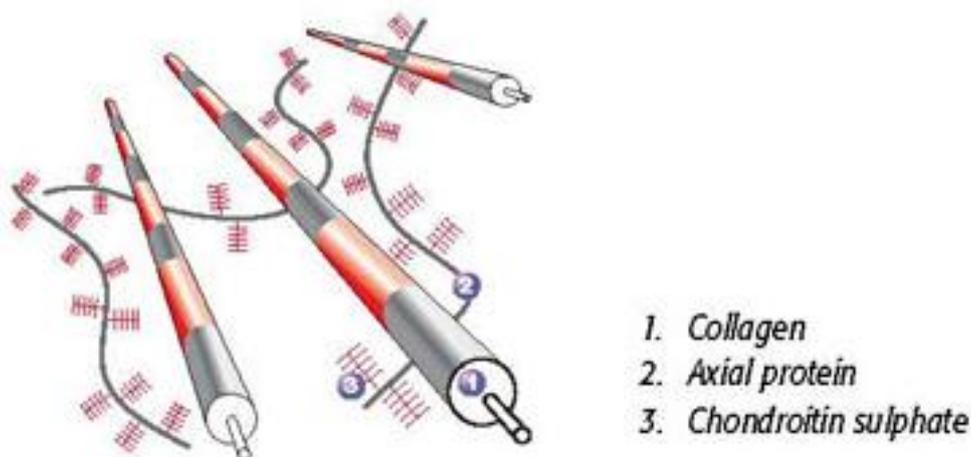
En 2005, Zanotti et al. entreprennent d'étudier le taux de décorine dans différents contextes de dystrophies musculaires humaines [250]. Des analyses RT-PCR montrent que l'ARNm de décorine est significativement moins élevé chez des patients atteints de DMD (2-8 ans) et chez des enfants de 2 à 7 ans atteints de MDC1A (*merosin-deficient congenital muscular dystrophy*). Au contraire, chez de jeunes patients atteints de BMD (*Becker muscular dystrophy*), le taux d'ARNm décorine est normal alors qu'il est plus élevé chez des adultes BMD (30-37 ans), ainsi que chez des malades atteints de sarcoglycanopathies et de dysferlinopathies. Selon les auteurs, les variations du niveau d'expression transcriptionnel et protéique de la décorine obtenues dans différents types de dystrophies pourraient s'expliquer par des perturbations différentes de la matrice extracellulaire occasionnées par ces différentes maladies. Bien que cette étude soit, pour le cas DMD, contradictoire avec les résultats d'Abe et al., et Hiroki et al., il semble établi que la quantité de décorine varie dans un contexte dystrophique - ce qui suggère que ce SLRP pourrait avoir un rôle « important » au niveau musculaire.

## 2.4 Rôles de la décorine

### 2.4.1 Actions sur la matrice extracellulaire

Les souris KO ou mutantes pour la décorine [251] ont permis d'identifier plusieurs fonctions et implications de ce SLRP. Les souris génétiquement déficientes pour le gène de la décorine sont viables et présentent d'une part, une fragilité de la peau qui est plus fine et flexible [236, 252] et d'autre part, une augmentation de la fibrose rénale [253]. Les fibres de collagène se trouvent disposées de façon irrégulière et leur taille serait également affectée, soulignant ainsi le rôle important de la décorine dans la régulation de la fibrillogénèse du collagène. L'une des fonctions de la décorine est donc de participer à l'organisation de la matrice extracellulaire et de réguler la maturation des fibrilles de collagène. Le phénotype observé chez les souris DCN<sup>-/-</sup> se rapproche fortement de celui observé chez l'Homme atteint du syndrome progéroïde d'Ehlers-Danlos caractérisé par des anomalies des tissus conjonctifs [252, 254].

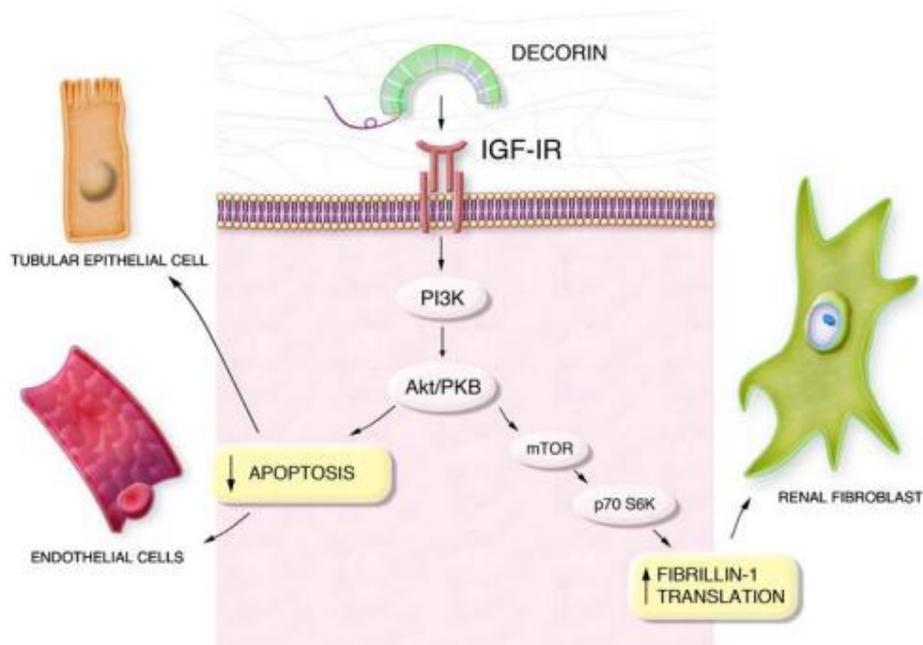
L'interaction du core de décorine avec les fibrilles de collagène a été montrée dès 1984 par Vogel et al., [255]. Par cette interaction, la décorine permet de réguler le diamètre des fibres durant leur formation et les interactions fibrilles-fibrilles dans la matrice extracellulaire. Ces dernières présentent un accès limité aux collagénases sur l'unique site de clivage de chaque molécule de collagène et sont alors protégées de dommages protéolytiques. L'interaction de la décorine avec le collagène permet donc d'augmenter la stabilité des fibrilles [252, 256] et de protéger les fibrilles de clivages protéolytiques par diverses collagénases [257]. L'interaction décorine-collagène I (Fig. 48) implique les séquences LRR 5-6 de la DCN [258] différentes de celles impliquées dans les interactions fibromoduline (LRR11 et 7) - collagène I et lumican (LRR7) - collagène I [259, 260, 261, 262]. A ce jour, la décorine a été décrite comme pouvant lier le collagène de type VI [263] et interagir avec le collagène de type XII et XIV [264, 265].



**Figure 48 :** Schéma simplifié de l'interaction entre les molécules de collagène et décorine - D'après Afexa.com.

Les résultats de Rühland et al. en 2007 suggèrent que la décorine régule la fibrillogénèse dans la MEC [266]. Par ajout de décorine sur des fibroblastes DCN<sup>-/-</sup>, une augmentation du diamètre des fibrilles fût constatée. Ces auteurs précisent également qu'une décorine sans GAG aboutit à la réduction de la fibrillogénèse, confirmant les résultats obtenus précédemment par Seidler et al. [267]. En fait, la chaîne GAG de la décorine contribue au bon espacement entre les fibrilles de collagène [185, 266, 268]. D'une manière générale, la chaîne GAG de la décorine joue un rôle très important dans tous les tissus cartilagineux en permettant d'une part l'hydratation de ces tissus et, d'autre part, en offrant une résistance mécanique face aux forces de compression, grâce à leur organisation et aux interactions qu'elle crée avec de nombreux partenaires de la matrice extracellulaire [269]. Il fut également montré que la décorine interagissait avec le facteur de Von Willebrand via la chaîne GAG, démontrant ainsi son rôle important dans l'organisation de la matrice extracellulaire par la liaison à de nombreux composants [270]. De plus, l'inhibition de la fibronectine, maillon-clé de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire, par le core protéique de la décorine renforce également ce rôle d'organisateur de la MEC prêté à la décorine [271].

Plusieurs observations ont montré que la décorine était impliquée dans la biologie de la fibre élastique. La décorine forme un complexe avec la fibrilline-1 et la tropoélastine, le précurseur soluble de l'élastine mature et avec MAPG-1 (*microfibril-associated glycoprotein-1*) [272, 273, 274]. En 2002, Kielty et al., décrivent et classent la décorine et les protéoglycanes comme des molécules associées aux microfibrilles et aux fibres élastiques [275].



**Figure 49 :** La décorine active la voie de signalisation PI3K/Akt par interaction avec le récepteur IGF-1R et conduit à des réponses types cellulaires spécifiques - D'après Merlane et al., 2009.

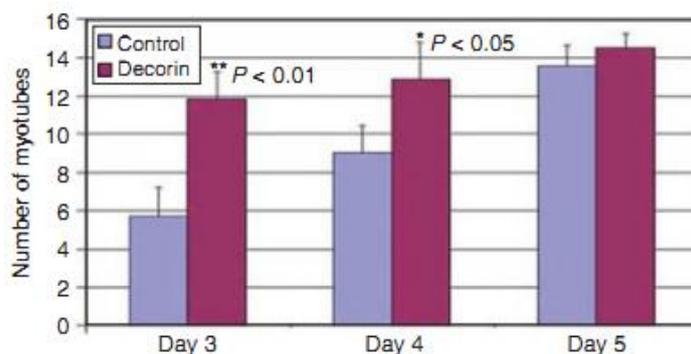
De récentes études ont permis d'établir le lien entre la décorine, la voie de signalisation de l'IGF-1R (*Insulin like growth factor receptor-1*) et la synthèse de fibrilline-1 dans les fibroblastes rénaux. Comme le présente la *figure 49*, cette régulation de la fibrilline-1 implique l'IGF-1R et la voie de signalisation PI3K/Akt ciblant mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et la kinase p70 S6 [275]. La décorine lie et induit la phosphorylation d'IGF-1R causant ainsi l'activation de PIP3K et d'Akt qui permet, via mTOR et p70S6K, une augmentation de la synthèse de fibrillin-1 dans les fibroblastes rénaux. Ces travaux indiquent que la décorine est capable de directement réguler la synthèse d'autres constituants de la MEC tels que la fibrilline-1, participant ainsi à son organisation.

L'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt par l'interaction décorine/IGF-1R conduit également à l'inhibition de l'apoptose dans les cellules endothéliales et les cellules épithéliales tubulaires [276, 277, 278] soulignant ainsi que la décorine présente différents rôles biologiques et ce de façon type cellulaire spécifique.

#### 2.4.2 Actions sur le muscle squelettique

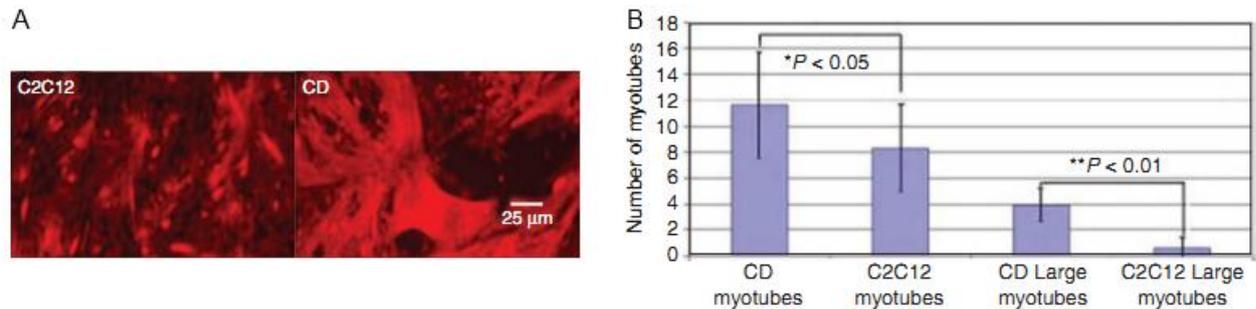
En 2001, Fukushima et al. observent que l'injection directe de protéine humaine recombinante décorine dans un muscle lacéré de souris permet de prévenir la fibrose et conduit à une augmentation de la régénération du muscle blessé. De plus, une restauration de la force du muscle lacéré à un niveau similaire à celui observé dans des muscles normaux de souris non injectées a été notée. Ces résultats indiquent que l'injection de décorine conduit à la restauration presque complète de la structure et de la fonction d'un muscle blessé [279].

Li et al. en 2007 ont montré que l'ajout de 10 mg/ml de décorine à des myoblastes C2C12 augmentait significativement la différenciation et la fusion cellulaire après 3 jours de traitement (Fig. 50) [280].



**Figure 50** : Effet de la décorine sur la différenciation cellulaire - D'après Li et al., 2007.

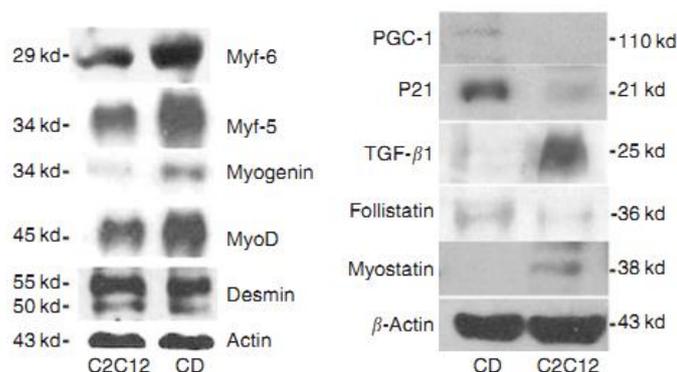
En comparant des myotubes contrôles à des myotubes transfectés avec un plasmide pAAV-CMV-décorine (CD), il fut confirmé, par marquage de la chaîne lourde de myosine et par comptage du nombre de noyaux, que la décorine permettait bien, *in vitro*, une augmentation de la différenciation cellulaire. Comme le présente la *figure 51*, les cellules CD sur-exprimant la décorine présentent des myotubes plus larges et en plus grand nombre que les cellules C2C12 non traitées.



**Figure 51 :** La décorine stimule la différenciation *in vitro* - D'après Li et al., 2007.

A : Immunomarquage de la chaîne lourde de myosine de cellules C2C12 contrôles et de cellules CD transduites par pAAV-CMV-décorine. B : Les cellules C2C12 CD présentent un plus grand nombre de myotubes que les cellules contrôles. La proportion de myotubes larges présentant plus de 3 nucléi est également plus importante dans les C2C12 CD.

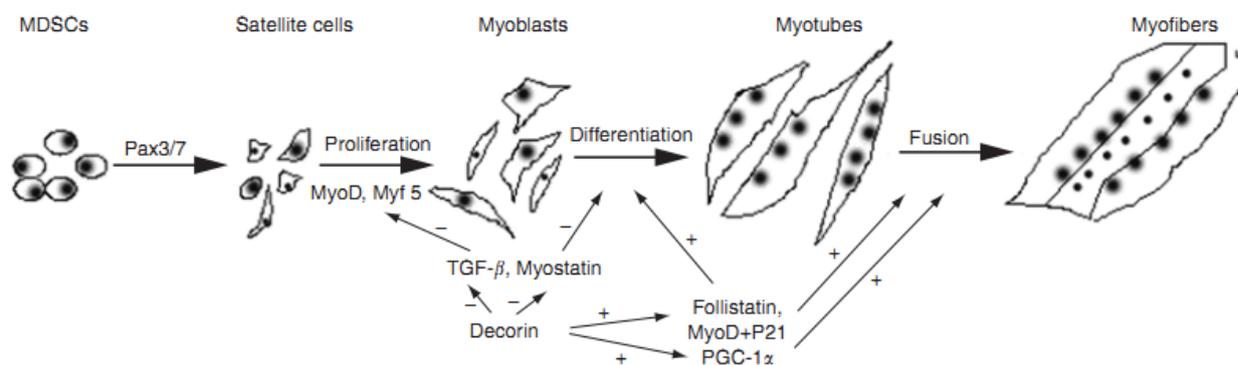
Li et al. ont ensuite étudié, par Western blot et RT-PCR, l'expression de différents gènes impliqués dans le contrôle de la différenciation myogénique. Comme l'indique la *figure 52*, les myoblastes CD présentent des taux d'expression protéique plus élevés pour Myf5, Myf6, MyoD et la myogénine comparés aux myoblastes C2C12 témoins.



**Figure 52 :** Comparaison par Western blot de l'expression de différents facteurs chez des cellules CD exprimant la décorine et des cellules C2C12 témoins - D'après Li et al., 2007.

La décorine permet également d'augmenter l'expression protéique de PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator-1 $\alpha$* ), de p21, de la follistatine et conduit à la régulation négative de la myostatine et du TGF- $\beta$ 1.

L'administration dans le muscle gastrocnemius gauche lacéré d'une dose de  $2.10^{11}$  vg d'AAV codant pour la décorine chez des souris saines C57BL6 de 6 semaines conduit, après 2 et 4 semaines de traitement, à une réduction de la fibrose et à une augmentation de la régénération cellulaire. Les muscles traités présentent un nombre de myofibres centronucléés significativement plus important que le muscle contrôle.

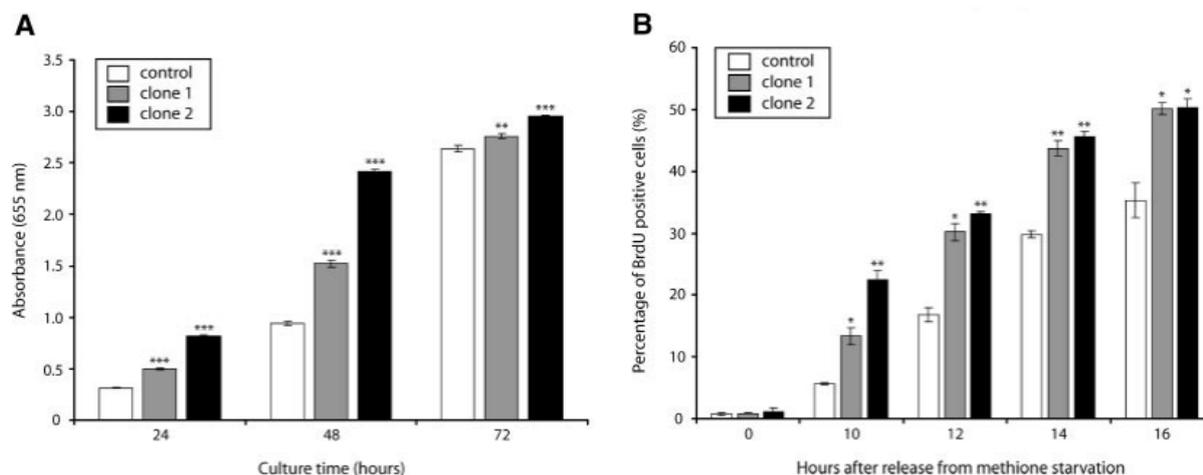


**Figure 53 :** Modèle de l'effet potentiel de la décorine sur la différenciation cellulaire et la régénération musculaire - D'après Li et al., 2007.

A la vue de ces résultats, Li et al. proposèrent un modèle expliquant l'implication de la décorine dans la différenciation cellulaire et la régénération musculaire. Comme le présente la *figure 53*, la décorine, en modulant l'activité de facteurs tels que TGF- $\beta$ , myostatine et follistatine, conduit, par activation de MyoD et Myf5, 2 MRF (*Myogenic regulatory factor*), à la détermination des MDSCs (*muscle-derived stem cells*). Par contrôle positif de MyoD et p21, kinases contrôlant la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des cellules musculaires, la décorine induit la différenciation des myoblastes et la formation de myotubes. Ce processus est soutenu par la régulation positive de la follistatine, présentée comme régulateur négatif de la myostatine [151]. Ce dernier facteur, inhibant la différenciation cellulaire et la croissance musculaire, a été décrit aux pages 14-16 comme régulant négativement MyoD, p21, la myogénine et Myf5 via une interaction Smad3-MyoD. De plus, la décorine permet une régulation positive de PGC-1 $\alpha$ , l'un des principaux facteurs impliqué dans le déterminisme du type de fibre musculaire, le métabolisme oxydatif et la biogénèse mitochondriale induite par l'exercice [281, 282].

En 2007, Kishioka et al. ont entrepris de confirmer les travaux de Li et al. [280]. Suite à la génération de deux lignées stables de cellules C2C12 sur-exprimant la décorine (clone 1 et 2,

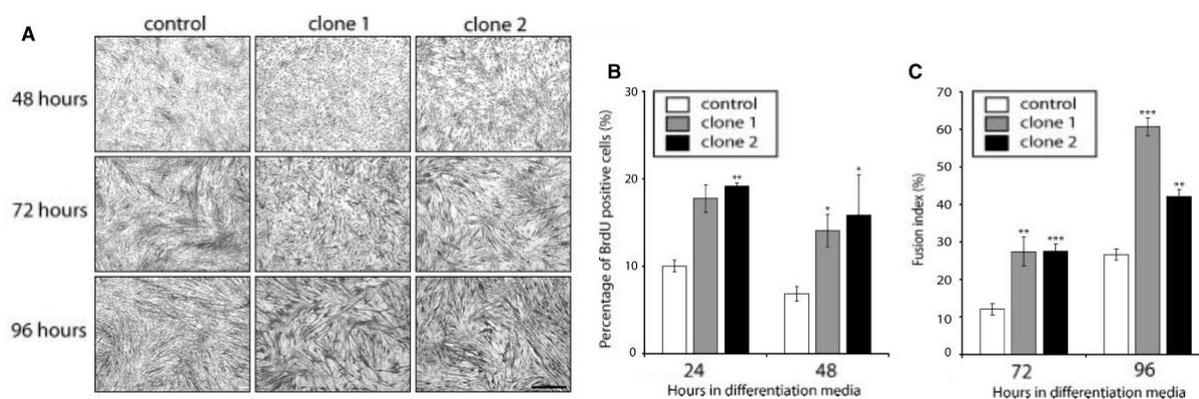
Fig. 54), il fut montré que la décorine permettait une augmentation de la prolifération cellulaire (Fig. 54A) [283]. En synchronisant les cellules C2C12 en phase G0/G1 par privation de méthionine, Kishioka et al. ont montré, par analyse de l'incorporation de BrdU à des temps définis, que les cellules C2C12 sur-exprimant la décorine progressaient plus rapidement de la phase G0/G1 vers la phase S en comparaison de cellules C2C12 contrôles (Fig. 54B). Ainsi, la décorine permet une accélération de la prolifération des cellules C2C12.



**Figure 54 :** La surexpression de la décorine promeut la prolifération des myoblastes C2C12 - D'après Kishioka et al., 2007.

A : 1000 cellules C2C12 / puits de plaque 96-puits ont été cultivées pendant 72 h dans un milieu DMEM et 10% de sérum. Le milieu a ensuite été remplacé par un milieu frais et les cellules incubées pendant 24, 48 et 72 h. A la fin de la période d'incubation, la prolifération cellulaire a été mesurée. B : Suite à une culture de 16 h dans du milieu DMEM 10% sérum, les cellules C2C12 en prolifération sont ensuite arrêtées en phase G0 par remplacement avec un milieu DMEM 1% sérum exempt de méthionine. A différents temps, un pulse de 15 minutes avec du BrdU est effectué. Le pourcentage de noyaux positifs pour le BrdU par rapport au nombre total de noyaux est ensuite déterminé.

Kishioka et al. ont également observé que l'induction de la différenciation, par changement de milieu de croissance DMEM + 10% FSB par du milieu DMEM + 2% HS, conduisait à un retard du processus de différenciation des cellules sur-exprimant la décorine (Fig. 55A). En effet, alors que des cellules C2C12 contrôles commencent à s'allonger et à fusionner entre elles 48 heures après induction de la différenciation, les cellules sur-exprimant la décorine (clone 1 et 2) restent mono-nucléées et le nombre de myotubes naissant est relativement faible (Fig. 55A). Cependant, après 72 heures d'incubation dans le milieu DMEM + 2% HS, les cellules sur-exprimant la décorine font état d'un nombre de myotubes plus élevé que dans les cellules contrôles. Comme l'atteste la *figure 55C*, l'index de fusion, témoin du processus de différenciation terminale [284], est plus élevé dans les cellules sur-exprimant la décorine 72 et 96 heures après induction de la différenciation. A 96 heures, les cellules sur-exprimant la décorine ont généré des myotubes géants hypertrophiques (Fig. 55A).



**Figure 55 :** La surexpression de la décorine retarde la sortie des cellules du cycle cellulaire et stimule la formation de myotubes - D'après Kishioka et al., 2007.

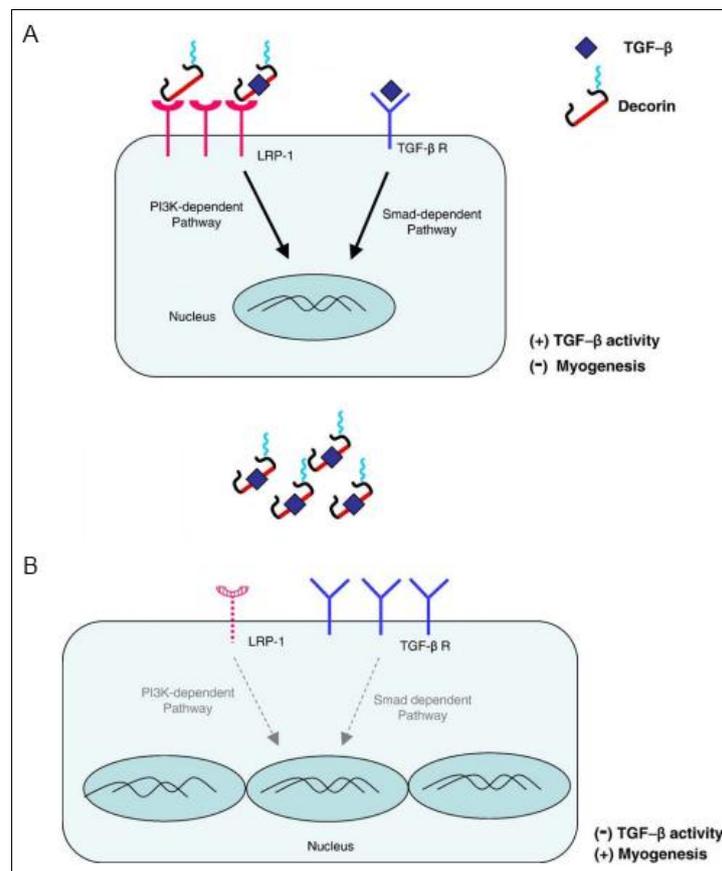
A : Images représentatives de la différenciation cellulaires de myoblastes C2C12 témoins et de myoblastes sur-exprimant la décorine (Clone 1 et 2) à 48, 72 et 96 heures de différenciation. Barres = 20 nm. B : Résultats de l'incorporation de BrdU, témoin du nombre de cellules en phase S, dans des cellules sur-exprimant la décorine et des C2C12 témoins. La différenciation est induite par un milieu DMEM + 2% HS et un pulse de BrdU de 15 minutes réalisé avant la fixation et l'analyse par immunofluorescence de l'incorporation de BrdU. C : Index de fusion des cellules sur-exprimant la décorine et de cellules contrôles à 72 et 96 heures de différenciation. L'index de fusion, utilisé pour quantifier la différenciation terminale, est déterminé comme étant le pourcentage de noyaux contenus dans les myotubes (au moins 2 noyaux) par rapport au nombre total de noyaux.

A la vue de ces observations, l'initiation de la différenciation dans les cellules sur-exprimant la décorine semble donc être retardée en comparaison des cellules témoins. Des études d'incorporation de BrdU ont ainsi été réalisées durant l'induction de la différenciation afin d'identifier le nombre total de cellules restant dans le cycle cellulaire. Comme le présente la *figure 55B*, 24 heures après induction de la différenciation, approximativement 10% des cellules contrôles sont BrdU positives contre 19% pour les cellules sur-exprimant la décorine. Après 48 heures d'incubation, le pourcentage de cellules en phase S est toujours plus important dans les clones décorine par rapport aux cellules témoins. Ces résultats indiquent que les cellules sur-exprimant la décorine ne peuvent pas facilement quitter le cycle cellulaire pour se différencier. Corrélés au nombre de myotubes géants hypertrophiques observé 96 heures après induction de la différenciation dans les cellules C2C12 sur-exprimant la décorine, ces résultats suggèrent que la surexpression de la décorine retarde dans un premier temps la sortie du cycle cellulaire puis, dans un deuxième temps, stimule la fusion des myoblastes C2C12.

En accord avec les travaux de Li et al., décrits aux pages 54-56, l'étude des niveaux d'expression de facteurs régulateurs myogéniques tels que MyoD, myf5 et la myogénine étudiés (pour les clones 1 et 2 ainsi que pour les cellules témoins) par Western blot révèlent que la décorine altère l'expression de nombreux facteurs myogéniques critiques et retarde

ainsi l'initiation de la différenciation jusqu'à 48h, et promeut ensuite une importante différenciation à 72 et 96h. A la vue de ces résultats, la surexpression de la décorine conduit à une augmentation de la prolifération des cellules C2C12 et à un processus de différenciation plus important et décalé dans le temps induisant une importante hypertrophie des myotubes.

Les fibroblastes et autres cellules d'origines mésenchymateuses sont connus pour internaliser efficacement la décorine par endocytose médiée par un récepteur [285, 286]. En 2006, Brandan et al. ont identifié le récepteur pour la décorine comme étant LRP-1 (*low-density lipoprotein related protein*) [287]. LRP est un récepteur appartenant à la famille des récepteurs LDL (*low-density lipoprotein*) qui lie de nombreux ligands [288]. LRP permet la liaison et l'endocytose de différents composés de la MEC tels que la thrombospondine [289], la fibronectine [290], des métalloprotéinases de la matrice [291] ou encore CTGF (*connective tissue growth factor*) [292]. Brandan et al. ont pu vérifier que la décorine était endocytée et dégradée dans des myoblastes C2C12 et que ces 2 processus étaient bloqués par la suppression de l'expression de LRP (réalisée en utilisant des siRNA). Ces travaux suggèrent que LRP-1 pourrait être le récepteur par lequel la décorine lie et régule la signalisation du TGF- $\beta$  et présente LRP comme un nouveau point de contrôle de l'activité de la décorine (Fig. 56).



**Figure 56 :** La décorine régule l'activité du TGF- $\beta$  durant la différenciation du muscle squelettique -  
D'après Brandan et al., 2007.

A : Myoblastes : Le TGF- $\beta$  se lie à son récepteur et active la voie de signalisation des Smads. La décorine lie le TGF- $\beta$  et interagit avec les récepteurs LRP pour ensuite activer la voie de signalisation PI3K. Ces 2 voies de signalisation conduisent à l'inhibition de la myogenèse. B : Myotubes : Une fois les myoblastes différenciés, le taux de décorine dans la MEC augmente. La décorine peut lier et séquestrer le TGF- $\beta$  dans la MEC et concentrer ce dernier facteur loin de la membrane et des récepteurs TGF- $\beta$ R. Il en résulte une baisse de la signalisation du TGF- $\beta$  permettant à la myogenèse de se produire.

Selon les auteurs, la décorine pourrait jouer différents rôles dans le muscle squelettique. Tout d'abord, en agissant comme une molécule clef de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  [293, 294] via LRP dans les myoblastes, notamment lors de processus tels que la migration des myoblastes. En inhibant la migration des myoblastes, la décorine établit et coordonne une densité critique de myoblastes permettant la différenciation musculaire lors de la myogenèse embryonnaire. Suite à cette étape, en modulant l'activité du TGF- $\beta$  dans la MEC par séquestration de ce facteur ainsi gardé éloigné de ces récepteurs [295], la décorine permettrait la différenciation cellulaire.

#### 2.4.3 La décorine : un inhibiteur de la croissance tumorale

Le cancer est une pathologie complexe, caractérisée par une multitude d'anomalies moléculaires et génétiques, affectant la prolifération, la différenciation cellulaire, l'apoptose ainsi que la mobilité cellulaire. La croissance des tumeurs est souvent dépendante ou facilitée par la surexpression de récepteurs à tyrosine kinase tels que le récepteur EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) conduisant à un avantage de croissance [296]. Exprimé par de nombreux types cellulaires, tels que les cellules épithéliales, EGFR est constitué d'un domaine extracellulaire de liaison, dont les principaux ligands sont l'EGF et le TGF- $\alpha$ , d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'un domaine intracellulaire qui a une activité tyrosine kinase permettant d'assurer la transduction du signal. Suite à la fixation d'un ligand spécifique et à la dimérisation du récepteur EGFR, le domaine intrinsèque tyrosine kinase est activé, entraînant l'autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine cytoplasmique C-terminal de EGFR et, par la même, l'initiation d'une cascade de signaux intracellulaires. Les voies de transduction du signal de l'EGFR font intervenir les voies Ras/MAPKinase, la phosphatidyl inositol 3-kinase, Akt, la protéine kinase C et la phospholipase. Ces voies de signalisation contrôlent la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la survie cellulaire [297]. Dans le cas d'un dysfonctionnement cellulaire et de cellules tumorales humaines, l'EGFR est sur-exprimé et entraîne la croissance et la progression tumorale, l'angiogenèse, l'invasion, le développement métastatique ainsi que l'inhibition de l'apoptose.

En 1995 et 1997, Santra et al. ont décrit la décorine comme capable de supprimer la croissance des cellules tumorales [298, 299]. Cette capacité s'opère par interaction directe avec l'EGFR [300, 301, 302]. La décorine permet également une régulation négative de l'EGFR [303] et d'autres récepteurs tyrosine kinase de la famille ErbB [304], bloquant ainsi la croissance tumorale [298]. En 2006, Seidler et al. démontrent que l'injection intrapéritonéale de 2,5-10 mg/kg de core protéique de décorine tous les 2 jours conduit, en 18-38 jours, à une réduction significative et dose dépendante de la croissance de la xénogreffe tumorale [305].

De nombreux autres travaux tels que ceux de Hu et al., en 2009 [306], de Khan et al., en 2011 [307], font de la décorine un potentiel nouvel agent anti-cancéreux.

#### 2.4.4 La décorine dans la cornée

Dans la cornée, la décorine a été montrée comme étant impliquée dans la régulation de la transparence, une fonction clef de la vision. Il a été rapporté que des mutations dans le gène de la décorine étaient associées à la dystrophie stromale congénitale, une maladie conduisant à une opacité de la cornée et à des anomalies de la vision. Cette maladie est causée par une mutation de type « décalage du cadre de lecture » (bp941 ou bp967) dans le gène de la décorine conduisant à une forme tronquée de la DCN délétée de 33 acides aminés au niveau du domaine C-terminal. Ce manque de décorine fonctionnelle conduit à une désorganisation des fibrilles de collagène et du matériel filamenteux dans le stroma [308]. De plus, suite à une blessure dans la cornée, le niveau de TGF- $\beta$  augmente et induit une différenciation des kératocytes en myofibroblastes, entraînant un phénomène de fibrose dans la cornée. En 2011, Mohan et al. ont démontré *in vitro* que la surexpression de la décorine dans les fibroblastes de la cornée bloquait la transformation des myofibroblastes et le développement de la fibrose induit par le TGF- $\beta$ , suggérant ainsi qu'une thérapie génique par la décorine pourrait être utilisée dans le traitement *in vivo* de cicatrisation de la cornée [309].

#### 2.4.5 Autres rôles de la décorine

Au-delà de son implication dans la régulation de la constitution de la MEC, dans la fibrillogénèse, le développement du muscle squelettique, le contrôle de la migration et de la progression du cycle cellulaire, la décorine joue également un rôle dans l'angiogenèse [310], l'inflammation [311] ainsi que dans certains processus neurologiques [312].

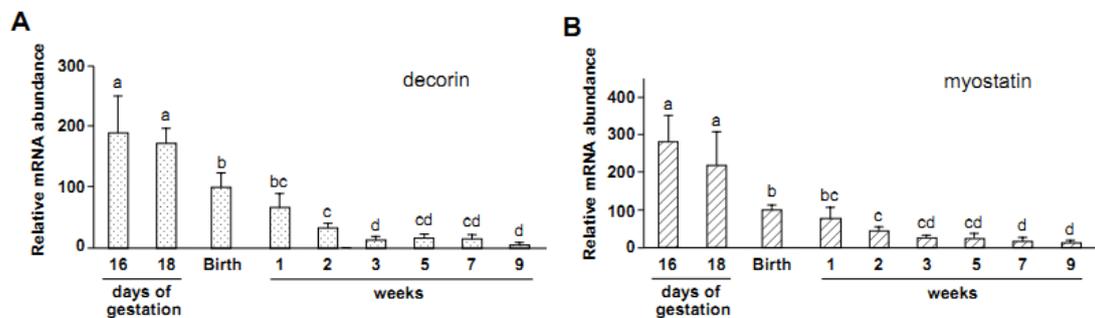
### 2.5 Décorine et myostatine

La matrice extracellulaire, qui est composée d'une variété de molécules telles que le collagène, les protéoglycanes et les glycoprotéines, n'est pas seulement un tissu de maintien

cellulaire mais également une réserve pour des facteurs de croissance [313]. En effet, un nombre grandissant de facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ , IGF, FGF et HGF ont été identifiés au cours des dernières années comme pouvant être associés à des composés de la MEC tels que les PGs [314]. La décorine, notamment, a été décrite comme pouvant lier et moduler [315] l'activité du TGF- $\beta$  via son core protéique [294]. En effet, ce SLRP stimule la signalisation du TGF- $\beta$  par LRP dans des myoblastes [316] alors qu'il diminue, par séquestration dans la MEC, la bio-activité de ce facteur dans des myotubes différenciés [317]. La découverte de cette interaction décorine-TGF- $\beta$  a conduit différentes équipes à s'intéresser aux relations que la décorine pouvait avoir avec d'autres facteurs de croissance, en particulier avec la myostatine.

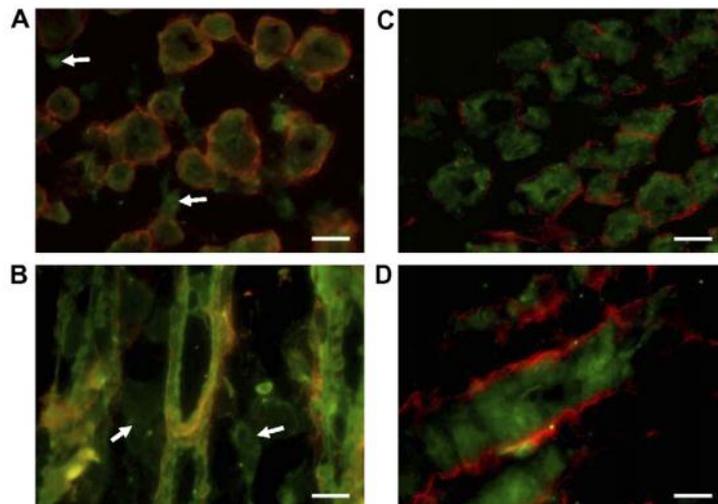
### 2.5.1 Profil d'expression spatio-temporelle

En 2007, Nishimura et al. ont montré que, lors du développement du muscle squelettique chez la rat, la décorine et la myostatine présentaient des profils d'expressions spatio-temporelles très similaires [241]. Comme le présente la *figure 57*, des études de RT-PCR ont permis de montrer que les transcrits d'ARNm de décorine et de myostatine sont principalement exprimés lors de la gestation et que les taux d'ARNm de décorine et de myostatine chutent à la naissance. Ainsi, les profils d'expression de l'ARNm de décorine et de myostatine sont similaires au cours du développement pré et post-natal du muscle squelettique chez le rat.



**Figure 57 :** Expression de l'ARNm de décorine (A) et de myostatine (B) au cours du temps dans le muscle squelettique de rats - D'après Nishimura et al., 2007.

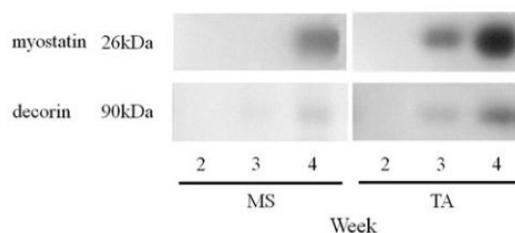
L'étude de la distribution de ces 2 facteurs par analyses immunohistochimiques a révélé que dans le muscle de rats nouveaux-nés ou adultes, la décorine était localisée dans la MEC, principalement à la périphérie des fibres musculaires, alors que la myostatine était localisée dans les fibres musculaires. Un double marquage avec des anticorps contre la décorine/myostatine et la laminine (Fig. 58) a permis de localiser, dans le muscle squelettique d'un fœtus de rat de 18 jours, la décorine dans le cytoplasme des fibres musculaires et dans la MEC incluant la membrane basale, et la myostatine exclusivement dans le cytoplasme des fibres musculaires.



**Figure 58 :** Localisation de la décorine et de la myostatine dans le muscle squelettique tibialis antérieur de fœtus de rat de 18 jours - D'après Nishimura et al., 2007.

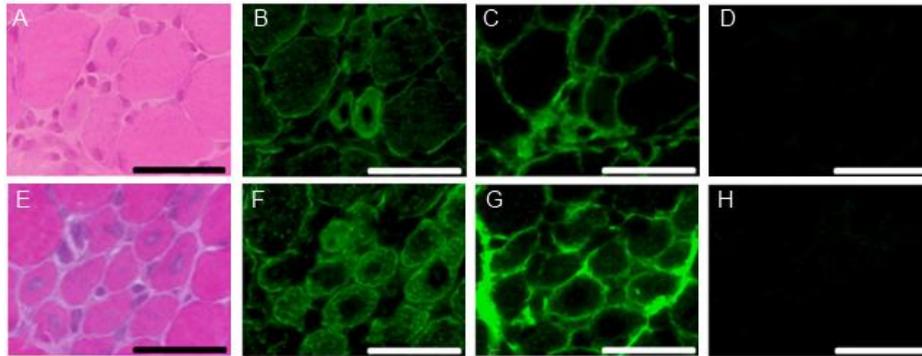
A et C : Sections transversales d'un tibialis antérieur de fœtus de rat de 18 jours. B et D : Sections longitudinales d'un tibialis antérieur de fœtus de rat de 18 jours. La myostatine est représentée en vert (C, D), la décorine en vert (A, B) et la laminine en rouge. Les flèches représentent la décorine dans la matrice extracellulaire.

En 2011, Hiroki et al. montrent que chez la souris dystrophique *mdx* mâle, la myostatine et la décorine présentent également des profils d'expression spatio-temporelle proches [248]. L'analyse par Western blot de la quantité de décorine et de myostatine révèle que dans le muscle tibialis antérieur (TA) de souris *mdx* de 2 semaines, les protéines myostatine et décorine ne sont pas détectables et qu'une importante augmentation du taux protéique de ces 2 facteurs est notée à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine (Fig. 59). Cette augmentation des taux protéiques est maximale à 4 semaines, lors de l'intense processus de régénération constaté chez la souris *mdx*. Dans le muscle masseter (MS), l'augmentation du taux protéique de la décorine et de la myostatine semble légèrement décalée dans le temps (Fig. 59). Les auteurs expliquent cette différence d'expression temporelle par un processus de régénération plus tardif dans le muscle masseter. Le tibialis antérieur et le muscle masseter n'ayant pas la même origine, ce processus de régénération est engagé à des temps différents.



**Figure 59 :** Analyses Western blot de la myostatine et de la décorine dans le muscle masseter et le tibialis antérieur de souris *mdx* mâles de 2, 3 et 4 semaines - D'après Hiroki et al., 2011.

Comme le présente la *figure 60*, les muscles masseter (Fig. 60A) et tibialis antérieur (Fig. 60B) de souris *mdx* de 4 semaines présentent des aires de régénération plus ou moins importantes. Le TA présente de larges aires de régénération alors que le MS fait l'objet d'un début de processus de régénération et ne présente donc que quelques aires de régénération. Dans ce contexte, la myostatine (Figs. 60B et F) est localisée dans le cytoplasme des fibres musculaires, au niveau de cellules centro-nucléées alors que la décorine est située autour des cellules musculaires en régénération (Figs. 60C et G).



**Figure 60** : Localisation de la myostatine et de la décorine dans le muscle masseter et tibialis antérieur de souris *mdx* mâles de 4 semaines - D'après Hiroki et al., 2011.

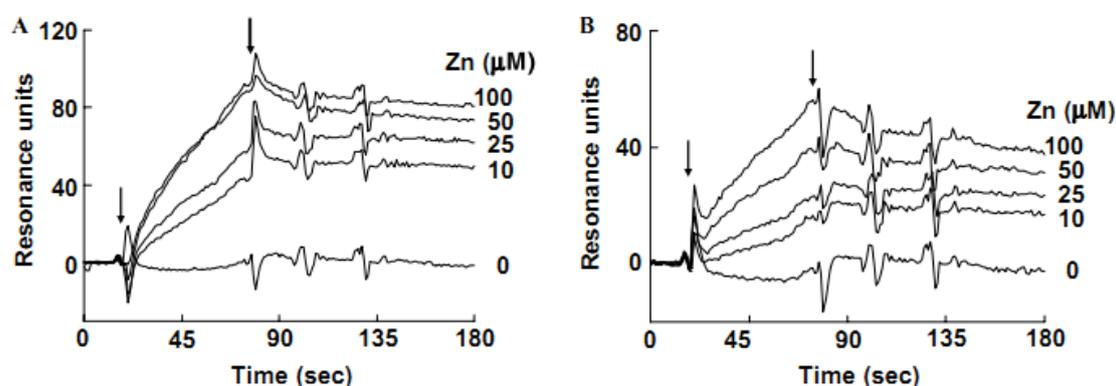
A, B, C et D : Coupes de muscles masseter de souris *mdx* mâles de 4 semaines ; E, F, G et H : Coupes de muscles tibialis antérieur de souris *mdx* mâles de 4 semaines ; A et E : Marquages HE (Hématoxyline et Eosine) ; B et F : Immunomarquages anti-myostatine ; C et G : Immunomarquages anti-décorine ; D et H : Contrôles négatifs.

Dans un contexte dystrophique, myostatine et décorine sont donc augmentées lors du processus de régénération cellulaire. Ces résultats pourraient suggérer une interaction directe entre ces 2 facteurs.

### 2.5.2 Etude *in vitro* de l'interaction décorine - myostatine et rôle du zinc

Yang et al., en 1999, et Dungan et al., en 2003, montrent respectivement que la décorine est une métalloprotéine capable de lier 2 ions  $Zn^{2+}$  [230] (Fig. 43) et que la présence de zinc est nécessaire pour observer une interaction entre la décorine et différents partenaires de la MEC tels que le collagène de type I, II, IV et V, la fibronectine et le fibrinogène [231] (Fig. 44). Sur la base de ces observations, Miura et al. ont réalisé une série d'analyses - basées sur la technique de résonance plasmonique de surface - de l'interaction décorine/myostatine [318]. Cette méthode consiste à immobiliser un composé tel qu'une protéine sur une surface. Le partenaire supposé est ensuite injecté et le système permet de mettre en évidence leur liaison.

Comme l'indique la *figure 61*, l'interaction entre la myostatine et la décorine fut examinée en absence ou en présence de différentes concentrations de  $Zn^{2+}$ . Il fut ainsi montré que la décorine liait la myostatine en présence d'ions zinc d'une concentration supérieure à 10  $\mu M$  mais pas en absence de zinc (Fig. 61A). Afin de déterminer si la décorine liait la myostatine via son core protéique, Miura et al., ont examiné l'interaction de la myostatine avec le core protéique de la décorine, la chaîne de GAG ayant été digérée par la chondroitinase ABC. Comme le présente la *figure 61B*, le décoron (core protéique de la décorine) lie la myostatine de façon dose et zinc dépendante. La suppression de la chaîne GAG n'affecte donc pas la liaison de la décorine à la myostatine.



**Figure 61 :** Analyses de résonance plasmonique de surface de l'interaction de la décorine (A) et du core protéique de décorine (B) avec la myostatine en fonction de la concentration de  $Zn^{2+}$  - D'après Miura et al., 2006.

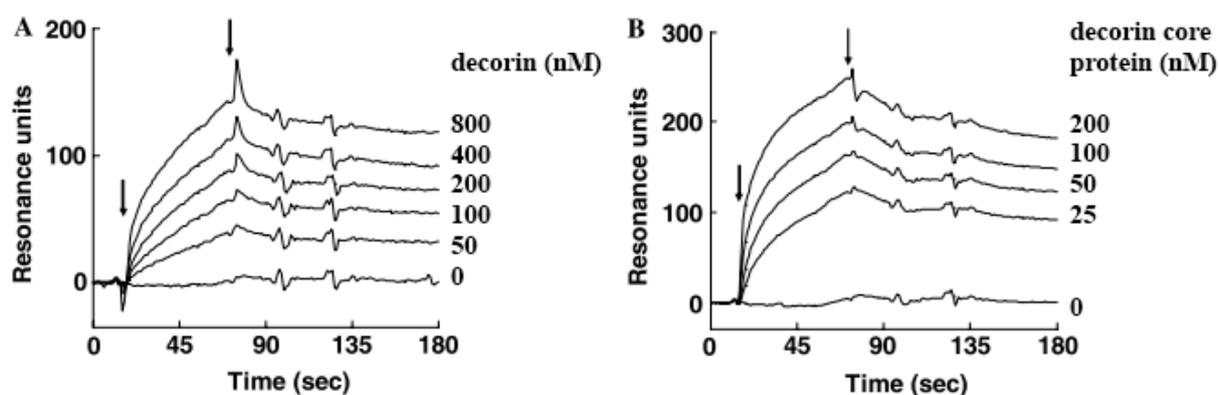
Afin de confirmer la liaison du  $Zn^{2+}$  au core protéique de décorine, une séparation par SDS-PAGE fut menée sur le core protéique avec ou sans  $ZnCl_2$ , le  $Zn^{2+}$  étant marqué par une sonde fluorescente. Une bande fluorescente de 45 kDa fut détectée, confirmant que le complexe core protéique de décorine /  $Zn^{2+}$  se forme lors de conditions similaires à l'étude de résonance plasmonique de surface. Les constantes d'association et de dissociation obtenues par Miura et al. sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

	$K_D$ (M)	$k_a$ (l/Ms)	$k_d$ (l/s)
Decorin	$2.02 \times 10^{-8}$	$7.58 \times 10^4$	$1.53 \times 10^{-3}$
Core protein	$9.36 \times 10^{-9}$	$2.72 \times 10^5$	$2.54 \times 10^{-3}$

**Tableau 2 :** Interaction entre la décorine et la myostatine et entre le core protéique de décorine et la myostatine - D'après Miura et al., 2006.

$k_a$  = Constante d'association ;  $k_d$  = Constante de dissociation ;  $K_D = k_d/k_a$ . Valeurs obtenues par BIAevaluation 3.2 et sur 3 études indépendantes.

Miura et al. ont également conduit une étude par résonance plasmonique de surface destinée à apprécier l'interaction décorine ou core protéique de décorine - myostatine en présence de concentrations variables de décorine ou de core protéique de décorine et d'une concentration fixe de  $ZnCl_2$  de 100  $\mu M$ . Comme le présente la *figure 62*, plus la quantité de décorine ou de core protéique utilisée est importante, plus le nombre d'unités de résonance - témoins de l'interaction décorine ou décoron/myostatine - est grand. Ainsi, l'interaction entre la décorine et la myostatine est dose dépendante. Il est à noter que le core protéique de décorine, à concentration équivalente, permet une meilleure interaction avec la myostatine que la protéine décorine entière.



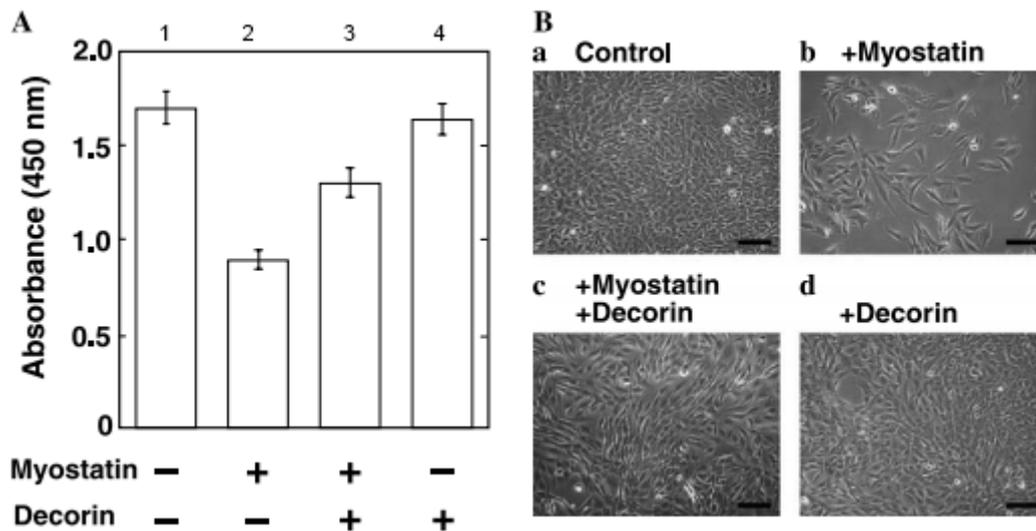
**Figure 62 :** Analyses de résonance plasmonique de surface de l'interaction entre la myostatine et différentes concentration de décorine (A) et de core protéique de décorine (B) - D'après Miura et al., 2006.

### 2.5.3 Effets anti-myostatine de la décorine sur la prolifération et la différenciation cellulaire

Suite à la mise en évidence de l'interaction décorine - myostatine et de l'importance du zinc dans l'association entre ces 2 protéines, Miura et al. ont entrepris d'étudier les conséquences de cette interaction au niveau cellulaire [318]. Comme nous l'avons précédemment décrit aux pages 12-14, la myostatine inhibe la prolifération cellulaire. La question qu'on pourrait se poser est la suivante : est-ce que la décorine peut inhiber l'activité anti-proliférative de la myostatine ?

Comme le présente la *figure 63*, Miura et al. ont ajouté aux cellules C2C12, cultivées dans un milieu de prolifération en présence de 50  $\mu M$  de  $ZnCl_2$ , les composés suivants : 2) 2  $\mu g$  de myostatine, 3) 2  $\mu g$  de myostatine et 20  $\mu g$  de décorine et 4) 20  $\mu g$  de décorine pendant 72 h à 37°C. Le nombre de cellules fut ensuite compté : l'ajout de 2  $\mu g$  de myostatine conduit à une diminution du nombre de cellules en comparaison de l'échantillon contrôle. Lorsque 20  $\mu g$  de décorine sont ajoutés aux 2  $\mu g$  de myostatine, la prolifération cellulaire est diminuée par rapport au puits témoin mais supérieure à celle observée dans l'échantillon ayant reçu

uniquement 2 µg de myostatine. La décorine permet donc de contrecarrer les effets négatifs de la myostatine sur la prolifération cellulaire. Il est à noter que l'ajout de 20 µg de décorine ne conduit pas, dans ce contexte, à une augmentation de la prolifération cellulaire par rapport à l'échantillon témoin. La *figure 63B* permet d'observer l'effet de la myostatine sur la prolifération cellulaire et l'effet anti-myostatine de la décorine.

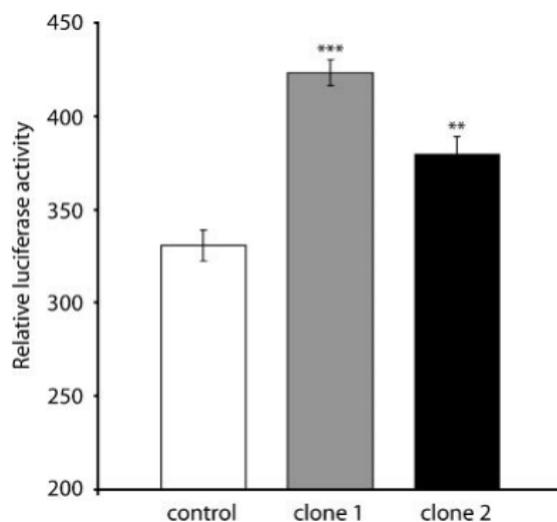


**Figure 63** : La décorine bloque l'effet inhibiteur de la myostatine sur la prolifération de cellules C2C12 - D'après Miura et al., 2006.

Les myoblastes myostatine déficients présentent une augmentation de la prolifération ainsi qu'une altération du cycle cellulaire dans le temps conduisant à une hypertrophie des myotubes [77]. Ces observations ont également été faites par Kishioka et al. sur des myoblastes sur-exprimant la décorine (Fig. 55). Ces auteurs ont donc souhaité vérifier si la surexpression de la décorine affectait l'expression et l'activité de la myostatine.

Il fut montré par RT-PCR et Western blot que la décorine n'entraînait aucune modification de l'expression de la myostatine au niveau transcriptionnel et protéique mais que la surexpression de ce SLRP engendrait une baisse de l'activité de la myostatine endogène. Pour aboutir à cette conclusion, Kishioka et al. ont réalisé un test « Myostatine » [157] basé sur le principe suivant : la myostatine présente la capacité d'exercer un contrôle négatif sur son promoteur via Smad7 [57]. Les auteurs ont transfecté des cellules C2C12 témoins et sur-exprimant la décorine avec un plasmide contenant les 1,6 kB du promoteur de la myostatine suivi du gène rapporteur luciférase. Si la myostatine est inactivée, cette dernière ne pourra pas exercer d'action négative sur son promoteur et en conséquence il y aura production de luciférase. Au contraire, si la myostatine endogène est active, le promoteur de la myostatine contenu dans le vecteur ajouté sera réprimé et par conséquent, un faible taux de luciférase sera détecté. Comme le présente la *figure 64*, les cellules sur-exprimant la décorine présentent un

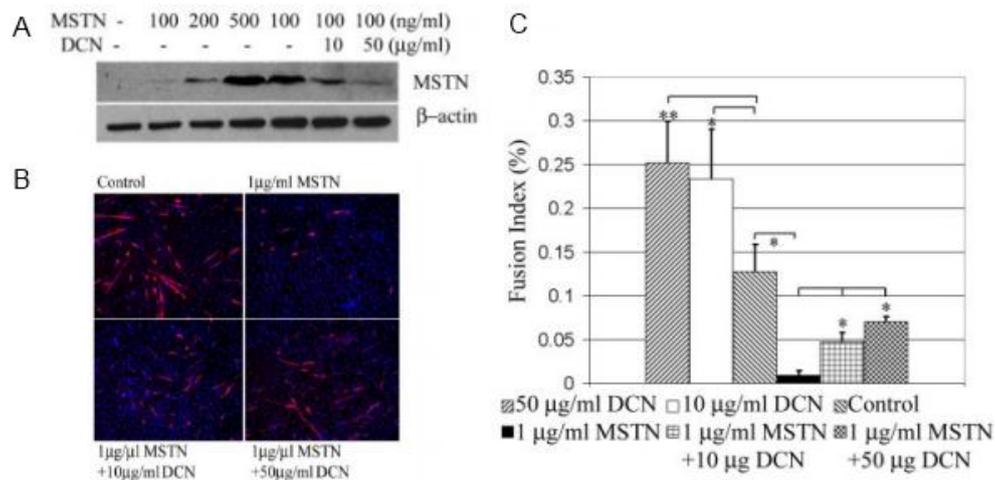
taux de luciférase plus fort que les cellules témoins, suggérant ainsi que la surexpression de la décorine pourrait atténuer l'activité de la myostatine endogène synthétisée par les myoblastes.



**Figure 64 :** La surexpression de la décorine atténue l'activité de la myostatine endogène synthétisée par les myoblastes C2C12 - D'après Kishioka et al., 2007.

Kishioka et al. ont ensuite montré que la surexpression de la décorine diminuait l'action inhibitrice de la myostatine sur la prolifération cellulaire et que la phosphorylation de Smad2 était moins marquée dans les cellules sur-exprimant la décorine. La décorine semble donc jouer un rôle important dans la prolifération et la différenciation des myoblastes en interférant - directement ou indirectement - avec la signalisation de la myostatine, endogène comme exogène. A l'instar de son action sur le TGF- $\beta$  et à la vue des travaux de Miura et al. [318], on peut penser que la décorine séquestre la myostatine dans la matrice extracellulaire, empêchant ainsi ce facteur d'exercer son effet négatif sur la prolifération et la différenciation musculaire.

Ces résultats confirment les travaux de Zhu et al. qui, en 2007, ont fait état d'une réduction des effets de la myostatine sur fibroblastes et myotubes à la suite d'ajout de décorine [319]. Zhu et al. ont également confirmé les travaux de Li et al. avançant que la décorine stimulait l'expression de la follistatine [280], un inhibiteur de la myostatine. Comme le présente la *figure 65A*, l'ajout d'une quantité croissante de décorine réduit le taux protéique de myostatine dans les fibroblastes PP1. Ces auteurs ont également démontré que la décorine contrecarrait les effets inhibiteurs de la myostatine sur la prolifération et la différenciation cellulaire. En effet, alors que 1  $\mu\text{g/ml}$  de MSTN réduit fortement la croissance de myoblastes C2C12, l'ajout de 50  $\mu\text{g/ml}$  de décorine permet une restauration de la prolifération et de la différenciation cellulaire (Fig. 65B et C).



**Figure 65** : La décorine bloque les effets de la myostatine dans les fibroblastes PP1 et les myoblastes C2C12 - D'après Zhu et al., 2007.

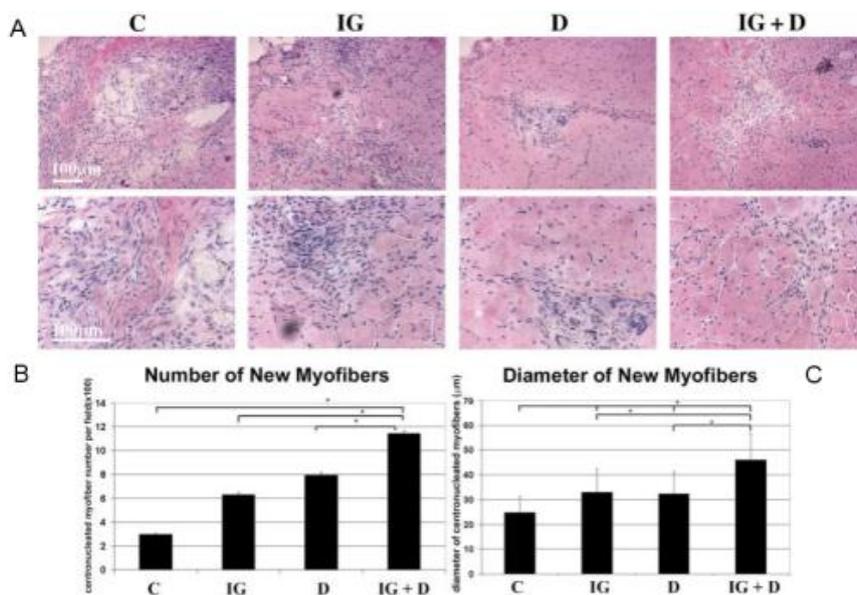
A : Analyse Western blot des taux protéiques de myostatine suite à l'incubation de MSTN ou d'une combinaison de MSTN et de décorine dans des fibroblastes PP1. B : Immunomarquage de la chaîne lourde de myosine de myoblastes C2C12 cultivés avec un traitement de 1 µg/ml de MSTN seule ou co-incubés avec 1 µg/ml de MSTN et différentes concentration de DCN pendant 5 jours. C : Index de fusion estimant les capacités de différenciation de myoblastes C2C12 en réponse à différents traitements.

Selon ces auteurs, la décorine pourrait réprimer l'activité de la MSTN par 3 voies : 1) par liaison direct avec la myostatine, 2) indirectement par régulation négative suite à la liaison au TGF-β et 3) indirectement par stimulation de la follistatine.

#### 2.5.4 Etude *in vivo* de l'effet de la décorine

Les travaux publiés faisant état de résultats *in vivo* avec la décorine sont peu nombreux. En 1997, Giri et al. démontrèrent, par injection intra-trachéale de 1 mg/ml de décorine, le potentiel anti-fibrotique de la décorine chez le hamster BL atteint de fibrose pulmonaire [320]. En 2004, Grosselin et al. ont étudié le potentiel de la décorine pour neutraliser le TGF-β. Pour ce faire, ils ont administré quotidiennement pendant 7 jours de la décorine en intra-péritonéal à des souris *mdx* de 5 semaines [321]. Ils ont observé une diminution de 40% de l'ARNm de collagène de type I, témoin de l'inhibition *in vivo* du TGF-β par la décorine, le TGF-β ayant été décrit comme stimulant la synthèse de collagène [322, 323] et inhibant sa dégradation [323, 324]. Cette étude met en avant le rôle du TGF-β durant les premiers stades de la fibrogenèse chez la souris dystrophique et laisse à penser que la décorine pourrait neutraliser cette cytokine dans l'optique d'un traitement de la fibrose chez des patients DMD.

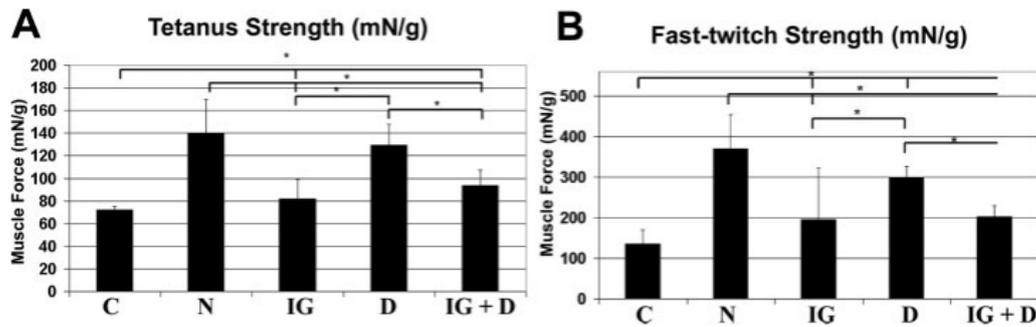
Dans l'optique de favoriser la régénération musculaire et de réduire la fibrose, Sato et al. ont utilisé une double approche thérapeutique : ils ont utilisé la décorine pour son effet antifibrotique et l'IGF-1 pour la régénération musculaire [326]. Suite à la lacération du muscle gastrocnemius (GM) de souris C57BL10 de 8 semaines, différents traitements ont été réalisés. Quatre semaines après lacération, toutes les souris ont été sacrifiées et les GM isolés. Comme le présente la *figure 66A*, les souris injectées avec 50 µg de décorine présentent un muscle GM moins touché par la fibrose que les souris non injectées. Le muscle GM traité à la décorine présente un nombre plus élevé de fibres nouvellement formées en comparaison du muscle GM contrôle (Fig. 66B). Il est à noter que ces myofibres présentent un diamètre moyen plus important que les myofibres du muscle témoin, soulignant ainsi que la décorine permet une hypertrophie de l'ordre de 30% (Fig. 66C).



**Figure 66 :** Etat et cicatrison d'un muscle contrôle ou traité à l'IGF-1 et/ou à la décorine, 4 semaines après une blessure par lacération - D'après Sato et al., 2003.

A : Marquage H&E d'un GM contrôle (C), injecté IGF-1 (G), injecté décorine (D) et co-injecté IGF-1 et décorine (IG + D). B : Nombre et diamètre moyens de myofibres nouvellement formées en fonction de différents traitements.

Sato et al. ont également constaté que la décorine permettait une réduction très importante de l'aire de fibrose et quasi-totale de l'aire de la cicatrice et que, suite au traitement à la décorine, la force tétnique et la force « fast-twitch » étaient grandement améliorées, permettant une restauration des fonctionnalités musculaires proche du niveau atteint par des souris non lacérées (Fig. 67). Cette étude a permis de conclure que la décorine permettait une restauration fonctionnelle d'un muscle lacéré.



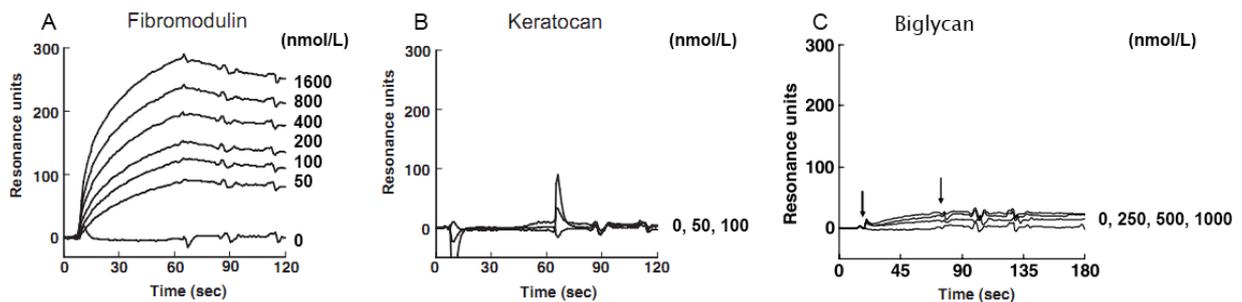
**Figure 67 :** Le traitement à la décorine entraîne un surplus de force permettant de restaurer les capacités fonctionnelles d'un muscle lacéré - D'après Sato et al., 2003.

L'ensemble de ces résultats *in vivo* indique que la décorine présente un réel potentiel thérapeutique. Cependant, au moment où nous avons entrepris nos analyses, aucune étude *in vivo* ne fait état du potentiel de la décorine dans un contexte dystrophique.

### 2.5.5 Les autres membres de la famille des SLRPs

Miura et al. ont récemment étudié l'interaction de la myostatine avec d'autres protéines, et notamment avec d'autres membres de la famille des SLRPs [318, 327].

Ces auteurs ont montré qu'en présence de zinc, la fibromoduline, un SLRP de la classe II, liait la myostatine (Fig. 68A) avec une affinité encore plus importante que la décorine, alors que le kératocane et le biglycane ne présentaient pas cette propriété (Fig. 68B, C). Il est intéressant, voire surprenant, de noter que la décorine interagit avec la myostatine alors que le biglycane, qui est assez proche de la décorine en terme de structure et de séquence, ne présente pas cette capacité.



**Figure 68 :** Analyses de résonance plasmonique de surface de l'interaction entre la myostatine et différentes concentrations de fibromoduline (A), de keratocane (B) et de biglycane - D'après Miura et al., 2006, 2009.

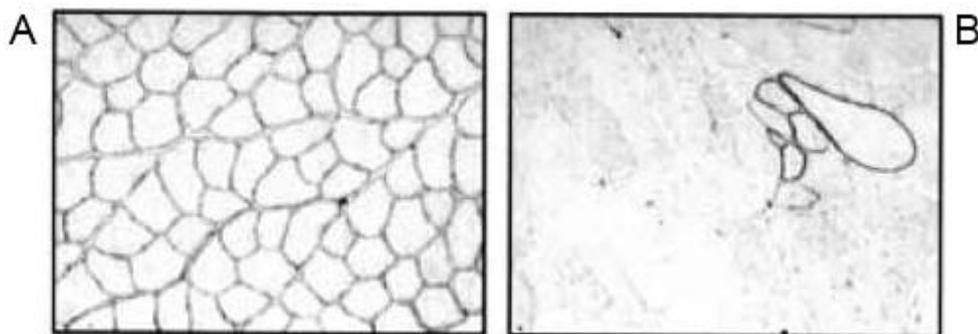
En conclusion, les travaux de Miura et al. montrent que la décorine n'est pas le seul membre de la famille SLRP - ni le seul composé de la matrice extracellulaire - à pouvoir se lier à la myostatine.

### 3. Modèles murins

#### 3.1 Modèle murin *mdx*

Découvert accidentellement en 1981 dans la lignée C57BL/10ScSn (B10) suite au dosage biochimique de routine d'un taux élevé de l'isoforme musculaire de la créatine kinase [244], la souris *mdx* (*X chromosome-linked muscular dystrophy*) est le premier modèle animal de DMD découvert et c'est aussi le plus utilisé.

Cette souris modèle présente une mutation non-sens C vers T au nucléotide 3185 sur le gène de la dystrophine dans l'exon 23 faisant apparaître un codon stop (TAA) à la place d'une glutamine (CAA). Il en résulte la production d'une dystrophine tronquée faisant 27 % de la taille de la dystrophine normale, qui est rapidement dégradée et ne peut être détectée dans la fibre musculaire [245] (Fig. 69). La dystrophine est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution des vertébrés, et son gène est probablement situé sur le chromosome X chez tous les mammifères placentaires. La souris *mdx* est fertile mais la taille des portées est deux fois moindre que la normale et la mortalité des souriceaux avant 4 semaines est multipliée par trois [328].



**Figure 69 :** Immunomarquages de la dystrophie dans le muscle d'une souris saine B10 (A) et d'une souris *mdx* (B) - D'après Ferre et al., 2004.

Le phénotype est normal et sans atrophie visible jusqu'à l'âge de 18 mois ; la souris *mdx* est nettement moins sévèrement touchée au plan clinique ou lésionnel que le malade DMD. Sa prise de poids est normale, voire même légèrement supérieure à la souris sauvage C57BL/10ScSn (par la suite nommée B10) du fait d'une hypertrophie musculaire [329]. Les souris femelles hétérozygotes sont asymptomatiques. Le taux de créatine kinase est

anormalement élevé dès les premiers jours de vie et ne baisse que tardivement vers 1 an en même temps que la nécrose musculaire diminue [330]. La faiblesse musculaire est minime et transitoire chez la souris jeune [331], et chez la souris âgée les résultats sont contradictoires puisque, selon les auteurs, on note soit une baisse de force après 20 mois comparé aux souris saines [332] ou alors aucune différence [333]. Cependant, le poids de la *mdx* diminue nettement après 52 semaines et sa durée de vie est inférieure aux souris B10 (20 à 24 mois contre 30) [334].

Le phénotype lésionnel des muscles squelettiques de la souris *mdx* évolue en 5 phases distinctes.

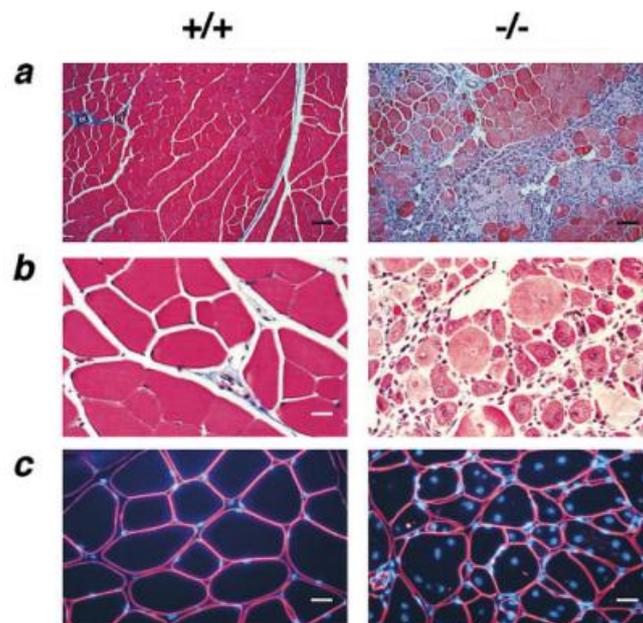
- Avant l'âge de trois semaines, au stade pré-nécrotique, seule une légère hypertrophie diffuse est visible, notamment dans les muscles des membres [335]. Une vague de nécrose musculaire massive apparaît brutalement à partir de trois semaines et touche de grands volumes de fibres adjacentes. Entre 3 et 5 semaines, la majorité des myofibres va subir une ou plusieurs vagues de nécrose/régénération [245]. L'apparition de nouveaux myotubes est visible 2 à 3 jours après la nécrose [336]. A cette étape, la répartition des muscles atteints rappelle les groupes touchés dans DMD : les muscles des membres sont plus sévèrement touchés que ceux de la tête, du cou et du tronc, alors que les muscles oculomoteurs sont épargnés [335].
- Le pic de nécrose situé entre 3 et 5 semaines, selon les auteurs, est suivi d'une régénération musculaire compensatrice intense et efficace jusqu'à l'âge de 12 semaines. On observe durant cette période une grande hétérogénéité du calibre des fibres dans les muscles des membres : le diamètre des fibres chez *mdx* est compris entre moins de 10 et plus de 140  $\mu\text{m}$ , alors que dans un muscle sain l'intervalle est compris entre 20 et 70  $\mu\text{m}$  [338]. Après le pic, les fibres touchées par la nécrose sont isolées.
- Entre 3 mois et un an, la pathologie de la souris *mdx* entre dans une phase dystrophique légère et chronique. En effet, la nécrose se stabilise à un niveau bas avec de rares fibres nécrosées, de petits groupes de fibres isolées en régénération, la persistance de noyaux centraux dans plus de 80 % des fibres et une absence de fibrose [245]. On observe encore une hétérogénéité de la taille des fibres, notamment du fait de la présence de fibres hypertrophiées – dont beaucoup sont fragmentées – augmentant en moyenne de 50 % la taille des fibres de souris *mdx* à 6 mois [334]. Le phénotype musculaire de la souris *mdx* adulte est donc différent de l'atteinte chez le malade DMD, et ceci est souvent attribué à une régénération efficace alors que dans le muscle DMD, les cycles de nécrose et régénération épuisent le stock de cellules myogéniques et les fibres nécrosées sont remplacées par du tissu conjonctif et adipeux.

- Après 1 an et jusqu'à la mort (2 ans), le phénotype *mdx* progresse jusqu'à un état lésionnel sévère dans le muscle squelettique strié touchant principalement les muscles proximaux des membres [335]. Les fibres en cours de régénération ou hypertrophiques se raréfient et les fibres dégénératives et nécrotiques persistent de manière isolée. Entre 12 et 15 mois, la fragmentation s'intensifie parallèlement à une atrophie des fibres et à une fibrose endomysiale [334]. Dans les derniers mois de vie, le phénotype lésionnel est sévère et proche de DMD [338], la fibrose est marquée et on peut parfois observer une infiltration de tissu adipeux blanc.

### 3.2 Modèle murin Gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>

Les souris Gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup> ( $\gamma$ sg<sup>-/-</sup>) sont des souris atteintes de gamma-sarcoglycanopathie ou LGMD 2C (*Limb Girdle Muscular Dystrophy 2C*), une dystrophie musculaire des ceintures rare de transmission autosomique récessive, due à des mutations dans le gène gamma-sarcoglycane (gSG) [339.]

La dystrophine lie l'actine et un complexe de protéines associées qui forme le complexe DGC (*dystrophin-glycoprotein complex*). L'un des « sous-complexes » du DGC, formé par les sarcoglycanes, a été décrit comme associé à des dystrophies musculaires autosomales récessives chez l'Homme en cas de mutation [340, 341, 342]. Ce sous-complexe est formé d'au moins 5 sous-unités sarcoglycanes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ ). La mutation dans le gène de l'un de ces sarcoglycanes conduit à la réduction des autres sarcoglycanes et à la déstabilisation du complexe sarcoglycanes conduisant à une fragilité membranaire.



**Figure 70 :** Analyses histologiques d'un quadriceps de souris sauvage et de souris  $\gamma$ -sarcoglycane<sup>-/-</sup>.  
D'après Hack et al., 1998.

A et B : Marquages au trichrome de Masson d'un quadriceps de souris sauvage et de souris  $\gamma$ -sarcoglycane<sup>-/-</sup>. C : Immunomarquage de la membrane plasmique avec un anticorps anti-dystrophine contre coloré au DAPI afin de révéler les noyaux centraux observés dans le muscle  $\gamma$ sg<sup>-/-</sup>.

Les souris  $\gamma$ -sarcoglycane<sup>-/-</sup> sont viables mais voient leur survie fortement diminuer à partir de 3 mois de vie. Ainsi, à 5 mois, seules 50% des souris  $\gamma$ sg<sup>-/-</sup> survivent. Ces souris sont moins actives que leurs congénères sauvages et plus lentes à initier la marche et la course à partir d'une position assise. Aucune différence de poids n'est observable à 8 semaines de vie en comparaison d'une souris sauvage mais à 20 semaines, la souris  $\gamma$ -sarcoglycane<sup>-/-</sup> présente une importante perte de poids (28,3 +/- 1,9g vs. 34.1 +/- 0.3 g). Le taux de créatine kinase, témoin d'une perturbation de l'intégrité membranaire, est 1,7 fois plus élevé chez la souris  $\gamma$ -sarcoglycane<sup>-/-</sup> que chez la souris témoin de 2 semaines, 10 fois plus important à 4 semaines et peut atteindre une augmentation 240 fois supérieure à 8 semaines [343].

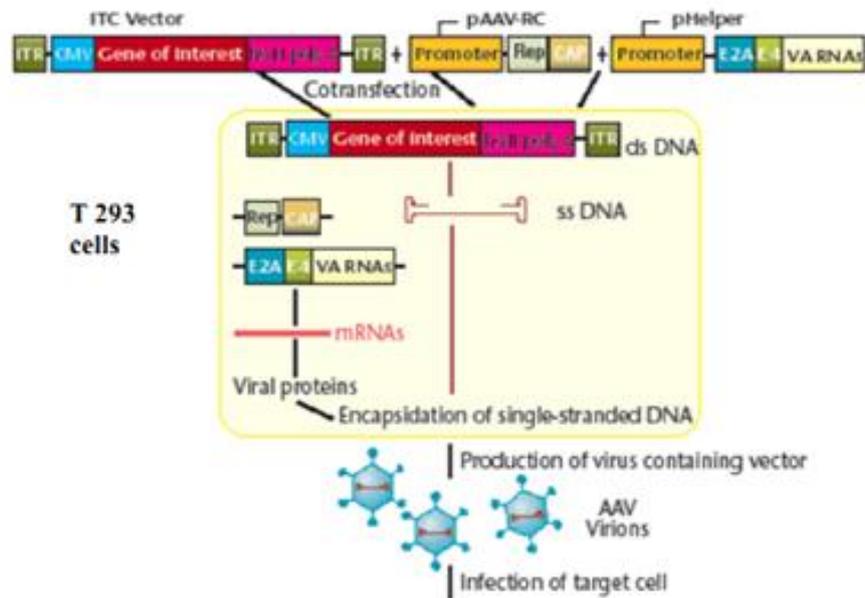
Dans les premiers stades de la vie, la souris  $\gamma$ -sarcoglycane<sup>-/-</sup> développe une dystrophie musculaire affectant la musculature proximale. Aucune altération de la dystrophine, du dystroglycane et de la laminine, présents normalement dans le sarcolemme des muscles déficients en sous unité  $\gamma$ , n'est observée. Ainsi, l'absence de sarcoglycane  $\gamma$  est suffisante pour causer l'instabilité membranaire et un processus dystrophique indépendamment de la dystrophine. Comme le présente la *figure 70*, dans le quadriceps d'une souris  $\gamma$ sg<sup>-/-</sup> les régions dégénératives, juxtaposées aux segments de myofibrilles intacts, sont plus importantes (Fig. 70A et B) et un intense processus de dégénération se met en place. La majorité des fibres musculaires intactes présente un noyau central où la régénération peut se dérouler et il est à noter que le nombre de noyaux centraux est fortement augmenté (x45) chez la souris déficiente en sous-unités  $\gamma$  (Fig. 70C). Entre 3 et 8 semaines, la souris  $\gamma$ -sarcoglycane<sup>-/-</sup> est atteinte par une importante nécrose.

Bien que le processus dystrophique engendré soit indépendant de la dystrophine, la déficience en sous-unités  $\gamma$  est suffisante pour observer des perturbations de la membrane musculaire similaires à celles observées chez la souris dystrophine déficiente. De plus, il est à noter que les souris  $\gamma$ -sarcoglycane présentent, à 20 semaines, d'importants troubles cardiaques dans le ventricule droit et gauche.

#### **4. Les virus adéno-associés (AAV)**

Le virus adéno-associé (AAV) fait partie de la famille des parvovirus. C'est un virus de petite taille non enveloppé possédant une molécule d'ADN monocaténaire. Il est non pathogénique chez l'Homme et il peut infecter un large spectre de cellules quiescentes ou en prolifération.

Le virus AAV est incapable de se répliquer sans la co-infection par un autre virus : adénovirus ou virus herpès. C'est pourquoi la production d'AAV recombinant se fait en utilisant un plasmide qui apporte des protéines adénovirales (Fig. 71).



**Figure 71** : Insertion d'un gène d'intérêt dans un vecteur AAV - D'après A. Vulin., 2005.

La lignée cellulaire 293(T) est transfectée avec 3 plasmides : 1) le plasmide contenant la cassette d'intérêt encadré d'ITR de sérotype 2, 2) un plasmide apportant les protéines de réplication et de capsid et, 3) un plasmide helper codant pour des protéines adénovirales. Les AAV recombinants sont ensuite récoltés à partir des lysats cellulaires, puis purifiés.

La plupart des vecteurs AAV (> 99,5%) ne s'intègre pas dans le génome mais reste sous forme épisomale en concatémères de configuration « tête-queue ». Néanmoins, ces vecteurs persistent sur le long terme après transduction. Les rares insertions au hasard dans le génome sont probablement associées avec des cassures de l'ADN double brin et ont lieu préférentiellement dans des gènes activement transcrits. Seul l'AAV2 sauvage est connu pour s'intégrer de manière spécifique au niveau du locus AAVS1 sur le chromosome 19 humain à travers l'activité de la protéine Rep qui se lie au site AAVS1 et aux ITR (*Inverted terminal repeats*) [344].

A ce jour, 12 sérotypes sont décrits, le mieux caractérisé et le plus utilisé en thérapie génique est le sérotype 2 présentant un tropisme restreint aux fibres musculaires matures. Il est à noter qu'une grande majorité de la population possède une immunité préexistante et des anticorps neutralisants contre l'AAV2. L'administration du vecteur recombinant peut donc donner lieu à une forte réponse immune. Malgré cet inconvénient et un désavantage certain lié à la taille du transgène pouvant être inséré (4,9 Kb), les vecteurs AAV semblent très prometteurs de par

leur efficacité de transfection *in vivo* [345]. En effet, plusieurs études ont montré une expression stable pendant plusieurs mois, voire années, chez la souris [346] et chez les gros animaux [347].

# **OBJECTIFS**

L'identification de la myostatine et des conséquences de son invalidation sur le développement musculaire a ouvert de nombreuses perspectives en médecine humaine. Différentes stratégies visant à réduire l'activité de la myostatine ont ainsi été menées. En 2001, l'équipe de J. Huard [279] a démontré que l'injection de la protéine humaine décorine, un membre de la famille des SLRPs, permettait la régénération d'un muscle lacéré. Ce SLRP fût ensuite montré par Miura et al. comme pouvant inhiber – via une interaction directe – l'action de la myostatine [318].

L'objectif majeur de ce travail a consisté à évaluer le potentiel thérapeutique d'une stratégie anti-myostatine par la décorine. Pour ce faire, nous nous sommes attachés à :

- étudier l'efficacité *in vitro* d'inhibition de la myostatine par la protéine décorine,
- étudier l'efficacité de la stratégie décorine chez le modèle murin *mdx* de la dystrophie musculaire de Duchenne à l'aide d'analyses cinétiques, d'études de dose et d'évaluations fonctionnelles. Afin de vérifier la possibilité d'un traitement à d'autres dystrophies, nous avons également procédé à des études *in vivo* chez un autre modèle murin dystrophique, la souris Gamma-sarcoglycane<sup>-/-</sup>,
- identifier le domaine de la décorine interagissant avec la myostatine. La décorine étant présentée par Yang et al. comme une métalloprotéine [230] et l'interaction décorine - myostatine dépendante du zinc [318], nous avons décidé d'évaluer l'activité anti-myostatine d'un peptide décorine long de 41 acides aminés issu de la partie N-terminale présentant une activité de liaison au Zn<sup>2+</sup>. Ce peptide et différents dérivés ont été évalués au cours d'études *in vitro* et *in vivo*,
- étudier les mécanismes induits par cette interaction.

Ce faisant, nous avons continué à explorer le potentiel thérapeutique de la décorine en vérifiant si ce SLRP permettait d'améliorer la prise de greffe de cellules myogéniques dans un muscle. A la vue de résultats encourageants avec la décorine, nous avons également étudié d'autres membres de la famille des SLRPs tels que le biglycan, la fibromoduline, le lumican ou encore PRELP.

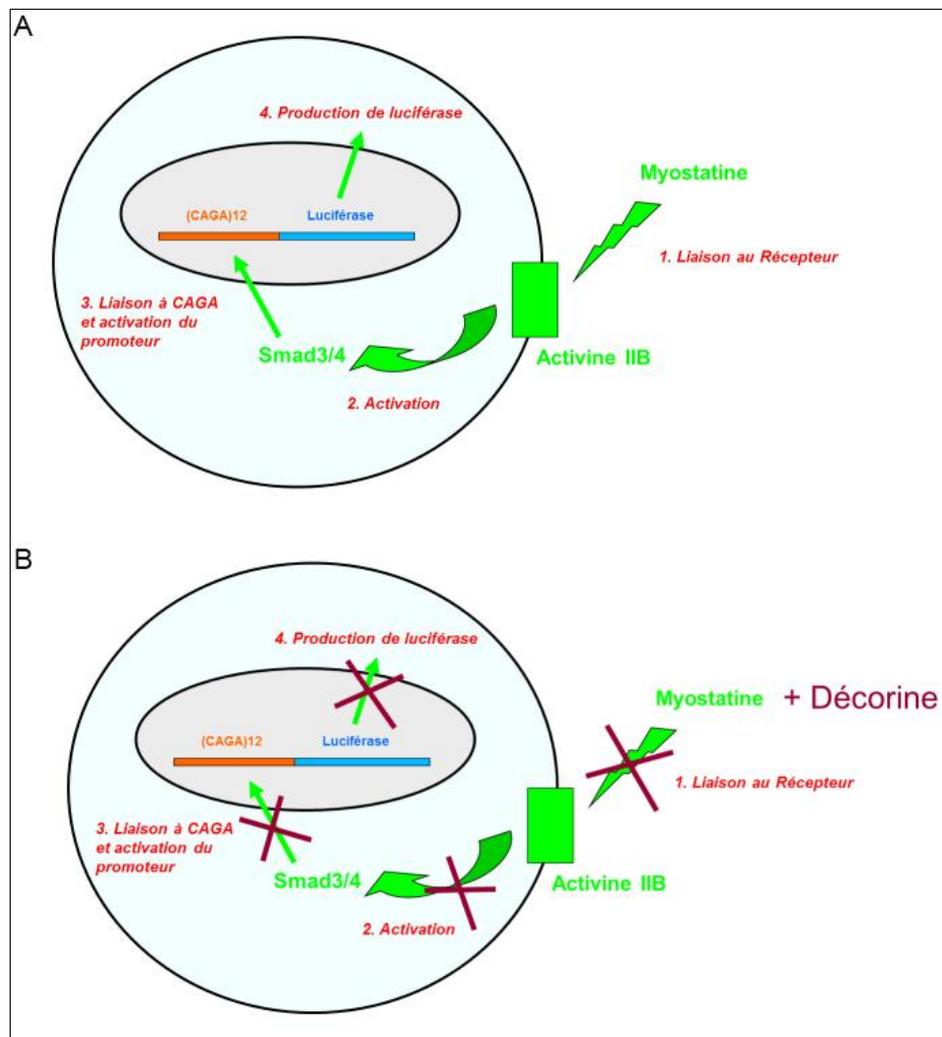
Parallèlement à l'approche protéique, nous avons développé 2 stratégies de thérapie génique dans l'optique d'un traitement permettant un effet sur l'ensemble de la musculature, durable dans le temps et sans nécessité de ré-administration. Une première stratégie a consisté à cloner le cDNA de la décorine murine dans un vecteur viral AAV en vue d'une injection intra-veineuse chez des souris *mdx*. Nous avons également souhaité évaluer le potentiel d'une myostatine tronquée sécrétée véhiculée par un vecteur AAV et entrant en compétition avec la forme active de la myostatine pour son récepteur.

# RÉSULTATS

## 1. Etudes *in vitro* de l'inhibition de la myostatine

### 1.1 La construction plasmidique pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-firefly luciférase

La construction plasmidique pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-firefly luciférase (notée pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc), obtenue du Pr. Carl-Henrik Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Suède), contient 12 copies CAGA de la séquence consensus SBE (*Smad Binding Element*) et permet indirectement de mesurer la liaison de la myostatine (MSTN) à son récepteur [52]. En effet, lorsque la myostatine se fixe au récepteur activine IIb, les protéines Smad 3 et 4 sont activées et vont se lier aux copies CAGA. Le promoteur de la cassette pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc est ainsi activé - ce qui se traduit par une production de luciférase. La liaison myostatine/activine IIb peut donc être suivie en dosant la luciférase (Fig. 72A). En conséquence, cet essai peut aussi être utilisé pour mettre en évidence la capacité d'un composé - protéine, peptide ou autre - à empêcher la myostatine à se lier à son récepteur (Fig. 72B).

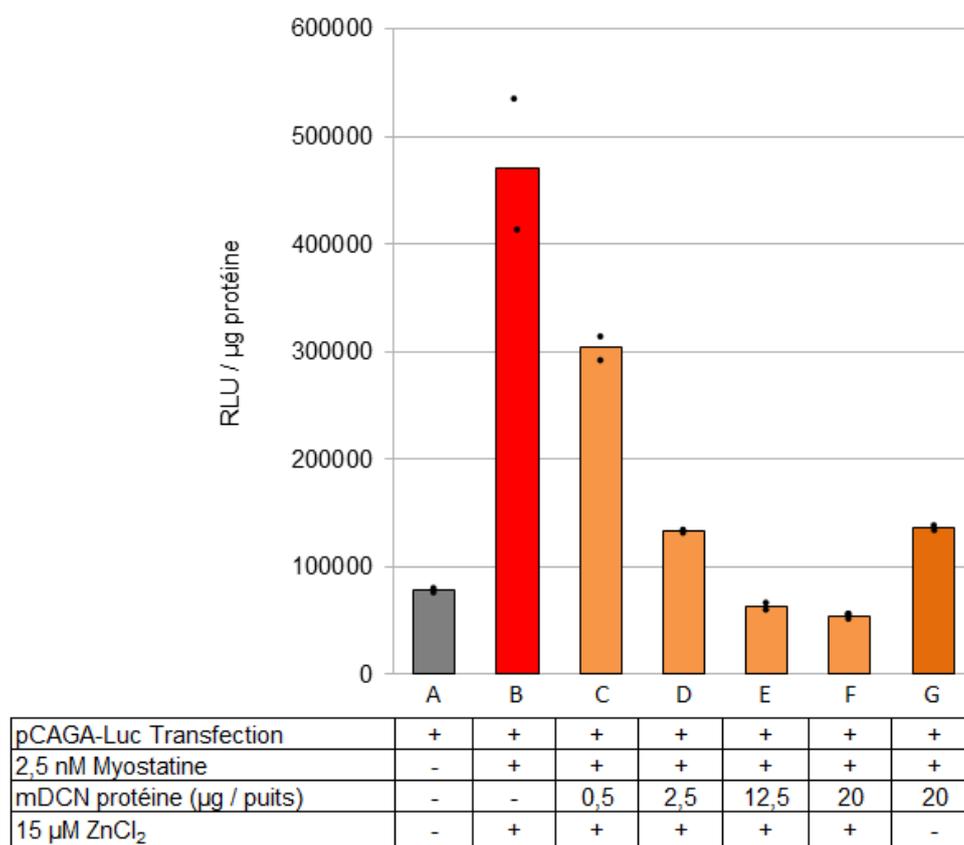


**Figure 72 :** Suivi de l'activité de la myostatine par la production de luciférase.

## 1.2 Evaluation de l'activité anti-myostatine de la décorine murine

En 2001, Fukushima et al. [279] rapportent que l'injection dans un muscle lacéré de la protéine humaine recombinante décorine permet une régénération musculaire et prévient la fibrose. En 2006, Miura T. et al. [318] ont montré par résonance des plasmons de surface que la décorine pouvait se lier à la myostatine et donc moduler l'activité de ce facteur. Ces auteurs ont également montré que la liaison MSTN/décorine nécessitait la présence d'une concentration de zinc supérieure à 10  $\mu\text{M}$ .

Nous avons utilisé la construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc dans le but de quantifier l'activité de la MSTN en présence d'une gamme de décorine murine (mDCN) allant de 1  $\mu\text{g}$  à 40  $\mu\text{g}$  (par duplicat). Le rôle du zinc a également été étudié. Les conditions de l'étude sont données à la page 173 (Matériels et Méthodes).



**Figure 73 :** Inhibition de l'activité de la myostatine par la mDécorine dans des cellules 293T.

L'échantillon « T » (Fig. 78A) correspond au niveau de luciférase présent dans les cellules 293T après transfection (témoin). Dans la condition « T + MSTN » (Fig. 78B), 2,5 nM de myostatine ont été ajoutés dans chaque puits du duplicat. Un, 5, 25 et 40  $\mu\text{g}$  de mDCN par duplicat ont été ajoutés aux 2,5 nM de myostatine en présence de 15  $\mu\text{M}$  de ZnCl<sub>2</sub> final (Fig. 78C-D-E-F). Ces échantillons permettent de quantifier l'efficacité d'inhibition de l'activité de la myostatine par la mDécorine. La condition « T + MSTN + 40  $\mu\text{g}$  de mDCN sans ZnCl<sub>2</sub> » permet d'étudier l'importance du zinc (Fig. 78G).

Les contrôles « T » et « T + MSTN » (Fig. 73A et 73B) nous ont permis de vérifier que la cassette pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc est bien fonctionnelle. Les résultats ont montré que ces 2 conditions permettaient bien un suivi de l'activité de la myostatine par la production de luciférase. En effet, dans la condition « T + MSTN » (Fig. 73B), où 2,5 nM de MSTN ont été ajoutés, on constate une augmentation significative du niveau de luciférase par rapport à l'échantillon « T » (Fig. 73A). Comme le présente la *figure 73C-D-E-F*, nous observons une réponse dose dépendante de la décorine murine sur l'activité de la myostatine mature. En effet, plus la quantité de décorine ajoutée est importante, plus l'activité de la myostatine est réprimée. A 25 µg de mDCN (Fig. 73F), on constate une production de luciférase qui est comparable à celle du témoin « T » (Fig. 73A). La totalité de la myostatine ajoutée (2,5 nM) est donc inhibée. Aucune différence significative n'est notée dans la répression de l'activité de la MSTN entre les conditions « + 25 µg » (Fig. 73E) et « + 40 µg de mDCN » (Fig. 73F), ce qui permet d'avancer que 25 µg de mDCN permettent de réprimer totalement les 2,5 nM de MSTN ajoutés.

L'importance du Zinc est observée dans la condition « T + MSTN + 40µg – ZnCl<sub>2</sub> » (Fig. 73G). En effet, l'inhibition de l'activité de la MSTN à 40 µg de mDCN sans ZnCl<sub>2</sub> (Fig. 73G) équivaut à un taux d'inhibition de la myostatine avec 5 µg de mDCN en présence de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> (Fig. 73D). Nous confirmons donc que le zinc joue un rôle important dans l'interaction mDCN/mMSTN. Le fait que l'on observe une inhibition même en absence de zinc (absence au cours de l'étape de pré-incubation MSTN/décorine) est sans doute dû au fait qu'il y a du zinc présent dans le milieu de culture et dans les cellules.

En résumé, nous avons observé que :

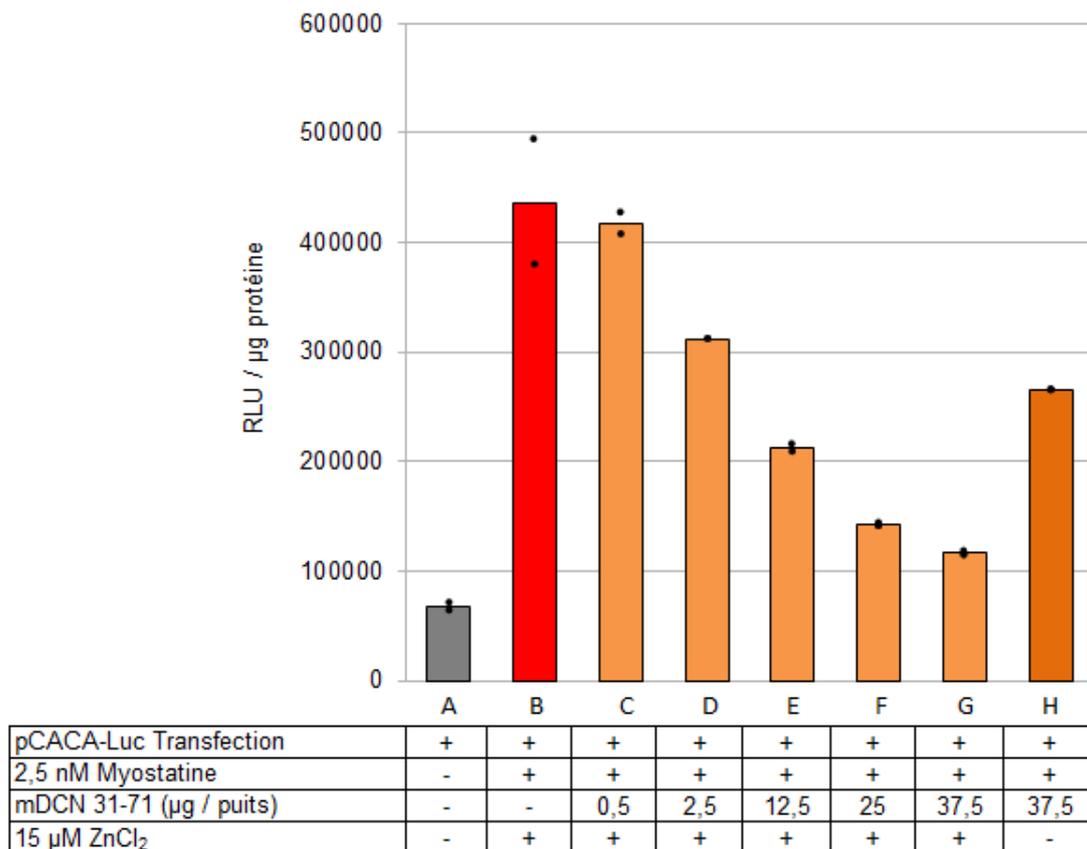
- ✓ La mDCN permet de réprimer de façon dose dépendante l'activité de la MSTN en présence de zinc.
- ✓ 25 µg de mDCN sont nécessaires pour inhiber 2,5 nM de mMSTN.
- ✓ Le zinc joue un rôle important dans l'inhibition de la mMSTN par la mDCN.

### 1.3 Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide 31-71 mDCN

La décorine est une métalloprotéine liant le zinc avec une constante d'affinité  $K_D = 1 \mu\text{M}$ . Yang et al. ont montré en 1999 [230] que le domaine N-terminal de la décorine présentait une petite séquence peptidique « MBP-MD4 » de 41 aa contenant 4 résidus cystéines capables de fixer 2 ions  $\text{Zn}^{2+}$  (Fig. 42). Nous nous sommes donc demandés si ce peptide était suffisant pour interagir avec la myostatine.

Le peptide 31-71 mDCN (DEASGIIPYDPDNPLISMCPYRCQCHLRVVQCSDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>), contenant les 41 acides aminés correspondant à la séquence MBP-MD4, a été synthétisé par la société GeneCust et une étude de l'efficacité d'inhibition de l'activité de la mMSTN a été réalisée à l'aide de la construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc.

Comme le présente la *figure 74*, nous observons le même profil d'inhibition de l'activité de la myostatine qu'avec la protéine recombinante décorine murine (Fig. 73), à savoir une réponse dose dépendante. Plus la quantité de peptide 31-71 mDCN est importante, plus l'inhibition de l'activité de la myostatine est élevée (Fig. 74C-D-E-F-G). On note cependant que pour réprimer l'activité de la mMSTN, la quantité de peptide 31-71 mDCN demandée est bien plus importante que celle avec la protéine mDécorine (Fig. 73). En effet, avec 75 µg de peptide 31-71 mDCN par duplicat, le niveau basal de luciférase (Fig. 74A), seuil équivalent à la condition « T », n'est pas encore atteint (Fig. 74G). Les 2,5 nM de myostatine ajoutés ne sont donc pas totalement réprimés. Le zinc, comme attendu, joue un rôle majeur dans cette activité, comme l'indique le résultat montré dans la *figure 74H*.



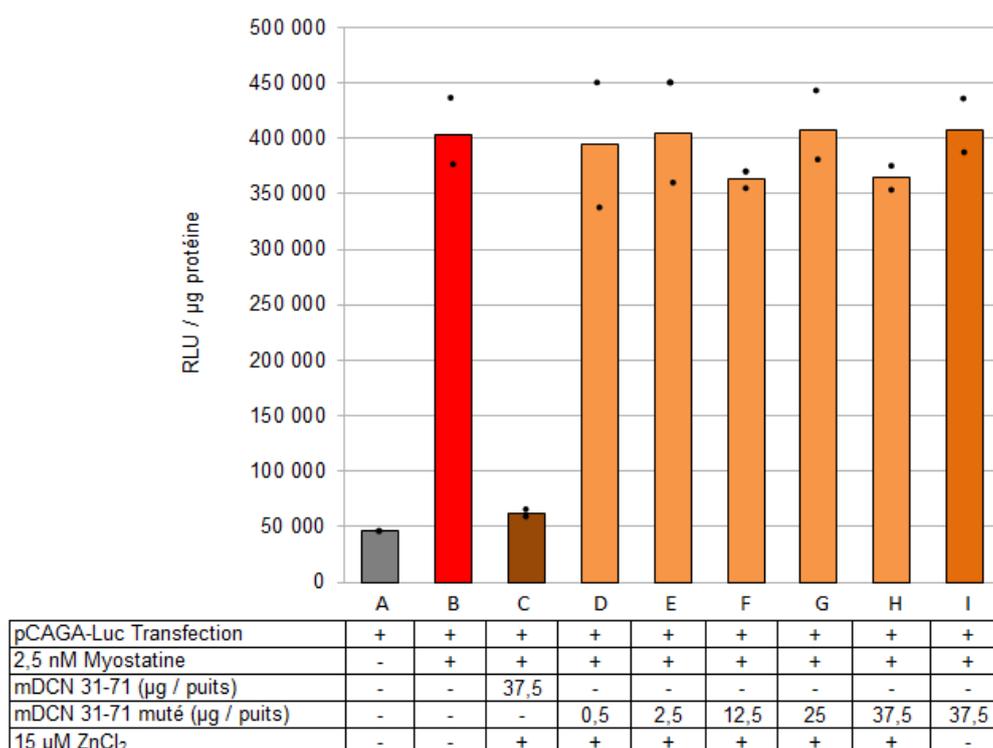
**Figure 74** : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 31-71 mDCN dans des cellules 293T.

En résumé, nous venons de montrer que :

- ✓ Le peptide mDCN 31-71 permettait une inhibition de l'activité de la myostatine. Les 41 acides aminés du domaine N-terminal contenant le domaine de liaison au zinc sont donc suffisants pour observer une activité anti-myostatine.
- ✓ L'efficacité d'inhibition par le peptide mDCN 31-71 est moins importante qu'avec la protéine recombinante mDécorine.
- ✓ Le zinc joue un rôle dans l'activité anti-myostatine du peptide.

#### 1.4 Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide 31-71 mDCN muté

Bien que cela n'ait pas été montré, il semble probable que les 4 cystéines présentes dans le domaine 31-71 de la décorine soient impliqués dans la liaison du zinc. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons fait synthétiser le peptide 31-71 mDCN muté dont la séquence est la suivante : DEASGIIPYDPDNPLISMCPYR△QAHLRVVQ△SDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>. Dans ce peptide, les 3 dernières cystéines ont été remplacées par des alanines.



**Figure 75 :** Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 31-71 mDCN muté dans des cellules 293T.

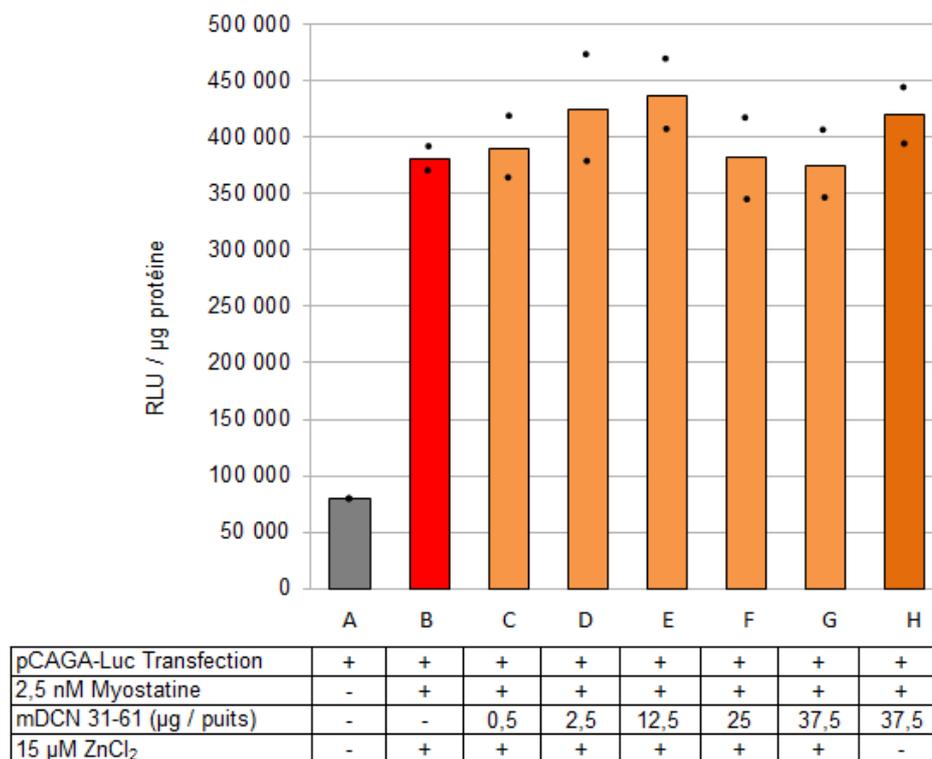
Les résultats montrent qu'aucune inhibition de l'activité de la myostatine n'est observée, et ce quelle que soit la quantité de peptide 31-71 mDCN muté ajoutée (Fig. 75). La condition « T + MSTN + 75 µg de peptide 31-71 mDCN » (Fig. 75C) a été incluse afin d'avoir un contrôle positif ; cela nous a permis de nous assurer de la validité de l'expérience.

En conclusion, nous avons montré que :

- ✓ Le remplacement de 3 des 4 cystéines présentes dans la séquence 31-71 par des alanines générerait un peptide qui est dénué d'activité anti-myostatine. Ce résultat suggère que les cystéines sont effectivement impliquées dans la fixation des ions  $Zn^{2+}$ .

### 1.5 Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide mDCN 31-61

Nos résultats précédents indiquent que les cystéines jouent un rôle primordial dans l'inhibition de la myostatine par le peptide 31-71 mDCN. En générant le peptide 31-61 mDCN avec la séquence DEASGIIPYDPDNPLISMCPYRCQCHLRVVQ-CONH<sub>2</sub>, nous avons souhaité : 1) vérifier s'il était possible de raccourcir la taille du peptide du côté C-terminal et 2) vérifier si la délétion de la dernière cystéine permettait de conserver l'activité biologique. Comme précédemment, l'efficacité d'inhibition de la MSTN par ce peptide 31-61 mDCN a été étudiée à l'aide de la construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc (Fig. 76).



**Figure 76 :** Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 31-61 mDCN dans des cellules 293T.

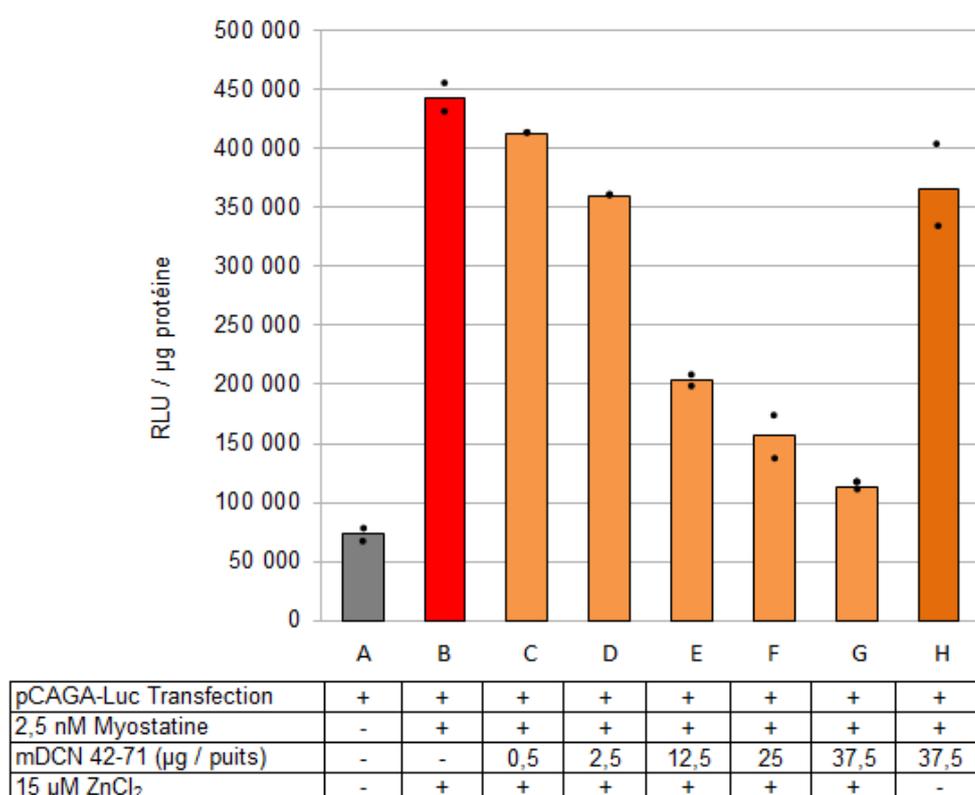
Nos résultats montrent que, contrairement au peptide 31-71 mDCN (Fig. 74), le peptide 31-61 mDCN ne permet aucune inhibition de la myostatine (Fig. 76). En effet, quelle que soit la quantité de peptide ajoutée (1 µg - 75 µg par duplicat), l'activité luciférase générée par l'ajout de 2,5 nM de mMSTN n'est pas réprimée.

Ces résultats indiquent donc que :

- ✓ une délétion de 10 aa du côté C-terminal (y compris de la dernière cystéine) détruit l'activité anti-myostatine.

### 1.6 Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide 42-71 mDCN

La question suivante à laquelle nous souhaitons répondre était de savoir s'il était possible d'éliminer des acides aminés du côté N-terminal tout en conservant l'activité anti-myostatine. Nous avons donc fait synthétiser le peptide 42-71 mDCN qui a la séquence suivante : DNPLISMCPYRCQCHLRVVQCSDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>. Comme indiqué en rouge, les 4 résidus cystéines sont présents dans ce peptide.



**Figure 77** : Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 42-71 mDCN dans des cellules 293T.

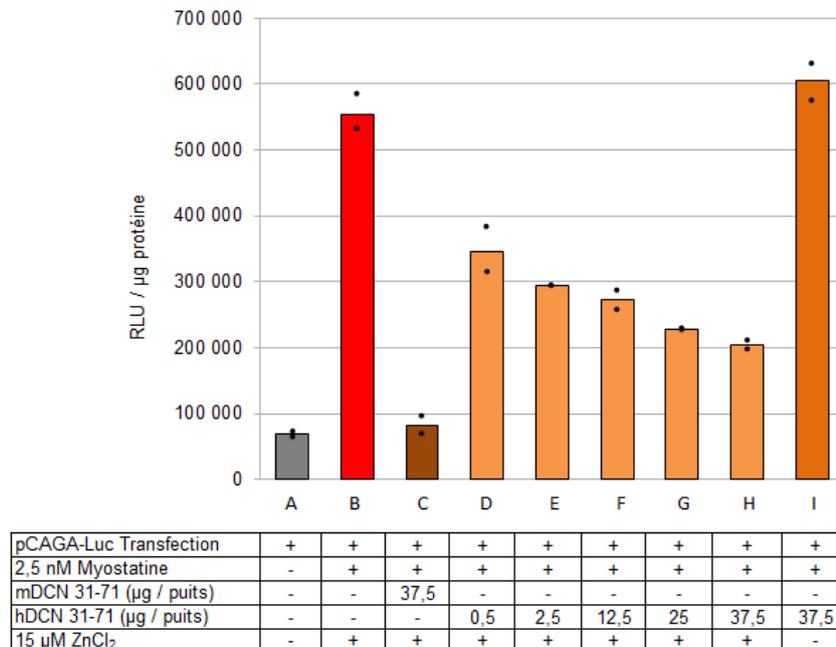
Les résultats de l'essai luciférase montrent une inhibition dose dépendante de la myostatine par le peptide 42-71 mDCN (Fig. 77C-D-E-F-G). Le profil d'inhibition est similaire à celui obtenu par le peptide 31-71 mDCN (Fig. 74). Comme avec ce dernier peptide, l'inhibition n'est pas complète même avec 75 µg de peptide par duplicat. A noter que, comme attendu, dans la condition où le zinc n'est pas présent, l'inhibition est bien moins importante (Fig. 77H).

Les résultats de cette expérience indiquent que :

- ✓ Le peptide 42-71 mDCN, amputé des 11 premiers acides aminés, conserve l'activité anti-myostatine du peptide 31-71 mDCN.

### 1.7 Evaluation de l'activité anti-myostatine du peptide 31-71 hDCN

Une version humaine du peptide 31-71 DCN, noté 31-71 hDCN, et de séquence : IGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRQCCHLRVVQCSDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub> a été synthétisée et étudiée afin de vérifier si ce peptide permet également une inhibition de la myostatine mature. Il est à noter que la forme mature de la myostatine est commune à de nombreuses espèces telles que la souris et l'Homme [1, 30]. La myostatine recombinante murine précédemment utilisée a donc également été utilisée pour cette étude.



**Figure 78 :** Inhibition de l'activité de la MSTN par le peptide 31-71 hDCN dans des cellules 293T.

Comme le présente la *figure 78*, on remarque une inhibition de l'activité de la myostatine de façon dose dépendante. Cependant, le profil d'inhibition de la MSTN est ici quelque peu différent de celui obtenu avec le peptide 31-71 mDCN (Fig. 74). En effet, on observe une importante activité anti-myostatine à 1 µg de peptide 31-71 hDCN (Fig. 78D), ce que l'on ne pouvait observer avec le peptide 31-71 murin. Cependant, l'efficacité d'inhibition de l'activité de la myostatine est moindre à hautes doses avec la version humaine du peptide 31-71 DCN (Fig. 78F-G-H) qu'avec la version murine (Fig. 74E-F-G). Le rôle du zinc a été étudié dans la condition I de la *figure 78*. Comme montré précédemment, en absence de zinc, aucune inhibition de la myostatine par le peptide 31-71 hDCN (75 µg par duplicat) n'a été observée.

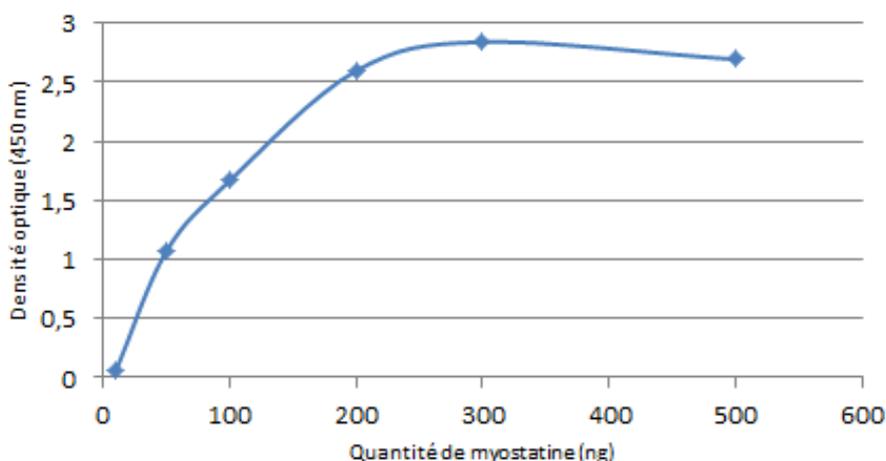
## 2. Etudes de l'interaction décorine - myostatine

Les études *in vitro* d'inhibition de l'activité de la myostatine via la construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc par la mDécorine et ses dérivés peptidiques nous ont permis d'étudier de manière indirecte l'interaction entre ces différents facteurs. Afin de vérifier si l'inhibition de l'activité de la myostatine est véritablement consécutive à une interaction directe (séquestration de la myostatine) entre le peptide 31-71 mDCN et la myostatine, la technique de l'Elisa a été utilisée (pages 173-175, Matériels et Méthodes). Cette méthode a consisté à déposer la myostatine mature au fond des puits d'une plaque 96 puits et, après 24 heures d'incubation, à y ajouter le peptide 31-71 mDCN conjugué à une biotine détectable à l'aide d'une streptavidine-HRP. Après 5 lavages, l'ajout du substrat tétraméthylbenzidine (TMB) de la peroxydase permet l'obtention d'une réaction colorée proportionnelle à la quantité de complexes MSTN/peptide 31-71 mDCN. Une lecture à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Discovery HT-R (Bio-TEK) permet de chiffrer cette quantité de complexes et donc l'interaction directe entre la myostatine et le peptide 31-71 mDCN.

### 2.1 Définition de la quantité minimale saturante de myostatine

Dans le but de quantifier l'interaction directe entre la myostatine et le peptide 31-71 mDCN biotine, une étude préliminaire de la quantité de myostatine à utiliser est nécessaire. Cette quantité de MSTN correspond à la quantité minimale pour laquelle une saturation du signal est observée.

Pour ce faire, nous avons réalisé une gamme de myostatine et nous avons inclus différents contrôles afin de quantifier le signal correspondant au bruit de fond. A noter que pour ce test, nous avons utilisé un anticorps primaire anti-myostatine de chèvre. La révélation a pu se faire en utilisant un anticorps anti-chèvre conjugué à la HRP.



**Figure 79 :** Caractérisation de la quantité saturante de myostatine.

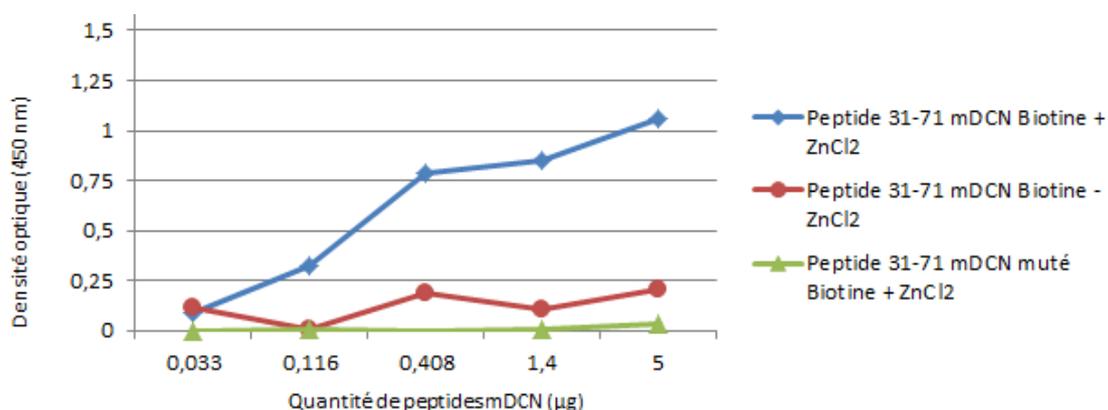
Les contrôles suivants ont été réalisés afin de quantifier le bruit de fond : 1) Anticorps primaire goat Myostatine murine utilisé au 1/100<sup>ème</sup> et anticorps secondaire Donkey polyclonal anti-goat utilisé au 1/4000<sup>ème</sup> sans MSTN dans le puits ; 2) Anticorps secondaire Donkey polyclonal anti-goat utilisé au 1/4000<sup>ème</sup> et MSTN ; 3) Anticorps secondaire Donkey polyclonal anti-goat utilisé au 1/4000<sup>ème</sup> sans MSTN. Le signal de bruit de fond a été retranché aux valeurs obtenues.

Comme le présente la *figure 79*, une saturation du signal est observée à 300 ng de myostatine. Cette quantité de myostatine a été choisie pour être utilisée dans l'ensemble des études d'interaction MSTN / Peptide 31-71 mDCN biotine décrites ci-dessous.

## 2.2 Etude des interactions myostatine - peptide 31-71 mDCN

Afin de vérifier s'il y a interaction directe entre le peptide 31-71 mDCN biotine et la myostatine, le test Elisa suivant a été réalisé. Une gamme de peptide 31-71 mDCN biotine (33 ng ; 116 ng ; 408 ng ; 1,4 µg et 5 µg par puits), en présence ou en absence de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub>, a été mise en contact avec 300 ng de MSTN.

Les résultats obtenus sont montrés dans la figure ci-dessous : on observe qu'avec 116 ng de peptide 31-71 mDCN biotine, un début d'interaction directe avec la myostatine apparait. Plus la quantité de peptide 31-71 mDCN biotine ajoutée est importante et plus le signal, témoin de l'interaction peptide 31-71 mDCN / myostatine, est élevé. L'interaction entre la myostatine et le peptide 31-71 mDCN est donc dose dépendante. On note également qu'à 5 µg de peptide 31-71 mDCN biotine, le signal obtenu n'est toujours pas saturant. Cinq microgrammes de peptide 31-71 mDCN sont donc insuffisants pour interagir totalement avec 300 ng de myostatine.



**Figure 80 :** Etudes de l'interaction directe entre la myostatine et les peptides 31-71 mDCN biotine (en présence et absence de zinc) et le peptide 31-71 mDCN muté biotine.

Cette étude nous a également clairement montré qu'en absence de zinc, il n'y a pas d'interaction entre la myostatine et le peptide 31-71 mDCN (Fig. 80, courbe rouge). Dans une autre série, une gamme de peptide 31-71 mDCN muté (3 cystéines remplacées par des alanines) conjugué à une biotine (Biotine-DEASGIIPYDPDNPLISMCPYR**AQA**HLRVV**QAS**DLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>) (116 ng ; 408 ng ; 1,4 µg ; 5 µg ; 17,5 µg et 61,25 µg) a également été mise en contact de 300 ng de MSTN en présence de 15 µM de zinc. Les résultats montrés dans la *figure 80* (courbe verte) indiquent que, quelle que soit la quantité de peptide ajouté, aucune interaction avec la MSTN n'est observée.

Finalement, nous avons réalisé un test « préliminaire » de compétition entre le peptide 31-71 mDCN biotine et l'anticorps primaire goat Myostatine murine afin de déterminer si le peptide 31-71 mDCN interagit avec la myostatine au niveau du domaine de liaison C-terminal de l'anticorps primaire à la MSTN (information du fournisseur de l'anticorps). Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé les 2 conditions suivantes : 1) 300 ng MSTN, 5 µg de peptide 31-71 mDCN biotine, 15 µM ZnCl<sub>2</sub> dans un puits et, 2) 300 ng MSTN, 5 µg de peptide 31-71 mDCN biotine, 15 µM ZnCl<sub>2</sub> + anticorps primaire au 1/100<sup>ème</sup> dans un second puits. Les résultats indiquent qu'il n'y a aucune différence significative (DO = 0,945 versus 1,112) entre le puits peptide biotine seul et le puits peptide + anticorps, ce qui pourrait suggérer que le peptide 31-71 mDCN n'interagit pas avec le domaine C-terminal de la myostatine. Bien entendu, pour véritablement pouvoir conclure sur ce point, d'autres expériences sont nécessaires.

En résumé, dans cette partie nous avons montré que :

- ✓ Le peptide 31-71 mDCN interagit directement avec la myostatine mature et ce de façon dose dépendante.
- ✓ En absence de zinc, l'interaction peptide 31-71 mDCN/MSTN n'existe pas.
- ✓ En présence de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub>, le peptide 31-71 mDCN muté n'interagit pas avec la myostatine mature. Les 3 cystéines remplacées par des alanines sont donc indispensables pour observer une interaction avec la MSTN.

### **3. Etudes *in vivo* des effets d'une injection de décorine et de ses dérivés peptidiques sur le muscle squelettique**

Suite aux résultats obtenus *in vitro*, nous avons souhaité étudié l'effet d'une injection de décorine et de peptide mDCN sur le muscle squelettique. Nous avons choisi d'utiliser des souris dystrophiques et principalement la souris *mdx* [245] pour mener nos études. Il est à noter que nous avons obtenu la protéine recombinante décorine par l'intermédiaire de R&D systems. Le coût élevé de la protéine nous a conduit à limiter à 20 - 30 µg la quantité de protéine injectée par muscle.

### 3.1 Etude préliminaire chez la souris *mdx*

20 µg de mDécorine sont dissous la veille de l'injection dans du NaCl 150 mM stérile et du ZnCl<sub>2</sub> à une concentration finale de 15 µM est ajouté. La protéine est ensuite placée à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, 22 µl de solution contenant les 20 µg de mDécorine sont injectés dans le tibialis antérieur gauche (TAG) d'une souris *mdx* âgée de 7 semaines. Le tibialis antérieur droit (TAD) a été utilisé comme contrôle et a reçu 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 22 µl de NaCl 150 mM. A J21, la souris *mdx* a été sacrifiée et le TAG et le TAD ont été prélevés, pesés et photographiés (Fig. 81). Le choix du jour de sacrifice s'est basé sur les travaux de Fukushima et al., et Sata et al. [279, 326].



**Figure 81** : Comparaison du TAG/EDLG injecté mDCN avec le TAD/EDLD contrôle.

Comme le présente la *figure 81*, on note une importante prise de masse du muscle injecté avec mDCN ; l'augmentation est de l'ordre de +50%. De plus, on note que l'effet de la mDCN semble également affecter le muscle EDL (*Extensor Digitorum Longus*) car l'EDL gauche est plus volumineux que l'EDL droit.

### 3.2 Etude des effets de la décorine sur la croissance musculaire chez la souris *mdx*

#### 3.2.1 Décorine et augmentation de la masse musculaire

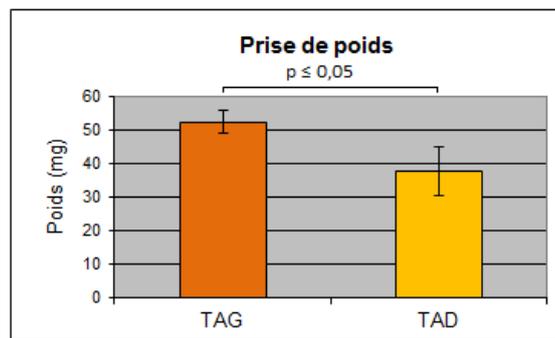
L'étude préliminaire ayant montré une augmentation du volume musculaire suite à l'injection de mDécorine, un protocole regroupant 3 souris *mdx* mâles de 7 semaines (Tab. 3) a été mis en place afin de vérifier la reproductibilité de ces résultats.

Id animaux	Age à l'injection	Voie d'injection	TAG	TAD	Sacrifice
1	7 semaines	IM	20 µg mDécorine + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 25 µL NaCl	15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 25 µL NaCl	J17
2					
3					

**Tableau 3** : Etudes *in vivo* de l'effet de la mDécorine chez la souris *mdx*.

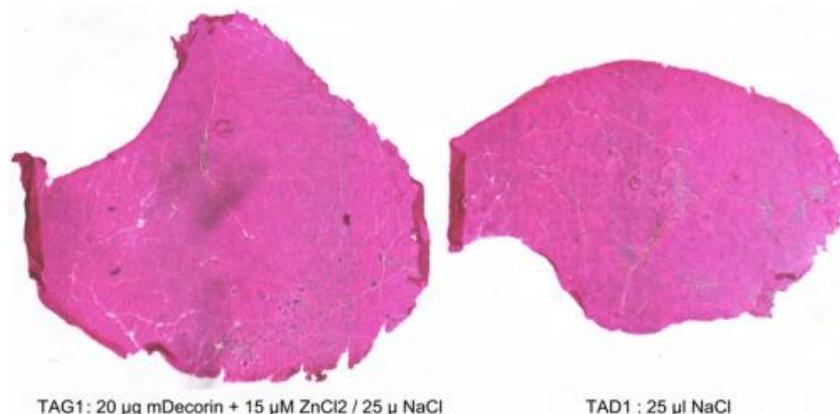
A J0, les 3 souris *mdx* ont été injectées avec 20 µg de mDCN + 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM dans le TAG. Le contrôle TAD a reçu 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM. A J17, les souris ont été sacrifiées, les TAG et TAD de chaque souris ont ensuite été prélevés, pesés et photographiés. A l'aide d'un cryostat, des coupes de 8 µm d'épaisseur ont été réalisées sur les muscles congelés et montés sur bouchons. Des marquages HPS et laminine ont ensuite été réalisés afin d'étudier la cartographie et la morphologie des muscles prélevés.

Souris	Muscles	Poids (mg)	Prise de poids (%)
Souris 1	TAD 1	31,1	65
	TAG 1	51,3	
Souris 2	TAD 2	33,3	46
	TAG 2	48,5	
Souris 3	TAD 3	48,4	19
	TAG 3	57,5	



**Figure 82 :** Prise de poids des souris *mdx* suite à l'injection de mDécorine dans le TAG.

La *figure 82* présente les poids à J17 des TAG injectés mDCN et des TAD contrôles, ainsi que les taux de croissance de la masse musculaire. Ce dernier paramètre correspond au pourcentage d'augmentation du poids du muscle TAG injecté mDCN par rapport au poids du contrôle TAD. On note une importante augmentation de la masse musculaire pour les 3 souris. Il faut cependant mentionner l'importante variabilité entre les 3 animaux. Celle-ci peut s'expliquer par différents facteurs tels que la qualité de l'injection et du prélèvement, et bien sûr aussi de l'état du muscle dystrophique au moment de l'injection.

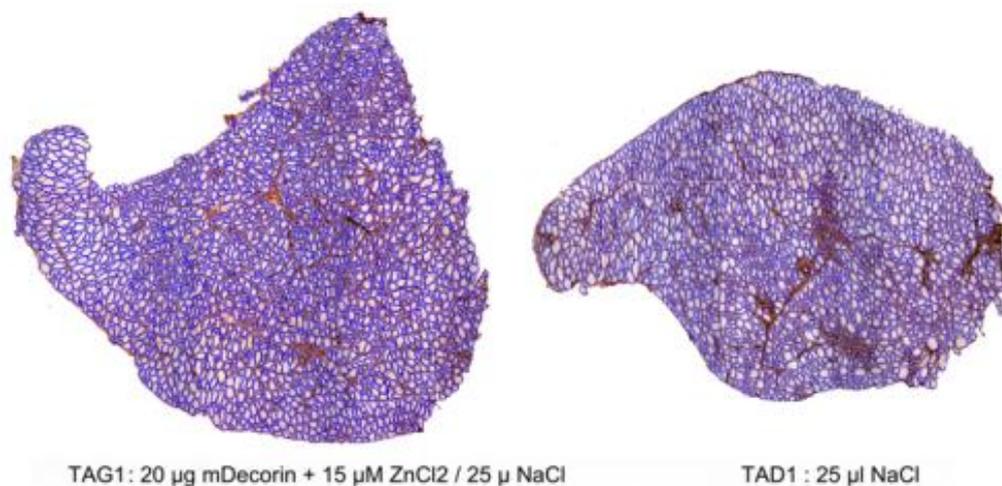


**Figure 83 :** Coupes HPS des TAG (injecté mDécorine) et TAD (Témoin) de la souris *mdx* N°1.

Des marquages HPS (Fig. 83), permettant de mettre en évidence les différentes structures tissulaires et cellulaires, ont été réalisés. Comme le montre la *figure 83*, on remarque que le TAG1 (51,3 mg) injecté mDCN est bien plus imposant que le TAD1 contrôle (31,1 mg). Au niveau histologique, nous n'avons pas constaté d'amélioration notable de l'aspect du muscle, la nécrose et l'infiltration cellulaire étant similaires entre les muscles injectés et contrôles.

### 3.2.2 Hyperplasie et hypertrophie

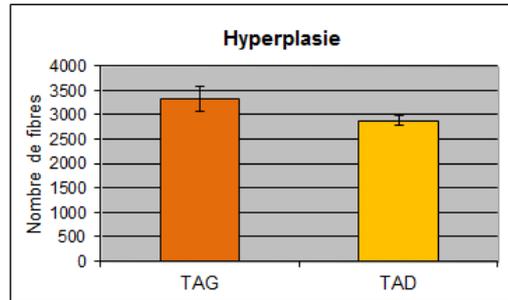
Afin de déterminer si la prise de masse musculaire observée est due à une augmentation du nombre de fibres (hyperplasie) et/ou à une augmentation de la taille de celles-ci (hypertrophie), nous avons procédé à des analyses morphométriques des différentes coupes de muscles. Toutes les coupes de muscles ont été réalisées à un seul niveau qui est le centre du muscle. Nous avons mesuré le nombre et la surface de l'ensemble des fibres de différentes coupes transversales de muscles injectés en intramusculaire. L'analyse morphométrique a été réalisée grâce au logiciel Ellix (Microvision). Les coupes ont été marquées avec un anticorps anti-laminine, révélé en peroxydase, permettant de délimiter la membrane sarcoplasmique en lumière blanche. Le logiciel délimite ainsi le contour de chaque fibre, les comptabilise et calcule leur surface. De nombreuses corrections manuelles sont néanmoins nécessaires (Fig. 84).



**Figure 84** : Analyse morphométrique de coupes laminines de TAG (injecté mDCN) et TAD (contrôle) de la souris *mdx* N°1.

Les comptages ont montré une différence significative (moyenne = +16%) du nombre de fibres musculaires entre les muscles injectés mDCN et les muscles contrôles (Fig. 85). Cependant, les injections ont donné des résultats très variables selon les souris.

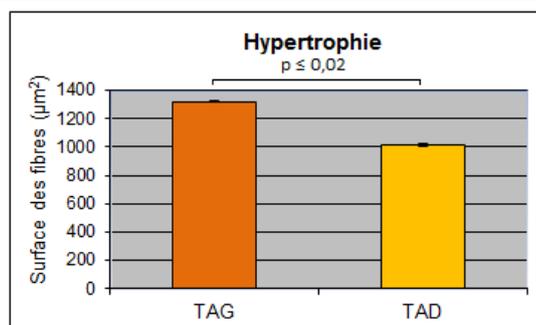
Souris	Muscles	Nombre de fibres	Hyperplasie (%)
Souris 1	TAD 1	2941	18
	TAG 1	3479	
Souris 2	TAD 2	2732	29
	TAG 2	3519	
Souris 3	TAD 3	2960	0
	TAG 3	2939	



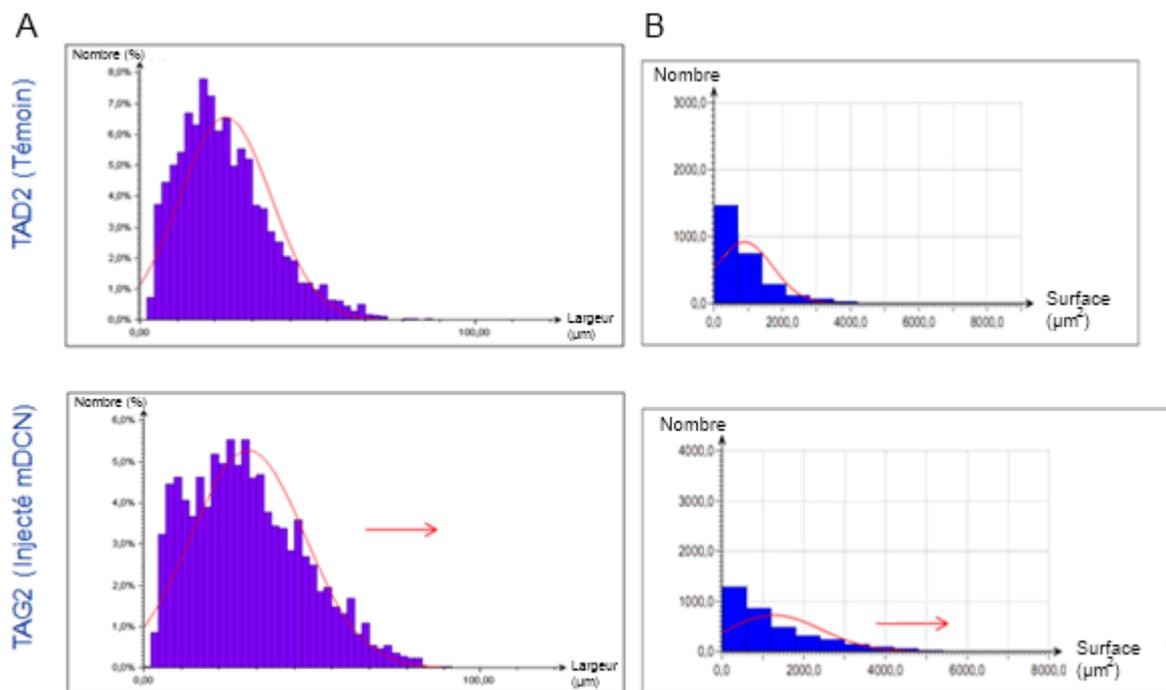
**Figure 85 :** Données d'hyperplasie chez la souris *mdx* suite à l'injection de mDécorine (TAG).

Une augmentation d'environ 30% de la surface moyenne du muscle total en coupe transversale est observée (Fig. 86). Cette augmentation est due à une hypertrophie de la taille des fibres. En effet, un accroissement du nombre de grosses fibres (surface > à 2000  $\mu\text{m}^2$ , largeur > 40  $\mu\text{m}$ ) est constaté ainsi qu'une diminution du nombre des petites fibres (surface < à 500  $\mu\text{m}^2$ , largeur < 20  $\mu\text{m}$ ), témoin d'un processus d'hypertrophie (Fig. 87A-B). Les différentes courbes (rouges) de la *figure 87* représentent la moyenne de la largeur des fibres musculaires en fonction du nombre de fibres (Fig. 87A) et la moyenne de la surface de ces fibres musculaires en fonction du nombre de fibres (Fig. 87B). Ces courbes permettent d'apprécier l'hypertrophie observée suite à l'injection de décorine murine dans le muscle tibialis antérieur gauche. L'ensemble des paramètres définissant l'hypertrophie (surface moyenne, largeur et longueur) est plus élevé pour le muscle injecté mDCN que pour le contrôle TAD (Fig. 88).

Souris	Muscles	Surface moyenne ( $\mu\text{m}^2$ )	Hypertrophie (%)
Souris 1	TAD 1	1115,7	21
	TAG 1	1345,9	
Souris 2	TAD 2	885,1	43
	TAG 2	1266,7	
Souris 3	TAD 3	1045,9	29
	TAG 3	1344,8	



**Figure 86 :** Données d'hypertrophie chez la souris *mdx* suite à l'injection de mDécorine (TAG).



**Figure 87 :** Comparaison des largeurs (A) et des surfaces (B) moyennes des fibres musculaires ( $\mu\text{m}^2$ ) entre un TAG injecté mDCN et un TAD contrôle.

	Moyenne		Moyenne
Surface de l'ellipse [ $\mu\text{m}^2$ ]	1266,7	Surface de l'ellipse [ $\mu\text{m}^2$ ]	885,1
Longueur [ $\mu\text{m}$ ]	47,63	Longueur [ $\mu\text{m}$ ]	41,46
Largeur [ $\mu\text{m}$ ]	27,67	Largeur [ $\mu\text{m}$ ]	22,80
Surface de l'objet [ $\mu\text{m}^2$ ]	1161,8	Surface de l'objet [ $\mu\text{m}^2$ ]	830,0
Périmètre de l'objet [ $\mu\text{m}$ ]	135,33	Périmètre de l'objet [ $\mu\text{m}$ ]	113,83

TAG2 : Injecté mDCN                      TAD2 : Témoin

**Figure 88 :** Paramètres d'hypertrophie chez la souris *mdx* suite à l'injection de mDécorine (TAG).

En conclusion, ces résultats ont permis de montrer que la mDécorine injectée en IM induit, après 17 jours, chez des souris *mdx* mâles de 7 semaines, une augmentation de la masse musculaire (moyenne = +43%) via des phénomènes d'hyperplasie (moyenne = +16%) et d'hypertrophie (moyenne = +31%).

### 3.3 Etude cinétique de l'effet de la mDécorine chez la souris *mdx*

Afin de déterminer à quel moment l'effet de la mDécorine est maximal et combien de temps l'effet peut perdurer, une étude cinétique a été menée sur 9 souris *mdx* mâles de 7 semaines (Tab. 4).

N°animal	Souches	Age à l'injection	Produits injectés	Voie d'injection	Volume injecté	Sacrifice
1	MDX	7 semaines	TAG : 20 µg mDecorin + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 22 µl NaCl TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 22 µl NaCl	IM	22 µl	J7
2						J14
3						
4						
5						
6						J21
7						J33
8						
9						

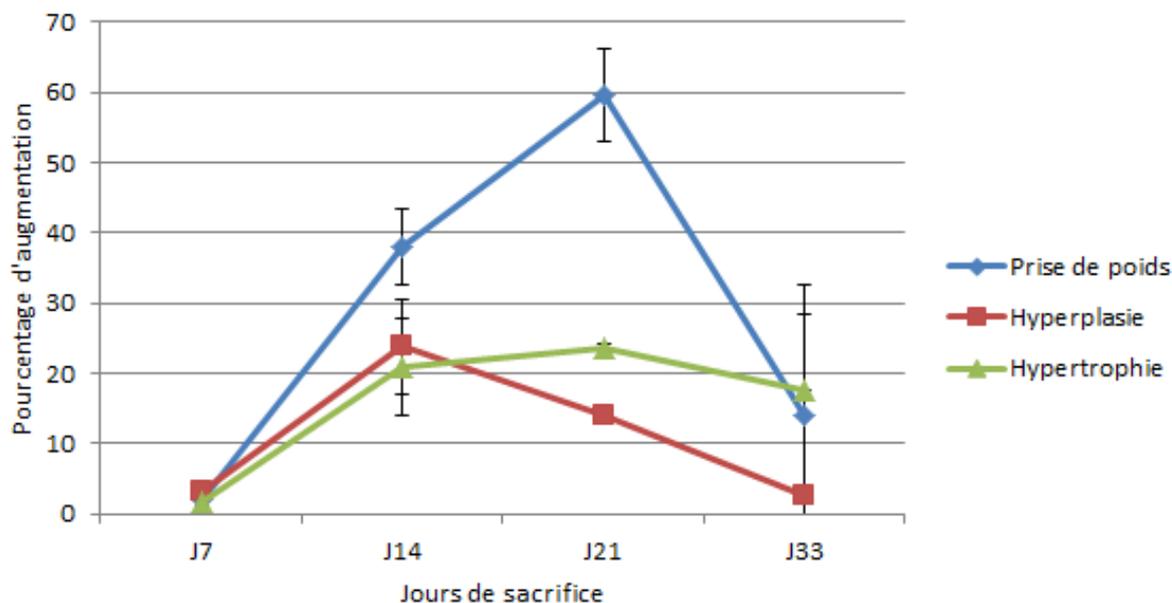
**Tableau 4 :** Etude de la cinétique de l'effet de la mDecorine chez *mdx*.

- A J0, toutes les souris reçoivent 20 µg de mDCN + 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 22 µl NaCl 150 mM en intramusculaire dans le TAG et 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 22 µl NaCl 150 mM dans le TAD.
- A J7, J14, J21 et J33 des souris ont été sacrifiées et les muscles TAG et TAD ont été prélevés, pesés, congelés et montés sur bouchon.
- Des coupes de 8 µm d'épaisseur ont été réalisées et des marquages HPS et laminine ont ensuite été réalisés.

Comme le présente le *tableau 5*, une importante prise de poids est observée à J14 (+38%) et J21 (+59,7%,  $p \leq 0,02$ ). Cette augmentation de la masse musculaire tend à diminuer à J33 (+14,1%) laissant penser que le pic d'effet de la mDCN se situe entre J14 et J21. En effet, on observe que le phénomène d'hyperplasie est surtout présent à J14 (+23,8%,  $p \leq 0,05$ ) et tend à disparaître vers J33 (+2,6%). A J14, on observe une importante hypertrophie (+21%,  $p \leq 0,02$ ) des fibres musculaires. Ce phénomène perdure à J21 (+23,7%,  $p \leq 0,02$ ) puis diminue à J33 (+17,7%).

Souris	Jours	Muscles	Poids (mg)	Prise de poids (%)	Prise de poids moyenne (%)	Nombre de fibres	Hyperplasie	Hyperplasie moyenne	Surface des fibres (µm <sup>2</sup> )	Hypertrophie	Hypertrophie moyenne
Souris 1	J7	TAD 1	66,1	3,18	2,04	3379	2,78	3,21	1814,2	3,06	1,63
		TAG 1	68,2			3473			1869,8		
Souris 2	J7	TAD 2	77,4	0,90	2,04	3989	3,63	3,21	1677,3	0,20	1,63
		TAG 2	78,1			4134			1680,7		
Souris 3	J14	TAD 3	70,7	58,98	38,02	3795	19,66	23,80	1638,6	26,78	20,97
		TAG 3	112,4			4541			2077,4		
Souris 4	J14	TAD 4	69,4	48,41	38,02	2794	33,25	23,80	1710,2	16,46	20,97
		TAG 4	103,0			3723			1991,7		
Souris 5	J14	TAD 5	85,4	6,67	38,02	2617	18,49	23,80	1762,3	19,66	20,97
		TAG 5	91,1			3101			2108,8		
Souris 6	J21	TAD 6	68,0	53,09	59,70	3025	13,36	13,91	2102,2	17,88	23,72
		TAG 6	104,1			3429			2478,0		
Souris 7	J21	TAD 7	56,7	66,31	59,70	3366	14,47	13,91	1650,7	29,57	23,72
		TAG 7	94,3			3853			2138,8		
Souris 8	J33	TAD 8	76,7	-0,78	14,06	3534	-12,39	2,60	1501,5	20,61	17,72
		TAG 8	76,1			3096			1811,0		
Souris 9	J33	TAD 9	76,1	28,91	14,06	3262	17,60	2,60	1663,6	14,83	17,72
		TAG 9	98,1			3836			1910,3		

**Tableau 5 :** Prise de poids, hyperplasie et hypertrophie chez des souris *mdx* à J7, J14, J21 et J33 suite à l'injection de mDCN dans le TAG.



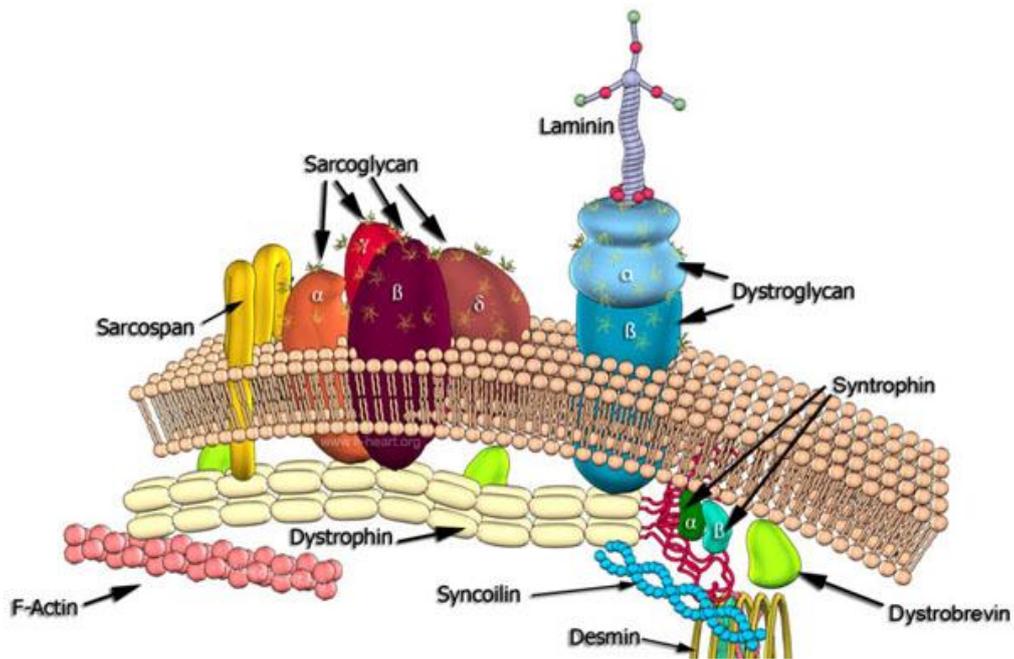
**Figure 89** : Cinétique de l'effet de la mDécorine chez la souris *mdx*.

La *figure 89* représente sous forme de graphique l'évolution dans le temps de la prise de poids et des phénomènes d'hyperplasie et d'hypertrophie. Un effet maximal de la mDCN situé entre J14 et J21 et une diminution de cet effet vers J33 sont observés. Il est à noter que les effets étant visibles pendant environ 1 mois, cela montre qu'une seule injection intra-musculaire de 20  $\mu\text{g}$  de la protéine recombinante mDCN engendre d'importantes modifications dans la régulation de la croissance musculaire.

#### 3.4 Effets de la mDCN sur la croissance musculaire de souris gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>

Afin de tester l'efficacité de la mDCN dans un autre modèle de souris, une étude *in vivo* sur des souris gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>, modèle murin de sarcoglycanopathies sur fond pur C57/B16 [343], a été menée.

Les sarcoglycanopathies sont des maladies musculaires d'origine génétique appartenant au groupe des myopathies des ceintures (*Limb Girdle Muscular Dystrophy* ou LGMD). La LGMD 2C, ou gamma-sarcoglycanopathie [339], est une dystrophie musculaire des ceintures rare de transmission autosomique récessive, due à des mutations dans le gène gamma-sarcoglycane (gSG). La sous-unité  $\gamma$  du complexe des sarcoglycans est, de ce fait, non fonctionnelle et la fragilité de la membrane s'en trouve accentuée (Fig. 90).



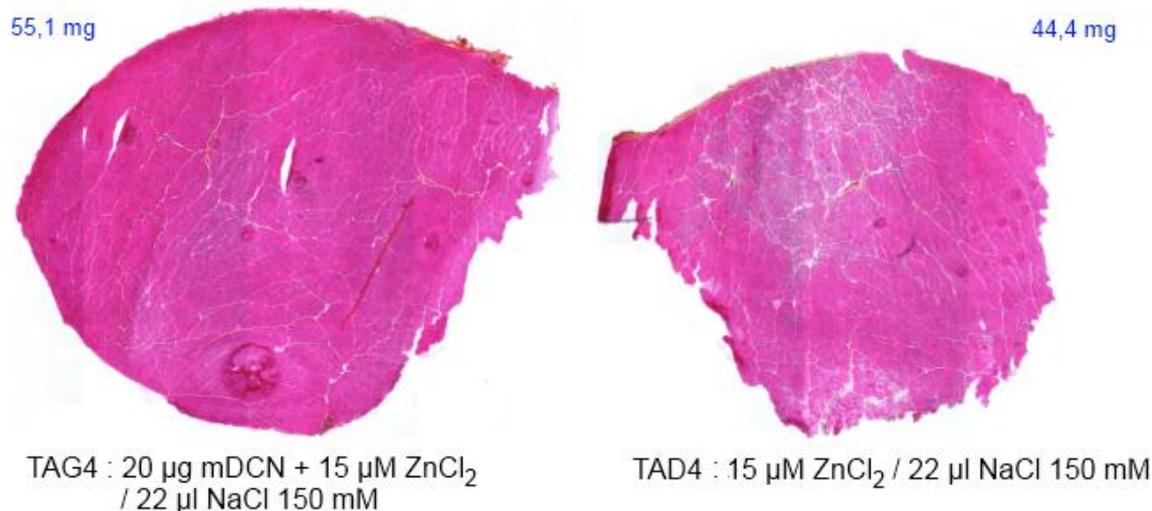
**Figure 90** : Structure du complexe Sarcoglycane - D'après Carmela et al., 2009.

L'étude regroupe 4 souris gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup> mâles de 8 semaines (Tab. 6). A J0, toutes les souris reçoivent 20 µg de mDCN + 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 22 µl de NaCl 150 mM par voie intramusculaire dans le TAG. Le TAD est utilisé comme contrôle et reçoit 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 22 µl de NaCl 150 mM. Les 4 souris ont été sacrifiées à J17 et les TAG et TAD ont été prélevés.

N°animal	Age à l'injection	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Sacrifice
1	8 semaines	TAG : 20 µg mDecorin + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 22 µl NaCl TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 22 µl NaCl	IM	22 µl	J17
2					
3					
4					

**Tableau 6** : Etude de l'effet de la mDÉcorine chez la souris gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>.

Au niveau histologique, nous avons constaté une amélioration notable de l'aspect du muscle chez certaines souris (Fig. 91), la nécrose et l'infiltration cellulaire étant quelque peu atténuées. Comme le présente la *figure 91*, le TAG injecté avec 20 µg de mDCN + 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> est plus volumineux que le TAD.



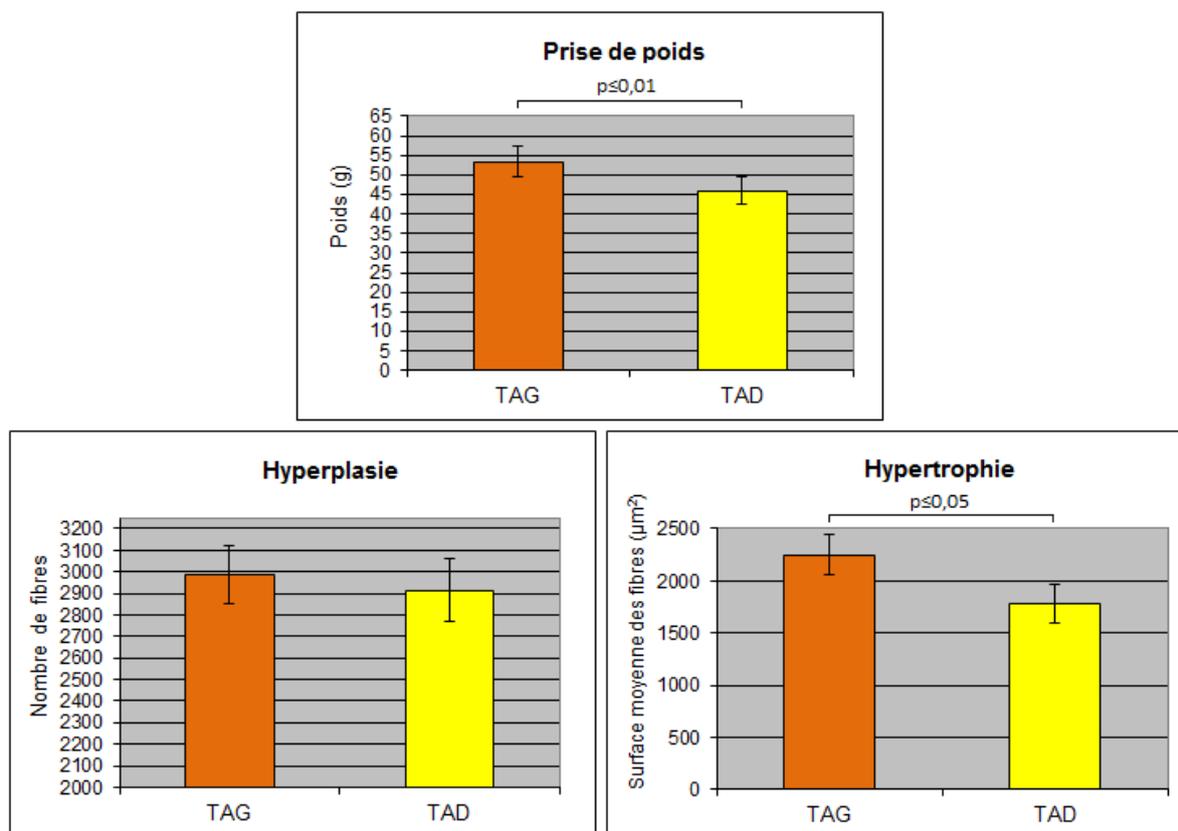
**Figure 91 :** Coupes HPS d'un TAG (injecté mDCN) et d'un TAD (Témoin) de souris Gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>.

Chez toutes les souris, une prise de poids allant de 11% à 24% (moyenne de 16%,  $p \leq 0,01$ ) a été observée (Tab. 7 et Fig. 92A).

Souris	Muscles	Poids (g)	Prise de poids (%)	Nombre fibres	Hyperplasie (%)	Surfaces fibres ( $\mu\text{m}^2$ )	Hypertrophie (%)
Souris 1	TAD 1	45,6	11	2786	4	1791,6	24
	TAG 1	50,5		2896		2220	
Souris 2	TAD 2	41,3	17	3004	1	1584	52
	TAG 2	48,5		3037		2400,8	
Souris 3	TAD 3	52,8	12	2748	2	2066	20
	TAG 3	59,3		2812		2487,3	
Souris 4	TAD 4	44,4	24	3117	3	1682,2	13
	TAG 4	55,1		3207		1899,9	

**Tableau 7 :** Données de prise de poids, d'hyperplasie et d'hypertrophie chez les 4 souris gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup> suite à l'injection de mDécorine (TAG).

Suite à l'injection de 20  $\mu\text{g}$  de mDécorine, la prise de poids chez la souris gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup> mâle est consécutive à une hypertrophie de l'ordre de 27% ( $p \leq 0,05$ ) (Tab. 7 et Fig. 92C). On note une inégalité des résultats et une certaine variabilité dans les données d'hypertrophie, pouvant s'expliquer par une réaction différente chez chaque souris à l'injection de mDécorine. Contrairement à l'étude menée chez la souris *mdx*, aucune hyperplasie n'a été constatée suite à l'injection de mDCN chez la souris gamma-sarcoglycan (Tab. 7 et Fig. 92B). La croissance de la masse musculaire suite à l'injection de mDCN est donc uniquement due au phénomène d'hypertrophie chez la souris gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>.



**Figure 92 :** Prise de poids, hyperplasie et hypertrophie chez la souris *gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>* suite à l'injection de mDécorine (TAG).

En résumé, nous venons de voir que :

- ✓ La mDécorine permettait d'induire une augmentation de la masse musculaire chez la souris *gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>*. Chez les 4 souris injectées, la prise de poids est consécutive à une augmentation de la surface moyenne des fibres musculaires.

### 3.5 Peptides mDCN et effets sur la croissance musculaire

#### 3.5.1 Etude *in vivo* du peptide 31-71 mDCN chez *mdx*

Afin de déterminer si le peptide 31-71 mDCN permet, comme la protéine recombinante mDCN, d'obtenir une augmentation de la masse musculaire, une étude *in vivo* regroupant 6 souris *mdx* (1 mâle et 5 femelles) de 6-10 semaines a été menée (Tab. 8). L'effet dose du peptide 31-71 mDCN est également étudié à travers 2 groupes de souris recevant 40  $\mu\text{g}$  de peptide ou 65  $\mu\text{g}$  de peptide 31-71 mDCN.

Souris	Age à l'injection	Sexe	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Sacrifice
1	7 semaines	Mâle	TAG : 40 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 22 µl NaCl TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 22 µl NaCl	IM	22 µl	J17
2	10	Femelle				
3	semaines					
4	6 semaines	Femelle	TAG : 65 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 33 µl NaCl TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 33 µl NaCl		33 µl	J18
5						
6						

**Tableau 8 :** Etude de l'effet du peptide 31-71 mDCN chez la souris *mdx*.

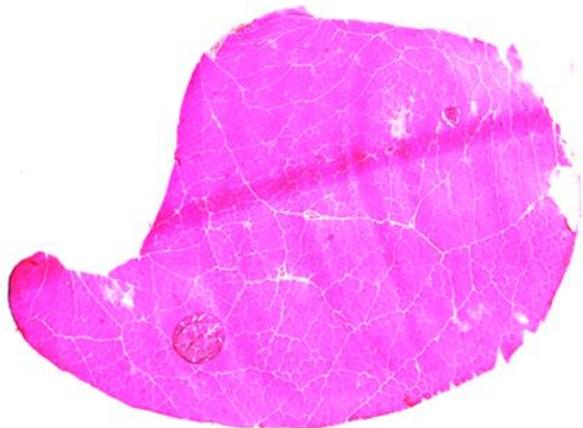
A J0, les souris *mdx* 1, 2 et 3 constituant le groupe 1 ont été injectées avec 40 µg de peptide 31-71 mDCN / 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 22 µl de NaCl 150 mM dans le TAG. Le TAD a été utilisé comme contrôle et a reçu 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 22 µl de NaCl 150 mM. Le groupe 2 comprend les souris 4, 5 et 6. Chacune de ces souris a reçu une dose plus importante de peptide 31-71 mDCN (65 µg + 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 33 µl de NaCl 150 mM dans le TAG). Le TAD fait toujours office de témoin avec une injection de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 33 µl de NaCl 150 mM. Les souris impliquées dans ce protocole ont été sacrifiées soit à J17 (groupe 1) soit à J18 (groupe 2).

Comme on peut l'observer sur la *figure 93*, l'effet du peptide 31-71 mDCN (Souris 4 / injection de 65 µg de peptide 31-61 mDCN) est visible à l'œil nu 18 jours après injection.

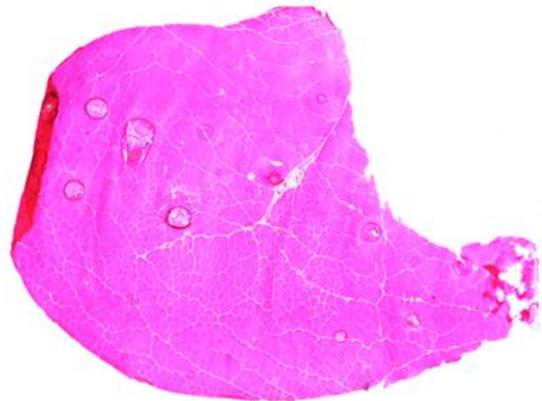


**Figure 93 :** Comparaison du TAG5 et TAD5 18 jours après injection du peptide 31-71 mDCN.

Les marquages HPS (Fig. 94) n'ont pas permis de constater une amélioration du muscle au niveau histologique. Cependant, les marquages montrent que les TAG injectés avec 40 et 65 µg de peptide 31-71 mDCN sont plus volumineux que les muscles contrôles.



**TAG1** : 40  $\mu$ g peptide 31-71 mDCN  $\mu$ M + 15  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> / 22  $\mu$ l NaCl



**TAD1** : 15  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> / 22  $\mu$ l NaCl



**TAG4** : 65  $\mu$ g peptide 31-71 mDCN  $\mu$ M + 15  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> / 22  $\mu$ l NaCl



**TAD4** : 15  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> / 22  $\mu$ l NaCl

**Figure 94** : Coupes HPS du muscle TAG1 injecté avec 40  $\mu$ g (A) et 65  $\mu$ g (B) de peptide 31-71 mDCN et de son contrôle TAD.

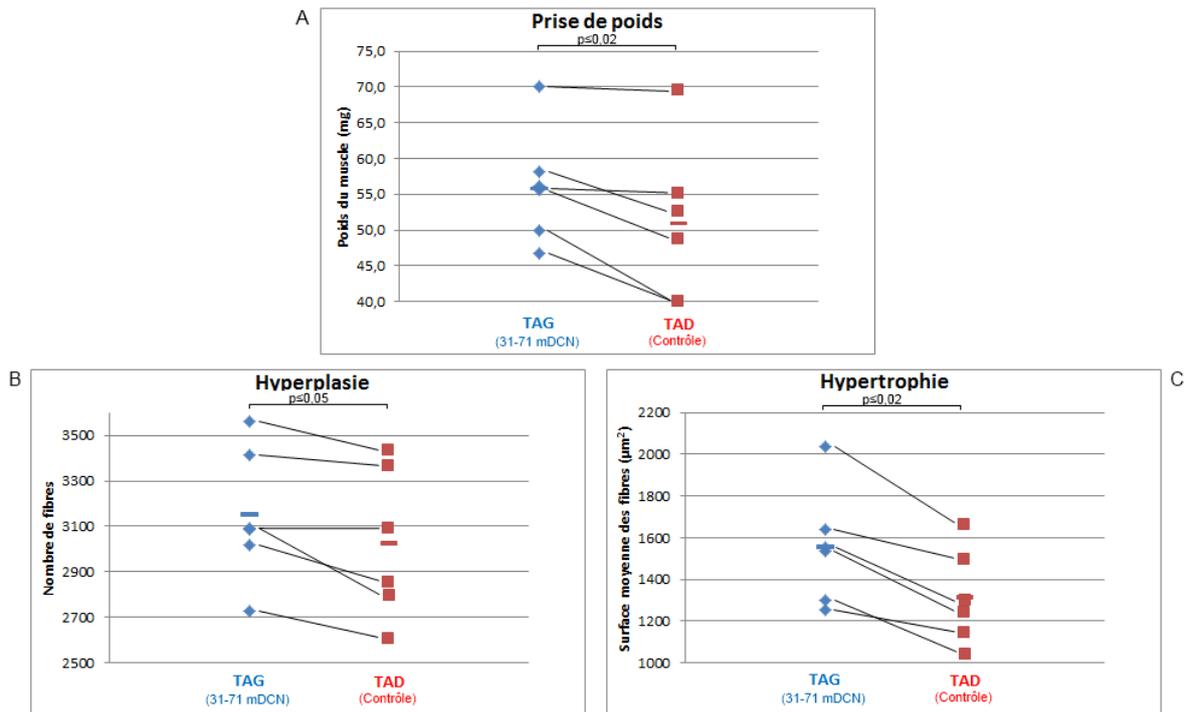
Comme indiqué dans le *tableau 9* et à la *figure 95*, une prise de poids du muscle TAG injecté (peptide 31-71 mDCN) par rapport au contrôle a été observée. Pour une injection de 40  $\mu$ g de peptide 31-71 mDCN, l'augmentation du poids du muscle injecté est de l'ordre de 5,3% (moyenne des prises de poids des souris 1 à 3) et peut atteindre une augmentation de la masse du muscle injecté de 14,1% (Souris 1, Tab. 9). Pour une injection de 65  $\mu$ g de peptide 31-71 mDCN, on constate une augmentation de la masse du muscle injecté d'environ 18,2% (moyenne des prises de poids des souris 4 à 6).

D'une manière générale, le peptide 31-71 mDCN permet une augmentation de la croissance musculaire de façon dose dépendante (Tab. 9).

Souris	Produit injecté	Poids TA (Témoïn -> Injecté)	Hyperplasie (Témoïn -> Injecté)	Hypertrophie (Témoïn -> Injecté)
Souris 1	TAG : 40 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 22 µl NaCl TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 22 µl NaCl	48,8 mg -> 55,7 mg + 14,14%	3433 -> 3560 + 3,7%	1665,4 µm <sup>2</sup> -> 2034,8 µm <sup>2</sup> + 22,18%
Souris 2		55,2 mg -> 55,8 mg + 1,09%	3091 -> 3093 + 0,06%	1494,1 µm <sup>2</sup> -> 1638,7 µm <sup>2</sup> + 9,68%
Souris 3		69,6 mg -> 70 mg + 0,57%	3364 -> 3414 + 1,49%	1242,4 µm <sup>2</sup> -> 1535,8 µm <sup>2</sup> + 23,62%
Souris 4	TAG : 65 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 33 µl NaCl TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 33 µl NaCl	52,6 mg -> 58,1 mg +10,46%	2608 -> 2730 +4,68%	1147,6 µm <sup>2</sup> -> 1253,7 µm <sup>2</sup> +9,25%
Souris 5		39,2 mg -> 46,8 mg +19,39%	2800 -> 3089 +10,32%	1302 µm <sup>2</sup> -> 1557 µm <sup>2</sup> +19,59%
Souris 6		40,1 mg -> 50 mg +24,69%	2857 -> 3020 +5,71%	1046 µm <sup>2</sup> -> 1298 µm <sup>2</sup> +24,09%

**Tableau 9 :** Prise de poids, hyperplasie et hypertrophie chez des souris *mdx* suite à l'injection de peptide 31-71 mDCN (40 ou 65 µg dans le TAG).

Comme l'indique le *tableau 9*, la prise de poids du muscle injecté est la conséquence d'une augmentation du nombre de fibres musculaires pouvant atteindre 10% et d'une augmentation de la taille moyenne des fibres musculaires de 23,6% (groupe) et de 24,1% (groupe 2).



**Figure 95 :** Représentation graphique des prises de poids, d'hyperplasie et d'hypertrophie constatés lors d'une injection de peptide 31-71 chez la souris *mdx*.

Chaque marqueur représente un TA de souris *mdx*. La moyenne des prises de poids, du nombre de fibres (hyperplasie) et de la surface des fibres musculaires (hypertrophie) des TAG et TAD est signifiée par une barre horizontale.

### 3.5.2 Etudes *in vivo* des peptides 31-61 mDCN, 42-71 mDCN et 31-71 mDCN muté chez *mdx*

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet des peptides 31-61 et 42-71 sur la croissance musculaire chez *mdx* (Tab. 10).

N°animal	Age à l'injection	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Sacrifice
1	9 semaines	TAG : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM	IM	35,5 µl	J20
2		TAG : 65 µg peptide 31-61 mDCN + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM			
3					
4		TAG : 65 µg peptide 42-71 mDCN + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM TAD : 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM			
5					
6					
7					

**Tableau 10 :** Etude de l'effet des peptides 31-61 et 42-71 mDCN sur la croissance musculaire chez des souris *mdx*.

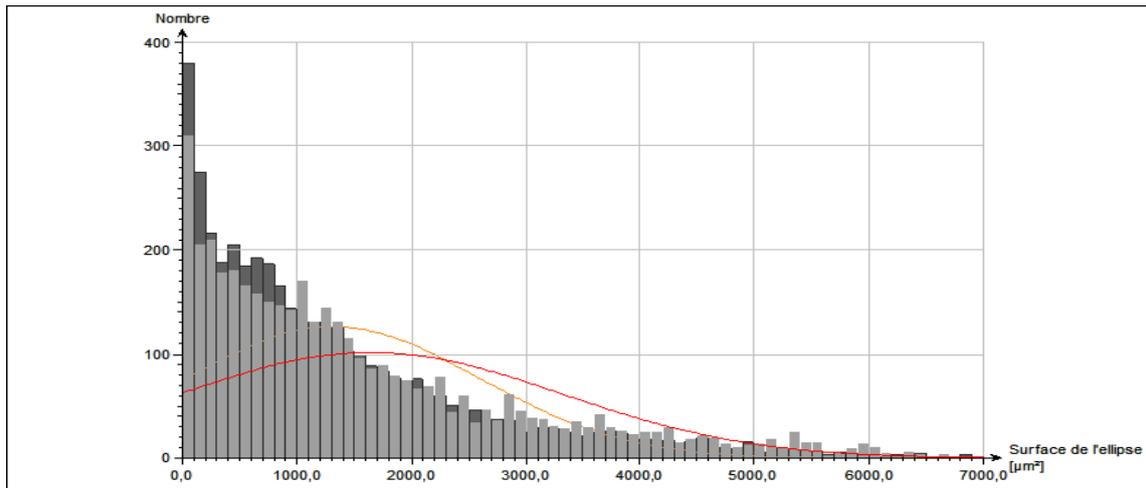
La souris 1 « Témoin » reçoit 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM dans le TAG et le TAD. Les souris 2 à 4 reçoivent en intra-musculaire dans le TAG 65 µg de peptide 31-61 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 35,5 µl de NaCl 150 mM. 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM sont injectés dans le TAD. Les souris 5 à 7 reçoivent en intra-musculaire dans le TAG 65 µg de peptide 42-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 35,5 µl de NaCl 150 mM. 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM sont injectés dans le TAD. A J20, toutes les souris impliquées dans l'étude ont été sacrifiées.

A J20, comme le présente le *tableau 11*, aucune prise de poids n'est constatée chez la souris 1 témoin et chez les souris 2, 3 et 4 injectées avec le peptide 31-61 mDCN (TAG). En accord avec ce constat, aucune hyperplasie ou hypertrophie n'a été observée lors de l'analyse des marquages laminine (Tab. 11).

		Prise de poids(TA) à J20	Hyperplasie	Hypertrophie
Témoin	Souris 1	0,73	2,76	4,15
Injecté Pep 31-61	Souris 2	-0,16	-2,33	-1,87
	Souris 3	-1,10	-1,11	-3,59
	Souris 4	0,79	3,88	-1,87
Injecté Pep 42-71	Souris 5	17,63	-0,53	23,99
	Souris 6	10,29	-0,69	33,65
	Souris 7	4,25	4,66	25,31

**Tableau 11 :** Prise de poids, hyperplasie et hypertrophie chez des souris *mdx* suite à l'injection de peptide 31-61 mDCN (souris 2 à 4) et de peptide 42-71 mDCN (souris 5 à 7).

Le peptide 42-71 mDCN permet quant à lui une prise de poids de l'ordre de 11% consécutive à un phénomène d'hypertrophie de 28% (Tab. 11). En effet, une augmentation du nombre de fibres musculaires de grandes tailles (>3000 µm<sup>2</sup>) est observée ainsi qu'une diminution des fibres de petites tailles (<500 µm<sup>2</sup>) (Fig. 96). Cette hypertrophie est observable à l'aide des courbes gaussiennes propres à chaque muscle représentant la moyenne des surfaces par nombre de fibres musculaire.



**Figure 96 :** Comparaison de la surface et du nombre de fibres musculaires du TAG6 injecté peptide 42-71 mDCN (gris clair, courbe rouge) et du TAD6 témoin (gris foncé, courbe orange).

Le peptide 31-71 mDCN muté a ensuite été administré dans le TAG de 4 souris *mdx* de 9 semaines pour une durée totale de 20 jours de traitement. Les résultats montrés ci-dessous indiquent que, comme attendu suite aux résultats *in vitro*, ce peptide n'induit pas d'augmentation de la masse musculaire (Tab. 12).

		Prise de poids (TA) à J20	Hyperplasie	Hypertrophie
Injecté Pep 41 muté	Souris 1	1,19	-3,47	-3,35
	Souris 2	0,25	-4,18	-6,58
	Souris 3	-1,56	0,19	-4,08
	Souris 4	1,19	/	0,57

**Tableau 12 :** Injection de peptide 31-71 mDCN muté dans le TAG de souris *mdx*.

#### 4. Etudes fonctionnelles : Décorine, peptide 31-71 mDCN et tests de force

L'injection de décorine murine chez la souris *mdx* permet, après environ 18 jours, une augmentation de la masse du muscle injecté. Afin de vérifier si cette augmentation de la masse musculaire est accompagnée d'un gain de force et d'une résistance accrue de la membrane, différentes études d'évaluations fonctionnelles ont été menées.

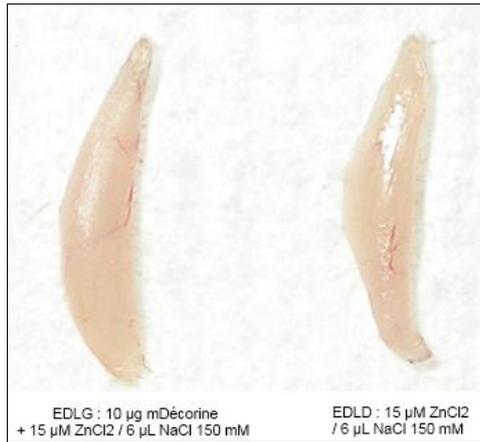
##### 4.1 Etudes de l'effet de la décorine et du peptide 31-71 mDCN sur muscles isolés

Les propriétés contractiles d'un muscle de souris *mdx* injecté avec 10  $\mu\text{g}$  de mDécorine + 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 6  $\mu\text{l}$   $\text{NaCl}$  150 mM et d'un muscle témoin injecté avec 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 6  $\mu\text{l}$   $\text{NaCl}$  150 mM ont été évaluées sur le muscle isolé EDL (*Extensor Digitorum Longus*). Ce muscle a

été choisi pour l'individualisation de ses tendons à chaque extrémité, ce qui permet un isolement complet et sans lésion du muscle. Le dispositif expérimental du laboratoire « Evaluation fonctionnelle » de Généthon permet d'étudier différents paramètres musculaires tels que :

- La secousse ou « Twitch » : le nombre de fibres musculaires parallèles et leur diamètre déterminent la force maximale que le muscle peut développer. Cette force est mesurée suite à l'application d'un stimulus électrique unique qui produit une secousse musculaire, caractérisée par la durée de sa phase de contraction (TC), son amplitude maximale développée (P0) et par son temps de relâchement nécessaire pour obtenir une chute de tension de 50 % (T50). Différentes secousses musculaires sont effectuées pour déterminer la longueur optimale  $L_0$ , longueur pour laquelle le muscle développe la plus grande force lors d'une contraction isométrique.
- Le Tétanos : la répétition des stimulations électriques permet d'aboutir à une sommation et une fusion des secousses. Le myogramme obtenu présente une allure de plateau. Si la fréquence est assez grande, le plateau est rectiligne et le tétanos est dit parfait ou fusionné. Chaque muscle est stimulé à sa longueur optimale. Un tétanos se caractérise par sa pente de contraction (p), son amplitude maximale développée ( $P_0$ ) et son temps de relâchement nécessaire pour obtenir une chute de force de 50% (T50). La force obtenue est exprimée en mN et traduite en tension (force normalisée par unité de surface exprimée en  $\text{mN}/\text{mm}^2$ ) en prenant en compte différents paramètres du muscle (longueur de fibres, densité et poids du muscle).
- « Stretch » : le muscle est soumis à 5 contractions excentriques successives espacées de 3 minutes. Une chute progressive de la force isométrique se produit et peut être quantifiée en exprimant sa chute relative entre la première et la cinquième contraction excentrique. Cette chute de force est directement corrélée à la déficience de la membrane musculaire.

Afin d'étudier l'ensemble de ces paramètres, une première étude regroupant 5 souris *mdx* de 7 semaines a été réalisée. Toutes les souris impliquées dans ce protocole ont été injectées à J0 avec 10  $\mu\text{g}$  mDÉcorine + 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 6  $\mu\text{L}$  NaCl 150 mM dans l'EDL gauche et avec 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 6  $\mu\text{L}$  NaCl 150 mM dans l'EDL droit. Dix-sept jours après traitement, les 5 souris *mdx* ont été sacrifiées et les muscles EDL prélevés et pesés (Fig. 97).



**Figure 97** : Photographie d'un EDL gauche injecté mDCN et d'un EDL droit témoin.

Comme le suggère la *figure 97* et l'indique le *tableau 13*, aucune différence significative en terme de gain de masse musculaire n'a été observée après injection de décorine. Les différents tests réalisés par l'équipe « Evaluation fonctionnelle » ont cependant montré que la mDécorine permettait, après normalisation, d'obtenir dans l'EDL gauche (50,9) une force maximale ou Twitch un peu plus élevée (+ 6,5 %) qu'avec le muscle contrôle (47,8). Après normalisation, le test du Tétanos a montré que la mDCN augmentait de 6% la force d'un muscle lorsque ce dernier est stimulé à sa longueur optimale. On observe également une pente ou vitesse de contraction du muscle injecté mDCN plus importante que pour le contrôle latéral EDLD (+ 6,2%). Enfin, l'étude de la déficience de la membrane musculaire, ou test du Stretch, indique que la mDécorine permet une meilleure résistance à des exercices excentriques. En effet, comme décrit dans le *tableau 13*, on observe un stretch moyen de -32,9 pour les 5 EDLG injectés avec 10 µg mDCN et un stretch moyen de -51,5 pour les 5 EDLD contrôle latéral, soit une différence de l'ordre de 36%. Cette chute de force étant corrélée avec une déficience de la résistance membranaire, la mDCN a pour effet d'améliorer l'état de résistance de la membrane musculaire.

Souris	Produit injecté	Muscle		Tétanos				Twitch		Stretch	
		Poids (mg)	Moyenne	sPO <sub>CSA</sub>	Moyenne sPO <sub>CSA</sub>	Pente	Moyenne Pente	sPo	Moyenne sPo	%	Moyenne
1	10 µg mDécorine + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 6 µL NaCl 150 mM	EDL G1	15,7	124,7	157,0	7,7	10,3	37,8	50,9	-30,3	-32,9
2		EDL G2	18,9	147,8		13,5		51,1		-56,3	
3		EDL G3	20,2	153,6		12,3		51,9		-40,7	
4		EDL G4	10,6	193,4		8,0		61,5		-4,7	
5		EDL G5	15,7	165,8		10,1		52,4		-32,5	
Ecart-Type		3,7		25,2		2,6		8,5		18,8	
		Poids (mg)	Moyenne	sPO <sub>CSA</sub>	Moyenne sPO <sub>CSA</sub>	Pente	Moyenne Pente	sPo	Moyenne sPo	%	Moyenne
1	15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 6 µL NaCl 150 mM	EDL D1	16,3	100,0	148,2	6,0	9,7	26,1	47,8	-68,6	-51,5
2		EDL D2	17,0	166,0		14,2		61,9		-54,9	
3		EDL D3	19,8	/		/		/		/	
4		EDL D4	13,8	183,1		8,7		59,4		-44,8	
5		EDL D5	15,8	143,9		9,7		43,9		-37,6	
Ecart-Type		2,18		35,9		3,4		16,5		13,5	
p Value		0,72		0,40		0,80		0,61		0,16	

**Tableau 13** : Résultats des différents tests de force suite à l'injection de mDCN dans l'EDLG.

Il est cependant à noter que les valeurs obtenues présentent des p value non significatives. Afin de pouvoir affirmer que la décorine augmente réellement la force, il faudrait reproduire ce protocole en utilisant un plus grand nombre de souris par groupe.

Des tests de force ont également été réalisés avec le peptide 31-71 mDCN. 4 souris *mdx* de 8 semaines ont été injectées avec 25 µg de peptide 31-71 mDécorine + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 6 µL NaCl 150 mM dans l'EDL gauche et avec 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 6 µL NaCl 150 mM dans l'EDL droit. Après 19 jours, les souris impliquées dans l'étude ont été sacrifiées et les EDL gauche et droit ont été prélevés afin de réaliser les différents tests de force (Tétanos et Twitch).

Souris	Produit injecté	Muscle	Poids du muscle (mg)		Tétanos				Twitch	
			Poids du muscle (mg)	Moyenne	sPO <sub>CSA</sub>	Moyenne sPO <sub>CSA</sub>	Pente	Moyenne Pente	sPo	Moyenne sPo
1	25 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 6 µL NaCl 150 mM	EDL G1	17,3	19,9	120,7	97,8	7,1	5,8	38,8	33,3
2		EDL G2	23,4		72,0		5,7		21,7	
3		EDL G3	18,6		80,4		5,0		20,3	
4		EDL G4	20,1		118,2		5,6		52,4	
Ecart-Type			2,6		25,2		0,9		15,3	
			Poids du muscle (mg)	Moyenne	sPO <sub>CSA</sub>	Moyenne sPO <sub>CSA</sub>	Pente	Moyenne Pente	sPo	Moyenne sPo
1	15 µM ZnCl <sub>2</sub> / 6 µL NaCl 150 mM	EDL D1	17,4	18,5	121,4	125,3	8,9	7,8	38,4	43,2
2		EDL D2	17,8		104,0		6,6		33,3	
3		EDL D3	19,4		149,0		8,0		55,1	
4		EDL D4	19,4		126,7		7,6		46,1	
Ecart-Type			1,05		18,6		1,0		9,5	
p Value			0,42		0,17		0,02		0,36	

**Tableau 14** : Résultats des tests de force suite à l'injection de peptide 31-71 mDCN dans l'EDLG.

Comme indiqué dans le *tableau 14*, nous n'avons pas pu constater de prise de poids plus importante des EDLG suite à l'injection de 25 µg de peptide 31-71 mDécorine + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 6 µL NaCl 150 mM. Les résultats obtenus avec les tests du Tétanos et du Twitch n'ont pas montré de gain de force après injection de peptide 31-71 mDCN dans le muscle EDL gauche.

En conclusion, aucune amélioration statistiquement significative n'a pu être observée dans les tests fonctionnels après injection de la protéine entière ou du peptide 31-71. Cependant, les résultats avec la décorine pourraient tout de même indiquer un effet positif de la décorine entière sur la force et sur la résistance à des exercices excentriques. Ceci demande à être confirmé en réalisant le même protocole avec un plus grand nombre de souris par groupe.

#### 4.2 Etudes de l'effet de la décorine et du peptide 31-71 mDCN sur la loge entière (TA + EDL)

Suite aux tests de force réalisés sur le muscle EDL, une étude de l'effet de la mDCN et du peptide 31-71 mDCN sur la force de la loge antérieure (TA + EDL) a été menée sur 16 souris âgées de 8 à 12 semaines. La mesure de la force de la loge antérieure de la patte chez la souris se réalise à l'aide d'un exercice excentrique sur les muscles dorsiflecteurs (TA et EDL) de la patte. Cet exercice excentrique consiste en une série répétée de contractions musculaires par stimulation électrique, simultanément à un étirement forcé du muscle [348, 349]. Comme précédemment, le Twitch ou secousse musculaire (contraction suivie d'une relaxation d'un muscle en réponse à une stimulation isolée unique et de courte durée du nerf) et le Tétanos (fusion de plusieurs secousses musculaires sans relâchement aboutissant à un maintien long et uniforme de la contraction en réponse à une stimulation électrique du nerf à haute fréquence) sont mesurés. Le dispositif expérimental permettant seulement une étude de la patte gauche, les résultats de Twitch et de Tétanos ont été comparés à un groupe témoin. Les 16 souris impliquées dans l'étude sont réparties dans les groupes à J0 de manière « homogène » en termes de poids et l'ensemble des tests de force a été réalisé 19 jours après l'injection. Les 16 souris dans cette étude sont regroupées dans 4 groupes de 4 souris :

- Groupe 1 : Souris 1 à 4 : souris C57/B1 10 (souris saines ayant le même fond génétique que les souris *mdx*) non injectées.
- Groupe 2 : Souris 5 à 8 : *mdx* non injectées.
- Groupe 3 : Souris 9 à 12 : *mdx* recevant 25 µg mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM dans le TAG et 16 µg mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 8 µl NaCl 150 mM dans l'EDLG.
- Groupe 4 : Souris 13 à 16 : *mdx* recevant 50 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM dans le TAG et 25 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 8 µl NaCl 150 mM dans l'EDLG.

Comme le présente le *tableau 15*, nous observons une différence entre le groupe des souris non injectées C57/B110 et le groupe 2 des souris non injectées *mdx*. En effet, les souris *mdx* étant dystophiques, il n'est pas étonnant d'observer un Tétanos normalisé (0,028 N.mm.mg<sup>-1</sup>) et un Twitch normalisé (0,006 N.mm.mg<sup>-1</sup>) de moitié inférieurs à ceux obtenus chez la souris sauvage B110 (Tétanos normalisé = 0,050 N.mm.mg<sup>-1</sup> ; Twitch normalisé = 0,014 N.mm.mg<sup>-1</sup>). Cette comparaison nous permet d'assurer la fiabilité des tests réalisés et d'obtenir un seuil maximum (souris saines) et minimum (souris malades) de Tétanos et de Twitch.

Souris	Groupe	Souris (g)	TAG (mg)	EDL G (mg)	LAG (mg)	Tétanos brut (N.mm)	Tétanos normalisée (N.mm.mg <sup>-1</sup> )	Twitch brut (N.mm)	Twitch normalisé (N.mm.mg <sup>-1</sup> )
1	Témoin BI10	24,6	34,6	8,2	42,8	2,77	0,065	0,97	0,0227
2		26,3	44,8	11,5	56,3	2,95	0,052	0,8	0,0142
3		26,8	36,8	12,8	49,6	2,22	0,045	0,54	0,0109
4		25,5	41,6	9,4	51	1,89	0,037	0,52	0,0102
Moyenne		25,80	39,45	10,48	49,93	2,46	0,050	0,71	0,014
Ecart-type		0,96	4,61	2,06	5,56	0,49	0,012	0,22	0,006
5	Témoin <i>mdx</i>	35,5	89,1	20,1	109,2	2,92	0,027	0,82	0,0075
6		34,9	82,4	18,6	101	2,97	0,029	0,69	0,0068
7		35,4	93,3	21,1	114,4	2,99	0,026	0,48	0,0042
8		33,9	86,9	19,3	106,2	3	0,028	0,56	0,0053
Moyenne		34,93	87,93	19,78	107,70	2,97	0,028	0,64	0,006
Ecart-type		0,73	4,54	1,08	5,61	0,04	0,001	0,15	0,001
9	mDCN	39,3	101,2	21,9	123,1	1,35	0,011	0,65	0,0053
10		40	101,3	19,6	120,9	3	0,025	0,5	0,0041
11		40	96,5	24,3	120,8	3,12	0,026	0,6	0,0050
12		38,7	92,8	22,7	115,5	5,93	0,051	1,7	0,0147
Moyenne		39,50	97,95	22,13	120,08	3,35	0,028	0,86	0,007
Ecart-type		0,63	4,10	1,96	3,23	1,90	0,017	0,56	0,005
13	P41 mDCN	31,3	79,7	17,3	97	2,86	0,029	0,58	0,0060
14		32,7	71,6	23,4	95	2,1	0,022	0,61	0,0064
15		36,1	96,7	18,6	115,3	3,09	0,027	0,52	0,0045
16		36,8	86,2	20,1	106,3	2,18	0,021	0,4	0,0038
Moyenne		34,23	83,55	19,85	103,40	2,56	0,025	0,53	0,005
Ecart-type		2,65	10,61	2,63	9,34	0,49	0,004	0,09	0,001

**Tableau 15** : Résultats des différents tests de forces réalisés sur la loge gauche.

Dix-neuf jours après injection de 25 µg mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM dans le TAG et de 16 µg mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 8 µl NaCl 150 mM dans l'EDLG de souris *mdx* (souris 9 à 12), on constate une prise de poids du muscle injecté mDCN de l'ordre 11,5% pour le TA et de 11,9% pour l'EDL. Aucune différence de Tétanos normalisé (0,028 N.mm.mg<sup>-1</sup>) et de Twitch normalisé (0,007 N.mm.mg<sup>-1</sup>) n'a pu être observée par rapport aux valeurs obtenues chez les souris *mdx* témoins non injectées. On note cependant que le Tétanos brut (3,35 N.mm) et le Twitch brut (0,86 N.mm) des 4 souris *mdx* injectées mDCN sont plus élevés que chez les souris *mdx* non injectées (Tétanos brut = 2,97 N.mm ; Twitch brut = 0,64 N.mm.mg<sup>-1</sup>). Ceci indique que la mDCN permet d'augmenter la force absolue mais que cette force, une fois rapportée à la masse du muscle, ne se traduit pas en gain de force sur muscle entier. Il est à noter que la variabilité inter-souris est importante et donc des études utilisant plus d'animaux par groupe devraient être réalisées afin de pouvoir véritablement conclure sur l'effet de la mDCN sur la force musculaire de souris *mdx*.

Les souris *mdx* 13 à 16 injectées avec 50 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM dans le TAG et 25 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 8 µl NaCl 150 mM dans l'EDLG ne présentent aucun gain de force en comparaison avec les souris *mdx* non injectées. Encore plus inattendu est le fait que, dans cette expérience, aucune augmentation de la masse musculaire n'est observée ; ce qui n'est pas en accord avec nos résultats précédents. Ces résultats sont difficiles à interpréter. Nous discuterons des raisons possibles de la variabilité des résultats *in vivo* dans la partie Discussion, pages 157 – 158.

En conclusion, nous venons de voir que :

- Chez la souris *mdx*, un traitement de 19 jours avec 25 µg mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM dans le TAG et 16 µg mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 8 µl NaCl 150 mM dans l'EDL gauche induit une augmentation du poids de la LAG de l'ordre de 11,5%. Cette augmentation de la masse musculaire est accompagnée d'un gain de force absolue de l'ordre de 12,8% pour le test du Tétanos et de 34,4% pour le test Twitch. Cependant, lorsque ces forces sont normalisées par rapport au poids des muscles, aucun gain n'est observé.
- Les souris *mdx* ayant reçu 50 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM dans le TAG et 25 µg peptide 31-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 8 µl NaCl 150 mM ne présentent aucun gain de force ni d'augmentation de la masse musculaire. Au vu des résultats obtenus précédemment avec le peptide 31-71 mDCN, cette expérience devrait être reconduite afin de pouvoir véritablement conclure.
- Il est possible, et même probable, que la protéine entière possède des propriétés que le peptide 31-71 n'a pas. On peut donc se demander si le gain de force induit par la DCN se réalise par la répression de l'activité de la MSTN et /ou par d'autres mécanismes qui impliquent d'autres domaines de la protéine que la portion 31-71.

## **5. Effets de la décorine sur des myoblastes/myotubes ainsi que sur la voie de signalisation Akt/GSK**

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier *in vitro* les effets d'un ajout de décorine sur des cellules musculaires C2C12 différenciées et non différenciées. Il est à noter que ces cellules n'ont pas été caractérisées.

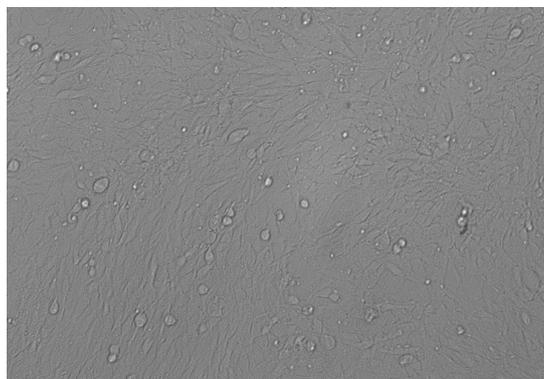
### 5.1 Effets de la mDCN sur la différenciation et la prolifération cellulaire

Afin d'étudier l'effet de la mDCN sur la prolifération et la différenciation cellulaire, des photographies des puits suivants ont été réalisées à l'aide du microscope Zeiss Axiovert 135 (Hamamatsu) et du logiciel Wasabi version 1.5 (Hamamatsu), 24 heures après ajout des produits : 1) cellules non traitées, et 2) cellules + 30 µg de mDCN/puits.

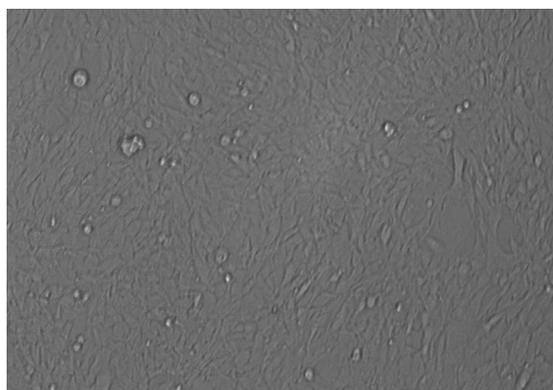
#### 5.1.1 Effets de la mDCN sur les myoblastes

Cette étude, uniquement basée sur une « impression » visuelle, n'est pas quantitative. La *figure 98* présente un puits témoin contenant des myoblastes C2C12. Suite à l'ajout de 30 µg

de mDCN (Fig. 99), nous avons observé une activité prolifératrice plus importante que dans le puits témoin ainsi qu'un début de fusion cellulaire.



**Figure 98 :** Myoblastes non traités.



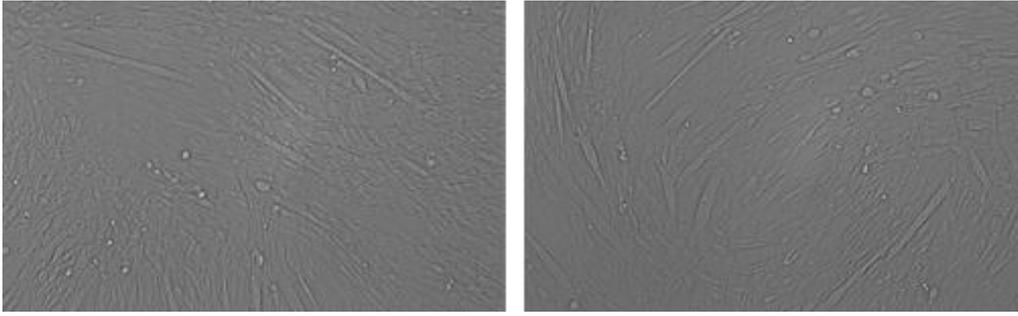
**Figure 99 :** Myoblastes 24h après avoir été mis en contact avec 30 µg de mDCN.

Bien que non quantitatifs, ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux déjà publiés. En effet, il a été montré que la décorine induisait une prolifération des myoblastes [283] ainsi qu'une différenciation de ces cellules en myotubes [280].

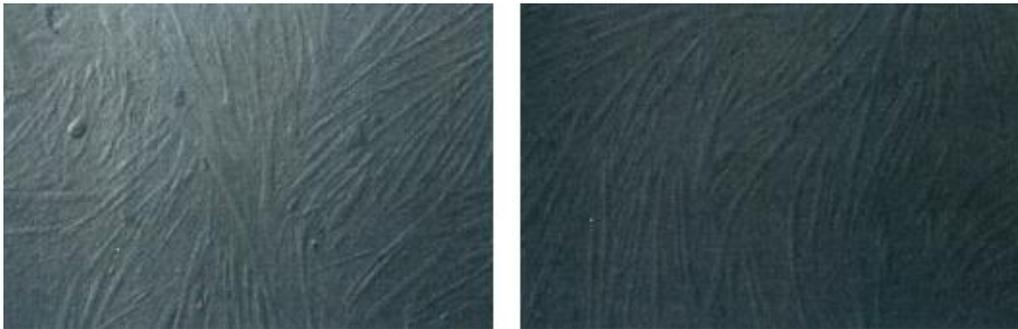
### 5.1.2 Effets de la mDCN sur des myotubes

Comme précédemment, cette étude n'est pas quantitative mais uniquement basée sur des observations au microscope. La *figure 100* présente un échantillon de myotubes non traités (témoins).

L'ajout de 30 µg de mDCN permet d'obtenir, après 24 heures d'incubation, un plus grand nombre de myotubes (Fig. 101) en comparaison du puits contrôle (Fig. 100). La mDCN semble donc favoriser la différenciation cellulaire.



**Figure 100** : Myotubes témoins.

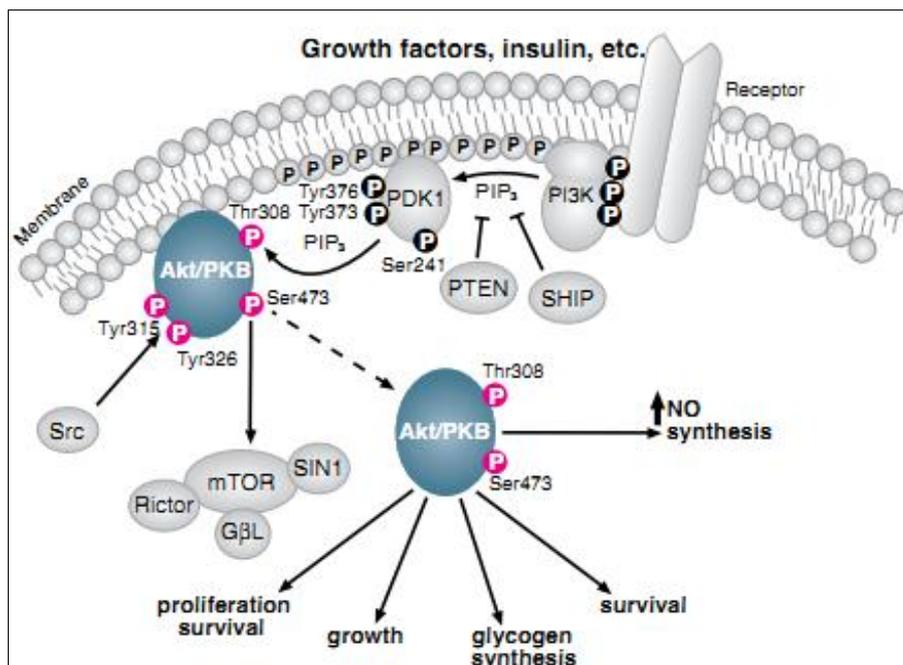


**Figure 101** : Myotubes 24 h après avoir été traité avec 30 µg de mDCN.

Bien que non quantitatives, ces simples observations sur myoblastes et myotubes traités avec de la décorine sont en parfait accord avec les résultats de la littérature avançant que la décorine favorise la prolifération des myoblastes et la différenciation en myotubes [280, 283].

## 5.2 Voie de signalisation Akt et GSK

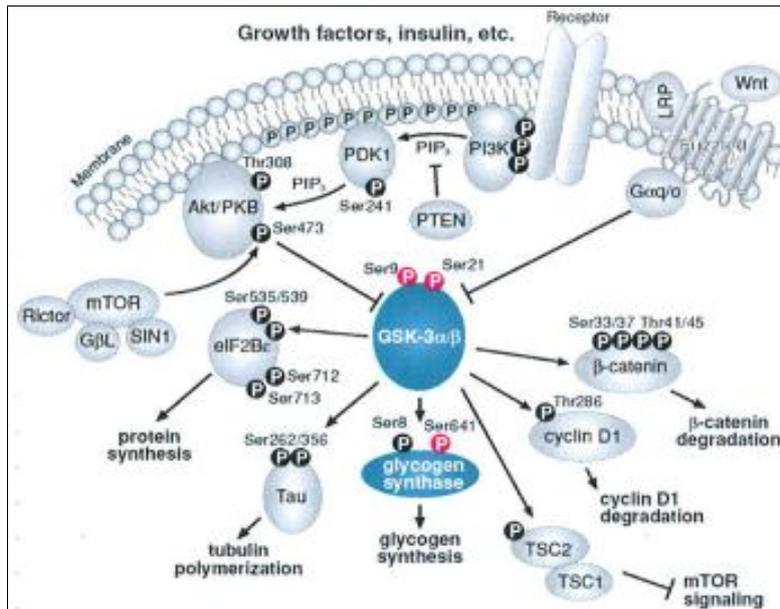
Les mécanismes qui contrôlent la croissance musculaire ne sont pas encore tous connus. D'importantes études portant sur la sérine/thréonine kinase Akt ont montré que cette protéine jouait un rôle clef dans de nombreux processus cellulaires contrôlant le métabolisme, la survie cellulaire, l'apoptose, la synthèse protéique ou encore la migration cellulaire [99]. Comme le présente la *figure 102*, Akt est activée par PI3K [350]. Cette activation d'Akt est médiée par une phosphorylation de cette sérine/thréonine kinase sur la thr308 par PDK1 [351] et par phosphorylation sur la Ser473. Akt activée phosphoryle un grand nombre de protéines cibles tels que GSK, mTO ou encore FOXO [100] et participe par la même à la régulation de nombreux processus biologiques.



**Figure 102 :** Voie de signalisation d’Akt - D’après Cell Signaling, 2010.

En 2002, Takahashi et al. ont montré que l’injection intramusculaire d’un vecteur adénoviral codant pour Akt induisait l’hypertrophie des myofibres du muscle gastrocnemius qui avait été injecté [352]. Lai et al. ont également démontré que l’induction d’Akt via un promoteur tamoxifen-inductible conduisait à une prise de poids du quadriceps injecté de l’ordre de 73% en seulement 14 jours de traitement. Les souris traitées ont un nombre de fibres plus important dans les muscles et les fibres présentent une surface moyenne plus grande que les fibres d’un muscle témoin [98]. L’activation d’Akt conduit à une augmentation de la synthèse protéique et à une diminution de la dégradation protéique par l’action de FOXO sur l’atrogin-1 [353]. Ainsi, l’activation d’Akt dans le muscle squelettique induit des processus qui conduisent à une hypertrophie.

Une autre fonction d’Akt est de réguler la synthèse de glycogène par la phosphorylation et donc l’inactivation de GSK-3 $\alpha$  et  $\beta$  [354, 355]. La glycogène synthase kinase-3 (GSK-3), initialement identifiée comme une enzyme régulant la synthèse du glycogène en réponse à l’insuline [356], est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire qui phosphoryle et inactive la glycogène synthase (*UDP-glucose-glycogen glucosyltransférase*) impliquée dans la conversion du glucose en glycogène. Comme le présente la *figure 103*, GSK-3 est un élément en aval de la voie de signalisation PI3 kinase/Akt pouvant être inactivée par phosphorylation sur les Ser21 de GSK-3 $\alpha$  et sur la Ser9 de GSK-3 $\beta$  [357].



**Figure 103 :** Voie de signalisation d' Akt et de GSK-3 - D'après Cell Signaling, 2010.

Nous avons souhaité étudier l'effet de la mDÉcorine et de la myostatine sur Akt et GSK-3 afin de mieux comprendre les résultats que nous avons obtenus avec la DÉcorine. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de Western Blot sur des cellules C2C12 différenciées (myotubes) et non différenciées (myoblastes).

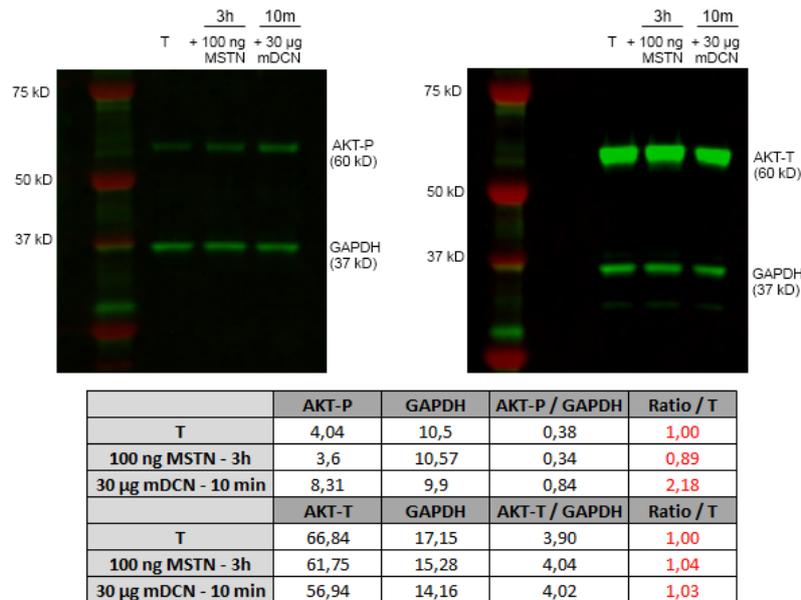
### 5.3 Effets de la mDCN et de la MSTN sur l'activation/inactivation des kinases Akt et GSK-3

Afin d'étudier les effets de la mDCN (incubation de 10 minutes et de 24 heures) et de la MSTN (incubation de 3 et 24 heures) sur Akt et GSK-3 dans les cellules C2C12 différenciées et non différenciées, la technique du Western Blot a été utilisée. Suite à la lyse cellulaire des différents échantillons, un dosage protéique est réalisé par la méthode BioRad Dc Protein Assay et 35 µg de protéines de chaque échantillon sont déposés dans un puits Invitrogen 4-12% Bis-Tris en vue d'un Western Blot destiné à étudier les différentes formes d' Akt et GSK-3. Toutes les conditions expérimentales sont décrites aux pages 175 – 176.

#### 5.3.1 Effets de la mDCN et de la MSTN sur les myoblastes

Comme on peut le remarquer sur la *figure 104* présentant le résultat des Western Blots Akt phosphorylé et Akt total, l'ajout de 30 µg de mDCN aux cellules induit une augmentation de la forme phosphorylée en position Ser473de Akt (Akt-P). Le système Odyssey nous permet, grâce à GAPDH ici utilisé pour normaliser les valeurs, de calculer les ratios Akt-P/GAPDH pour chaque échantillon et donc de comparer, condition à condition, le niveau de

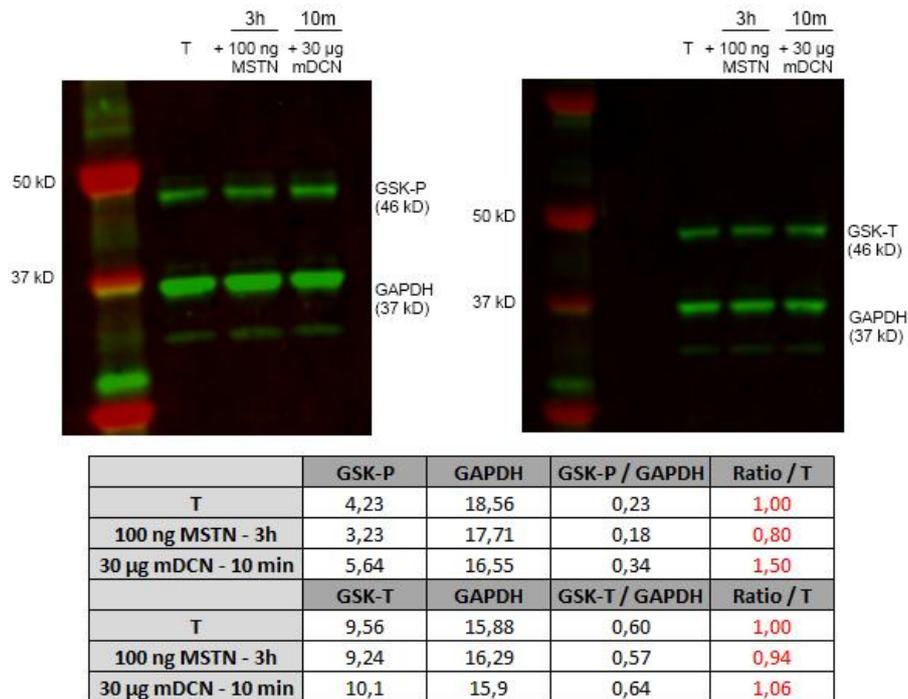
phosphorylation et donc le degré d'activation de la kinase Akt. Ainsi, l'ajout de 30 µg de mDCN permet une activation d'Akt de l'ordre de 2,18 fois supérieure en comparaison de l'échantillon contrôle (Fig. 104). Sur des myoblastes, la mDCN induit donc une phosphorylation d'Akt. Aucune différence n'est observée sur le pool total d'Akt (Akt-T) et ce quelle que soit la condition étudiée (ajout de MSTN ou de mDCN). Le traitement de 3 heures avec 100 ng de MSTN conduit à une légère diminution de l'activité de la kinase Akt (Ratio Akt-P/GAPDH = 0,89).



**Figure 104** : Western Blots Akt-P, Akt-T et tableau avec valeurs normalisées.

Comme indiqué précédemment, la kinase Akt, une fois activée, peut phosphoryler entre autres la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), une sérine/thréonine protéine kinase régulant la synthèse de glycogène. Ayant constaté que l'ajout de 30 µg mDCN pendant 10 minutes sur myoblastes conduisait à l'activation d'Akt, nous nous sommes demandés si une des conséquences était la phosphorylation et donc l'inactivation de GSK-3.

Comme le présente la *figure 105*, après normalisation, une faible augmentation de la forme GSK-3β phosphorylée (Ser9) est observée dans l'échantillon traité pendant 10 minutes avec 30 µg de mDCN (1,50x). Une légère baisse de la forme phosphorylée de GSK (0,80x) est observée dans l'échantillon traité pendant 3 heures avec 100 ng de myostatine. Aucune modification de la forme GSK totale n'est observée.



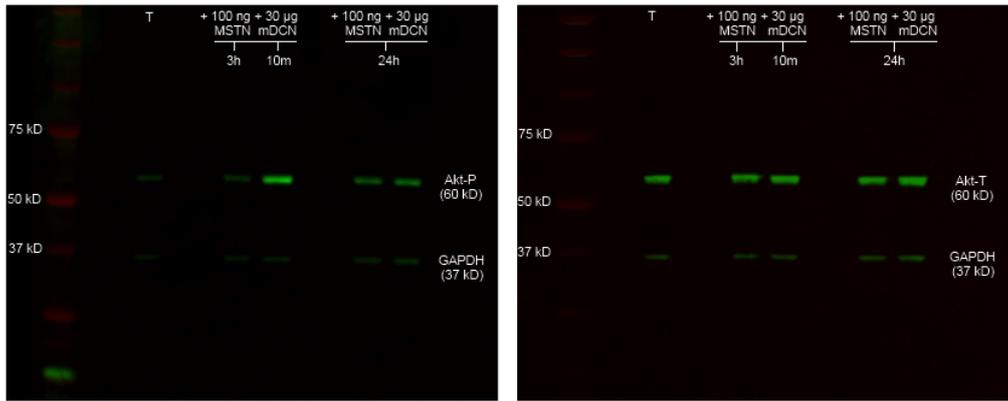
**Figure 105 :** Western Blots GSK-P, GSK-T et tableau avec valeurs normalisées.

Pour résumer, nous venons de voir :

- ✓ Sur myoblastes C2C12, un traitement de 10 minutes avec 30 µg de mDCN permet d'augmenter l'activité d'Akt de 2,18x. Akt activée peut ainsi agir sur GSK-3 dont la forme phosphorylée inactive est retrouvée en quantité plus importante dans les cellules traitées (1,50x).
- ✓ Un traitement sur myoblastes de 3 heures avec 100 ng de MSTN induit une légère inactivation d'Akt (0,89x) ainsi qu'une baisse de la forme phosphorylée de GSK (0,80x).

### 5.3.2 Effets de la mDCN et de la MSTN sur les myotubes

Suite à l'étude de l'effet de la mDCN et de la myostatine sur la voie de signalisation Akt/GSK dans des myoblastes, une analyse similaire a été menée sur des C2C12 différenciées. Ci-dessous sont montrés les résultats obtenus par Western Blot avec Akt-P, Akt-T, GSK-P et GSK-T suite à l'ajout de mDCN (10 minutes et 24 heures) et de MSTN (3 heures et 24 heures) sur des myotubes C2C12.

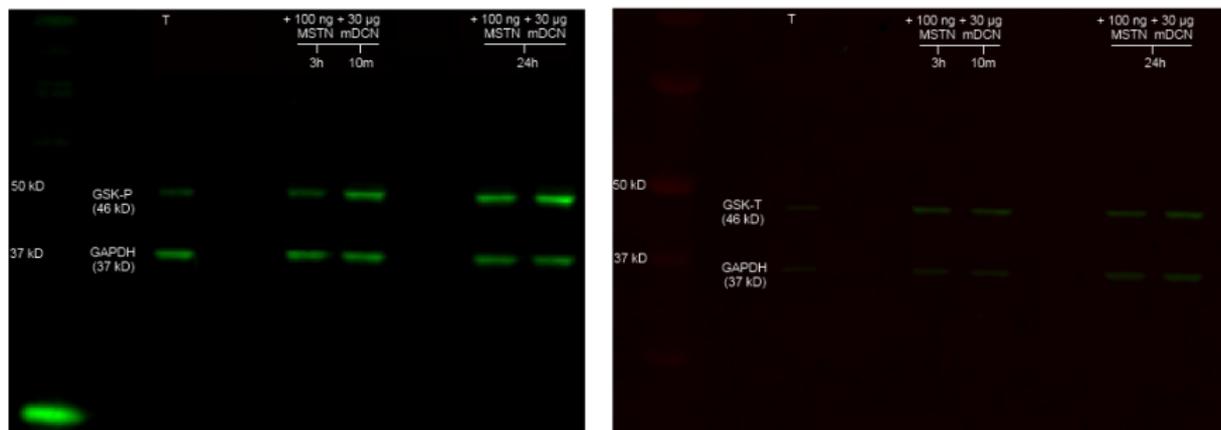


	AKT-P	GAPDH	AKT-P / GAPDH	Ratio / T
T – 3h	6,13	4	1,53	1,00
100 ng MSTN – 3h	7,93	5,18	1,53	1,00
30 µg mDCN – 10 min	33,37	5,06	6,59	4,30
100 ng MSTN – 24h	16,37	5,71	2,87	/
30 µg mDCN – 24h	19,98	6,42	3,11	/
	AKT-T	GAPDH	AKT-T / GAPDH	Ratio / T
T – 3h	11,19	3,24	3,45	1,00
100 ng MSTN – 3h	11,13	3,2	3,48	1,01
30 µg mDCN – 10 min	11,79	3,53	3,34	0,97
100 ng MSTN – 24h	10,46	3,02	3,46	/
30 µg mDCN – 24h	13,1	3,86	3,39	/

**Figure 106** : Résultats de Western Blot pour Akt-P, Akt-T et tableau avec valeurs normalisées.

On note une importante augmentation de la forme phosphorylée d’Akt (Ser473) dans l’échantillon ayant reçu 30 µg de mDCN pendant 10 minutes (Fig 106). Cette augmentation de la forme Akt phosphorylée est également visible, bien que moindre, après 24 heures d’incubation. Dans cette étude, nous n’avions pas intégré d’échantillon « Témoin » à 24 heures ; nous ne pouvons donc pas comparer directement les échantillons « Témoins », « cellules + 100 ng MSTN – 24 heures » et « cellules + 30 µg mDCN – 24 heures » et ainsi réellement conclure quant à l’effet de la mDCN après 24 heures de traitement. Une normalisation du signal Akt-P par le signal GAPDH permet d’avancer que 30 µg de mDCN permettent, après 10 minutes d’incubation, d’augmenter de 4,3 fois les niveaux d’Akt-P (Fig. 106). L’activité de la mDCN est donc plus importante sur cellules différenciées que sur myoblastes en ce qui concerne l’effet sur Akt. On peut également noter que l’effet après 24 heures de traitement semble s’estomper, ce qui suggère un effet relativement court dans le temps de la décorine. Contrairement à l’étude sur myoblastes, aucune modification de la forme phosphorylée d’Akt n’a été notée sur myotubes lors de l’ajout de 100 ng de MSTN.

De plus, la mDCN ou la MSTN n’induisent aucun changement dans la quantité totale d’Akt. Les études par Western Blot de l’effet de la myostatine et de la décorine murine sur la kinase GSK ont permis de montrer que l’ajout de 30 µg de mDCN (incubation de 10 minutes) conduisait à une augmentation de la forme inactive GSK-P de l’ordre de 2,1x (Fig. 107). Aucune modification de la forme GSK-P n’est observée suite à l’ajout de 100 ng de myostatine et la forme GSK totale ne présente aucune modification suite à l’ajout de décorine et de myostatine.



	GSK-P	GAPDH	GSK-P / GAPDH	Ratio / T
T – 3h	3,02	5,85	0,52	1,00
100 ng MSTN – 3h	3,06	5,61	0,55	1,06
30 µg mDCN – 10 min	6,01	5,66	1,06	2,06
100 ng MSTN – 24h	6,63	4,13	1,61	/
30 µg mDCN – 24h	9,8	4,7	2,09	/
	GSK-T	GAPDH	GSK-T / GAPDH	Ratio / T
T – 3h	3,08	3,41	0,90	1,00
100 ng MSTN – 3h	4,1	4,18	0,98	1,09
30 µg mDCN – 10 min	4,18	4,26	0,98	1,09
100 ng MSTN – 24h	5,11	5,37	0,95	/
30 µg mDCN – 24h	5,3	6,04	0,88	/

**Figure 107** : Résultats de Western Blot pour GSK-P, GSK-T et tableau avec valeurs normalisées.

En conclusion nous venons de voir que :

- ✓ Sur des cellules C2C12 différenciées, un traitement de 10 minutes avec 30 µg de mDCN permet de fortement activer la kinase Akt (4,3x). Akt activée peut ainsi réprimer GSK dont la forme phosphorylée inactive est ici retrouvée en excès de 2,06x comparé au témoin.
- ✓ Un traitement sur myotubes de 3 heures avec 100 ng de MSTN n'induit, contrairement à l'étude portée sur myoblastes, aucune modification de l'activation/inactivation de Akt et GSK.

Ces études par Western Blot ont permis de montrer que la décorine – soit en conséquence de la séquestration de la myostatine dans la MEC soit par effet direct sur un ou des récepteur(s) - permettait une activation de la kinase Akt (qui est plus marquée sur des cellules différenciées). Différentes études [96, 97, 98] ont montré que l'activation d'Akt conduisait aux phénomènes d'hypertrophie. L'activation d'Akt par la Décorine pourrait donc constituer l'un des mécanismes expliquant l'hypertrophie constatée lors de nos différentes études *in vivo* chez la souris *mdx* (Figs. 86, 87 et 88) et *Gamma-sarcoglycan*<sup>-/-</sup> (Tab. 7 et Fig. 92C).

En outre, l'activation d'Akt conduit à la répression de la kinase GSK que l'on retrouve donc de façon plus abondante dans sa forme phosphorylée inactive. Ainsi réprimée, GSK ne peut exercer son effet négatif sur la Glycogène Synthase, ce qui conduit à une synthèse de glycogène. La mDCN permettrait donc, par activation d'Akt et répression de la kinase GSK, d'enclencher une synthèse de glycogène.

Ces résultats obtenus par Western Blot sont en accord avec les travaux de Ilham Chelh et al [92] qui ont mis en évidence, à travers des études de transcriptomiques et de protéomiques, que dans une souris *MSTN<sup>-/-</sup>*, PI3K et Akt étaient activées et que l'activité de GSK-3 $\beta$  était réduite. Très récemment, l'équipe d'Anne Bonniou a également obtenu des résultats similaires chez une souris myostatine déficiente, à savoir un phénotype hypertrophique associé à une augmentation de l'activation de la voie de signalisation Akt/mTor conduisant à une augmentation de la synthèse protéique [105].

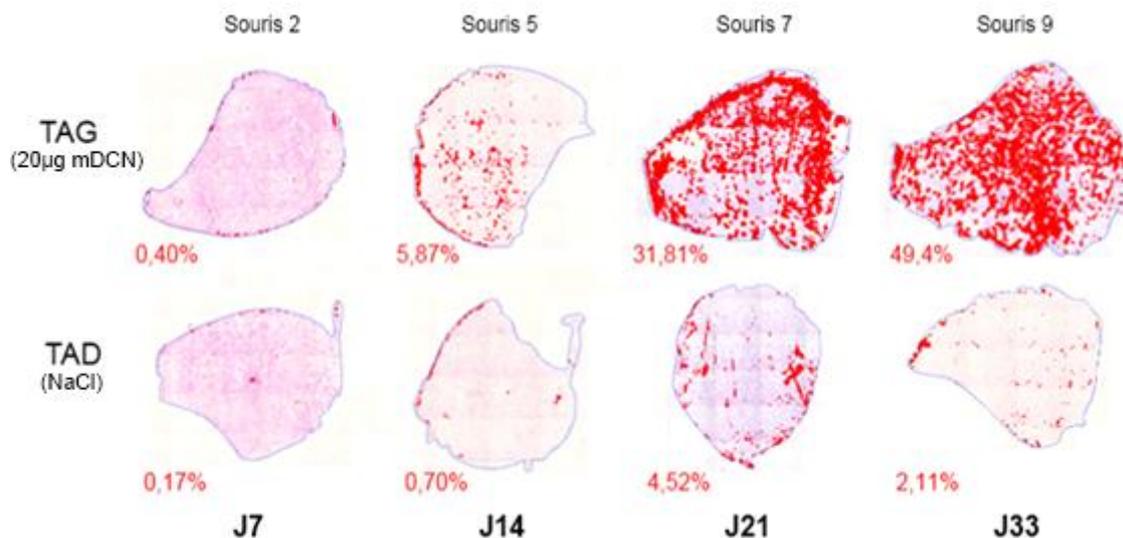
Afin de vérifier les résultats obtenus par Western Blot suggérant que la mDCN induit la synthèse de glycogène, des études de marquages Shiff et Lugol ont été entreprises.

#### 5.4 Etude cinétique de l'effet de la mDCN sur la synthèse de glycogène

Afin de vérifier si la décorine induit après injection IM chez la souris *mdx* une augmentation du taux de glycogène, nous avons réalisé des marquages Shiff. Ces derniers permettent de mettre en évidence le glycogène par l'intermédiaire d'une couleur magenta/pourpre). L'étude a été réalisée sur les coupes des muscles TAG et TAD des souris *mdx* impliquées dans l'étude de cinétique de la mDCN précédemment décrite (Tableau 4).

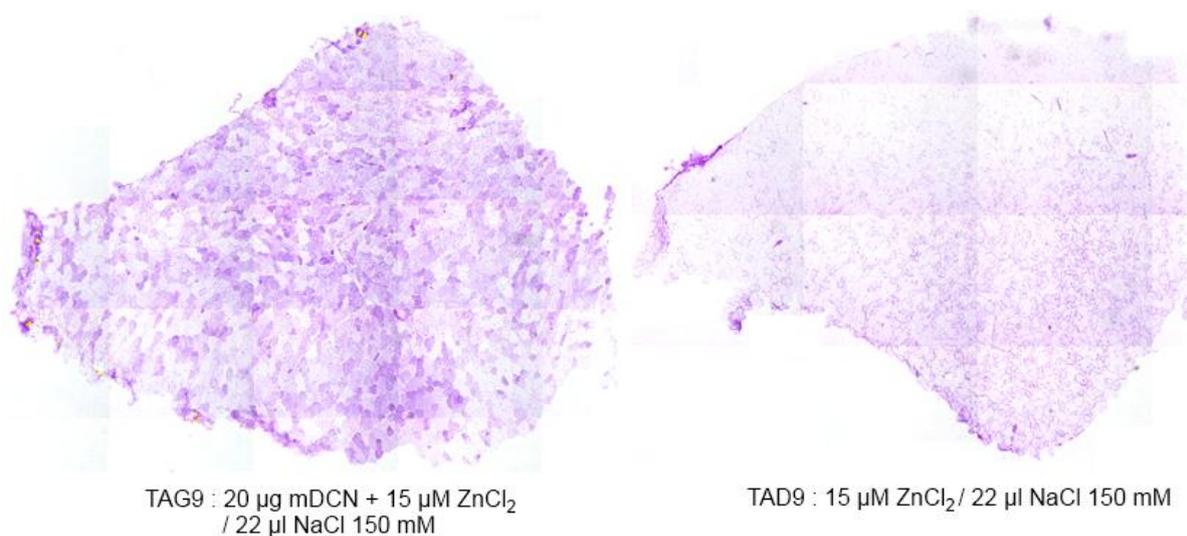
Comme le présente la *figure 108*, on ne constate que peu de « surplus » de glycogène 7 jours après injection de 20  $\mu$ g de mDCN par rapport au muscle TAD témoin. La souris 2 ne présente quant à elle aucun surplus de glycogène (Fig. 108). Lors de l'étude cinétique de l'effet de la mDécorine chez la souris *mdx*, nous avons observé que la mDCN permettait, suite à un traitement de 14 jours, une importante prise de poids du muscle injecté (Tab. 5). Nous avons également pu déterminer que le pic d'effet de la mDCN se situait approximativement 18 jours après injection intramusculaire et que, passé ce délai, les effets de la mDCN sur la croissance musculaire tendaient à s'estomper (Fig. 89). A 14 jours, seule une très faible augmentation du taux de glycogène est notée (+ 9%) dans le TAG des souris 3, 4 et 5 injecté avec de la mDCN (Figs. 108, 110). Vingt et un jours après traitement, une nette augmentation du taux de glycogène (+22%) est observée. Cette importante synthèse de glycogène continue de croître pour atteindre, 33 jours après injection de mDCN, une moyenne

de 38% de glycogène (Figs. 108, 109). A la vue des résultats des marquages, nous pouvons conclure que l'administration de mDCN en IM induit la synthèse de glycogène.



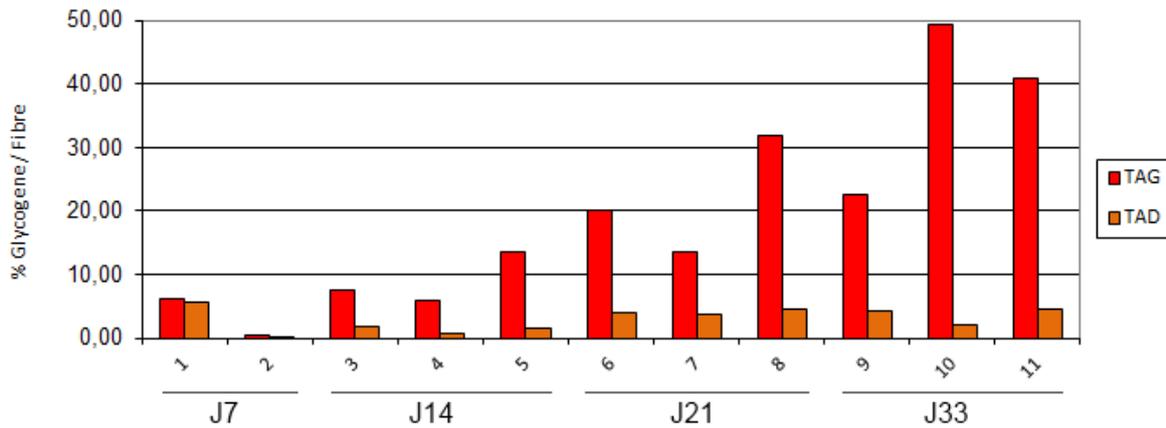
**Figure 108** : Effets de la mDCN sur la synthèse de glycogène à différents temps après injection.

Suite à la définition d'un témoin de coloration, le marquage rouge correspond aux fibres considérées comme positives pour le glycogène par le logiciel ELLIX.



**Figure 109** : Marquage Schiff du TAG9 injecté avec de la mDCN et d'un TAD9 contrôle, 33 jours après injection.

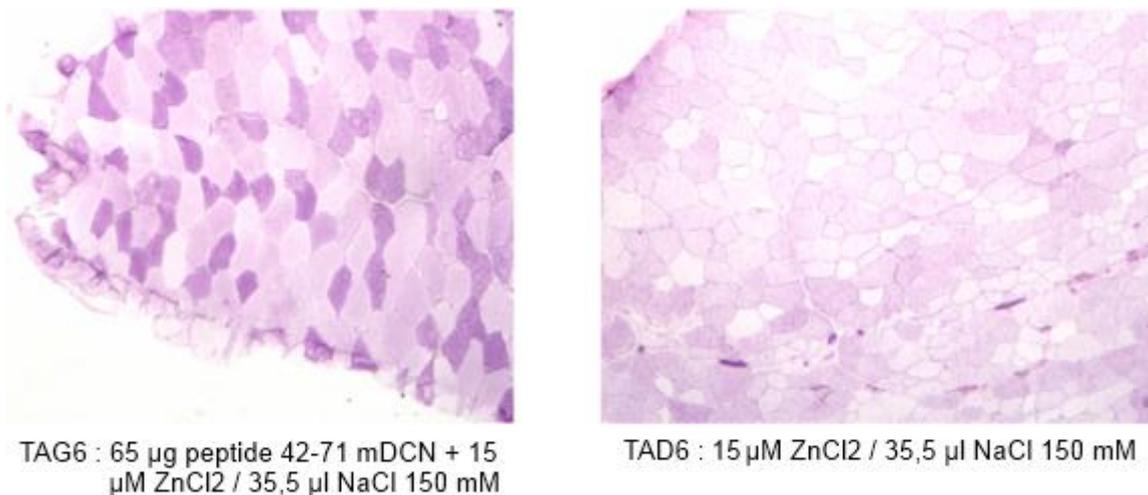
Il est intéressant de noter que l'augmentation du taux de glycogène est décalée dans le temps par rapport à la prise de poids du muscle (J18-J21).



**Figure 110 :** Suivi du taux de glycogène suite à l'injection de mDCN.

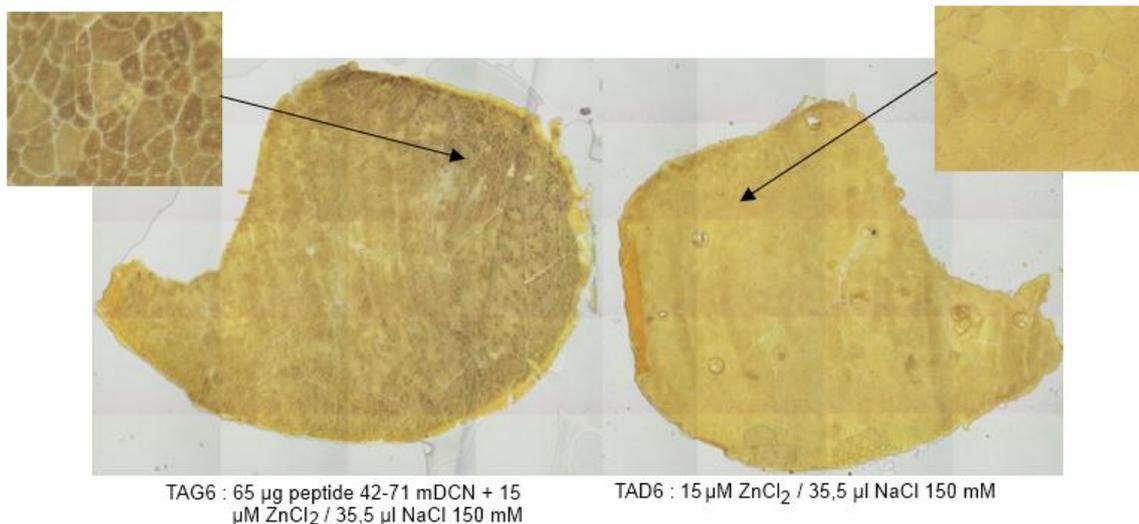
Nous avons ensuite souhaité vérifier que le peptide 42-71 mDCN avait un effet similaire sur la glycogénèse. Pour cela, des marquages Shiff ont été réalisés sur des coupes de muscles TAG injectés avec 65 µg de peptide 42-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM et TAD contrôle latéral injecté 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM. Les données de prise de poids du muscle injecté ainsi que les valeurs d'hypertrophie et d'hyperplasie associées sont données à la page 97.

Comme le présente la *figure 111*, un important marquage de glycogène (+23%) est visible dans le muscle TAG6 injecté 65 µg de peptide 42-71 mDCN en comparaison du muscle TAD6. Nous avons également obtenu des valeurs similaires avec les 2 autres souris *mdx* impliquées dans ce protocole (TAG5 = + 16% et TAG7 = + 24%). Ces marquages révèlent que le peptide 42-71 mDCN permet, tout comme la protéine recombinante décorine, une activation de la glycogénèse.



**Figure 111 :** Marquage Shiff d'un TAG injecté 65 µg de peptide 42-71 mDCN et de son TAD contrôle latéral, 20 jours après injection.

Un marquage au Lugol, permettant une coloration bleu-violet de l'amidon et brun-acajou du glycogène, a été effectué afin de confirmer les marquages Shiff précédemment réalisés. Comme le montre la *figure 112*, le TAG6 injecté avec 65 µg de peptide 42-71 mDCN + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 35,5 µl NaCl 150 mM présente un aspect plus brun et foncé que le TAD6 injecté 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 35 µl NaCl 150 mM.



**Figure 112 :** Coloration Lugol d'un TAG injecté avec le peptide 42-71 mDCN et d'un TAD contrôle.

Ces dernières observations, même si elles ne sont pas véritablement quantitatives, sont en accord avec les travaux de Chen et al. qui décrivent en 2010 et pour la première fois, la myostatine comme régulateur du métabolisme du glucose [127]. En effet, cette étude a révélé que via la régulation de différents gènes tels que Glut1, Glut4, Hk2, et IL-6, la MSTN favorisait la consommation de glucose et pouvait, en conséquence, réduire la synthèse du glycogène. En outre, il a été montré que la myostatine activait AMPK (AMP-activated protein kinase), un composant clef du maintien de l'homéostasie énergétique et activait en cela la glycolyse. La décorine, en inhibant la MSTN, permettrait ainsi de contrecarrer l'effet inhibiteur de la myostatine sur la synthèse de glycogène et conduire, comme nous l'avons vu à travers nos études de Western Blot et de marquages Shiff/Lugol, à une synthèse de glycogène.

## **6. Utilisation de la mDCN pour essayer d'améliorer la prise de greffe de cellules myogéniques**

La myostatine a été décrite comme inhibant la prolifération des myoblastes. En effet, Thomas et al. montrent en 2000 que l'administration de myostatine recombinante, ou la surexpression de ce facteur, induisait l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 de myoblastes en culture et inhibait la prolifération et la différenciation cellulaire [48]. En tenant compte de ces éléments, l'équipe de J. Tremblay a récemment montré qu'il était possible d'améliorer la transplantation

de myoblastes en bloquant l'activité de la myostatine par la follistatine, un partenaire et régulateur négatif de la MSTN [358, 359] ou par l'utilisation de récepteur Activin IIB dominant négatif [360, 361]. Ainsi, en bloquant l'activité de la myostatine, il est donc possible d'améliorer l'efficacité de prise de greffe de myoblastes.

Suite à ces travaux et compte tenu de nos résultats, il nous semblait intéressant de vérifier si la décorine pouvait favoriser la prise de greffes de cellules myogéniques. Afin de nous permettre de suivre aisément la survie cellulaire et la prise de greffe après injection, nous avons utilisé des cellules générées par David Israël et collègues (Généthon) [362]. En réalisant une trypsinisation sélective et des marquages desmises spécifiques des cellules précurseurs, des MPCs (*myogenic progenitor cells*) ont pu être sélectionnées. Ces cellules musculaires précurseurs ont ensuite été doublement infectées avec un vecteur lentiviral mSeAP. Les cellules issues de ce protocole ont été dénommées MYO-B6.

L'utilisation de la mSeAP comme gène rapporteur présente deux avantages, à savoir que c'est un système très sensible car il est possible de détecter de faibles doses de protéine et que la mSeAP peut être dosée dans le sang puisqu'elle est sécrétée. Enfin, il est également possible de faire des marquages sur coupes puisqu'il reste environ 10% de mSeAP dans les cellules. Ainsi, il est possible à un instant t, via un prélèvement sanguin et un dosage mSeAP, de suivre l'évolution de la greffe, le niveau de mSeAP circulant étant corrélé au nombre de cellules transplantées.

## 6.1 Cellules précurseurs MYO-B6

Afin de réaliser une étude *in vivo* permettant de vérifier si la mDCN permet une meilleure prise de greffe chez la souris *mdx*, des cellules MYO-B6 ont été mises en culture.

Un jour avant l'ensemencement, 5 ml de gélatine sont déposés dans une boîte T75 qui recevra les cellules MYO-B6. Les cellules MYO-B6 ont été cultivées dans un milieu DMEM 50%, Ham F12 50%, Gentamicine (10 µg/ml) Ultrosor SF à 2% final et SVF à 20% final, filtré sur filtre de cellulose 0,22µm et conservé à 4°C au maximum 1 mois à l'abri de la lumière.

## 6.2 Etudes *In Vivo* et rôle de la mDCN dans la prise de greffe

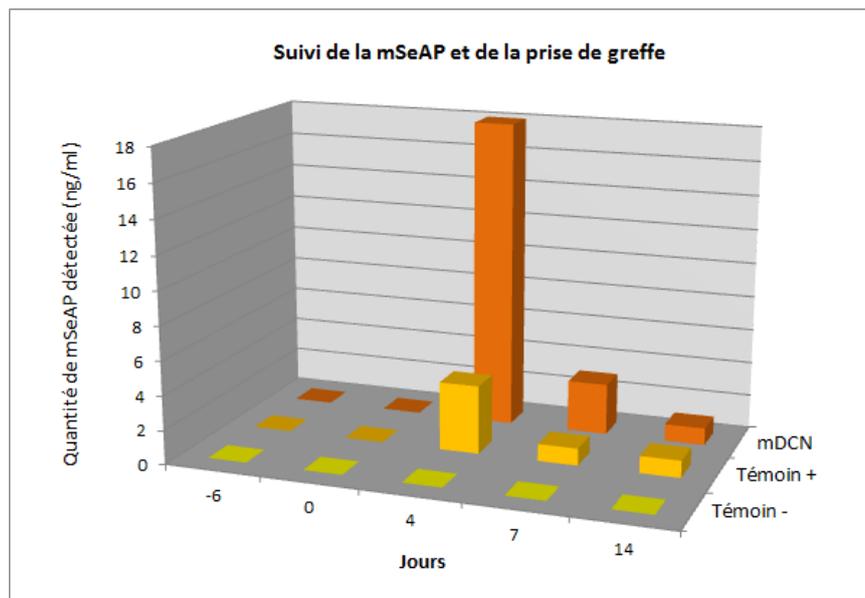
Afin de voir si la mDCN permet une meilleure prise de greffe chez la souris *mdx*, une étude *in vivo* regroupant 8 souris âgées de 7-8 semaines a été réalisée, les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Souris	Groupe	Age à l'injection	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Prélèvement de sang
1	Témoin	7-8 semaines	TAG : 25 µl NaCl 150 mM	IM (TAG)	35 µl	J-6 J0 J4 J7 J14
2	Injectées-myoblastes		TAG : Cellules MyoB6 / 25 µl NaCl 150 mM			
3						
4						
5	Pré-injectées mDCN		TAG : Pré-injection 25 µg mDCN 25 µL NaCl 150 mM (J-7)			
6			Injection cellules MyoB5 / 25 µl NaCl 150 mM (J0)			
7						
8						

**Tableau 16 :** Protocole *in vivo* permettant d'évaluer l'effet de la mDÉcorine sur la prise de greffe.

- A J-6, les souris 5, 6, 7 et 8 reçoivent 25 µg mDCN / 25 µl NaCl 150 mM en intramusculaire dans le TAG.
- A J0, toutes les souris *mdx* impliquées dans ce protocole à l'exception de la souris 1 témoin, reçoivent 200 000 cellules MyoB6 / 25 µl NaCl 150 mM.
- Des prélèvements sanguins sont réalisés sur toutes les souris impliquées à J-6, J0, J4, J7 et J14.

Les prélèvements sanguins ont été centrifugés à 8000 RPM pendant 3 minutes à 4°C. Le dosage mSeAP a été réalisé sur le surnageant comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes à la page 170. Le niveau de mSeAP circulant étant corrélé aux nombre de cellules transplantées, il nous est ainsi possible de comparer l'efficacité de prise de greffe entre les différents groupes de souris *mdx* impliqués dans l'étude et donc de conclure quant au rôle de la mDCN dans le processus de transplantation.



**Figure 113 :** Suivi des niveaux de mSeAP dans le sang.

Comme le présente la *figure 113*, aucune mSeAP circulante n'est détectable à J-6 et J0. Quatre jours après l'injection des myoblastes MYO-B6, on note une quantité de mSeAP de 4 ng/ml pour le groupe de souris 2, 3 et 4 « Témoin mSeAP ». Cette quantité de mSeAP correspond au seuil « basal » de cellules MYO-B6 effectivement transplantées (ou au moins vivantes) chez des souris *mdx* 4 jours après injection. Les souris 5, 6, 7 et 8 ayant reçu 25 µg de mDCN à J-6 présentent quant à elles, au jour 4 après injection des cellules, une quantité de mSeAP de l'ordre de 18 ng/ml, soit une efficacité de survie 4,5 fois supérieure à celle du groupe « Témoin mSeAP ». Cependant, nous avons noté qu'à J14, les niveaux de mSeAP sont similaires dans le groupe témoin et dans le groupe DCN.

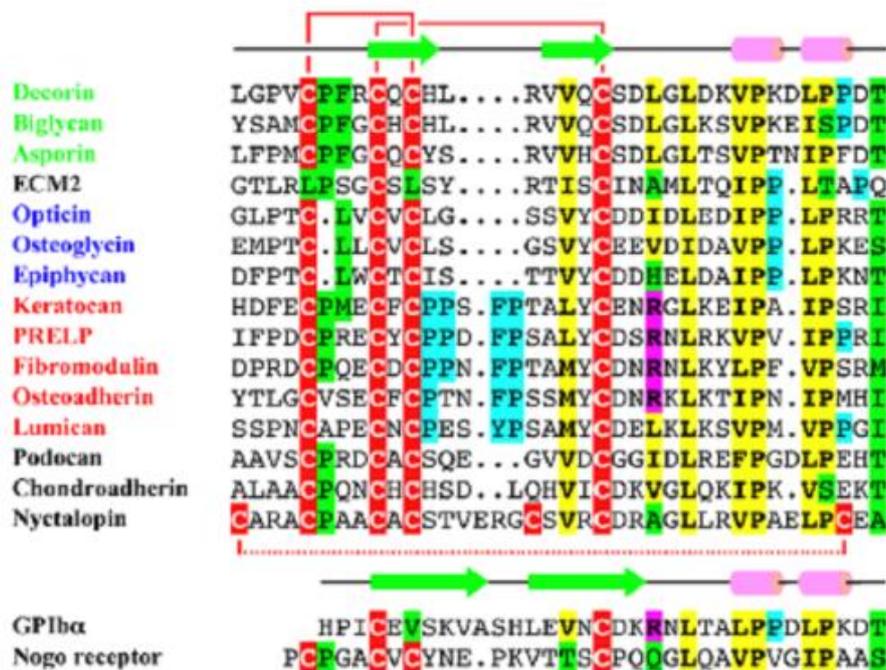
Cette expérience n'est bien évidemment pas suffisante pour pouvoir conclure quant au réel potentiel de la décorine pour augmenter la prise de greffe de cellules myogéniques. Hélas cette étude préliminaire n'a pas pu être confirmée faute de stock de cellules MYO-B6. Cependant, de par ses effets positifs sur la prolifération et la différenciation cellulaire et de par sa capacité d'inhibition de l'activité de la myostatine, nous pensons que la DCN est un candidat potentiellement intéressant pour améliorer l'efficacité de transplantation de cellules MPCs (*myogenic progenitor cells*).

## **7. La famille des SLRP : Fibromoduline, biglycan et autres membres**

Comme décrit aux pages 39 - 41, les SLRPs (*small leucine-rich proteoglycans*) sont une famille de protéines présente dans la matrice extracellulaire (MEC), divisée en 5 classes distinctes regroupant 17 protéoglycanes. Ces PGs ont en commun : 1) la présence de séquences riches en leucines (LRR), 2) des résidus cystéines présents dans les domaines N- et C-terminaux, 3) la présence d'au moins une chaîne latérale de glycosaminoglycane (GAG) [181, 182].

Nous avons précédemment observé que la décorine, SLRP de classe I pouvait réprimer l'activité de la myostatine en présence de zinc et qu'un peptide de 41 acides aminés de la partie N-terminale gardait intacte cette capacité de répression. En 2009, Miura et al. ont démontré par résonance plasmonique de surface que la fibromoduline, la fibronectine et la laminine liaient la myostatine en présence de zinc [327] - contrairement au biglycan qui est un SLRP de la classe I. La fibromoduline présente la constante d'association à la myostatine la plus élevée parmi les composés testés.

Comme indiqué dans la figure ci-dessous, le cluster de 4 cystéines dans la partie N-terminale est très bien conservé parmi les SLRPs. Ce point a beaucoup retenu notre attention puisque nous avons pu observer que les cystéines jouaient un rôle important dans l'interaction décorine - myostatine. Il est cependant à noter que l'espacement entre les cystéines n'est pas le même entre les 5 classes de SLRPs (Fig. 114).



**Figure 114** : Alignement de séquences de la partie N-terminale des SLRPs - D'après McEwan et al. 2006.

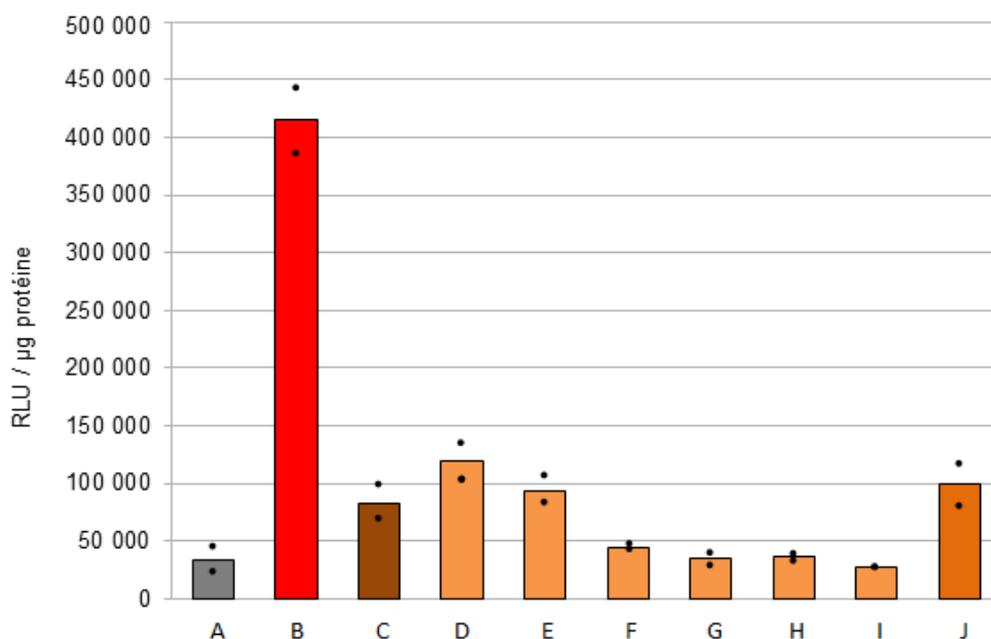
Au vu de ces résultats, nous avons souhaité vérifier si un peptide de la partie N-terminale de la fibromoduline était suffisant pour lier la myostatine.

## 7.1 La Fibromoduline

### 7.1.1 Etude *in vitro* de l'activité anti-myostatine des peptides 69-101 Fmod biotine et 69-101 Fmod muté biotine

Pour notre étude, nous avons sélectionné la séquence 69-101 de la fibromoduline murine : PPPEPRDCPQECDCPPNFPTAMYCDNRNLKYLP-CONH<sub>2</sub>. Comme pour les expériences avec la décorine, nous avons utilisé la cassette pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc pour vérifier si le peptide Fmod 69-101 était capable d'inhiber l'action de la myostatine. Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées avec la décorine.

Comme le présente la *figure 115*, une répression de l'activité de la myostatine est observée dès 1 µg (par duplicat) de peptide 69-101 Fmod. Plus la quantité de peptide Fibromoduline est importante, plus la répression de l'activité de la myostatine est conséquente. A 50 µg de peptide 69-101 Fmod, le seuil basal est atteint. Il est à noter que l'efficacité d'inhibition de ce peptide Fibromoduline semble plus importante que celle du peptide 31-71 mDCN. En effet, sur cette étude, l'efficacité de répression de l'activité de la myostatine avec 5 µg de peptide 69-101 Fmod est proche de l'efficacité de répression observée avec 50 µg de peptide 31-71 mDCN.

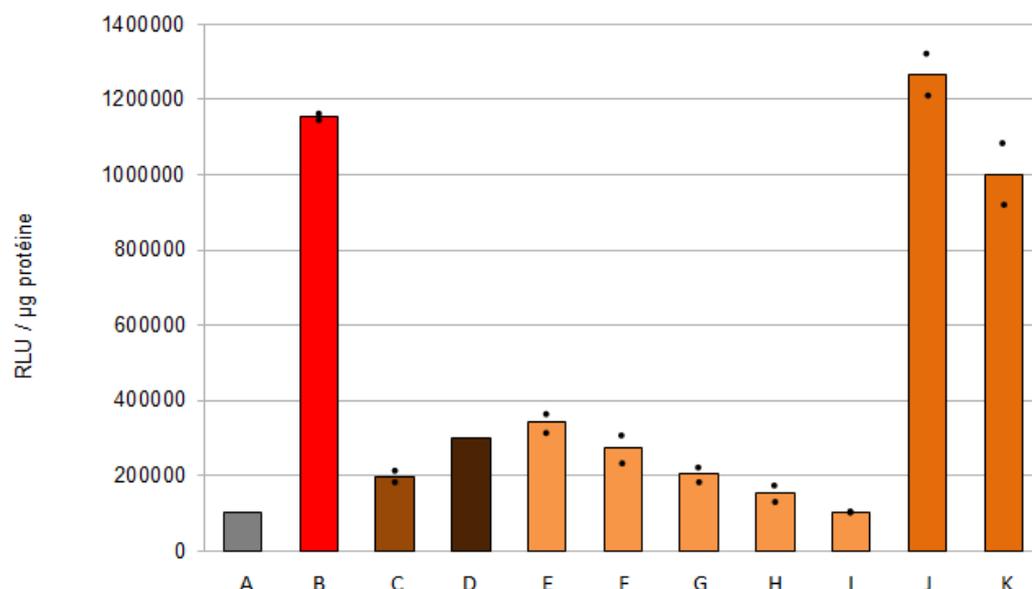


pCAGA-Luc Transfection	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5 nM Myostatine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mDCN 31-71 (µg / puits)	-	-	25	-	-	-	-	-	-	-
Fmod 69-101 (µg / puits)	-	-	-	0,5	2,5	12,5	25	37,5	50	50
15 µM ZnCl <sub>2</sub>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

**Figure 115 :** Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 69-101 Fmod dans des cellules HEK293T.

L'échantillon A correspond aux cellules transfectées par la cassette. La condition B représente la référence positive, le 100% d'activité des 2,5 nM de MSTN ajoutés. L'échantillon C est utilisé comme contrôle positif. Un, 5, 25, 50, 75 et 100 µg de peptide 69-101 Fmod par duplicat sont ajoutés aux 2,5 nM de myostatine en présence de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> final (D-E-F-G-H-I). Ces échantillons permettent de quantifier l'efficacité d'inhibition de l'activité de la myostatine par une gamme croissante de peptide 69-101 Fmod. La comparaison des puits I et J permet d'apprécier le rôle du zinc dans l'interaction peptide 69-101 Fmod – myostatine.

Pour les tests ELISA, nous avons utilisé les peptides Biotine-69-101 Fmod et Biotine-69-101 Fmod muté (Biotine-PPPEPRDCPQEADAPPNFPTAMYADNRNLKYLPCONH<sub>2</sub>). Avant d'effectuer les tests ELISA, nous avons souhaité évaluer ces 2 peptides lors d'essais pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc. Comme le montre la *figure 116*, le peptide Fmod avec la biotine reste actif alors que le peptide biotinylé Fmod muté est dénué d'activité anti-myostatine.



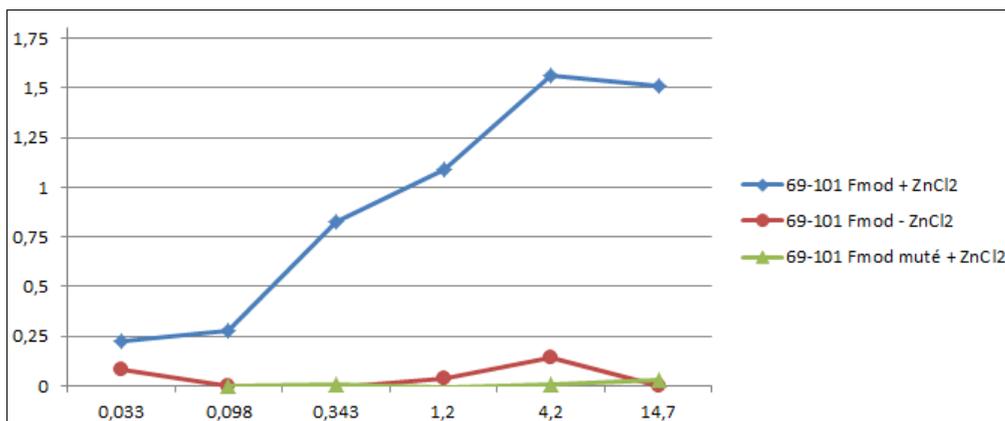
pCAGA-Luc Transfection	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5 nM Myostatine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mDCN 31-71 (µg / puits)	-	-	37,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Fmod 69-101 (µg / puits)	-	-	-	37,5	-	-	-	-	-	-	-
Fmod 69-101 Biotine (µg / puits)	-	-	-	-	2,5	12,5	25	37,5	50	-	-
Fmod 69-101 Biotine muté(µg / puits)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,5	50
15 µM ZnCl <sub>2</sub>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

**Figure 116 :** Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 69-101 Fmod biotine et 69-101 Fmod biotine muté dans des cellules HEK293T.

L'échantillon A correspond aux cellules transfectées par la cassette. La condition B représente la référence positive, le 100% d'activité des 2,5 nM de MSTN ajoutés. Les échantillons C et D sont utilisés comme contrôles positifs. Cinq, 25, 50, 75 et 100 µg de peptide 69-101 Fmod biotine sont ajoutés, par duplicat, aux 2,5 nM de myostatine en présence de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> final (E-F-G-H-I). Ces échantillons permettent de quantifier l'efficacité d'inhibition de l'activité de la myostatine par une gamme croissante de peptide 69-101 Fmod biotine. Les puits J et K reçoivent respectivement 75 et 100 µg de peptide 69-101 Fmod muté biotine et 2,5 nM de myostatine en présence de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> final. Ces puits permettent d'apprécier l'importance des cystéines du domaine N-terminal dans l'interaction peptide 69-101 Fmod – myostatine.

### 7.1.2 Etude de l'interaction entre la myostatine et les peptides fibromoduline

Afin de vérifier si le peptide 69-101 Fmod interagit directement avec la myostatine mature, la technique de l'Elisa a été utilisée. Les conditions expérimentales utilisées sont similaires à celles utilisées avec les peptides décorine. Une gamme de peptide 69-101 Fmod (33 ng ; 98 ng ; 343 ng ; 1,2 µg ; 4,2 µg ; 14,7 µg) en présence ou en absence de ZnCl<sub>2</sub> a été mise en contact avec 300 ng de MSTN. Le peptide 69-101 Fmod muté a également été étudié avec une gamme identique (uniquement avec la condition contenant du ZnCl<sub>2</sub>).



**Figure 117** : Etude de l'interaction entre les peptides 69-101 Fmod, 69-101 Fmod muté et la MSTN.

Comme le présente la *figure 117*, plus la quantité de peptide 69-101 Fmod mise en contact avec les 300 ng de myostatine est importante, plus l'absorbance est grande. Cette dernière témoigne d'une interaction directe entre le peptide 69-101 Fmod et la myostatine. On constate que le plateau est obtenu avec 4,2 µg de peptide 69-101. En absence de ZnCl<sub>2</sub>, aucune interaction entre la myostatine et le peptide Fmod 69-101 n'a été observée, ce qui permet de conclure que le zinc est indispensable pour observer une interaction Fmod/MSTN.

Lorsque cet essai a été réalisé avec le peptide muté, nous n'avons pas pu constater de liaison à la myostatine, ce qui indique que les cystéines jouent un rôle crucial pour que la liaison peptide 69-101 Fmod - la myostatine puisse s'opérer.

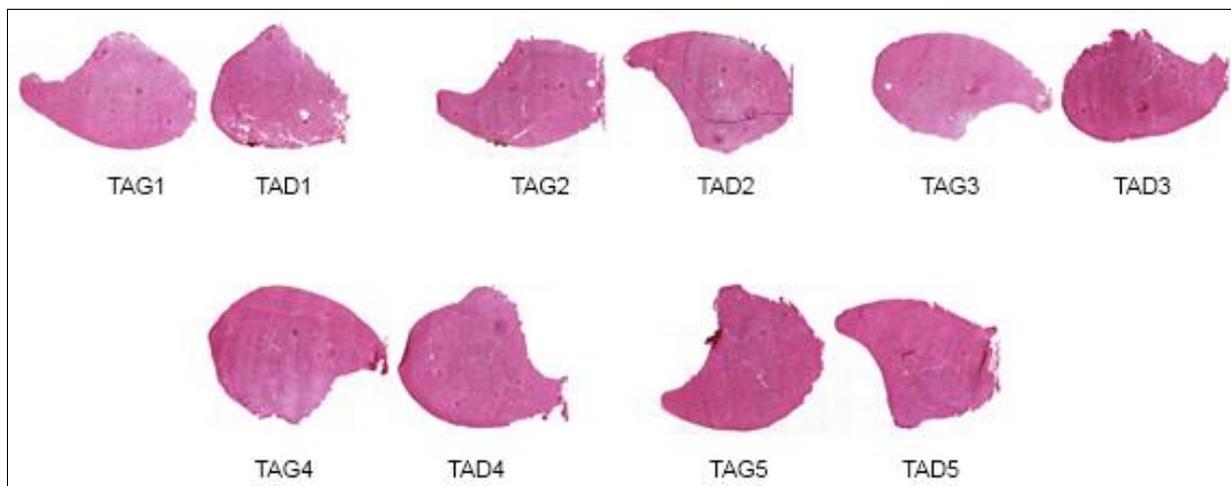
### 7.1.3 Etudes *In Vivo* des effets du peptide 69-101 Fmod sur la croissance musculaire de souris *mdx*

Afin de vérifier l'effet du peptide 69-101 Fmod sur la croissance musculaire de souris *mdx*, une étude regroupant 5 souris *mdx* de 7 semaines a été réalisée (Tab. 17). Les 5 souris impliquées dans l'étude ont été injectées à J0 avec 50 µg de peptide 69-101 Fmod + 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM dans le TAG, le TAD contrôle recevant 15 µM ZnCl<sub>2</sub> / 25 µl NaCl 150 mM. Après 20 jours de traitement, les 5 souris ont été sacrifiées, les muscles TAG et TAD prélevés, pesés et congelés. Des marquages HPS et laminine ont ensuite été faits.

N°animal	Age à l'injection	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Date	Prélèvements
1	7 semaines	TAG : 50 µg Pep Fmod + 15 µM ZnCl <sub>2</sub> TAD : 25 µl µg NaCl + 15 µM ZnCl <sub>2</sub>	IM	25 µl	J20	TAG, TAD
2						
3						
4						
5						

**Tableau 17** : Protocole *in vivo* pour évaluer l'effet du peptide 69-101 Fmod chez la souris *mdx*.

Comme le présente la *figure 118*, les marquages HPS ne révèlent aucune amélioration du phénotype dystrophique. L'augmentation de la masse du muscle injecté constatée, d'une moyenne de + 14,2% ( $p \leq 0,02$ ), lors de la pesée des muscles TAG et TAD après 20 jours de traitement, est difficilement visible sur les coupes HPS.



**Figure 118** : Coupes HPS des muscles TAG (injecté peptide Fmod) et TAD Témoins de souris *mdx*.

L'analyse des coupes marquées laminine a montré que l'injection de 50  $\mu\text{g}$  de peptide 69-101 Fmod conduit soit à une hypertrophie soit à un phénomène d'hyperplasie (Tab. 18). Il faut cependant noter que lors de cette étude, les résultats obtenus avec la souris 3 sont étonnants. En effet, une augmentation de la masse du muscle est observée, mais lors de l'analyse des coupes, aucune hyperplasie/hypertrophie n'a été notée. Parmi les explications possibles, on peut mentionner un problème de pesée ou alors un muscle mal prélevé. Il est à noter aussi que les souris 1, 2 et 4 présentent une importante hypertrophie pouvant atteindre 29% alors que les fibres du TAG de la souris 5 ne sont que peu hypertrophiées.

Souris	Produit injecté	Masse musculaire (J0 -> J21)	Poids TA (Témoin -> Injecté)	Hyperplasie (Témoin -> Injecté)	Hypertrophie (Témoin -> Injecté)
Souris 1	TAG : 50 $\mu\text{g}$ pFmod + 15 $\mu\text{M}$ ZnCl <sub>2</sub> TAD : 25 $\mu\text{l}$ $\mu\text{g}$ NaCl + 15 $\mu\text{M}$ ZnCl <sub>2</sub>	23,8 g -> 27,55 g + 15,76 %	71,6 mg -> 75,4 mg + 5,31 %	4133 -> 4188 + 1,33 %	1505,59 $\mu\text{m}^2$ -> 1934,96 $\mu\text{m}^2$ + 28,52 %
Souris 2		23,64 g -> 27,3 g + 15,48 %	62,2 mg -> 74,6 mg + 19,94 %	5116 -> 5163 + 0,92 %	1043,83 $\mu\text{m}^2$ -> 1221,11 $\mu\text{m}^2$ + 16,98 %
Souris 3		24,88 g -> 27,2 g + 13,34 %	61,9 mg -> 65,2 mg + 5,33 %	4544 -> 4368 - 3,87 %	1527,31 $\mu\text{m}^2$ -> 1541,7 $\mu\text{m}^2$ + 0,94 %
Souris 4		25,65 g -> 28,72 g + 11,97 %	65,8 mg -> 73,9 mg + 12,31 %	4175 -> 4263 + 2,11 %	1539,69 $\mu\text{m}^2$ -> 1859,99 $\mu\text{m}^2$ + 20,80 %
Souris 5		23,94 g -> 27,2 g + 13,62 %	54,4 mg -> 66,5 mg + 22,24 %	3736 -> 4731 + 26,63 %	1793 $\mu\text{m}^2$ -> 1853,5 $\mu\text{m}^2$ + 3,37 %

**Tableau 18** : Effets de l'injection intramusculaire de 50  $\mu\text{g}$  de peptide Fmod sur les muscles.

Les résultats *in vivo* semblent indiquer que le peptide fibromoduline 69-101 est bien capable d'augmenter la masse musculaire. Cependant, ces résultats demandent à être confirmés par au moins une expérience *in vivo* supplémentaire.

En conclusion, les études réalisées nous permettent d'avancer que le peptide Fmod 69-101 est capable de lier la myostatine mature de manière directe (test ELISA). Le peptide a également démontré une activité anti-myostatine dans l'essai pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc et les résultats *in vivo* obtenus sur des souris *mdx* suggèrent que le peptide est capable d'induire une augmentation de la masse musculaire. Ces résultats sont en accord avec les observations faites par Miura et al. avec la protéine fibromoduline entière [327].

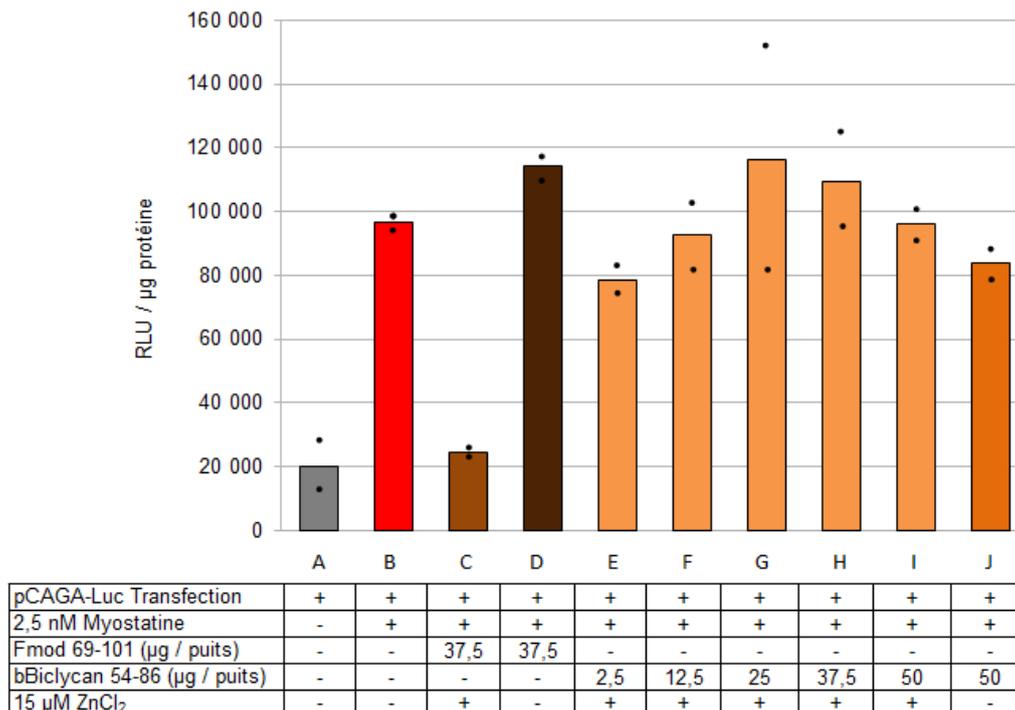
## 7.2 Biglycan, Lumican et mPRELP

Suite aux résultats obtenus avec le peptide fibromoduline, nous avons décidé de vérifier si des peptides issus des 3 SLRPs suivants : Biglycan, Lumican et PRELP, possédaient une activité anti-myostatine. Pour cela, le test de transfection avec la cassette pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc a été réalisé dans des conditions expérimentales similaires à celles utilisées précédemment. Il est important de noter que les résultats obtenus avec ces peptides sont très préliminaires car l'expérience de transfection n'a été réalisée qu'une seule fois pour chacun des composés.

- Biglycan

Le biglycan est un SLRP issu de la classe I. Ce SLRP interagit préférentiellement avec le collagène de type II, mais également avec le collagène de type 1 [363], et il entre en compétition avec la décorine au niveau des sites de liaison au collagène. Le biglycan, qui partage 59% d'identité avec la décorine, est impliqué dans la minéralisation des os et il a été décrit comme liant le TGF- $\beta$  et le TGF- $\alpha$  [293] et régulant la bioactivité du facteur de croissance BMP-4 [364]. Il a été récemment décrit que le biglycan présentait un site de liaison au Zn<sup>2+</sup> se trouvant dans le domaine N-terminal du core protéique [230]. Il est à noter que le biglycan diffère cependant de la DCN en terme de localisation, la décorine étant associée aux fibres de collagène dans les matrices et le biglycan étant associé aux matrices de surface et péricellulaires des fibres [250].

Nous avons choisi d'évaluer le peptide biglycan 54-86 bovin ayant la séquence suivante : DSLPPTYSAMCPFGCHCHLRVVQCSDLGLKAVP-CONH<sub>2</sub>. A noter que nous avons délibérément choisi d'utiliser la séquence bovine plutôt que la version murine car cette dernière ne présente que 3 cystéines et non 4.



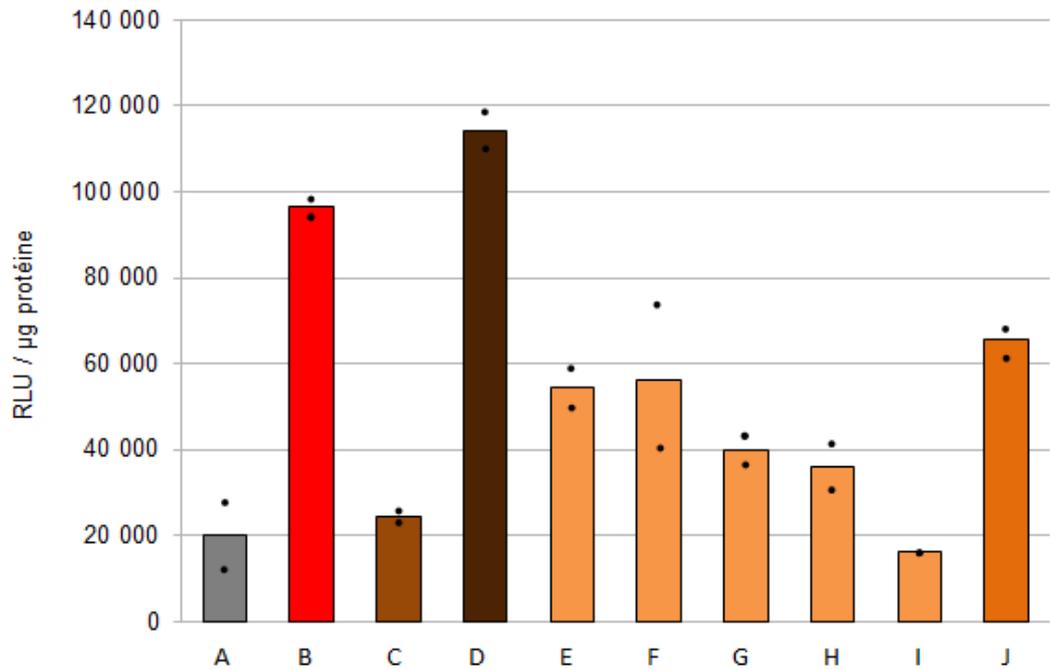
**Figure 119 :** Evaluation du potentiel d’inhibition de l’activité de la myostatine par le peptide 54-86 bBiglycan dans des cellules HEK293T.

L’échantillon « T » correspond aux cellules transfectées par le plasmide. La condition « T + MSTN » correspond aux puits dans lesquels 2,5 nM de myostatine ont été ajoutés. L’échantillon « T + MSTN + 75 µg peptide Fmod + ZnCl<sub>2</sub> » est notre contrôle positif. Cinq, 25, 50, 75 et 100 µg de peptide 54-86 bBiglycan ont été ajoutés aux 2,5 nM de myostatine en présence de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> final. La condition « T + MSTN + 100µg de peptide bBiglycan sans ZnCl<sub>2</sub> » permet d’étudier l’importance du Zinc dans l’interaction peptide 54-84 bBiglycan – myostatine.

Comme le montre la *figure 119*, aucune inhibition de l’activité de la myostatine n’est observée après ajout de peptide 54-86 bBiglycan. Ce résultat est en accord avec Miura et al. qui ont montré dans leur test de liaison *in vitro* que la protéine biglycan ne lie pas la myostatine [318].

- mLumican

Le lumican appartient à la Classe II des SLRPs. Cette protéine régule l’organisation des fibrilles de collagènes, la transparence de la cornée et elle joue également un rôle dans la migration des cellules épithéliales ainsi que dans la réparation tissulaire. La suppression du gène codant pour le lumican chez la souris crée une opacification de la cornée et un relâchement de la peau, pouvant s’expliquer par une répartition et un assemblage non homogènes du collagène [365]. A ce jour, aucun rôle impliquant le lumican dans la régulation de la myostatine n’a été démontré. Nous avons choisi d’évaluer le peptide mLumican 30-62 ayant la séquence suivante : YGQISPNC**CAPE**CN**C**PHSYPTAMY**C**DDLKLK**SVP**-CONH<sub>2</sub>.



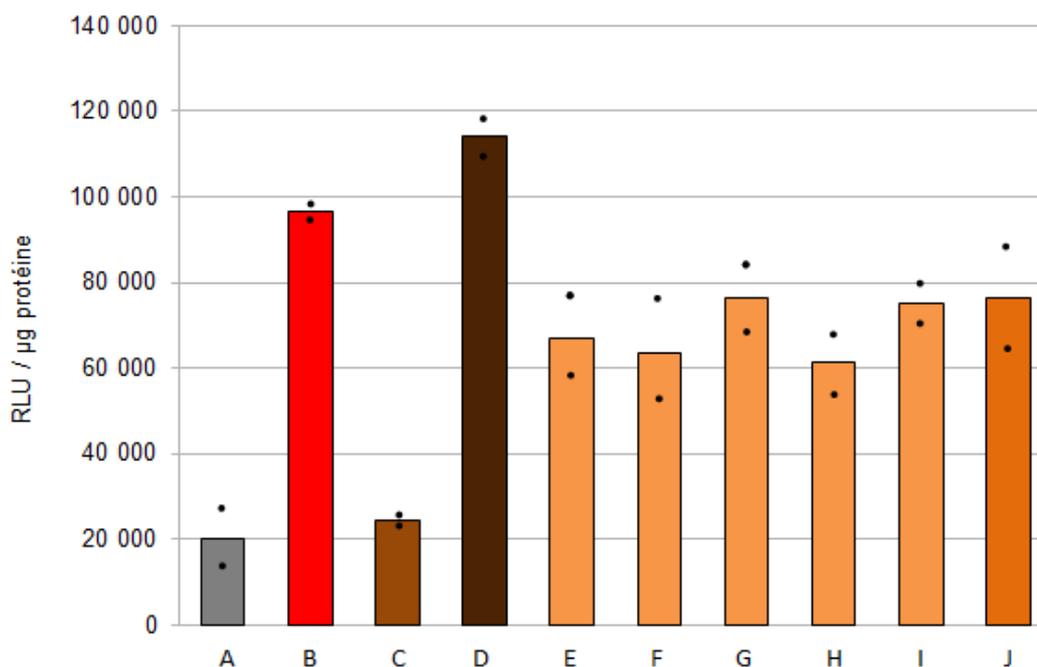
pCAGA-Luc Transfection	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5 nM Myostatine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fmod 69-101 (µg / puits)	-	-	37,5	37,5	-	-	-	-	-	-
mLumican 30-62 (µg / puits)	-	-	-	-	2,5	12,5	25	37,5	50	50
15 µM ZnCl <sub>2</sub>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-

**Figure 120 :** Inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 30-62 mLumican dans des cellules HEK293T.

Les résultats obtenus avec le peptide 30-62 mLumican montrent que ce dernier est capable de réprimer l'activité des 2,5 nM de myostatine dans le test p(CAGA)-Luc (Fig. 120). Avec 100 µg de peptide mLumican, les niveaux de luciférase sont équivalents à ceux des cellules transfectées avec le plasmide sans ajout de MSTN. Ces résultats suggèrent donc que le lumican, ainsi que le peptide 30-62, sont capables de lier la myostatine en présence de zinc.

- mPRELP

La prolargine est un protéoglycane de la classe II des SLRPs codée par le gène PRELP (*proline arginine end leucine rich proteoglycan*) que l'on retrouve principalement dans le tissu conjonctif de la matrice extracellulaire [366]. Cette protéine a été décrite comme liant le collagène de type I aux membranes basales et le collagène de type II au cartilage. En outre, la prolargine serait impliquée dans la pathologie d'Hutchinson-Gilford, communément appelée Progeria, syndrome d'un manque dans la liaison du collagène aux membranes basales et au cartilage [367]. A ce jour, aucun lien direct avec la myostatine n'a été démontré concernant ce SLRP. Nous avons choisi d'évaluer le peptide mPRELP 62-94 ayant la séquence suivante : PPSVFPD**C**PRE**C**Y**C**PPDFPSALY**C**D**S**RNLRRVP.



pCAGA-Luc Transfection	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,5 nM Myostatine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fmod 69-101 (µg / puits)	-	-	37,5	37,5	-	-	-	-	-	-
mPRELP 62-94 (µg / puits)	-	-	-	-	2,5	12,5	25	37,5	50	50
15 µM ZnCl <sub>2</sub>	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-

**Figure 121** : Test d'inhibition de l'activité de la myostatine par le peptide 62-94 mPRELP dans des cellules HEK293T.

Les résultats obtenus avec le peptide 62-94 mPRELP se distinguent de ceux obtenus jusqu'alors. En effet, il semblerait que ce peptide ait une action anti-myostatine qui n'est pas dose-dépendante et peut-être même zinc indépendante (Fig. 121). On peut également penser que la réponse maximale (plateau) est déjà atteinte avec 5 µg de peptide.

Comme mentionné plus haut, les résultats obtenus avec ces 3 derniers peptides demandent à être confirmés en réalisant des expériences supplémentaires.

### 7.3 Alignements de séquences et études des structures

Afin d'essayer de comprendre pourquoi tel peptide peut lier et réprimer l'activité de la myostatine et pourquoi un autre peptide ne dispose pas de cette capacité, des études d'alignements et de structures secondaires ont été menées.

#### 7.3.1 Comparaison des séquences

Nous avons aligné les séquences des peptides étudiés à l'aide du logiciel Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen).

	1	10	20	30	40	Liaison à la MSTN
<b>31-71 mDCN</b>	DEASGIIPYDPDNPLISM	CPYR	CHLRVVQ	CSDLGLDKVPP		+
<b>31-71 mDCN muté</b>	DEASGIIPYDPDNPLISM	CPYRAQAHLRVVQASDLGLDKVPP				-
<b>42-71 mDCN</b>	-----DNPLISM	CPYR	CHLRVVQ	CSDLGLDKVPP		+
<b>31-61 mDCN</b>	DEASGIIPYDPDNPLISM	CPYR	CHLRVVQ	-----		-
<b>31-71 hDCN</b>	IGPEVPDDDRDFEPSLGPV	CPFR	CHLRVVQ	CSDLGLDKVPP		+
	1	10	20	30	40	Liaison à la MSTN
<b>69-101 Fmod</b>	-----PPPEPRD	PQE	DCP	PNFPTAMY	C DNRNLKYLPP	+
<b>69-101 Fmod muté</b>	-----PPPEPRD	PQEADAP	PNFPTAMYADNRNLKYLPP			-
<b>50-86 bBiglycan</b>	-----DSLPPPTYSAM	CPFG	CHLRVVQ	CSDLGLKAVPP		-
<b>30-62 mLumican</b>	-----YGQISPN	CAPE	CNP	HSYPTAMY	CDDLKLKSVPP	+
<b>62-94 mPRELP</b>	-----PPSVFPD	PRE	CYP	PDFPSALY	CDSRNLRRVPP	+(faible)

**Tableau 19 :** Alignement des séquences des différents peptides.

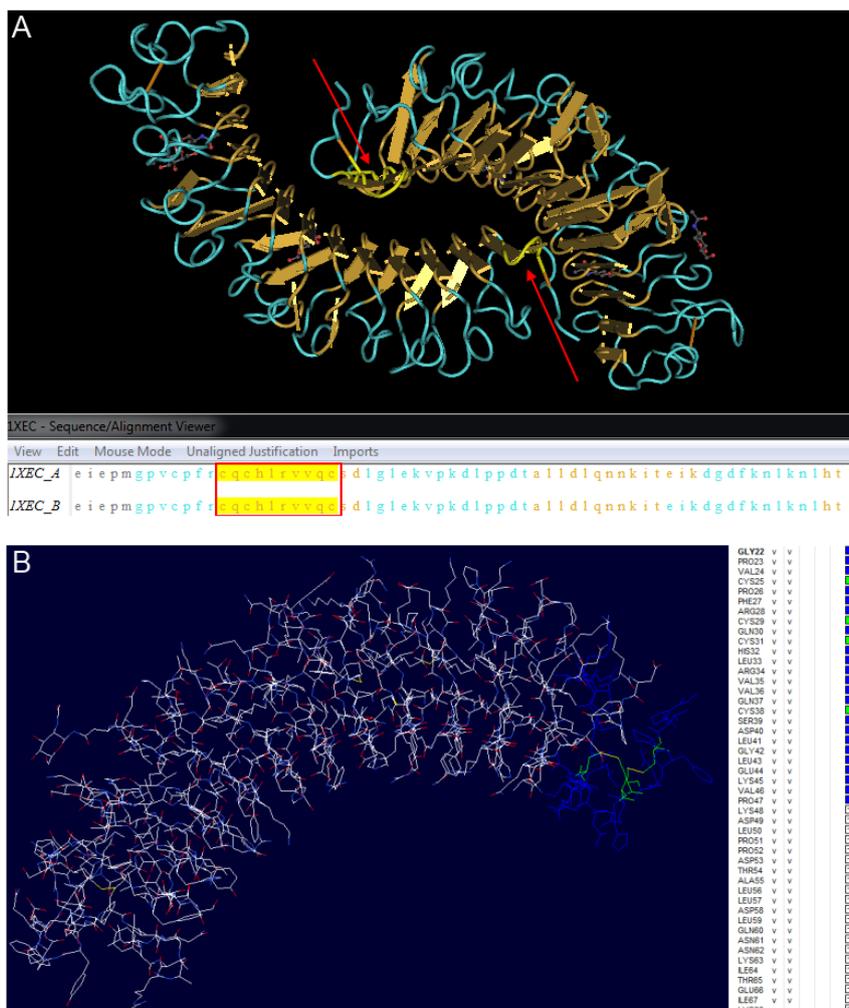
Les cystéines de chaque peptide sont indiquées en rouge sur fond jaune. La capacité de lier ou non la myostatine est indiquée dans la colonne de droite (respectivement mentionnées par un + et un -).

Comme on peut le remarquer dans le *tableau 19*, l'homologie entre le biglycan et la décorine est assez importante alors que l'homologie avec des peptides tels que le lumican et la fibromoduline est plutôt faible. Il n'y a donc pas de relation « évidente » entre les peptides liant la myostatine et les peptides n'ayant pas cette propriété. Il est donc très probable que la structure adoptée par les peptides soit le facteur clé pour les interactions avec la myostatine.

### 7.3.2 Structures secondaires et tridimensionnelles

Comme nous l'avons décrit aux pages 45 - 46, la décorine adopte une structure concave. Cette surface pourrait être impliquée dans la formation de dimères compatible pour des liaisons et interactions à divers ligands [227, 228].

A l'aide des travaux de Scott et al. qui ont associé chaque domaine de la décorine à la séquence protéique [226], nous avons pu situer le peptide 31-71 mDCN dans la partie N-terminale de la décorine et, en partie, sur le 1<sup>er</sup> domaine LRR de la protéine. La structure de la décorine bovine étant disponible, nous avons créé la *figure 122* pour localiser le cluster de cystéines en utilisant les logiciels Cn3D 4.1 et Swiss-Pdb Viewer 4.02.



**Figure 122** : Structure secondaire de la décorine bovine et localisation du domaine contenant le cluster de cystéines - Cn3D 4.1 (A) et Swiss-Pdb Viewer 4.02 (B).

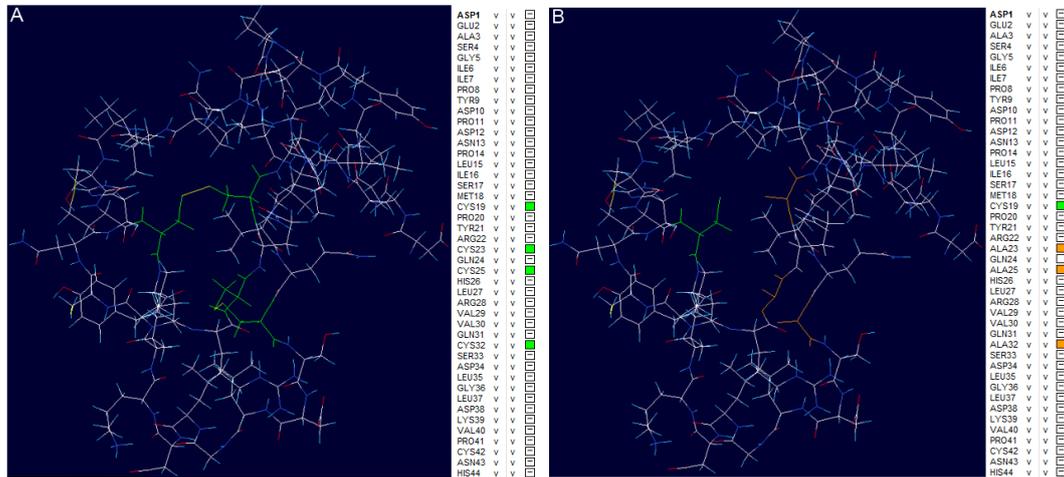
A : Le cluster de cystéines est indiqué en jaune et signalé par une flèche rouge. B : Les 41 acides aminés du peptide 31-71 mDCN sont représentés en bleu. Les 4 cystéines sont quant à elles marquées en vert.

**Note** : A ce jour, seule la forme bovine de la décorine a été cristallisée. L'alignement des séquences - du domaine d'intérêt - de la décorine murine et bovine a mis en évidence des différences de séquences pouvant induire des variations de structures entre les 2 versions de la décorine (Tab. 20).

	1	10	20	30	40
mDécorine	1	DEASGIIPYD	-----	PDNPIISMCPYRCQCHLRVVQCS	DLGLDKVE
bDécorine	1	DEASGI	GFEEHFPEVPEIE	EMGPFVCF	RCQCHLRVVQCS

**Tableau 20** : Alignement des séquences de la décorine murine et de la décorine bovine.

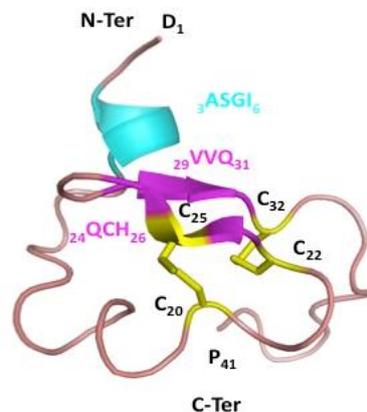
Nous avons fait appel au service I-TASSER, un serveur internet accessible gratuitement de l'Université du Michigan, qui permet de prédire la structure de protéines. Les modèles construits sont basés sur des alignements LOMETS et un score de justesse est fourni pour chacun des modèles [368, 369, 370]. Ce service nous a permis de prédire la structure de différents peptides étudiés.



**Figure 123** : Prédiction de structure des peptides 31-71 mDCN (A) et 31-71 mDCN muté (B).

A : Les 4 cystéines du peptide 31-71 mDCN sont représentées en vert. Les 2 ponts disulfures sont notés en jaune. B : La cystéine du peptide 31-71 mDCN est indiquée en vert et les 3 cystéines mutées en alanines sont marquées en orange.

Comme nous pouvons l'observer sur les *figures 123* et *124*, le peptide 31-71 mDCN peut former deux ponts disulfures impliquant les 4 cystéines. Le peptide 31-71 mDCN muté dispose quant à lui de seulement une cystéine, les trois dernières étant mutées en alanine. Pour ce peptide muté, les ponts disulfures ne peuvent se former et la structure est fortement modifiée.

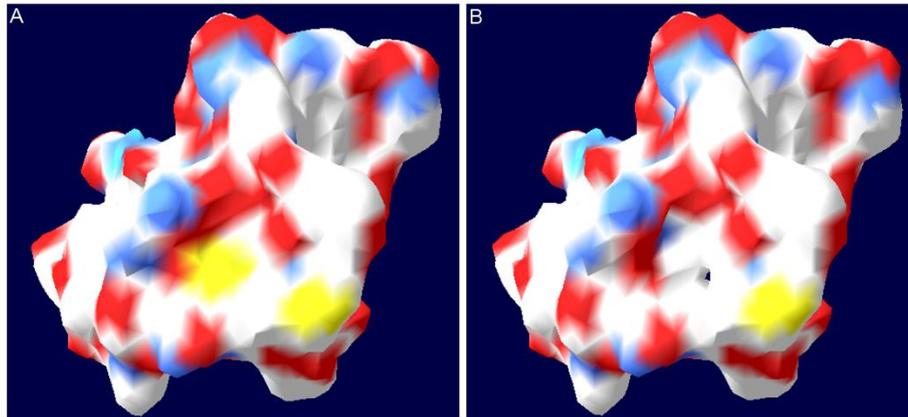


**1-DEASGIIPYDPDNPLISMCPYRCQCHLRVVQCSDLGLDKVP-41**

**Figure 124** : Modèle théorique du peptide 31-71 mDCN - Réalisé avec Pymol.

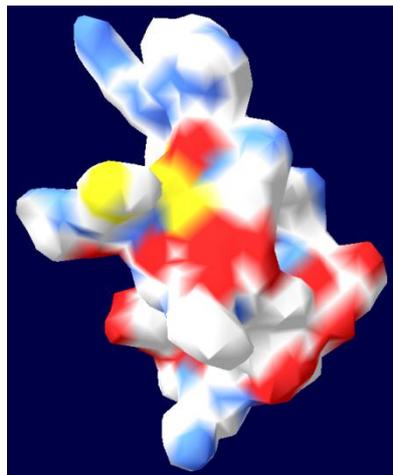
Sur la figure sont représentées 2 feuillets en magenta, un tour d'hélice en cyan ainsi que les 2 ponts dissulfures. Les cysteines sont notées en jaune.

A partir du modèle du peptide 31-71 mDCN, nous avons également généré la structure tridimensionnelle. Comme le présente la *figure 125*, les ponts disulfures sont du même côté du peptide. Il semblerait donc que les 4 cystéines soient assez proches dans l'espace ; ce qui suggère qu'une liaison avec une molécule de zinc soit possible.



**Figure 125** : Structures tridimensionnelles des peptides 31-71 mDCN (A) et 31-71 mDCN muté (B).

Les régions riches en acides sont notées en rouges. Les régions basiques sont précisées en bleu et les régions neutres en blanc. Les cystéines sont marquées en jaune.



**Figure 126** : Structure tridimensionnelle du peptide 54-86 bBiglycan.

Les régions riches en acides sont notées en rouges. Les régions basiques sont précisées en bleu et les régions neutres en blanc. Les cystéines sont marquées en jaune.

La structure tridimensionnelle du modèle prédit pour le peptide 54-86 bBiglycan a également été générée. Outre plusieurs différences de séquences d'acides aminés et le fait que la décorine, capable d'inhiber l'activité de la myostatine, et le biglycan, présenté comme incapable de se lier à la MSTN, n'aient pas l'exacte même expression spatiotemporelle, on peut noter une structure tridimensionnelle du peptide 54-86 bBiglycan (Fig. 126) assez différente de celle du peptide 31-71 mDCN (Fig. 125A). La position des cystéines, notamment, n'est pas la même.

Curieusement, Hook et al. décrivent que le peptide décorine long de 41 acides aminés peut lier 2 ions  $Zn^{2+}$ . Actuellement, nous ne voyons pas comment se ferait la liaison de la 2<sup>ème</sup> molécule de zinc. Il est aussi à noter que, d'après la structure tridimensionnelle obtenue, la zone du cluster de cystéines serait très exposée, ce qui indiquerait que cette partie pourrait aisément interagir avec d'autres protéines. Toutes ces données et prédictions ne permettent actuellement pas de répondre aux questions que nous nous posons, à savoir :

- Comment, et avec quels acides aminés, le peptide interagit-il avec une 2<sup>ème</sup> molécule de zinc ?
- Quelles modifications structurales entraînent la liaison du zinc ?
- Avec quel domaine de la myostatine interagit le peptide ?

Enfin, comment expliquer les différences de propriétés entre les peptides décorine, fibromoduline, biglycan, lumincan et PRELP ? Il nous semble aujourd'hui évident que pour pouvoir répondre en partie à ces points, la structure de tous ces peptides en présence et en absence de zinc sera à déterminer.

## 8. Approches de transfert de gènes

En marge de nos études d'approches anti-myostatine par protéine recombinante (mDCN) et peptides (Peptides 31-71 mDCN, 69-101 mFibromoduline), nous avons également développé des stratégies anti-MSTN basées sur le transfert non viral et viral de gènes.

### 8.1 Construction de la cassette pGG2 - MSTN tronquée

La myostatine, lors de sa maturation, subit plusieurs clivages protéolytiques. La myostatine mature comprend les acides aminés 266-375 de la protéine. Ces 110 acides aminés, après dimérisation, présentent la capacité de se lier au récepteur activine IIB. En 2007, Siriatt. et al. ont développé une version antagoniste de la myostatine [145] (Fig. 23). En effet, en éliminant une partie du C-terminus de la MSTN - et plus précisément la séquence 351-375 - une protéine tronquée de la myostatine répondant au nom de Mstn-ant, capable de se lier au récepteur activine sans induire l'activation des Smads, a été obtenue. Les études conduites

avec cet antagoniste ont montré une augmentation significative de la régénération musculaire chez des souris âgées chez qui les muscles avaient été dégradés.

L'utilisation *in vivo* de cette version tronquée de la myostatine conduit à l'activation de cellules satellites, à l'augmentation du niveau protéique de Pax7 et MyoD et à une migration accrue des myoblastes et des macrophages résultant ainsi à une augmentation de la régénération musculaire suite à l'injection de notexine chez la souris âgée. En outre, cette antagoniste Mstn-ant1 a démontré un haut degré d'efficacité. En effet, de faibles doses durant la période critique de régénération suite à la blessure ont été suffisantes pour restaurer la myogenèse.

Suite à ces études réalisées par injection de la protéine tronquée, nous nous sommes demandés si une utilisation basée sur du transfert de gènes ne permettrait pas d'obtenir des résultats plus intéressants chez la souris *mdx*. Nous avons donc généré un plasmide codant pour Mstn-ant1. Toutes les étapes de construction de la cassette pGG2-MSTN tronquée sont données aux pages 179-184 (Matériels et Méthodes).

Afin de vérifier l'effet de cet antagoniste, nous avons réalisé une étude *in vivo* chez la souris *mdx* (Tab. 21). Sept souris *mdx* mâles de 7 semaines ont été réparties dans 3 groupes distincts : la souris 1 est un témoin ne recevant aucune injection ; les souris 2 à 4 ont été injectées avec 25 µg de plasmide pGG2-MSTN tronquée / 35 µl de NaCl 150 mM en intramusculaire dans le TAG ; les souris 5 à 7 ont reçu la même dose que les souris 2-4 mais l'injection a été suivie par une électroporation. Dix-neuf jours après traitement, les 7 souris *mdx* impliquées dans cette étude ont été sacrifiées.

Souris	Age à l'injection	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Sacrifice
1	7 semaines	/	/	/	J19
2		TAG : 25 µg MSTN T - pGG2 / NaCl 150 mM	IM (Injection rapide - 2 secondes)	35 µl	
3					
4		TAG : 25 µg MSTN T - pGG2 / NaCl 150 mM	IM + Electroporation		
5					
6					
7					

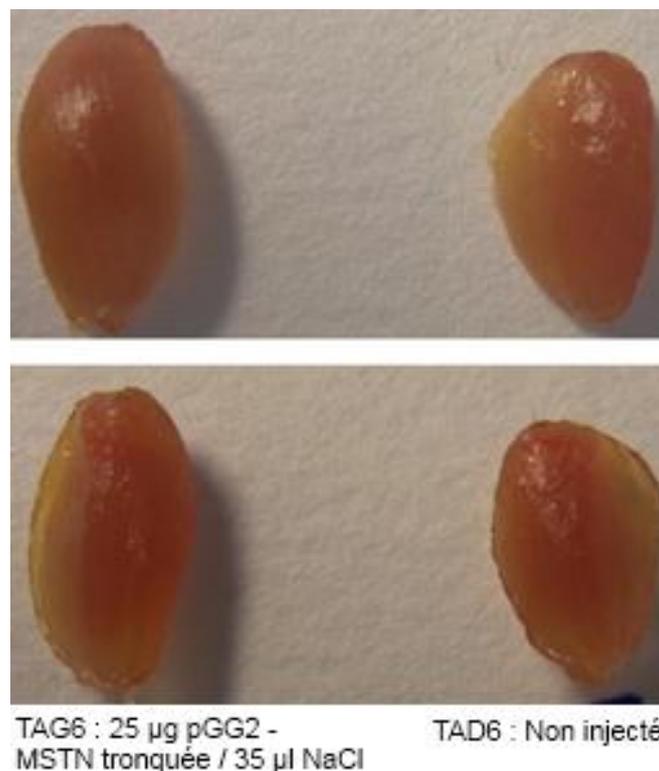
**Tableau 21** : Etude de l'efficacité de la construction pGG2-MSTN tronquée chez *mdx* après injection IM.

Suite aux 19 jours de traitement, une augmentation de la masse corporelle chez les souris *mdx* injectées 25 µg de pGG2-MSTN tronquée est notée. Les souris 2 à 4 et 5 à 7 présentent une augmentation de la masse corporelle de l'ordre de 15% ( $p \leq 0,01$ ) alors que la souris 1 témoin a vu sa masse corporelle augmenter de 9% en 19 jours (Tab. 22).

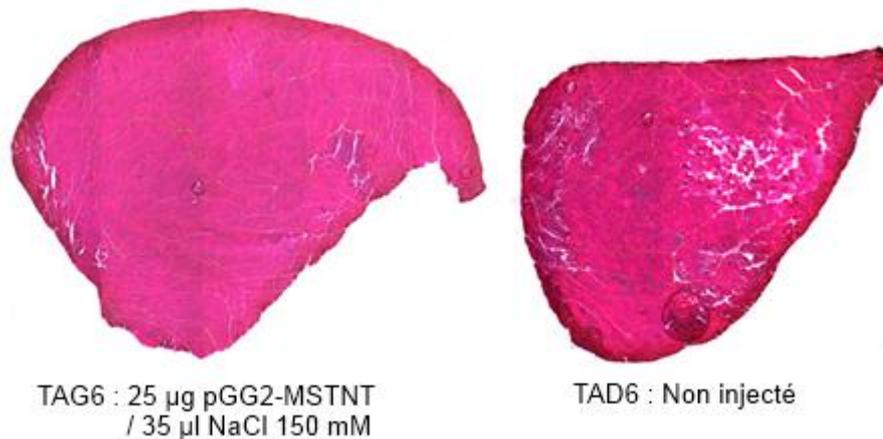
Souris	Groupe	Augmentation Masse totale (%)	Moyenne	Prise de poids du muscle Témoin -> Injecté	Moyenne	Hyperplasie (Témoin -> Injecté)	Moyenne	Hypertrophie (Témoin -> Injecté)	Moyenne
Souris 1	Témoin	28,48 g -> 30,97 g + 8,74%	9,20	72,4 mg <-> 71,1 mg -1,80%	-1,80	3523 <-> 3573 +1,42%	1,42	1984,7 $\mu\text{m}^2$ <-> 2020 $\mu\text{m}^2$ +1,78%	1,78
Souris 2	Injecté pGG2 - MSTN Tronquée (IM)	28,58 g -> 32,15 g +12,49%	15,03	65,4 mg -> 77,4 mg +18,35%	20,73	3706 <-> 3576 -3,51%	23,45	1463,9 $\mu\text{m}^2$ <-> 1711,1 $\mu\text{m}^2$ +16,89%	14,48
Souris 3		26,1 g -> 29,91 g +14,6%		59,1 mg -> 68 mg +15,06%		3011 -> 2718 -9,73%		1635,6 $\mu\text{m}^2$ <-> 1835,1 $\mu\text{m}^2$ +12,20%	
Souris 4		25,78 g -> 30,42 g + 18%		53,35 mg -> 68,7 mg +28,77%		1888 -> 3466 +83,58%		2325,9 $\mu\text{m}^2$ <-> 2659,9 $\mu\text{m}^2$ +14,36%	
Souris 5	Injecté pGG2 - MSTN Tronquée (IM + Electroporation)	26,97 g -> 30,41 g +12,75%	15,49	63,1 mg -> 81,3 mg +28,84%	22,39	2480 -> 3619 +45,93%	27,67	1716,9 $\mu\text{m}^2$ <-> 2128,8 $\mu\text{m}^2$ +23,99%	22,30
Souris 6		27,78 g -> 31,85 g +14,65%		70,07 mg -> 85,57 mg +22,12%		3242 -> 4436 +36,83%		1774 $\mu\text{m}^2$ <-> 2260,5 $\mu\text{m}^2$ +27,42%	
Souris 7		24,97 g -> 29,73 g +19,06%		67,2 mg -> 78,1 mg +16,22%		3381 -> 3381 +0,24%		1364,1 $\mu\text{m}^2$ <-> 1575,2 $\mu\text{m}^2$ +15,48%	

**Tableau 22 :** Résultats *in vivo* obtenus après administration de pGG2-MSTN tronquée.

Comme le présente le *tableau 22*, les TAG injectés avec 25  $\mu\text{g}$  de pGG2-MSTN tronquée présentent une prise de poids de l'ordre de 20% ( $p \leq 0,05$ ). Il est à noter que les différences entre les souris électroporées et celles ayant reçues le plasmide « nu » ne sont pas très importantes. Les photos des muscles et les marquages HPS nous permettent d'apprécier cette prise de poids du muscle TAG injecté avec le pGG2-MSTN tronquée (Figs. 127 et 128).



**Figure 127 :** Photographie (dorsale et ventrale) du TAG6 injecté 25  $\mu\text{g}$  de pGG2-MSTN tronquée / 35  $\mu\text{l}$  NaCl 150 mM après 19 jours de traitement et du contrôle TAD6.



**Figure 128** : Coupes HPS du TAG6 injecté 25 µg de pGG2-MSTN tronquée / 35 µl NaCl 150 mM après 19 jours de traitement et du contrôle TAD6.

Les marquages laminine et les analyses morphométriques ont permis de montrer que la prise de poids du muscle injecté était consécutive à une hyperplasie (+23-28%,  $p \leq 0,05$ ) et à une hypertrophie (+14-22%,  $p \leq 0,05$ ) pour les muscles TAG injectés 25 µg de pGG2-MSTN tronquée / 35 µl de NaCl 150 mM (Tab. 22).

En conclusion, la construction pGG2-MSTN tronquée injectée en IM chez *mdx* induit, après 19 jours, une augmentation de la masse musculaire de l'ordre de 20% médiée par des phénomènes d'hyperplasie et d'hypertrophie.

## 8.2 Plasmide pGG2 - MSTN tronquée / propeptide muté

La myostatine est synthétisée sous la forme d'un précurseur long de 375 acides aminés composé d'une séquence en N-terminal dénommée propeptide (28 kDa) et d'une région mature en position C-terminale. Plusieurs processus de clivages protéolytiques vont aboutir à la libération de la forme active de la myostatine. Un premier clivage permet l'élimination du segment peptide signal. Un deuxième clivage libère le propeptide de la partie C-terminale (= forme active). Ce clivage protéolytique est réalisé, au niveau de la séquence RSRR située à 110 acides aminés de l'acide aminé C-terminal, par une protéase de la famille des subtilisines : la furine. Après ce clivage, le dimère de protéine mature et le propeptide restent liés de manière non covalente sous la forme d'un complexe latent inactif. Une dégradation protéolytique du propeptide est nécessaire pour libérer la myostatine active. Ce dernier clivage protéolytique est assuré par certaines métalloprotéinases de la famille des BMP-1/TLD (bone morphogenetic protein-1/tolloid) qui clivent le propeptide entre l'arginine 75 et l'aspartate 76, provoquant ainsi la dissociation du complexe latent propeptide/dimère actif

[31]. En 2008, Lee et al. ont pu démontrer que ce mécanisme, jusqu'alors vérifié *in vitro*, était également établi *in vivo* [33].

Suite à la mise en évidence du processus de maturation de la myostatine, une approche anti-myostatine a été développée. En 2003, Wolfman et al. ont montré que l'utilisation d'une forme mutante du propeptide de la myostatine (mutant D76A) - résistante au clivage protéolytique par les protéinases BMP-1/TLD - induisait une augmentation de la masse musculaire chez la souris adulte [31]. Suite aux résultats intéressants obtenus avec la construction pGG2-MSTN tronquée et les conclusions parues avec le propeptide muté de la myostatine, nous avons souhaité rassembler ces 2 approches dans une seule et même construction. Ainsi, nous avons réalisé la construction pGG2 – MSTN tronquée / propeptide muté (D76A) dont les détails de clonage sont donnés dans la partie « Matériels et Méthodes » aux pages 185-187.

Bien que, théoriquement, il ne devrait pas y avoir synergie entre ces 2 approches puisque le propeptide muté n'est pas sensé être clivé et la forme mature tronquée de ce fait non libérée, nous avons tout de même décidé d'évaluer l'efficacité d'une telle construction. Une étude préliminaire *in vivo* avec 3 souris *mdx* de 6 semaines a été réalisée (Tab. 23). Dans ce protocole, nous avons testé 2 modes d'injection différents : la voie intramusculaire par injection rapide (souris 1) et la voie intramusculaire suivie d'une électroporation (Souris 2 et 3). Après 18 jours de traitement, toutes les souris ont été sacrifiées.

Souris	Age à l'injection	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Sacrifice
Souris 1	6 semaines	TAD : 25 µg MSTN T-PM / NaCl 150 mM	IM (Injection rapide - 2 secondes)	35 µl	J18
Souris 2		TAD : 25 µg MSTN T-PM - NaCl 150 mM	IM + Electroporation		
Souris 3					

**Tableau 23** : Etude de l'efficacité de la construction pGG2-MSTN tronquée / propeptide muté chez *mdx*.

Comme nous pouvons l'observer sur la *figure 129*, la construction pGG2-MSTN tronquée / propeptide muté permet, après 18 jours de traitement, d'observer à l'œil nu une augmentation de la masse musculaire. En effet, la patte droite de la souris 3 injectée avec 25 µg pGG2 – MSTN tronquée / propeptide muté / 35 µl NaCl 150 mM est bien plus volumineuse que la patte gauche injectée avec 35 µl de NaCl 150 mM.



**Figure 129** : Comparaison du TAD3 (flèche rouge) 18 jours après injection de la construction pGG2-MSTN tronquée / propeptide muté et du TAG3 contrôle.

Cette première observation a été confirmée par les études réalisées sur coupes à l'aide des marquages HPS où l'on constate un TAD injecté pGG2-MSTN tronquée / propeptide muté plus volumineux que le TAG contrôle (Fig. 130).



**Figure 130** : Coupes HPS de TAD injecté avec 25 µg de pGG2-MSTN tronquée – propeptide muté / 35 µl NaCl 150 mM après 18 jours de traitement et du contrôle TAG injecté 35 µl NaCl 150 mM.

Les marquages laminine et les études morphologiques nous ont permis de voir que l'injection IM de 25 µg de la construction pGG2-MSTN tronquée / propeptide muté induisait une hyperplasie de l'ordre de 10% et une hypertrophie proche de 21% (souris 1, Tab. 24).

Lorsque, suite à l'injection de cette cassette anti-myostatine, on réalise une électroporation, une hyperplasie de 26% et une hypertrophie de 29% sont constatées (souris 2 et 3, Tab. 24).

Souris	Groupe	Hyperplasie (Témoin -> Injecté)	Moyenne	Hypertrophie (Témoin -> Injecté)	Moyenne
Souris 1	Injecté pGG2 - MSTN T-PM (IM)	2975 -> 3270 +9,92%	9,92	1553,7 $\mu\text{m}^2$ -> 1880,1 $\mu\text{m}^2$ +21,01%	21,01
Souris 2	Injecté pGG2 - MSTN T-PM (IM + Electroporation)	2838 -> 3426 +20,72%	25,92	1353,2 $\mu\text{m}^2$ -> 1828,1 $\mu\text{m}^2$ +35,09%	28,78
Souris 3		2275 -> 2983 +31,12%		1564,4 $\mu\text{m}^2$ -> 1916 $\mu\text{m}^2$ +22,48%	

**Tableau 24 :** Effets de la stratégie MSTN tronquée - propeptide muté sur la croissance musculaire de souris *mdx* de 6 semaines.

Ces résultats préliminaires, obtenus sur un faible nombre de souris, ne semblent pas indiquer d'effet synergique entre la stratégie myostatine tronquée et propeptide muté. Afin d'obtenir potentiellement un effet cumulatif, il faudrait générer un vecteur comprenant 2 promoteurs (ou un IRES) permettant la synthèse indépendante du propeptide muté et de la forme tronquée de la myostatine mature.

### 8.3 La construction pGG2 - mDécorine

Afin d'étudier l'effet de la décorine dans une stratégie de transfert de gènes, nous avons généré la construction pGG2-mDCN (pages 187-190) que nous avons tout d'abord étudiée chez la souris *mdx* dans sa version plasmidique avant de réaliser une production AAV1. Cinq souris *mdx* de 8 semaines ont été utilisées : les souris 2 à 5 ont été injectées avec 25  $\mu\text{g}$  de pGG2-mDCN / 35  $\mu\text{l}$  NaCl 150 mM suivie d'une électroporation. La souris 1 témoin n'a pas été injectée. Dix-huit jours après injection, toutes les souris ont été sacrifiées (Tab. 25).

Souris	Age à l'injection	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Sacrifice
1	8 semaines	/	Témoin	/	J18
2		TAG : 25 $\mu\text{g}$ pGG2-mDCN / 35 $\mu\text{l}$ NaCl 150 mM	IM + Electroporation	35 $\mu\text{l}$	
3					
4					
5					

**Tableau 25 :** Protocole *in vivo* de l'efficacité de la cassette pGG2-mDCN sur la croissance musculaire de souris *mdx*.

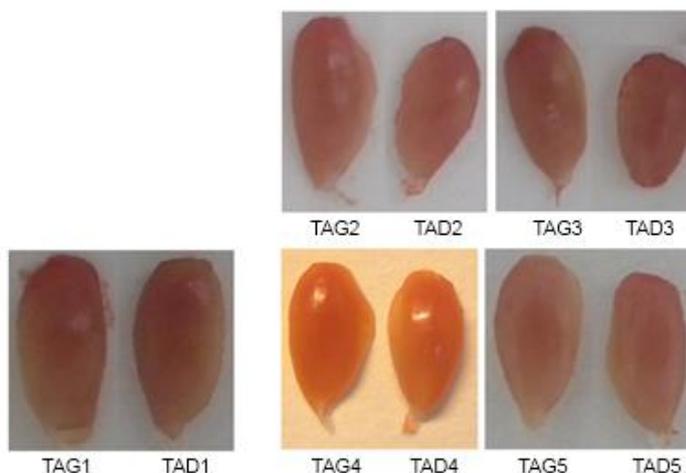
Comme l'indique le tableau ci-dessous, après 18 jours de traitement, la construction pGG2-mDCN injectée en intramusculaire et suivie d'une électroporation permet une augmentation

de la croissance musculaire. En effet, les souris 2 à 5 voient leur poids total croître de 14% ( $p \leq 0,01$ ) contre 9% pour la souris témoin.

Souris	Groupe	Augmentation Masse totale (%)	Moyenne	Prise de poids du muscle Témoin -> Injecté	Moyenne	Hyperplasie (Témoin -> Injecté)	Moyenne	Hypertrophie (Témoin -> Injecté)	Moyenne
Souris 1	Témoin	23,21 g -> 25,34 g + 9,2%	9,20	44,3 mg <-> 44,6 mg +0,7%	0,70	3363 <-> 3383 +0,59%	0,59	1382,6 $\mu\text{m}^2$ <-> 1347 $\mu\text{m}^2$ -2,57%	-2,57
Souris 2	Injecté pGG2 - mDCN	21,13 g -> 23,1 g +9,3%	14,125	50,20 mg -> 56,7 mg +12,9%	18,425	4003 <-> 4421 +10,44%	6,575	1028,6 $\mu\text{m}^2$ <-> 1262,1 $\mu\text{m}^2$ +22,70%	20,74
Souris 3		22,86 g -> 25,64 g +12,2%		47 mg -> 58,3 mg +24%		4705 -> 5383 +14,41%		994,9 $\mu\text{m}^2$ <-> 1186,8 $\mu\text{m}^2$ +19,29%	
Souris 4		20,07 g -> 24,31 g +21,1%		55,1 mg -> 61,3 mg +11,3%		3767 -> 3803 +0,96%		1325,5 $\mu\text{m}^2$ <-> 1590 $\mu\text{m}^2$ +19,95%	
Souris 5		19,23 g -> 21,9 g +13,9%		45,1 mg -> 56,6 mg +25,5%		3295 -> 3311 +0,49%		1443,2 $\mu\text{m}^2$ <-> 1746,6 $\mu\text{m}^2$ +21,02%	

**Tableau 26 :** Résultats obtenus avec la cassette pGG2-mDCN chez *mdx*.

L'injection de 25  $\mu\text{g}$  de pGG2-mDCN conduit à une prise de poids du muscle injecté de l'ordre de 18% ( $p \leq 0,01$ ). Aucune différence de poids entre le TAG et le TAD n'a été constatée chez la souris 1 Témoin (+ 0,7%). Comme le montre la *figure 131*, l'augmentation de la masse musculaire des TAG injectés est observable à l'œil nu en comparaison des TAD témoins.

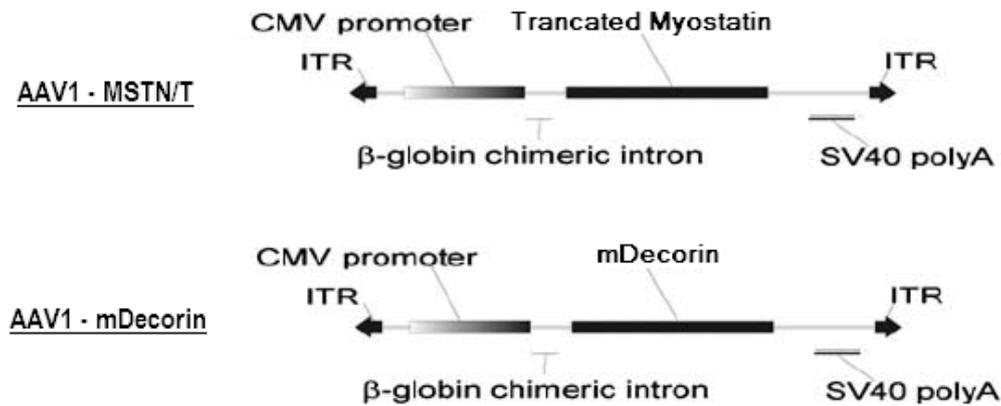


**Figure 131 :** Photographies des TAG/TAD des 5 souris *mdx* impliquées dans l'étude.

Les analyses morphologiques ont permis d'observer que l'augmentation de la masse du muscle injecté TAG était consécutive à une hyperplasie de l'ordre de 6% et une hypertrophie d'environ 20% ( $p \leq 0,01$ ). Il est à noter que les valeurs d'hypertrophie sont homogènes et révèlent que la construction pGG2-mDCN permet bien une augmentation de la surface moyenne des fibres musculaires. L'hyperplasie constatée est très dépendante de la souris. En effet, deux souris (2 et 3) présentent respectivement une augmentation du nombre de fibres musculaires de 10,4% et de 14,4% alors qu'aucune hyperplasie n'est observée chez les souris 4 (1%) et 5 (0,5%). Une étude *in vivo* regroupant un plus grand nombre de souris *mdx* permettrait de mieux caractériser l'effet de l'approche anti-MSTN pGG2-mDCN sur la croissance musculaire de ces souris.

## 8.4 Approches AAV

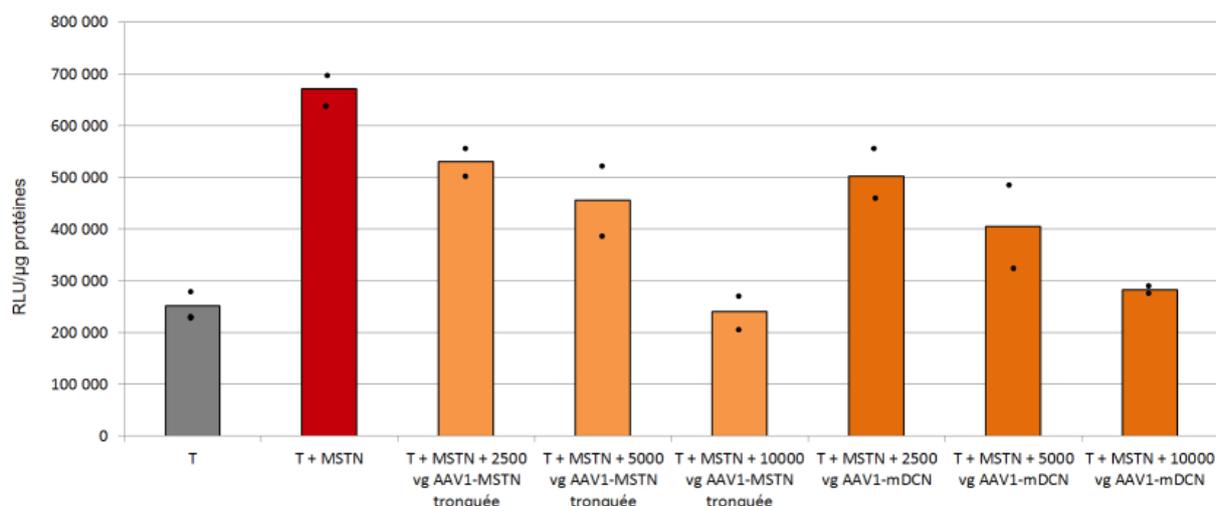
Suite à nos études *in vivo* chez *mdx* avec les différentes constructions plasmidiques, nous avons décidé de générer des AAV1 avec les vecteurs MSTN tronquée et mDCN (Fig. 132).



**Figure 132** : Schéma des 2 cassettes AAV.

Avant de réaliser des expériences *in vivo*, nous avons procédé à des analyses *in vitro*. Pour ce faire, nous avons utilisé la cassette pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc. Nous avons cependant dû modifier le protocole afin de pouvoir l'utiliser dans le contexte AAV. Suite à l'ensemencement des cellules HEK293T dans des puits de plaques 24 puits, nous avons réalisé, après 24 heures d'attente, une transduction des cellules avec les virus AAV contenant la myostatine tronquée et le gène de la décorine murine. Les puits « Témoin » et « T + MSTN » ne reçoivent aucun AAV. Trois autres puits reçoivent eux une gamme croissante d'AAV1-MSTN tronquée (2500, 5000 et 10000 vg/puits) et 3 autres puits reçoivent la même gamme croissante d'AAV1-mDCN. Après 24 heures à l'incubateur à 37°C, la transfection de la cassette pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc est réalisée pendant 3 heures et après 24 heures d'attente, 2,5 nM de MSTN sont ajoutés à tous les puits excepté le puits « Témoin ». Après incubation de 24 heures, la lyse cellulaire de tous les puits est réalisée et des dosages luciférase et protéiques sont conduits.

Comme le présente la *figure 133*, une répression de l'activité de la myostatine par l'AAV1-MSTN tronquée et par l'AAV1-mDCN est observée. L'inactivation de la myostatine est dose dépendante et on observe qu'avec 10000 particules virales, l'effet des 2,5 nM de MSTN est totalement réprimé.



**Figure 133 :** Inhibition de l'activité de la myostatine par l'AAV1-MSTN tronquée et l'AAV1-mDCN.

Une étude *in vivo* chez la souris *mdx* a été réalisée : le protocole regroupe 11 souris *mdx* de 6 semaines (Tab. 27).

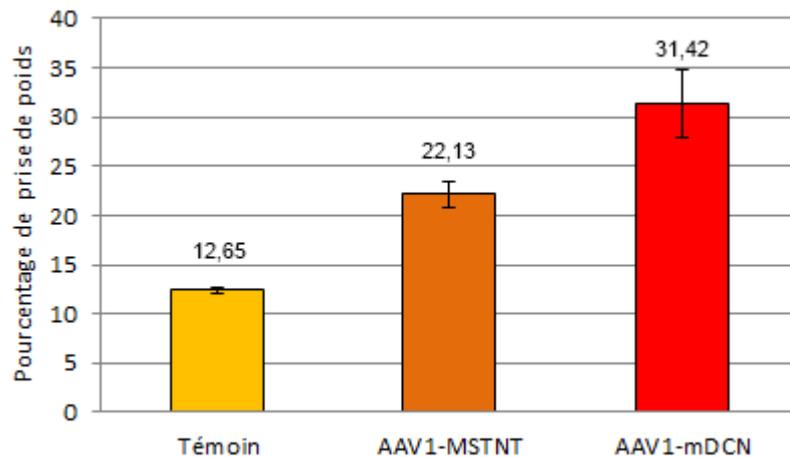
Souris	Approches	Age à l'injection	Produit / Vecteur	Voie d'injection	Volume injecté	Sacrifice
1	Témoin	6 semaines	TAG : 35 μl NaCl 150 mM TAD : 35 μl NaCl 150 mM	IM (TAG/TAD)	35 μl	J31
2	Injectées AAV1 - MSTN tronquée		3,2. 10 <sup>9</sup> - 35 μl AAV1-MSTNT TAD : 35 μl NaCl 150 mM			
3						
4						
5						
6						
7	Injectées AAV1 - mDCN		1,5. 10 <sup>10</sup> - 35 μl AAV1-mDCN TAD : 35 μl NaCl 150 mM			
8						
9						
10						
11						

**Tableau 27 :** Etude de l'efficacité des AAV1-MSTN tronquée et AAV1-mDCN chez la souris *mdx*.

- Souris 1 : Témoin. Injectée en IM dans le TAG et le TAD avec 35 μl de NaCl 150 mM.
- Souris 2 à 6 : injection dans le TAG de 3,2. 10<sup>9</sup> AAV1-MSTN tronquée / 35 μl NaCl 150 mM. Le TAD contrôle reçoit 35 μl NaCl 150 mM.
- Souris 7 à 11 : injection dans le TAG de 1,5. 10<sup>10</sup> AAV1-décorine murine / 35 μl NaCl 150 mM. Le TAD contrôle reçoit 35 μl NaCl 150 mM.
- La durée du traitement est de 31 jours et le TAG, le TAD, le QUAD droit et gauche ainsi que le diaphragme et le cœur ont été prélevés.

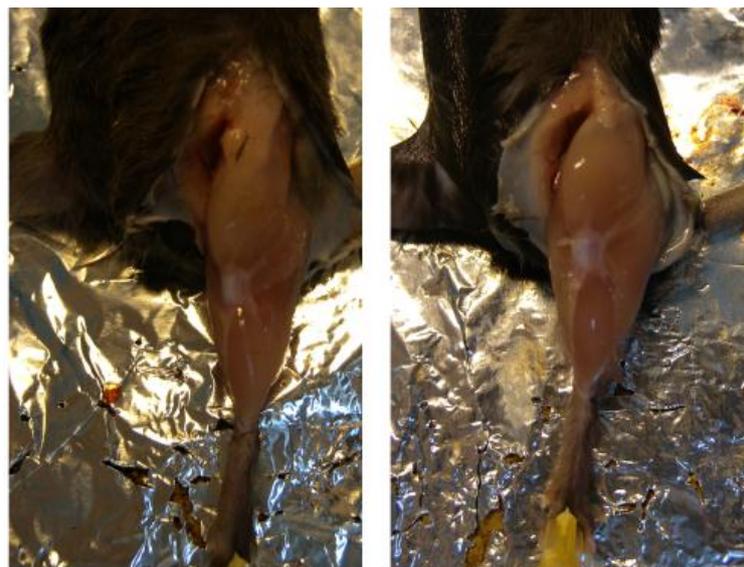
Suite à l'injection d'AAV1-MSTN tronquée (souris 2 à 6) et d'AAV1-mDCN (souris 7 à 11) et un traitement de 31 jours, toutes les souris *mdx* impliquées dans ce protocole ont été pesées puis sacrifiées. Comme le présente la *figure 134*, le traitement à l'AAV1-MSTN tronquée et à

l'AAV1-mDCN conduit à une importante augmentation de la masse totale des souris *mdx* concernées. En effet, en 31 jours, la souris *mdx* « Témoin » de 6 semaines voit sa masse totale croître d'environ 12,65% alors qu'une souris *mdx* de 6 semaines injectée avec  $3,2 \cdot 10^9$  AAV1-MSTN tronquée (souris 2 à 6) a vu sa masse corporelle croître d'environ 22,1% ( $p=0,0002$ ). L'augmentation de la masse corporelle totale est encore plus significative suite à l'injection d'AAV1-mDCN, cette dernière étant en moyenne de 31,4% (Souris 7 à 11) ( $p=0,0001$ ).



**Figure 134 :** Augmentation moyenne de la masse corporelle de souris *mdx* après 31 jours de traitement.

A J31, toutes les souris *mdx* impliquées dans l'étude ont été sacrifiées. Comme on peut l'observer sur la *figure 135*, l'augmentation de la masse musculaire d'une souris injectée AAV1-MSTN tronquée est visible à l'œil nu comparée à une souris *mdx* témoin faisant, à J0 le même poids.



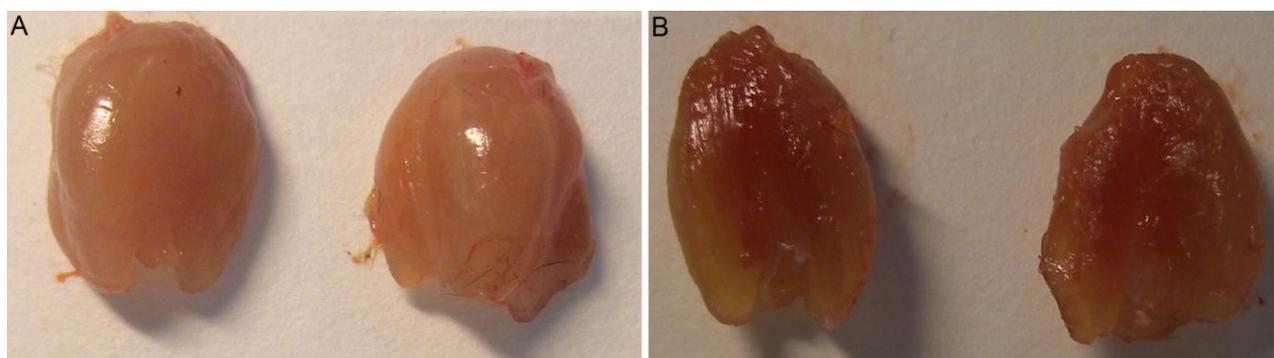
TAG1 : 35 µl NaCl 150 mM      TAG6 : 1,5 · 10<sup>9</sup> vg AAV1-MSTN tronquée

**Figure 135 :** Photographie de la patte gauche d'une souris *mdx* témoin (à gauche) et de la patte gauche d'une souris *mdx* injectée AAV1-MSTN tronquée (à droite).

Les figures 136 et 137 permettent de mesurer l'effet de l'approche AAV-MSTN tronquée sur les muscles tibialis antérieur et quadriceps de souris *mdx*.



**Figure 136** : Photographie des TAG5/TAD5 (A) et TAG6/TAD6 (B : face dorsale, C : face ventrale) suite au traitement de 31 jours par AAV1-MSTN tronquée dans le TAG.



**Figure 137** : Photographie (A : face dorsale, B : face ventrale) des quadriceps gauche et droit de la souris N°4 suite au traitement de 31 jours par AAV1-MSTN tronquée dans le TAG.

Bien que tous les muscles TAG injectés soient donnés comme plus lourds par rapport au TAG1 témoin après un traitement de 31 jours, nous n'avons pas constaté, à l'exception de la souris 6 (+ 16%), d'augmentation de la masse musculaire du muscle injecté par rapport au muscle témoin TAD chez une même souris (Tab. 28).

Les analyses des coupes et marquages laminine ont démontré que l'injection d'AAV1-MSTN tronquée ou d'AAV1-mDCN conduisait à une importante hyperplasie et/ou hypertrophie.

Souris	Produit injecté	Poids (J0 -> J21)	Poids TA (TAD -> TAG)	Hyperplasie (TAD -> TAG)	Hypertrophie (TAD -> TAG)
Souris 1	TAG : 35 µl NaCl 150 mM TAD : 35 µl NaCl 150 mM	29,53 g -> 33,3 g +12,65 %	67,9 mg -> 68,1 mg +0,29 %	5111 -> 5270 - 3,02 %	1614,59 µm <sup>2</sup> -> 1567,01 µm <sup>2</sup> -2,95 %
Souris 2	TAG : 3,2. 10 <sup>9</sup> - 35 µl AAV1-MSTNT TAD : 35 µl NaCl 150 mM	29,28 g -> 35,6 g +21,58 %	69,1 mg -> 73,6 mg +6,51 %	4628 -> 4306 -6,96 %	1690,29 µm <sup>2</sup> -> 1800,48 µm <sup>2</sup> +6,52 %
Souris 3		32,06 g -> 38,8 g +21,02 %	88,4 mg -> 94,4 mg +3,39 %	3832 -> 5025 +31,13 %	1690,07 µm <sup>2</sup> -> 1594,32 µm <sup>2</sup> -5,67 %
Souris 4		25,36 g -> 31,5 g +24,21 %	71,31 mg -> 71,9 mg +0,83 %	4497 -> 4594 +2,16 %	1436,92 µm <sup>2</sup> -> 1683,38 µm <sup>2</sup> +17,15 %
Souris 5		28 g -> 34,4 g +22,86 %	78,1 mg -> 80,5 mg +3,07 %	4317 -> 5414 +25,41 %	1154,63 µm <sup>2</sup> -> 1328,88 µm <sup>2</sup> +15,09 %
Souris 6		19,83 g -> 24 g +21,03 %	35,9 mg -> 41,8 mg +16,43 %	4577 -> 5516 +20,52 %	632,43 µm <sup>2</sup> -> 811,97 µm <sup>2</sup> +28,39 %
Souris 7		TAG : 1,5.10 <sup>10</sup> - 35 µl AAV1-mDCN TAD : 35 µl NaCl 150 mM	26,62 g -> 34,4 g +29,23 %	71,9 mg -> 73,5 mg +2,23 %	4202 -> 4538 +8 %
Souris 8	26,75 g -> 34,9 g +30,47 %		70,3 mg -> 71,8 mg +2,13 %	4775 -> 6008 +25,82 %	1187,18 µm <sup>2</sup> -> 1371,46 µm <sup>2</sup> +15,52 %
Souris 9	22,84 g -> 29,2 g +27,85 %		61,4 mg -> 61,1 mg -0,49 %	4110 -> 4506 +9,64 %	1690,29 µm <sup>2</sup> -> 1800,48 µm <sup>2</sup> +6,52 %
Souris 10	27,89 g -> 36,9 g +32,31 %		75,9 mg -> 76,9 mg +1,32 %	5458 -> 6441 +18,01 %	1078,58 µm <sup>2</sup> -> 1373,69 µm <sup>2</sup> +27,36 %
Souris 11	26,4 g -> 36,1 g +36,74 %		76,4 mg -> 77,1 mg +0,92 %	4558 -> 5018 +10,09 %	1499,48 µm <sup>2</sup> -> 1645,32 µm <sup>2</sup> +9,73 %

**Tableau 28** : Résumé des résultats *in vivo* obtenu avec les 2 stratégies AAV1.

Ces résultats préliminaires laissent à penser que les 2 approches pourraient permettre une augmentation significative de la masse musculaire.

Souris	QUADG (mg)	QUADD (mg)	Prise de poids (%)	Prise de poids moyenne (%)	Cœur (mg)	Moyenne des poids (mg)
1	166	171,3	-3,09	-3,1	131	131,0
2	347	327,1	6,18		176	
3	402	386,4	4,04		188	
4	338	319	5,96		148	
5	372,1	356	4,52		169	
6	188,5	187,9	0,32		99,3	
7	319,5	309	3,40	+4,2	142,1	156,1
8	307,3	298,7	2,88		167,8	
9	268,1	259,1	3,47		128,6	
10	362	349,2	3,67		181,4	
11	332,3	328,7	1,10		221,1	
				+2,9		168,2

**Tableau 29** : Prise de poids et moyennes de poids des quadriceps et du muscle cardiaque.

Nous avons également étudié l'effet de ces 2 stratégies AAV1 sur la croissance musculaire du quadriceps et du muscle cardiaque. Comme l'indique le *tableau 29*, les poids des quadriceps de la patte injectée (dans le TAG) AAV1-MSTN tronquée ou AAV1-mDCN, sont plus importants que ceux des quadriceps de la patte témoin, indiquant ainsi un effet systémique des

2 approches testées. On note également une augmentation assez importante du poids du cœur suite au traitement de 31 jours par l'AAV1-MSTN tronquée (+19%) et par l'AAV-mDCN (+28%).

En résumé, cette étude préliminaire nous a permis d'observer que :

- ✓ Les approches AAV1-MSTN tronquée et AAV1-mDCN induisent une hyperplasie et/ou une hypertrophie du muscle tibialis antérieur.
- ✓ L'effet des 2 approches AAV ne semble pas se limiter au muscle injecté puisque tous les quadriceps gauche de la patte où le TAG a été injecté par le vecteur ont vu leur masse augmenter.
- ✓ Suite au traitement par ces 2 approches, le cœur voit son poids significativement augmenter.

De plus amples études regroupant un plus grand nombre de souris, notamment des souris témoins, devraient nous permettre de mieux définir l'efficacité de ces 2 stratégies.

# **DISCUSSION**

En 1997, le caractère culard, un phénotype hypermusclé rencontré chez certaines races de bovins, est montré comme étant la conséquence de mutations dans le gène de la myostatine [1, 2]. La baisse de l'activité de ce facteur de croissance a depuis été montrée comme induisant une hypertrophie musculaire chez d'autres espèces comme la souris [11], le chien [18] mais aussi chez l'Homme [23]. L'identification de la myostatine et des conséquences de son invalidation sur le développement musculaire a ouvert de nombreuses perspectives en médecine humaine. En effet, une réduction du niveau de myostatine pourrait être bénéfique pour des personnes atteintes de maladies neuromusculaires telles que la myopathie de Duchenne mais également chez des personnes ayant subi une fonte musculaire importante suite à une immobilisation prolongée ou en conséquence d'une maladie chronique telle que le cancer ou le sida. Dès lors, de nombreuses stratégies visant à réprimer l'activité de ce facteur ont été menées. A l'aide d'anticorps [132], de myostatines génétiquement modifiées [141, 145] ou par l'utilisation de partenaires de la myostatine [150, 153], les approches développées ont démontré que l'inhibition de la myostatine permettait d'augmenter la masse musculaire et, dans certains cas, d'augmenter la force du muscle traité [139, 145].

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la décorine. Outre le fait d'être un composant de la matrice extracellulaire [185], ce SLRP est impliqué dans de nombreux processus tels que la fibrillogénèse [266], la progression du cycle cellulaire ou encore le développement du muscle squelettique [280]. En 2001, Fukushima et al. constatent que l'injection de cet agent anti-fibrotique permet la régénération musculaire d'un muscle lacéré [279]. Miura et al. montrent par la suite, en utilisant la technique de résonance plasmonique de surface, que la décorine peut interagir avec la myostatine et que cette liaison nécessite la présence de zinc [318]. En 2003, Sato et al. observent, après injection de 50 µg de décorine dans un muscle lacéré de souris C57BL10, une augmentation du nombre de fibres musculaires, ainsi qu'une augmentation significative de leur diamètre. Un surplus de force est également observé chez les souris traitées à la décorine [326]. L'ensemble de ces travaux nous ont encouragé à évaluer le potentiel thérapeutique d'une stratégie anti-MSTN par la décorine.

- **Etude *in vitro* de l'inhibition de l'activité de la myostatine par la décorine**

Nous avons tout d'abord souhaité vérifier si la protéine décorine murine recombinante permettait de réprimer l'activité de la myostatine sur cellules myoblastes C2C12. Pour ce faire, nous avons utilisé la construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc permettant de quantifier indirectement la liaison de la myostatine à son récepteur [52]. Lorsque la myostatine se fixe au récepteur activine IIB, les protéines Smads 3 et 4 sont activées et vont se lier aux 12 copies CAGA. Le promoteur de la cassette pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc est ainsi activé - ce qui se traduit par une production de luciférase. Les résultats obtenus indiquent que 0,5 µg de décorine murine, soit 10 fois plus de décorine que de myostatine, permettent d'observer un début de réduction du niveau de luciférase et que 2,5 µg/puits de mDécorine (50 fois plus de décorine

que de myostatine) permettent d'inhiber la quasi-totalité des 2,5 nM de myostatine utilisés. L'IC50 obtenu pour la décorine est de  $2,3 \times 10^{-8}$ . Nous avons donc pu vérifier que la mDCN permettait de réprimer de façon dose dépendante l'activité de la MSTN en présence de zinc. En accord avec les résultats de Miura et al. [318], nous avons également constaté que le zinc jouait un rôle important dans l'inhibition de la MSTN par la mDCN.

*Perspectives* : Il est important de mentionner que l'essai pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc ne permet qu'une quantification indirecte de l'activité de la myostatine. Les voies de signalisation du TGF- $\beta$  et de l'activine font aussi intervenir les protéines Smads 3 et 4 [354, 355]. Dans l'optique de démontrer que la décorine inhibe bien l'activation des Smads par répression de l'activité de la myostatine, des essais pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc utilisant le TGF- $\beta$  et l'activine au lieu de la MSTN sont donc nécessaires. De plus, contrôler l'efficacité de transfection par un plasmide rapporteur de type CMV-mSeAP afin de normaliser nos résultats luciférase serait également important.

- **Etude *in vivo* chez la souris *mdx* et gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>**

Des études *in vivo* ont ensuite été menées chez la souris *mdx*, un modèle murin de Dystrophie de Duchenne présentant un taux de myostatine dans le sérum décrit comme 5 fois plus important que chez la souris sauvage [356]. Suite à l'injection de 20  $\mu$ g de décorine murine et de 15  $\mu$ M de ZnCl<sub>2</sub>, nous avons constaté, après 21 jours de traitement, une augmentation de la masse musculaire du muscle traité pouvant atteindre 50%. Des études de cinétique chez la souris *mdx* ont permis de montrer que l'effet maximal de la décorine était situé entre J14 et J21 et que, 33 jours post-injection, l'effet s'estompait. Entre J14 et J21, l'augmentation de la masse musculaire est consécutive à une hypertrophie et une hyperplasie de 24%. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Sato et al. [326]. Afin d'étendre le possible champ d'action de la stratégie décorine, nous avons réalisé une étude similaire chez la souris gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>, un modèle murin de sarcoglycanopathie. Suite à l'injection de 20  $\mu$ g de mDécorine, nous avons observé, après 17 jours de traitement, une prise de poids de 16%. Contrairement à l'étude menée chez la souris *mdx*, aucune hyperplasie n'a été constatée et la prise de masse observée est consécutive à une seule hypertrophie de l'ordre de 27%. La décorine permet donc, chez la souris *mdx* et gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup>, d'augmenter la masse musculaire après 17-18 jours de traitement. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que Muñoz-Delgado et al. ont fait état d'une concentration en zinc plus élevée chez la souris dystrophique que chez la souris sauvage [372].

*Perspectives* : Nous avons noté une inégalité des résultats et une variabilité non négligeable dans les données de prise de poids mais également d'hypertrophie/hyperplasie. Cette variabilité peut être due à plusieurs facteurs : 1) réaction différente chez chaque souris *mdx* suite à l'injection (selon l'état du muscle au moment de l'injection), 2) qualité des gestes

techniques, en particulier du prélèvement (important pour la pesée) et qualité de la coupe du muscle au cryostat, 3) qualité du lot de la protéine recombinante et 4) efficacité de liaison du zinc à la décorine. Il est clair que nos études *in vivo* doivent être complétées par d'autres analyses : en particulier, vérifier l'état d'activation des Smads après injection de mDCN ; faire des études de RT-qPCR sur différents facteurs connus pour être modulés par la myostatine (MyoD, MURF-1, atrogin-1, etc...).

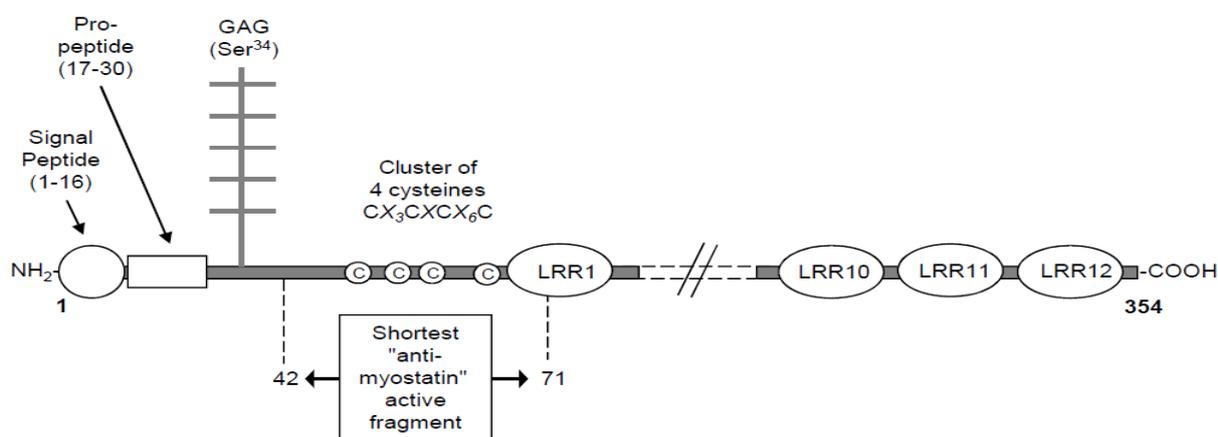
- **Définition du domaine d'interaction DCN - MSTN : Etudes *in vitro* et *in vivo***

Miura et al. montrent en 2006 que la décorine lie la myostatine seulement en présence d'ions zinc d'une concentration supérieure à 10  $\mu$ M. Yang et al. ont réussi à identifier un peptide décorine long de 41 acides aminés, issu de la partie N-terminale, présentant une activité de liaison au  $Zn^{2+}$  et pouvant lier 2 ions  $Zn^{2+}$  avec une  $K_D$  de  $3.10^{-7}$  M. Nous nous sommes donc demandés si ce peptide de 41 acides aminés permettait, comme la protéine décorine entière, de réprimer l'activité de la myostatine et d'induire une augmentation de la masse musculaire.

Un essai pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc a donc été conduit et nous avons pu vérifier que le peptide mDCN 31-71 permettait une inhibition dose dépendante de l'activité de la myostatine dans des cellules HEK293T. Les 41 acides aminés du domaine N-terminal contenant le domaine de liaison au zinc sont donc suffisants pour observer une activité anti-myostatine. Il est à noter que l'efficacité d'inhibition par le peptide mDCN 31-71 est moins importante qu'avec la protéine recombinante mDécorine. L'IC<sub>50</sub> obtenu pour le peptide 31-71 mDCN est de  $3.10^{-6}$  et permet d'avancer que l'affinité du peptide décorine pour la myostatine est d'environ 130 fois moins importante que celle de la protéine entière. Les raisons de cette différence ne sont à ce jour pas définies, mais on peut penser que la structure de la protéine entière est mieux adaptée pour interagir avec d'autres protéines que la structure d'un peptide court, ou encore que le peptide décorine lie le zinc avec moins d'efficacité que la protéine entière, ce qui aboutit à une interaction moins efficace avec la myostatine.

Il est ici important de préciser que contrairement à l'essai pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc conduit avec la protéine recombinante décorine, nous pouvons avancer que l'inhibition de l'activité de Smad2 observée n'est pas dépendante du TGF- $\beta$ . En effet, la décorine interagit avec le TGF- $\beta$  au niveau des LRR6-10 (Leu 155-Val 260) [294], non présents avec le peptide 31-71 mDCN contenant les LRR1 et 2. Ainsi, la repression de l'activité de Smad2 s'opère nécessairement par une inhibition de l'activité de la myostatine ou par la repression de l'activité d'un autre TGF tel que l'activine. Ce dernier point reste à vérifier. On peut également noter que cette inhibition de l'activité de Smad2 n'est pas dépendante de l'IGF-1, partenaire de la décorine au niveau de ses 5 premiers LRR [277]. L'IGF-1 n'empruntant pas la voie des Smads [54], ce dernier facteur n'est pas impliqué dans la repression de l'activité de Smad2 que nous avons observée.

Dans l'optique de mieux définir le domaine d'interaction entre la décorine et la myostatine et de vérifier l'importance des 4 cystéines du domaine de liaison au zinc de la décorine, nous avons fait synthétiser différents variants du peptide 31-71 mDCN. Les études *in vitro* pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc ont ainsi montré que la mutation en alanine de 3 des 4 cystéines du domaine de liaison au zinc (peptide 31-71 muté) rendaient impossible l'inhibition de l'activité de la myostatine et que le peptide 42-71 mDCN gardait intacte la capacité à inhiber l'activité de la MSTN, au contraire d'un peptide 31-61 mDCN. Ce faisant, nous avons donc affiné le site d'interaction de la décorine au segment 42-71 et vérifié que pour observer une activité anti-myostatine par la décorine, les 4 cystéines du domaine de liaison au zinc et une concentration de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  était nécessaires.



**Figure 138 :** Structure de la décorine murine et définition du domaine d'interaction avec la myostatine.

*Perspectives :* L'étude de nouveaux peptides mDCN (48-71 et variants, peptides muté pour telle ou telle cystéine) devrait permettre de préciser le fragment actif minimal et devrait confirmer l'importance de chacune des cystéines. La *figure 138* présente la structure de la décorine et l'emplacement du fragment minimal actuel ayant la capacité à réprimer l'activité de la myostatine.

Ces études *in vitro* ne permettant d'apprécier que de façon indirecte l'interaction décorine - myostatine, nous avons réalisé différentes études Elisa qui ont montré que le peptide 31-71 mDCN interagissait directement et de façon dose dépendante avec la myostatine et qu'en absence de zinc, l'interaction peptide 31-71 mDCN/MSTN n'existait pas. De plus, en présence de 15  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ , le peptide 31-71 mDCN muté n'interagit pas avec la myostatine mature. Les 3 cystéines remplacées par des alanines sont donc indispensables pour observer une interaction avec la MSTN. En 2007, Li et al. [280] et Zhu et al. [319] révèlent que la décorine pourrait indirectement réprimer l'activité de la myostatine via la follistatine, un inhibiteur de la MSTN [151]. Nos travaux complètent ces résultats en prêtant à la décorine un rôle d'inhibiteur direct de l'activité de la myostatine.

Les effets de l'ensemble des peptides mDCN sur la croissance musculaire de souris *mdx* ont ensuite été étudiés. Les peptides 31-71 et 42-71 mDCN ont permis d'observer, après 18-20 jours de traitement, une prise de poids de l'ordre de 10,7-18,2% consécutive à une hypertrophie respective de 24,1 et 27,7%. Seul le traitement par le peptide 31-71 mDCN a fait état d'une hyperplasie, de l'ordre de 6,9%. Le peptide 31-71 mDCN muté et le peptide 31-61 mDCN, ne présentant pas la totalité des 4 cystéines du domaine de liaison au zinc, ont également été injectés chez la souris *mdx* et, suite à un traitement de 18-20 jours, aucune prise de poids ne fut constatée.

A l'aide des travaux de Scott et al., reliant séquence protéique et domaines de la décorine [226], nous avons pu situer le peptide 31-71 mDCN dans la partie N-terminale de la décorine et, en partie, sur le 1<sup>er</sup> domaine LRR de la protéine. La structure de la décorine bovine étant disponible, nous avons pu localiser le cluster de cystéines en utilisant les logiciels Cn3D 4.1 et Swiss-Pdb Viewer 4.02. Nous avons noté que d'après la structure cristalline de la décorine bovine, le peptide 31-71 mDCN présentait deux ponts disulfures impliquant les 4 cystéines. Pour le peptide 31-71 mDCN muté, disposant de seulement une des quatre cystéines, les ponts disulfures ne peuvent se former et donc la structure du peptide est certainement modifiée. A partir du modèle du peptide 31-71 mDCN, nous avons également généré la structure tridimensionnelle et observé que les ponts disulfures sont du même côté du peptide et que les 4 cystéines sont assez proches dans l'espace, suggérant ainsi qu'une liaison avec une molécule de zinc est possible.

De façon intéressante, 2 modifications induites par le zinc ont été rapportées concernant la décorine. Des analyses de spectroscopie par dichroïsme circulaire ont montré que le peptide 31-71 mDCN présentait une conformation différente en présence d'ions  $Zn^{2+}$  [230] et il fut noté que le  $Zn^{2+}$  permettait une auto-association du peptide 31-71 mDCN [231]. Ainsi, on peut faire l'hypothèse du mécanisme suivant :

1. Cassure des ponts disulfures,
2. Liaison du zinc via les résidus cystéines,
3. Induction du changement de conformation du peptide 31-71 DCN,
4. Oligomérisation du peptide 31-71 DCN permettant une meilleure affinité pour différentes protéines telles que la myostatine.

De plus amples études sont nécessaires pour valider ce mécanisme et en préciser chacune des étapes.

- **Mécanismes induits et voie de signalisation**

En 2009, Chelh et al. révèlent que, chez les souris déficientes en myostatine, la voie PI3kinase/Akt, est activée. Cette voie de signalisation joue un rôle majeur dans la promotion de la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de la mort cellulaire [93, 94]. L'activation de la voie PI3K a été corrélée à une augmentation de la taille des fibres [95] et l'activation d'Akt à l'hypertrophie musculaire [96, 97, 98] et une augmentation de la synthèse protéique [99]. Très récemment, Rodriguez et al. ont confirmé que le phénotype hypertrophique observé chez des souris myostatine déficientes était associé à une augmentation de l'activation de la voie de signalisation Akt/mTor conduisant à une augmentation de la synthèse protéique [105].

Afin de comprendre comment la décorine permet d'augmenter la masse musculaire, nous avons décidé d'étudier l'effet de ce SLRP sur l'activation de la kinase Akt. Les études Western blot réalisées sur myoblastes et myotubes ont fait état, suite à un traitement de 10 minutes par 30 µg de décorine murine, d'une importante augmentation (respectivement x2,2 et x4,3) de la forme phosphorylée d'Akt. L'activité de la mDCN sur Akt est donc plus importante sur cellules différenciées que sur myoblastes. On peut également noter que l'effet après 24 heures de traitement semble s'estomper, ce qui suggère un effet relativement court dans le temps de la décorine. Cette activation d'Akt, montrée comme induisant la synthèse protéique par inhibition de GSK-3β [101] et réduisant la dégradation protéique par régulation négative de FoxO1 [102], pourrait expliquer l'hypertrophie constatée chez les souris *mdx* traitées par la décorine. Afin de valider cette hypothèse, l'analyse des niveaux de FoxO1, MURF-1 et atrogin-1 serait requise. Il est important ici de mentionner que la décorine a été décrite comme pouvant lier et activer le récepteur IGF-1, conduisant à une importante activation de la kinase Akt [277]. Ainsi, nous ne pouvons conclure formellement que l'augmentation d'Akt que nous avons observée est bien la résultante d'une inhibition de la myostatine et non la conséquence d'une liaison au récepteur IGF-1.

L'effet de la décorine sur GSK-3β, sérine-thréonine kinase en aval d'Akt, a également été étudiée et a révélé une augmentation de la forme phosphorylée de l'ordre de x1,50 (myoblastes) et x2,1 (myotubes). La décorine, via l'activation d'Akt, aboutit donc à une répression de GSK-3β, dont la forme phosphorylée inactive est retrouvée en excès, de façon plus marquée sur cellules différenciées.

Ces résultats nous ont conduit à étudier le taux de glycogène présent dans le muscle de souris *mdx* injecté par mDCN. En effet, l'une des fonctions de GSK-3β est de réprimer la glycogène synthase, enzyme contrôlant la synthèse de glycogène [356]. A l'aide de marquages Shiff, nous avons observé une importante augmentation du taux de glycogène 21 jours après injection de mDécorine, le taux de glycogène pouvant atteindre une augmentation de près de 50% à J33. Il est intéressant de noter que l'augmentation du taux de glycogène est décalée dans le temps par rapport à la prise de poids du muscle injecté. L'augmentation du taux de

glycogène pourrait donc être l'une des conséquences directes de l'injection de décorine dans le muscle squelettique. Nous avons également étudié l'effet des peptides 31-71 et 42-71 mDCN sur la synthèse de glycogène et nous avons observé un phénomène similaire. Les marquages Shiff ont été confirmés par marquage au Lugol. Ces dernières observations, même si elles ne sont pas véritablement quantitatives, sont en accord avec les travaux de Chen et al. qui décrivent en 2010 la myostatine comme permettant la consommation de glucose et pouvant inhiber la synthèse du glycogène [127]. En outre, il a été montré que la myostatine activait AMPK (AMP-activated protein kinase), un composant clef du maintien de l'homéostasie énergétique et activait en cela la glycolyse. La décorine, en inhibant la MSTN, favoriserait donc la synthèse de glycogène.

A noter que les résultats de ces marquages doivent être confirmés par d'autres analyses, en particulier par un dosage du glycogène. Si les résultats sont confirmés, la question de l'utilité de ce surplus de glycogène serait posée.

- **Décorine et évaluations fonctionnelles**

En 2003, Sato et al. ont constaté chez la souris sauvage que, suite à un traitement de 2 semaines à la décorine, la force tétanique et la force « fast-twitch » d'un muscle lacéré 2 semaines avant injection étaient grandement améliorées, permettant ainsi une restauration des fonctionnalités musculaires proche du niveau atteint par des souris non lacérées [326]. Afin de vérifier si la décorine et les peptides dérivés permettent une amélioration fonctionnelle du muscle traité, différents tests de force ont été réalisés.

Suite à l'injection de 10 µg de décorine murine ou de 25 µg de peptide 31-71 mDCN dans l'EDL gauche de souris *mdx*, nous n'avons pas constaté d'amélioration statistiquement significative pour les tests fonctionnels Twitch et Tétanos. Cependant, les résultats avec la décorine ont indiqué un effet positif sur la force et la résistance membranaire à des exercices excentriques suite à un traitement de 17 jours (test Stretch). Bien que ces premières données restent à confirmer en réalisant un protocole similaire regroupant un plus grand nombre de souris par groupe, on peut imaginer que le peptide 31-71, ayant été montré 130 fois moins efficace que la protéine entière pour inhiber la myostatine, ne permet pas, à la quantité utilisée, d'inhiber suffisamment la myostatine pour constater un effet positif sur la fonctionnalité du muscle injecté. On peut également penser que la décorine, via des interactions avec d'autres protéines (TGF-β, IGF-1R) dispose de plus de potentiel qu'un simple peptide.

Des études sur la loge antérieure (TA + EDL) ont également été réalisées et, suite à l'injection de 25 µg mDCN dans le TAG et de 16 µg mDCN dans l'EDLG en présence de 15 µM ZnCl<sub>2</sub>, nous avons constaté, 19 jours post-injection, une augmentation moyenne de la masse

musculaire de 11,5% pour le TA et de 11,9% pour l'EDL, ainsi que des valeurs de Tétanos et de Twitch brutes plus élevées chez les souris *mdx* traitées. Aucune différence n'a été constatée lorsque ces valeurs ont été rapportées au poids du muscle et normalisées. Ces données indiquent que mDCN permet d'augmenter la force absolue mais que cette force, une fois rapportée à la masse du muscle, ne se traduit pas en gain de force sur muscle entier. Il est à noter que la variabilité inter-souris est importante. Il faudrait donc refaire ces études avec plus d'animaux par groupe ; ceci afin de pouvoir véritablement conclure quant à l'effet de la mDCN sur la force.

Des études similaires ont été conduites avec le peptide 31-71 mDCN et aucune différence de force n'a pu être observée. Encore plus inattendu est le fait que, dans cette expérience, aucune augmentation de la masse musculaire n'est observée, ce qui n'est pas en accord avec nos résultats précédents. Ces résultats sont difficiles à interpréter. Nous avons observé, lors d'une étude préliminaire par spectrométrie de masse, que lorsque le peptide est simplement solubilisé dans l'eau, il y a formation de 2 ponts disulfures entre les 4 cystéines. Afin que le zinc puisse interagir avec ces résidus, les ponts disulfures doivent être cassés. Nous pensons que les 2 facteurs qui pourraient expliquer la variabilité dans nos résultats sont l'efficacité avec laquelle se fait la cassure des ponts disulfures puis la formation de la liaison avec le zinc. Il est en tout cas clair qu'avec notre protocole expérimental, nous ne maîtrisons aucun des 2 événements. La formation d'un pont disulfure étant une réaction d'oxydo-réduction réversible dépendante du potentiel rédox du milieu et du pH, des modifications à ces niveaux sont envisageables afin de faciliter la cassure des ponts disulfures et donc la fixation de zinc au niveau des 4 cystéines. La rupture des ponts disulfures entre les cystéines étant une dénaturation chimique, l'utilisation d'agents réducteurs porteurs de fonctions thiol (-SH) tels que le 2-mercaptoéthanol et le dithiothréitol ou le recours à des réducteurs non-thiolés tels que le TCEP (Tris (2-carboxyethyl) phosphine) est à envisager.

- **Décorine et amélioration de la prise de greffe**

Le potentiel thérapeutique de la protéine décorine a été également exploré lors d'études de transplantation cellulaire. A la suite des travaux de J. Tremblay ayant démontré qu'il était possible d'améliorer la transplantation de myoblastes en bloquant l'activité de la myostatine par la follistatine [360, 361] ou l'utilisation de récepteurs Activin IIB modifiés [358, 359], nous avons souhaité vérifier si la décorine permettait d'améliorer l'efficacité de la prise de greffe de myoblastes. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules musculaires précurseurs MYO-B6 exprimant le gène rapporteur mSeAP [362]. Le niveau de mSeAP circulant étant corrélé au nombre de cellules transplantées, il nous a ainsi été possible de comparer l'efficacité de prise de greffe entre les différents groupes de souris *mdx* impliqués dans l'étude. Nous avons observé que les souris *mdx* ayant reçu 25 µg de mDCN 6 jours avant injection des cellules MYO-B6 ont fait état, 4 jours après injection des cellules MYO-B6 (10

jours de traitement à la mDCN), d'une quantité de mSeAP et donc d'une efficacité de survie 4,5 fois supérieure à celle des souris témoins. Ces résultats indiquent que la décorine semble favoriser la survie cellulaire pendant 1 semaine. 14 jours après injection des cellules MYO-B6, les niveaux de mSeAP observés sont similaires dans le groupe témoin et dans le groupe DCN. Une des questions à élucider est de savoir si une ré-administration quelques jours après injection des cellules pourrait maintenir la prise de greffe à un taux élevé. Il faut tout de même préciser ici que cette étude préliminaire n'a pas pu être confirmée faute de cellules. Néanmoins, ces premiers résultats laissent entrevoir un possible champ d'application de la décorine en qualité de candidat dans l'amélioration de l'efficacité de transplantation de cellules MPCs.

- **La famille des SLRPs : de nouveaux candidats potentiels**

Les récents travaux de Miura et al. ont démontré qu'en présence de zinc, la fibromoduline, un SLRP de classe II, liait la myostatine avec une affinité encore plus importante que la décorine, alors que le kératocan et le biglycan ne présentaient pas cette propriété [327]. Ces travaux nous ont poussé à étudier le potentiel d'inhibition de l'activité de la MSTN d'autres membres de la famille des SLRPs.

Nous avons ainsi observé, à l'aide d'essais pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc, qu'un peptide dérivé de la fibromoduline, permettait d'inhiber l'activité de la myostatine. L'inhibition dose dépendante observée a été notée comme très efficace puisque 5 µg de peptide 69-101 Fmod présentent l'efficacité de répression observée avec 50 µg de peptide 31-71 mDCN. Un test pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc a montré qu'un peptide 69-101 Fmod muté ne permettait aucune inhibition de l'activité de la myostatine. Ceci suggère, comme c'est le cas avec le peptide décorine, que les cystéines jouent un rôle important dans l'interaction fibromoduline - myostatine en liant le zinc. Nous avons également procédé à des études Elisa permettant de rendre compte de l'interaction directe entre le peptide 69-101 Fmod et la myostatine. Des études *in vivo*, conduites chez la souris *mdx*, ont démontré qu'un traitement de 18 jours avec 50 µg de peptide 69-101 Fmod conduisait à une augmentation de la masse musculaire de l'ordre de 13%. Les résultats *in vivo* semblent indiquer que le peptide fibromoduline 69-101 est bien capable d'augmenter la masse musculaire suite à un traitement de 20 jours. Cependant, de plus amples études se doivent d'être menées afin de confirmer ces résultats et pour préciser les effets induits.

Les peptides 30-62 mLumican et 69-94 mPRELP ont également été montrés comme ayant la capacité de réprimer l'activité *in vitro* de la myostatine, au contraire du peptide 54-86 bBiglycan. Alors que la décorine et le biglycan sont les 2 SLRPs les plus proches en termes d'identité (57%), il peut paraître surprenant que la décorine interagisse avec la myostatine

alors que le biglycan ne présente pas cette capacité. Cette différence de fonctionnalité peut s'expliquer par une localisation spatiotemporelle différente et des fonctions *in vivo* distinctes. Nos résultats, ainsi que ceux de Mirua et al., montrent que différents membres de la famille des SLRPs sont capables d'interagir avec la myostatine. Il reste à déterminer le rôle exact de ces interactions au niveau musculaire. Afin d'identifier la structure responsable de l'interaction avec la myostatine, il serait important de déterminer la structure des peptides mDCN, Fmod et lumican en présence ou non de zinc.

- **Approches de transferts de gènes**

En marge de nos études d'approches anti-myostatine par protéine recombinante et peptides, nous avons également développé des stratégies anti-MSTN basées sur le transfert non viral et viral de gènes. Les études *in vivo* chez la souris *mdx* avec une protéine myostatine tronquée (25 µg) ont permis d'obtenir, 19 jours après injection, une augmentation de la masse musculaire de 20% consécutive à une hyperplasie (+23-28%) et à une hypertrophie de l'ordre de 14-22%. Nous avons ensuite muté le 3<sup>ième</sup> site de clivage de la myostatine pour créer la construction pGG2-MSTN tronquée/Propeptide muté dans l'optique d'obtenir un double effet par la myostatine tronquée et par le propeptide muté. Suite au traitement de 18 jours, une hyperplasie de 10% et une hypertrophie proche de 21% furent constatées. Ces résultats préliminaires obtenus sur un faible nombre de souris ne semblent pas indiquer d'effet synergique entre la stratégie myostatine tronquée et propeptide muté. Afin d'obtenir potentiellement un effet cumulatif, il faudrait générer un vecteur comprenant 2 promoteurs (ou un IRES) permettant la synthèse indépendante du propeptide muté et de la forme tronquée de la myostatine mature.

Une construction basée sur la décorine fut également développée et étudiée chez la souris *mdx*. Après 18 jours de traitement, une augmentation de la masse totale de 14% fut constatée (contre 9% pour la souris témoin) et une prise de poids du muscle injecté de l'ordre de 18% (0,7% chez la souris témoin). Cette augmentation de la masse musculaire fut montrée comme consécutive à une hypertrophie de 21% et une hyperplasie de 6,6%. Comme lors de nos études avec la protéine recombinante ou les peptides décorine dérivés, nous avons noté une importante variabilité. Une étude *in vivo* regroupant un plus grand nombre de souris *mdx* permettrait de mieux caractériser l'effet de l'approche anti-MSTN pGG2-mDCN sur la croissance musculaire de ces souris.

A la vue de ces résultats préliminaires, nous avons décidé de générer des AAV1 avec les vecteurs MSTN tronquée et mDCN. Des essais pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc ont montré que l'AAV1-MSTN tronquée et l'AAV1-mDCN permettaient de réprimer de façon dose dépendante la myostatine. Un protocole *in vivo* regroupant 11 souris *mdx* de 6 semaines fut alors conduit et démontra que ces 2 stratégies virales permettaient une hyperplasie et/ou une

hypertrophie des fibres musculaires dans le muscle tibialis antérieur. Nous avons également noté une augmentation significative du muscle cardiaque et que l'effet des 2 approches AAV ne semblait pas se limiter au muscle injecté puisque tous les quadriceps de la patte dont le TAG a été injecté ont vu leur masse augmenter. Cette première étude, conduite sur un faible nombre de souris, nous laisse à penser que ces approches anti-myostatine sont prometteuses. De plus amples études regroupant un plus grand nombre de souris devraient nous permettre de mieux définir l'efficacité de ces 2 stratégies.

Au cours de ce Doctorat, nous avons donc pu confirmer les résultats de Miura et al. et de Sato et al., en vérifiant que la décorine, 1) permettait *in vitro*, d'inhiber l'activité de la myostatine et 2) induisait *in vivo*, une croissance musculaire chez la souris dystrophique par hypertrophie/hyperplasie musculaire médiée par la phosphorylation des kinases Akt et GSK-3 $\beta$ . Néanmoins, à l'exception d'une amélioration de la résistance membranaire, aucun surplus de force ne fut constaté. En nous basant sur les études de Yang et al. et de Dungan et al., nous avons également pu identifier un segment minimal 42-71 du domaine N-terminal de la décorine gardant intact l'activité de répression de la MSTN. Ce domaine, représentant le site d'interaction entre la décorine et la myostatine, montrée comme directe et ne se limitant pas à une seule action indirecte sur la myostatine via la follistatine, présente une activité de liaison au Zn<sup>2+</sup> qui est indispensable à la relation DCN - MSTN. Ce segment contient un cluster de 4 cystéines que nous avons décrit comme nécessaire pour observer une interaction décorine – myostatine. D'autres membres de la famille des SLRPs, tels que la fibromoduline ou le lumican, ont également été identifiés comme pouvant se lier à la myostatine. Bien que de nombreuses études restent à mener, comme par exemple sur les potentiels autres ligands de la décorine (tels que l'activine), nos travaux présentent la décorine et certains membres la famille des SLRPs comme disposant d'un potentiel thérapeutique pour le traitement de maladies - ou d'états - nécessitant une augmentation de la masse musculaire.

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 1. Biologie cellulaire

### 1.1 Cellules et conditions de cultures

Les cellules embryonnaires humaines de rein (clone 293) HEK-293 ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) et cultivées dans le milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, #31966-021 Gluta Max I <sup>TM</sup>) (CAMBREX) complémenté avec 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (5 mg/mL) et de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF de HyClone). Les cellules HEK-293T présentant l'antigène T de SV40 (Simian Vacuolating Virus 40 TAg) ont également été cultivées dans les mêmes conditions. Ces cellules permettent la réplication épisomale de plasmides transfectés contenant l'origine de réplication SV40 et ainsi une expression temporelle plus importante des produits géniques désirés.

Les myoblastes murins C2C12 ont été obtenus auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC) et cultivés dans un milieu DMEM contenant 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (5 mg/mL) et 10 % (v/v) de SVF HyClone. Les myotubes ont été obtenus par remplacement du milieu de culture des myoblastes par un milieu de différenciation (DMEM complémenté avec de la pénicilline/streptomycine (5 mg/mL) et 3 % (v/v) de sérum de cheval (Horse Serum Donor Herd, Gibco INVITROGEN).

Les différentes lignées cellulaires H3K-293 et C2C12 sont entretenues en culture en utilisant des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> ventilées et incubées dans une enceinte thermostatée à 37°C, dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Le passage des cellules est réalisé tous les 3 jours sous atmosphère ventilée (hotte à flux laminaire) comme décrit ci-après : les cellules sont lavées au PBS (Phosphate Buffered Saline sans Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>) puis décollées à l'aide d'une solution de trypsine (0,5 g/l) contenant de l'EDTA (acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique à 0,2 g/l) et réensemencées dans une nouvelle boîte de 75 cm<sup>2</sup> contenant du milieu de culture frais. La quantité de cellules à ensemercer est calculée pour assurer une reprise rapide de la croissance ainsi que pour éviter l'obtention d'une culture à confluence avant le passage suivant, assurant ainsi le maintien en permanence de toute la population cellulaire en phase exponentielle de croissance.

Les cellules MPCs (Myogenic Progenitor Cells) MYO-B6 nous ont été données par David Israéli (Genethon). Ces cellules ont été obtenues par trypsination sélective et marquages desmine et par double infection avec un vecteur viral mSeAP. Les myoblastes ayant la particularité de mal adhérer, de la gélatine 2% est utilisée dans le but d'obtenir une meilleure adhérence des cellules sur le support, afin de recréer les conditions naturelles et les enchevêtrements permettant aux cellules MYO-B6 de bien se développer et de bien se diviser. Ainsi, un jour avant l'ensemencement, 5 ml de gélatine sont déposés dans une boîte de 75 cm<sup>2</sup> qui recevra les cellules MYO-B6. Les cellules MYO-B6 sont cultivées dans un milieu DMEM

50%, Ham F12 50% (Gibco BRL, #31767-027 Gluta Max I<sup>TM</sup>), Gentamicine (10 µg/ml) Ultrosor SF à 2% final (BiopSeptra, #12039-012) et SVF à 20% final, filtré sur filtre de cellulose 0.22 µm et conservé à 4°C au maximum 1 mois à l'abri de la lumière.

## 1.2 Dosage des activités biologiques

### 1.2.1 Dosage luciférase

Le dosage de la luciférase est basé sur une réaction enzymatique chimio-luminescente de cette enzyme avec son substrat conduisant à une émission de photons qui est proportionnelle à l'activité de l'enzyme. Le milieu de chaque puits des plaques 24 puits est aspiré et 200 µl de **tampon de lyse** sont ajoutés dans chaque puits. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules lysées sont récoltées et placées dans un tube eppendorf de 1,5 ml. Une centrifugation de 10 minutes à 14 000 RPM et 4°C est ensuite effectuée afin de sédimenter les débris cellulaires. Le dosage est réalisé dans une plaque 96 puits blanche opaque dans laquelle sont déposés un aliquot de 10 µl de chaque lysat cellulaire. L'activité luciférase est mesurée avec un luminomètre (VICTOR<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer life sciences) traitant de manière automatisée et séquentielle chaque puits en ajoutant 50 µl de **tampon essai** puis 50 µl de substrat de la firefly luciférase (la luciférine). La mesure de l'émission de photons (RLU) se fait sur 10 secondes. Les mesures sont normalisées par un dosage protéique de chaque échantillon par la méthode de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) et exprimées en RLU/10 sec/mg (ou µg) de protéine.

#### Composition des tampons :

- **Tampon d'essai** : 25 mM Tris-phosphate, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (Dithiothréitol), 1 mM EDTA, 15 % Glycérol, pH 7,8 et 2 mM d'ATP ajouté extemporanément le jour du test. Conservation à -20°C.

- **Tampon de lyse** : Tampon d'essai sans ATP et supplémenté de détergent Triton X-100 à 1 %. Conservation à -20°C.

### 1.2.2 Dosage protéique

Le dosage des protéines est réalisé grâce au test colorimétrique de Bradford. Le réactif du dosage (Biorad Protein Assay) forme un complexe stable de coloration bleue en présence de protéines qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 595 nm. Le réactif du dosage est préalablement dilué au cinquième dans de l'eau. La réaction est réalisée en plaque transparente de 96 puits et, par puits, 2 µl de lysat cellulaire sont ajoutés à 198 µl de réactif. En parallèle, une gamme de BSA (Bovine Serum Albumine, Biolabs, #B9001S) de 0 à 20 µg/ml est réalisée, ainsi qu'un contrôle avec 2 µl de tampon de lyse. La DO (densité optique)

obtenue avec les 2 µl de tampon de lyse est retranchée à toutes les mesures de DO des lysats. La concentration en protéines des lysats est calculée à partir de la courbe étalon (concentration de la gamme de BSA en fonction de la DO) et les résultats obtenus sont exprimés en mg de protéines totales du lysat. Les résultats des tests luciférase sont alors rapportés aux quantités totales de protéines correspondantes et sont exprimés en RLU/10 s/mg (ou µg) de protéine.

### 1.2.3 Dosage de la mSeAP

L'activité enzymatique de la mSeAP (*Phosphatase alcaline sécrétée murine*) dans un plasma est quantifiée par une réaction chimioluminescente. 25 µl de chaque échantillon sont dilués dans 75 µl de **tampon de dilution** 1X puis les phosphatases alcalines endogènes sont inactivées par une incubation à 65°C pendant 5 minutes pour un plasma, ou pendant 30 minutes pour un milieu conditionné ou un lysat tissulaire. L'activité de la mSeAP thermorésistante est alors quantifiée avec un luminomètre (Perkin Elmer, Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel counter) en plaque blanche 96 puits (50 µl de la dilution de l'échantillon) après l'ajout du **tampon réactionnel** (50 µl) et du substrat CSPD (50 µl, kit Phosphalight, Applied Biosystems). La concentration des échantillons est exprimée en ng/ml à l'aide d'une gamme étalon de phosphatase alcaline placentale humaine purifiée (kit Phosphalight).

#### Composition des tampons :

- **Tampon de dilution** : Tris-HCl 0,05 M ; NaCl 150 mM ; pH 7,4.
- **Tampon réactionnel** : Diéthanolamine 2M ; MgCl<sub>2</sub> 2 mM ; L-homoarginine 20 mM.

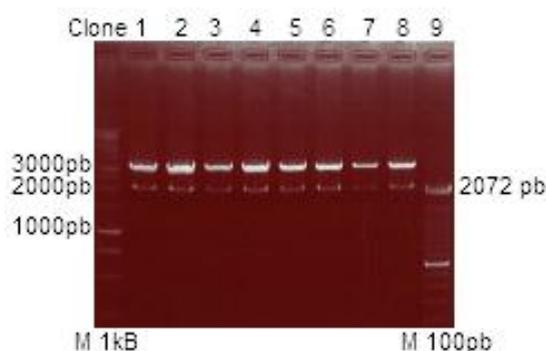
## 1.3 Evaluation *in vitro* de l'activité anti-myostatine

### 1.3.1 Cassette d'expression pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc

La construction plasmidique pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-firefly luciférase (notée pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc) obtenue du Pr. Carl-Henrik Heldin (Ludwig Institute for Cancer Research, Suède) contient 12 copies CAGA de la séquence consensus SBE (Smad Binding Element) et permet indirectement de mesurer la liaison de la myostatine à son récepteur [52]. En effet, lorsque la myostatine se fixe au récepteur Activine IIB, les protéines Smad 3 et 4 sont activées et vont se lier aux 12 copies CAGA. Le promoteur de la cassette pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc est ainsi activé, ce qui se traduit par une production de luciférase (Fig. 72A). La liaison myostatine/Activine IIB peut donc être suivie en dosant la luciférase. En conséquence, cet essai peut aussi être utilisé pour mettre en évidence la capacité d'un composé – protéine, peptide ou autre – à empêcher la myostatine à se lier à son récepteur (Fig. 72B).

### 1.3.2 Production de pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc

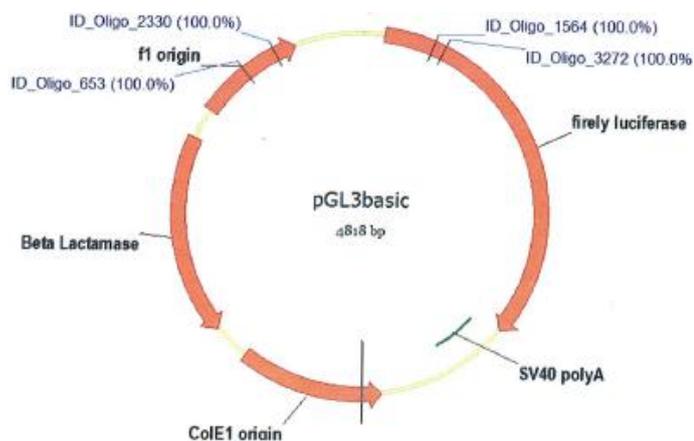
Afin de produire en quantité suffisante cette construction, le plasmide pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc a été transformé dans des bactéries E. coli Top 10. Les clones obtenus ont été repiqués et des mini-préparations (NucleoSpin Plasmid Quick Pure, Machery-Nagel) ont été réalisées. Cette construction de 4818 pb a des sites de restriction uniques pour les enzymes HindIII (pb 54) et BamH1 (pb 2005) (Fig. 140). Une double digestion a été effectuée afin de vérifier la présence de l'insert (CAGA)<sub>12</sub>. Une bande de 1951 pb (2005 - 54) et une bande de 2867 pb (4818 - 1951) qui sont attendues ont effectivement été obtenues (Fig. 139).



**Figure 139** : Digestions contrôles (HindIII/BamH1) de 8 clones pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc.

Suite à la validation des clones par digestion enzymatique, un séquençage a été réalisé afin de valider complètement la construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc. Les quatre oligonucléotides décrits ci-dessous entourant les copies CAGA ont été utilisés :

- Oligonucléotide IDo 653/IDt : gATggTTCACgTAgTggg
- Oligonucléotide IDo 2330/IDt : TTgCCgATTTCggCCTATTg
- Oligonucléotide IDo 1564/IDt : TTCTgTgATTTgTATTCAgCCC
- Oligonucléotide IDo 3272/IDt : CAACACCggCATAAAgAATTg



**Figure 140** : Oligonucléotides utilisés pour le séquençage de la construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc.

La construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc ayant été validée par séquençage, une maxi-préparation a été réalisée à l'aide du kit NucleoBond PC2000 (Machery-Nagel) afin d'obtenir un stock important de plasmides.

### 1.3.3 Liste des protéines et peptides utilisés lors des études pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc

- Myostatine murine recombinante (MSTN)
  - #788-G8/CF, R&D Systems
  - 10 µg repris dans 100 µl NaCl 150 mM stérile et 4 mM HCl
  - Conservation à -80°C
  
- Décorine murine (mDCN)
  - #1060-DE, R&D Systems
  - 100 µg dissout dans 100 µl NaCl 150 mM stérile +/- 6 µl ZnCl<sub>2</sub> 250 mM
  - Conservation à -20°C
  
- Peptide 31-71 mDCN :
  - DEASGIIPYDPDNPLISMCPYRCQCHLRVVQCSDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>
  - 7 mg repris dans 3,5 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide 31-61 mDCN :
  - DEASGIIPYDPDNPLISMCPYRCQCHLRVVQ-CONH<sub>2</sub>
  - 2 mg dissout dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide 42-71 mDCN :
  - DNPLISMCPYRCQCHLRVVQCSDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>
  - 2 mg dissout dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide 31-71 mDCN muté :
  - DEASGIIPYDPDNPLISMCPYRAQAHLRVVQASDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>
  - 4,8 mg dissout dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide 31-71 hDCN :
  - IGPEVPDDRDFEPSLGPVCPFRCQCHLRVVQCSDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>
  - 5 mg repris dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide 69-101 mFibromoduline :
  - PPPEPRDCPQECDCPPNFPTAMYCDNRNLKYLP-CONH<sub>2</sub>
  - 5.6 µg dissout dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.

- Peptide 69-101 mFibromoduline mutée :
  - PPPEPRDCPQEADAPPNFPTAMYADNRNLKYLP-CONH<sub>2</sub>
  - 4 µg dissout dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide 62-94 mPRELP :
  - PPSVFPDCPRECYCPPDFPSALYCDNRNLRRVP-CONH<sub>2</sub>
  - 5 µg repris dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide 30-62 mLumican :
  - YGQISPNCAPCNCPHSYPTAMYCDDLKLSVP-CONH<sub>2</sub>
  - 5 µg repris dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide 54-86 bBiglycan :
  - DSLPPTYSAMCPFGCHCHLRVQQSDLGLKAVP-CONH<sub>2</sub>
  - 4 µg repris dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.

A noter que tous les peptides ont été synthétisés par la société Genecust et ils ont tous été stockés à -20°C.

#### 1.3.4 Etude *in vitro* de l'inhibition de la Myostatine

La capacité de la décorine, et de l'ensemble des peptides précédemment décrits, à inhiber l'activité *in vitro* de la myostatine a été évaluée sur des cellules humaines embryonnaires rénales 293T au moyen de la construction pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc. Pour cela, 350 000 cellules 293T ont été déposées par puits dans une plaque 24 puits. Après 24 h de culture, les cellules ont été transfectées avec un mélange de 8 µl de PEI (PEI 25 kDa; Sigma) et de 2 µg de plasmide pGL3-(CAGA)<sub>12</sub>-Luc/puits. A noter que toutes les expériences de transfection ont été réalisées en duplicat. Vingt-quatre heures après transfection, 2,5 nM de myostatine murine recombinante mélangée ou non à différentes quantités de décorine ou de peptides dérivés ont été ajoutés dans chaque puits. Une incubation préalable de 30 minutes à 37°C a été réalisée pour les conditions regroupant myostatine et l'inhibiteur potentiel. Cette pré-incubation a – sauf indications contraires – toujours été réalisée en présence de 15 µM de ZnCl<sub>2</sub> (Sigma, #231-592-0). Vingt-quatre heures après incubation, les cellules ont été lysées, puis récoltées afin de doser l'activité de la luciférase et la quantité de protéine.

#### 1.3.5 Mise en évidence de la liaison MSTN/peptides DCN et MSTN/peptides Fmod

Le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est un test destiné à détecter et/ou doser une protéine présente dans un liquide biologique. Dans la technique de dosage dite "en sandwich", les puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée « coating », l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits par interaction électrostatique. L'anticorps de capture assure la spécificité du test. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits de la microplaque et, si l'antigène recherché est présent, il va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture. Un deuxième anticorps, l'anticorps traceur, capable de se lier à l'antigène capturé, est alors ajouté dans le puits et les anticorps traceurs non fixés sont éliminés par rinçage. L'anticorps traceur est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré.

Nous avons utilisé le principe de cette technique pour étudier l'interaction directe de la myostatine mature avec les peptides 31-71 mDCN Biotine, 31-71 mDCN Biotine mutée, 69-101 Fmod Biotine et 69-101 Fmod Biotine mutée. Pour cela, 3 µl de myostatine à la concentration de 100 ng/µl sont repris dans 50 µl de **tampon carbonate** et déposés dans chaque puits de la plaque de dosage (R&D Systems, DY990). Après une incubation d'une nuit à 4°C, la plaque est lavée avec 100 µl de PBS-tween (Tween 20 à 0,05 %) puis l'étape de blocage permettant de saturer les sites non spécifiques est réalisée pendant 2 heures à température ambiante avec 100 µl de PBS et 6 % de lait par puits. Cinq lavages successifs avec 200 µl de PBS-tween (Tween 20 à 0,05 %) sont effectués et des quantités croissantes de peptides décorine ou fibromoduline biotinylés sont ensuite déposées (100 µl final dans du PBS) et la plaque est incubée durant 1 heure à 37°C. Pour le contrôle positif, nous avons utilisé un anticorps de chèvre anti-myostatine ( $\neq$ AF788, R&D Systems) qui a été déposé dans les puits contrôles et incubé 1 heure au 1/100<sup>ième</sup> (concentration de 0,1 mg/ml). Les puits ont ensuite été lavés 5 fois avec du PBS-tween (Tween 20 à 0,05 %). Pour détecter la liaison des peptides biotinylés à la MSTN, nous avons ensuite ajouté dans les puits de la streptavidine-HRP ( $\neq$ N100, Pierce) qui a été utilisée au 1/20 000<sup>ième</sup>. Pour les points contrôles avec l'anticorps de chèvre anti-myostatine, nous avons ajouté (au 1/4000<sup>ième</sup>) un anticorps secondaire polyclonal d'âne anti-chèvre marqué à la HRP ( $\neq$ ab6885, Abcam). Après 5 lavages, l'ajout du substrat de la peroxydase, le TMB Substrate Reagent Set (Tétraméthylbenzidine, OptEIA,  $\neq$ 555214), permet l'obtention d'une réaction colorée proportionnelle à la quantité de HRP présente dans le puits. La réaction est stoppée au bout de 20 minutes par ajout d'acide sulfurique 2N puis la plaque est lue à 450 nm sur un spectrophotomètre Discovery HT-R (Bio-TEK).

#### Composition du tampon :

- **Tampon carbonate 0,1 M** : 4,2 g NaHCO<sub>3</sub>, 1,78 g de Na<sub>2</sub>CO dans 500 ml d'H<sub>2</sub>O MilliQ, pH 9,5. Conservation à 4°C.

### Séquences des peptides biotinylés :

- Peptide Biotine- 31-71 mDCN
  - Biotine-DEASGIIPYDPDNPLISMCPYRCQCHLRVVQCSDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>
  - 5,5 mg reconstitués dans 3,5 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide Biotine- 31-71 mDCN mutée
  - Biotine-DEASGIIPYDPDNPLISMCPYRAQAHLRVVQASDLGLDKVP-CONH<sub>2</sub>
  - 2,3 mg reconstitués dans 3,5 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide Biotine- 69-101 mFibromoduline
  - Biotine-PPPEPRDCPQECDCPPNFPTAMYCDNRNLKYLP- CONH<sub>2</sub>
  - 5,3 mg reconstitués dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.
  
- Peptide Biotine- 69-101 mFibromoduline mutée
  - Biotine-PPPEPRDCPQEADAPPNFPTAMYADNRNLKYLP- CONH<sub>2</sub>
  - 2,3 mg reconstitués dans 2 ml NaCl 150 mM stérile.

Ces peptides, synthétisés par la société Genecust, ont été conservés à -20°C.

#### 1.3.6 Etude par Western blot de l'activation de la voie Akt/GSK

Le Western Blot est une méthode permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Afin d'étudier les effets d'une activation ou inactivation de la myostatine sur les protéines impliquées dans la voie de signalisation Akt/GSK, une étude par Western Blot a été réalisée.

200 000 myoblastes C2C12 dans 1 ml de DMEM 10% SVF + PS sont déposés par puits dans une plaque 24 puits et placés à 37°C pendant 5 jours. Lorsque la confluence cellulaire est proche de 90%, le milieu cellulaire est retiré et la différenciation est induite par l'ajout de 1 ml de milieu DMEM + 3% sérum de cheval + PS. Une fois les cellules C2C12 différenciées, le milieu est aspiré et 100 ng de MSTN dans 1 ml DMEM + 3% sérum de cheval + PS sont ajoutés dans un puits pendant 3 h (puits 1) ou 24 h (puits 2). 30 µg de mDCN dans 1 ml de DMEM + 3% sérum de cheval 10% PS sont ajoutés dans un autre puits pendant 10 minutes (puits 3) ou 24 h (puits 4). Des points contrôles à 10 minutes et 24 h ne recevant pas de myostatine ni de décorine ont également été réalisés. Une étude similaire a été réalisée sur cellules C2C12 non différenciées (myoblastes). Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites ci-dessus.

A la fin de l'expérience une lyse cellulaire de 15 minutes a été effectuée. Le tampon de lyse contient 2,5 mM de sodium orthovanadate (BioLabs, #P0758S) permettant d'inactiver les phosphatases et ainsi de préserver les formes phosphorylées d'Akt et de GSK. Les cellules sont récoltées dans un tube eppendorf de 1,5 ml et centrifugées à 14 000 RPM pendant 10 minutes à 4°C. Un dosage protéique (BioRad Protein Assay) est effectué et une quantité équivalente de protéines (25 µg) de chaque échantillon est déposée dans un gel 4-15% Tris glycine/sulfate-polyacrylamide (Bio-Rad, #161-1104). Les protéines sont séparées par électrophorèse et transférées 2 h à 40 V en chambre froide sur une membrane de nitrocellulose. Un blocage de la membrane est ensuite réalisé, une nuit sous agitation à 4°C, afin de saturer les sites non spécifiques. Les anticorps primaires PhosphoPlus® AKT (Ser473) Duet (Cell Signaling, #8200), PhosphoPlus® GSK-β (Ser9) Duet (Cell Signaling, #8213) sont incubés 1 heure à la concentration de 1:2000. Suite à 4 lavages PBS/Tween 0,1% de 20 minutes chacun, les anticorps secondaires anti-lapin IRDye 800 (LI-COR Biosciences, #926-32211) et chèvre anti-souris IRDye 630 (LI-COR Biosciences, #926-32220) sont incubés 1 heure à température ambiante sous agitation à la concentration de 1:10000. La β-actine est utilisée pour la normalisation. La révélation de la membrane est réalisée grâce au logiciel Odyssey V2.1.12.

#### 1.4 Suivi de la prise de greffe par un dosage mSeAP

Afin d'étudier l'effet de la mDécorine sur la prise de greffe de myoblastes murins dans un muscle dystrophique, nous avons utilisé des cellules MYO-B6 qui sont des myoblastes primaires exprimant stablement le gène rapporteur mSeAP (ces cellules ont été infectées par un vecteur rétroviral codant pour le mSeAP) [362]. Les myoblastes primaires adhèrent mal. Afin de remédier à cela, 5 ml de gélatine sont déposés dans une boîte de culture T75 24 h avant ensemencement. Les cellules MYO-B6 sont cultivées dans un milieu composé de 50% de DMEM (Gibco BRL), de 50 % Ham F12 50% (Gibco BRL.), de gentamicine (10 µg/ml), d'Ultroser SF 2% final (BioSeptra. Réf 12039-012) et de 20% de sérum. Ce milieu est filtré à 0,22 µm (MILLIPORE-express plus) et conservé à 4°C au maximum pendant 1 mois.

En vue d'un protocole *in vivo* regroupant 8 souris *mdx* de 7-8 semaines destiné à étudier les effets d'une pré-injection de mDécorine sur la prise de greffe, les cellules MYO-B6 ont été lavées au PBS, décollées à la trypsine, comptées et réparties à hauteur de 200 000 cellules par tube Eppendorf de 1,5 ml dans 25 µl de NaCl 150 mM. Une pré-injection intramusculaire à J-6 de 25 µg de décorine murine a été réalisée chez 4 souris *mdx* de 7-8 semaines (souris 5 à 8). A J0, l'ensemble des 8 souris impliquées dans l'étude, à l'exception de la souris 1 témoin négatif, ont reçu 200 000 cellules MYO-B6 / 25 µl de NaCl 150 mM dans le TAG. Les souris 2-5 ne reçoivent aucune pré-injection à J-6 et aucune injection de décorine murine à J0.

Des prélèvements sanguins au niveau du sinus rétro-orbitaire à l'aide d'un capillaire hépariné ont été réalisés à J-6, J0, J4, J7 et J14 sur toutes les souris anesthésiées. Les plasmas ont ensuite été centrifugés à 8000 RPM pendant 3 minutes à 4°C et le surnageant ainsi récupéré a été placé à 4°C en vue d'un dosage mSeAP réalisé comme précédemment décrit.

## 2. Biologie moléculaire : Plasmides et AAV

### 2.1 Broyage, extraction, purification et transcription reverse

Afin de réaliser la construction des cassettes pGG2-mMyostatine tronquée, pGG2-mMyostatine tronquée avec propeptide muté et pGG2-mDCN, un quadriceps de souris C57BL/10ScSn a été prélevé puis congelé dans de l'azote liquide.

- Broyage du muscle

Le muscle est placé dans un tube à extraction (#6910-500, Lysing Matrix, MP Biomedicals) et 1 ml de tampon de lyse décrit pas 171 est ajouté. Le broyage se réalise avec la machine FastPrep FP 120 (MP Biomedicals) (Fig. 141) selon les conditions suivantes : vitesse en position 4 pendant 20 secondes. 200 µl de broyat sont alors prélevés et placés dans un tube RNA-free que l'on complète avec 1 ml de trysol. Les échantillons sont conservés à -80°C.



**Figure 141** : FastPrep FP 12.

- Extraction et purification de l'ARN

Suite au broyage du muscle, une extraction de l'ARN est réalisée. Une première phase de séparation s'effectue avec l'addition de 200 µl de chloroforme, suivie d'une centrifugation à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase supérieure (0,65 ml) correspond à l'ARN. Ce dernier est précipité à l'aide de 500 µl d'isopropanol (Propanol-2). Après centrifugation à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C, on ajoute 0,5 ml d'éthanol 75 % sur le culot. Une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C est suivie du séchage du culot d'ARN. On réalise ensuite un traitement de l'ARN à la DNase (≠1906, Kit AMBION : DNA-free (Dnase treatment and removal reagents)) afin d'obtenir un ARN total purifié.

- Transcription réverse

500 ng d'ARN purifiés sont utilisés dans un volume total de 11 µl (QSP H2O MQ). Le mélange utilisé pour effectuer la transcription réverse (« MIX RT ») est le suivant :

	<b>Volume en µl</b>
5X DNA Synthesis Buffer	4
dNTP Mix	2
DNA Primers (1/3) 1 = Anchored Oligo-dT , 3 = Random Hexamers	1
RT Enhancer	1
Verso Enzyme Mix	1

**Tableau 30:** Mix reverse transcriptase.

Les 8 µl de MIX RT sont ajoutés à 11 µl d'échantillon, vortexés et centrifugés rapidement à la centrifugeuse de paillasse (Micro Centrifuge Model SD 220 VAC). Un contrôle négatif est effectué en utilisant 1 µl d'H<sub>2</sub>O MQ au lieu du microlitre de Verso Enzyme (≠AB-1453/B, Verso cDNA Kit, Thermo Scientific).

Voici les cycles de la RT (durée = 32 min) :

- Synthèse de cDNA: 42°C pendant 30 minutes
- Inactivation : 95°C pendant 2 minutes

Les échantillons d'ADNc total obtenus ont été conservés à -80°C.

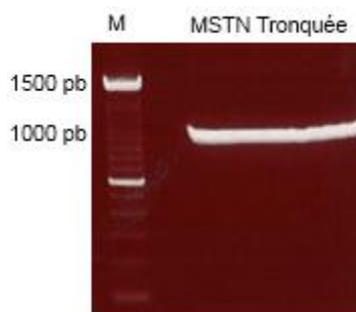
## 2.2 La cassette pGG2 - mMSTN tronquée

Une des approches anti-myostatine que nous avons développée a consisté à utiliser une myostatine tronquée - amputée de 81 pb (27 aa) au niveau de la partie C-terminale. Pour obtenir cette cassette d'expression, nous avons réalisé les étapes décrites ci-dessous.

### 2.2.1 Clonage de la mMSTN tronquée dans le vecteur intermédiaire pCR2.1 Topo

- PCR de la mMSTN tronquée :

Afin de réaliser la construction, l'ADNc de la myostatine a été généré par PCR à partir de l'ADNc total. La réaction de polymérisation a été effectuée dans un volume final de 50  $\mu$ l comprenant l'ADNc total (20 ng), des dNTP (25 mM), les deux amorces spécifiques utilisées à 10  $\mu$ M : M13F (Seq : 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') et MSTN 350 Stop-as (5'-TTAATTAATGGGAGACATTTTTGTCTCGGA-3'), du tampon et 2,5 unités de Taq Polymérase Fusion ( $\neq$ F-530L Phusion DNA polymerase, FINNZYMES). Le mélange est porté à une température de 98°C afin de dénaturer l'ADN. Une hybridation des amorces sur l'ADN (52°C) et une élongation à 72°C sont ensuite opérées. Cette PCR génère une myostatine murine délétée de 81 pb (soit 27 aa) sur la région C-terminale. L'ADN mMSTN tronquée (1049 pb) amplifié a ensuite été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (Fig. 142) et une purification de l'insert mMSTN tronquée a été réalisée à l'aide du kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel).

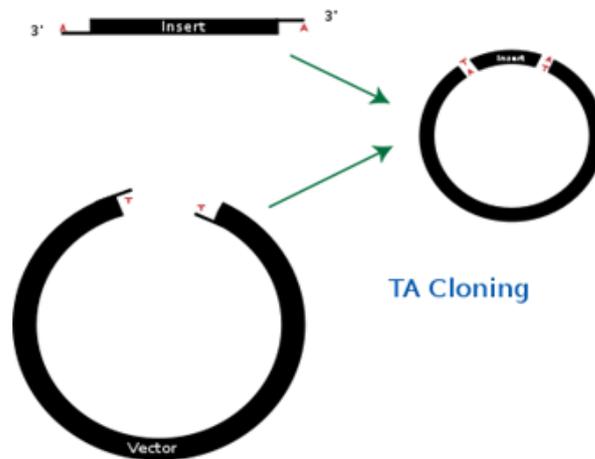


**Figure 142** : Résultat de la migration électrophorétique de la mMSTN tronquée.

- TA Cloning : Obtention de la cassette pCR2.1-MSTN tronquée

40  $\mu$ l du produit de PCR mMSTN tronquée ont été mélangés avec 1  $\mu$ l de AmpliTaq® DNA Polymerase (5U/ $\mu$ l, Applied Biosystems, N8080155) et 100  $\mu$ M ATP. L'ensemble de la réaction est incubé 20 minutes à 72°C. L'ajout d'ATP permet d'obtenir un insert mMSTN

tronquée présentant une adénosine aux extrémités 3' ; ceci permet ensuite une intégration aisée dans le vecteur pCR2.1 Topo (≠45-0245, Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen), ce dernier présentant une thymidine à ses extrémités 5' (Fig. 143).



**Figure 143** : Principe du « TA Cloning ».

Dans un tube eppendorf de 1,5 ml, 4 µl de MSTN tronquée-Adénosine sont mélangés avec 1 µl de solution saline et 1 µl de vecteur pCR2.1-Topo. La réaction est réalisée pendant 5 minutes à température ambiante. Les 6 µl de la réaction sont ensuite mis en présence de bactéries compétentes TOP10 (≠C404003, One Shot Chemically Competent E.Coli, Invitrogen). Une incubation de 5 minutes précède un choc thermique (42°C pendant 30 secondes et le tube est ensuite immédiatement placé dans la glace). 250 µl de SOC medium (15544-034, Invitrogen), un milieu enrichi, sont alors directement ajoutés sur les bactéries et le tube est placé à 37°C pendant 1 heure. La totalité de la réaction est ensuite déposée sur une boîte LB Ampicilline qui est placée à l'incubateur (37°C) pendant 16 heures.

- Sélection et mise en culture des clones obtenus

Suite au TA Cloning, 6 colonies ont été sélectionnées et placées chacune dans un tube Falcon de 15 ml contenant 5 ml d'un mélange LB + Ampicilline (100 µg/ml). La présence de l'antibiotique permet de sélectionner les bactéries contenant le vecteur pCR2.1 Topo. Les tubes ont ensuite été placés dans un incubateur/agitateur (37°C) pendant 12-16h.

- Mini-préparation et digestions contrôles

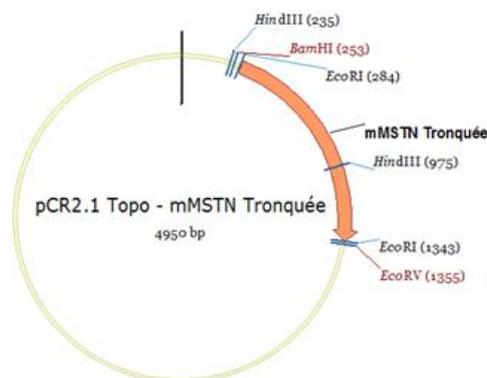
Une mini-préparation de chacun des clones est faite dans le but de récupérer le plasmide pCR2.1-Topo de 3908 pb contenant notre insert de myostatine murine tronquée (1049 pb). Pour cela, le kit NucleoSpin Multi-8 Plus Plasmid (Machery-Nagel) a été utilisé. La culture de nuit de 5 ml en milieu LB + Ampicilline est centrifugée à 14 000 rpm pendant 1 minute. Le

culot est resuspendu dans 250  $\mu$ l de « solution A1 » froide. Les cellules sont lysées dans 250  $\mu$ l de « tampon A2 ». L'ADN génomique est ensuite précipité à l'aide de 300  $\mu$ l de « solution A3 » de neutralisation. Après une centrifugation de 5 minutes à 11 000 rpm, le surnageant est transféré dans une NucleoSpin et centrifugé à 11 000 rpm pendant 1 minute. L'ADN plasmidique double-brin contenu dans le surnageant est ainsi récupéré. Le culot est rincé dans 600  $\mu$ l de « tampon A4 » et, suite à une centrifugation de 3 minutes à 11 000 rpm, resuspendu et élué dans 50  $\mu$ l de « tampon AE ». L'ADN plasmidique ainsi obtenu est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Une mesure de la densité optique (DO) des échantillons est réalisée grâce au Nanodrop ( $\neq$ ND-8000, 8 Sample Spectrophotometer) (Fig. 144).



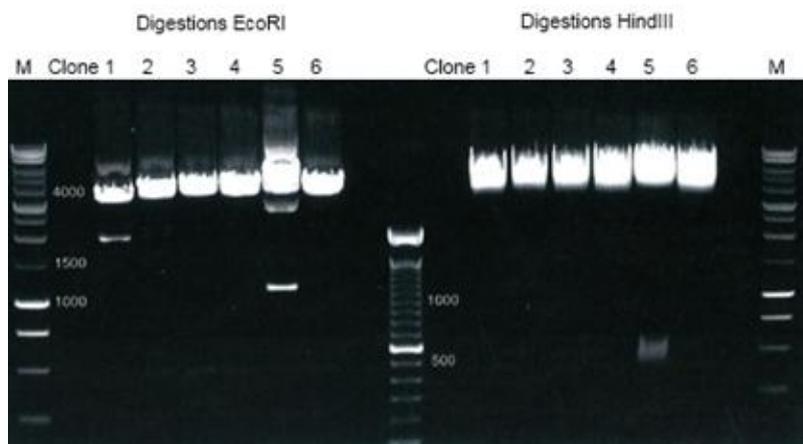
**Figure 144** : Le Nanodrop.

Afin de vérifier la présence de l'insert mMSTN tronquée, une digestion par l'enzyme EcoRI est réalisée. Comme présenté dans la *figure 145*, le vecteur intermédiaire pCR2.1 Topo contient 2 sites de restriction à l'enzyme EcoRI (284 pb et 1343 pb) entourant l'insert de myostatine murine tronquée et un site de restriction unique à l'enzyme HindIII (235 pb). L'insert mMSTN tronquée présente également un site de restriction unique à l'enzyme HindIII (975 pb). Il nous est donc possible, par digestions contrôles, de 1) vérifier la présence de l'insert de mMSTN tronquée avec l'enzyme EcoRI et, 2) déterminer l'orientation de l'insert « mMSTN » (grâce à la digestion avec HindIII).



**Figure 145** : Carte plasmidique (Vector NTI 11) de la construction pCR2.1-Topo mMSTN tronquée.

Pour effectuer les digestions, les conditions suivantes ont été utilisées : 10 µl de mini-préparation de chaque échantillon sont mélangés avec 20 µl du mélange suivant : 4 µl d'enzyme EcoRI (ou HindIII), 22 µl de Tampon N°4 (EcoRI) ou N°2 (HindIII) et 84 µl d'H<sub>2</sub>O MQ. Après mélange au vortex et une courte centrifugation, les tubes sont placés au bain marie (37°C) pendant 1 h. Les résultats de la digestion sont obtenus suite à la migration des échantillons à 100 Volts pendant 1 heure sur un gel d'agarose à 1% (Fig. 146).



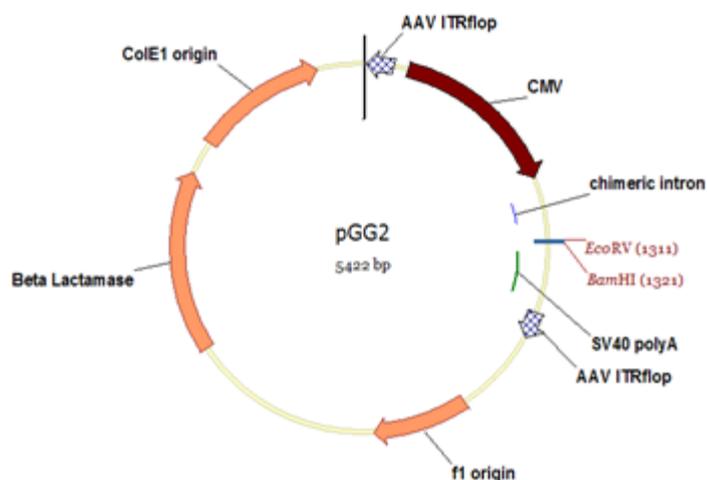
**Figure 146 :** Digestions contrôles de la construction pCR2.1-Topo mMSTN tronquée.

On note que seul le clone 5 présente une bande de l'ordre de 1100 pb (mMSTN tronquée = 1049 pb) suite à la digestion par l'enzyme EcoRI. La digestion par l'enzyme HindIII permet de conclure que l'insert « mMSTN tronquée » est disposé dans le sens 3'-5'. La cassette pCR2.1 Topo - mMSTN tronquée étant une construction intermédiaire servant de base aux constructions pGG2-mMSTN tronquée et pGG2-mMSTN tronquée / propeptide muté, la disposition de l'insert n'a pas d'importance. Un séquençage a ensuite été effectué afin de valider la construction pCR2.1 Topo - mMSTN tronquée.

Une maxi-préparation a été réalisée à l'aide du kit EndoFree Plasmid Mega Kit (5) (#12381, Qiagen) dans le but de préparer de grandes quantités d'ADN plasmidique à partir de la culture bactérienne validée (Clone 5). La séparation de la fraction plasmidique est basée sur le principe de la lyse alcaline des bactéries, qui permet une dissociation relativement aisée entre l'ADN chromosomique bactérien et les petits plasmides de structure circulaire. De plus, la purification est améliorée par la fixation des ADNs sur une résine échangeuse d'anions en présence de faible concentration saline. Cette étape permet une meilleure élimination des contaminants (ARN, protéines). L'ADN plasmidique est élué de la colonne à l'aide d'un tampon salin avant d'être précipité à l'isopropanol, centrifugé, lavé à l'éthanol 70%, séché et finalement re-suspendu dans 500 µl de tampon TE. La concentration en ADN est mesurée par lecture de la densité optique à 260 nm et la pureté est estimée par le rapport des densités optiques 260 et 280 nm. La conformité de l'ADN extrait est vérifiée par digestion enzymatique.

## 2.2.2 Sous clonage de la mMSTN tronquée dans le vecteur final pGG2

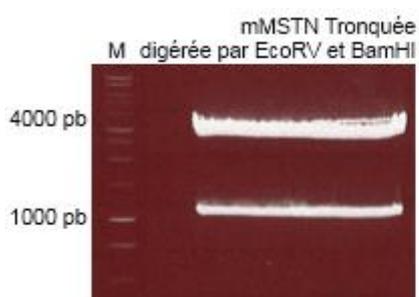
La construction pCR2.1-Topo mMSTN tronquée ayant été validée, le clonage de l'insert mMSTN tronquée dans le vecteur final pGG2 (Fig. 147) est réalisé afin d'obtenir la construction pGG2-mMSTN tronquée.



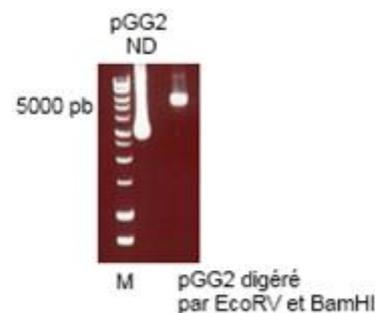
**Figure 147** : Carte plasmidique (Vector NTI 11) du vecteur pGG2.

- Digestions de l'insert mMSTN tronquée et du vecteur pGG2

Comme illustré dans la *figure 147*, le vecteur pGG2 présente un site de restriction unique aux enzymes EcoRV (1311 pb) et BamHI (1321 pb). L'insert mMSTN tronquée est positionné en 3'-5' dans le vecteur pCR2.1 Topo et dispose également de 2 sites de restriction uniques (Fig 145) aux enzymes BamHI (253 pb) et EcoRV (1355 pb). Le choix des 2 enzymes a donc été fait afin de repositionner l'insert de mMSTN tronquée dans le sens 5'-3' une fois intégré au vecteur final pGG2. Une digestion de l'insert mMSTN tronquée est réalisée avec les enzymes EcoRV et BamHI (Fig. 148), permettant de rendre compatibles les extrémités de l'insert pour un clonage dans le vecteur pGG2 digéré par ces 2 mêmes enzymes.



**Figure 148** : Purification de l'insert mMSTN tronquée suite à la digestion par les enzymes EcoRV et BamHI.



**Figure 149** : Digestion du vecteur pGG2 par les enzymes EcoRV et BamHI.

- Déphosphorylation du vecteur pGG2

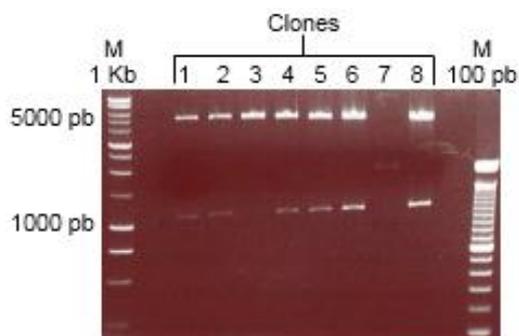
En parallèle, le plasmide pGG2 est également ouvert par EcoRV et BamHI (Fig. 149) puis déphosphorylé par une phosphatase alcaline. 85 µl de vecteur pGG2 sont mélangés avec 2 µl de phosphatase alcaline (qui déphosphoryle les extrémités 5'-phosphate) et 8,5 µl de tampon 10X (≠M0289S, Biolabs). La déphosphorylation s'effectue pendant 30 minutes à 37°C et une inactivation de l'enzyme est réalisée par un traitement de 10 minutes à 65°C. Cette étape de déphosphorylation est essentielle pour éviter la re-circularisation du plasmide en vue de la ligation de l'insert.

- Ligation insert mMSTN tronquée - Vecteur pGG2

Afin que la ligation s'opère dans de bonnes conditions, nous avons choisi d'utiliser un rapport molaire vecteur/insert de 1/3. Ainsi, 50 ng de vecteur pGG2 digéré et déphosphorylé sont mélangés avec 29 ng d'insert mMSTN tronquée digéré et purifié. 1 µl de Quick Ligase, 10 µl de Tampon 2X et 6 µl d'H<sub>2</sub>O MQ complètent le mélange de ligation. Ce mélange est ensuite placé 10 minutes à température ambiante avant d'être mis dans la glace. Une transformation dans des bactéries Top10 s'effectue comme décrit précédemment page 180 et, après étalement sur des boîtes de Pétri Ampicilline résistante, une sélection des clones obtenus est effectuée après une nuit d'incubation à 37°C. Ces clones sont placés dans 5 ml de LB + ampicilline comme vu précédemment.

- Mini-préparation, digestions contrôles et séquençage

Des mini-préparations de tous les clones sont effectuées à l'aide du kit NucleoSpin Multi-8 Plus Plasmid (Machery-Nagel) et, dans l'optique de vérifier la présence de l'insert mMSTN tronquée dans le vecteur pGG2, des digestions contrôles par les enzymes EcoRV et BamHI sont effectuées. Comme l'illustre la *figure 150*, les clones 1, 2, 4, 5, 6 et 8 présentent une bande de l'ordre de 1100 pb (insert mMSTN tronquée = 1049 pb). Un séquençage est effectué pour l'ensemble de ces clones afin de valider la construction pGG2-mMSTN tronquée. Une maxi-préparation est ensuite réalisée à l'aide du kit EndoFree Plasmid Mega Kit (5), Qiagen.



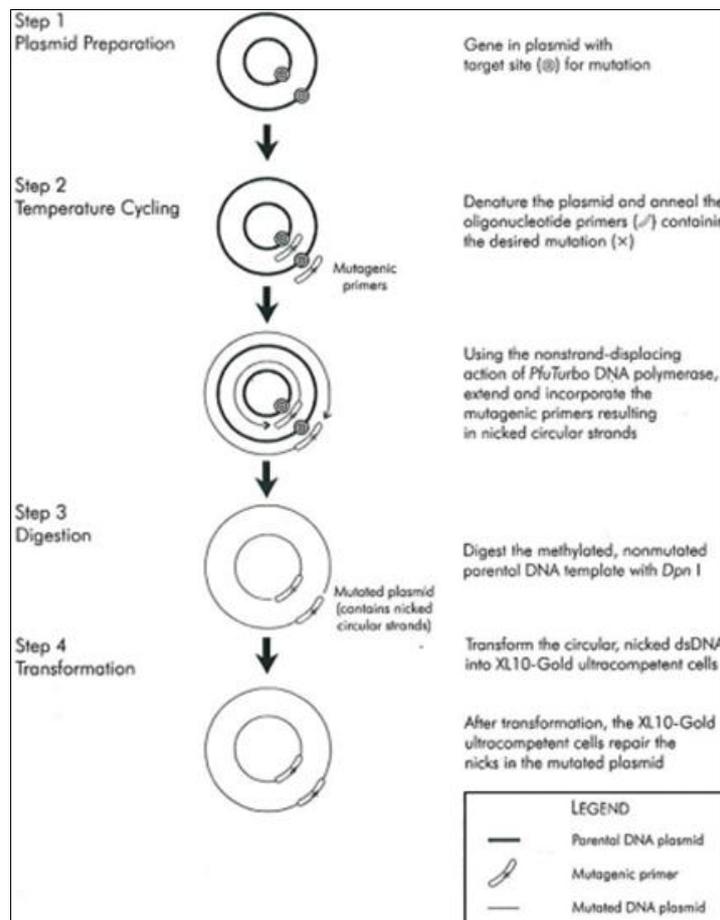
**Figure 150** : Digestions contrôles de la construction pGG2-mMSTN tronquée.

### 2.3 La cassette pGG2 - mMSTN tronquée / propeptide muté

Cette construction pGG2 - mMSTN tronquée / propeptide muté se propose de regrouper, dans une seule et même construction, 2 stratégies anti-myostatine préalablement décrites, à savoir un propeptide muté capable de capturer la myostatine mature [142, 143] et une myostatine mature tronquée, pouvant entrer en compétition avec la myostatine mature [146]. Afin d'obtenir la construction pGG2 - mMSTN tronquée / propeptide muté, une mutagénèse ciblée sur la cassette pGG2-MSTN tronquée est effectuée.

#### 2.3.1 Mutagénèse dirigée et création de la mutation D76A

La mutagénèse dirigée permet d'introduire une ou plusieurs mutations dans une séquence voulue. Notre objectif ici a été de modifier l'acide aspartique (D) en Alanine (A) en position 76 (site du 3<sup>ème</sup> clivage protéolytique permettant la libération de la myostatine mature) et d'obtenir ainsi la cassette pGG2 - mMSTN tronquée / propeptide muté. Le kit Quick Change XL Site Directed Mutagenesis (≠2005016, Stratagene) a été utilisé et une PCR sur la cassette pGG2-mMSTN tronquée (Fig. 151, étape 2) permet, à l'aide des primers MSTN D76A\_Up et MSTN D76A\_Bot, de créer la mutation D76A.



**Figure 151** : Principe et étapes de la mutagénèse dirigée.

Les oligonucléotides MSTN D76A\_Up et MSTN D76A\_Bot sont utilisés à une concentration de 100 ng/μl :

- MSTN\_D76A\_Up :5' CAGTACGACGTCGAGAGGGTCGACAGCAGTGATGGCTCT3'
- MSTN\_D76A\_Bot:5' AGAGCCATCACTGCTGTCAGCCCTCTGGACGTCGTA CTG3'

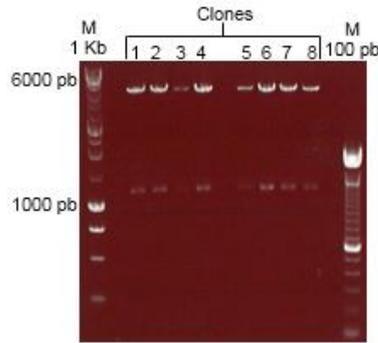
Voici la composition du mélange « MIX PCR » :

- 5X Fusion Buffer : 5 μl
- 10 mM dNTPs : 1 μl
- Oligonucléotide MSTN D76A\_Up : 1,25 μl
- Oligonucléotide MSTN D76A\_Bot : 1,25 μl
- Pfu Turbo DNA Polymérase (2,5U) : 1 μl
- pGG2-MSTN tronquée (50 ng/μl) : 2 μl
- H2O MQ : 38,5 μl

Les conditions de PCR ont été les suivantes : (Nombre de cycles = 12, Durée = 2h30)

- 98°C, 30 secondes
  - 98°C, 20 secondes
  - 55°C, 1 minute
  - 68°C, 10 minutes
- } (x12)
- 4°C, ∞

Une digestion du brin parental non muté est effectuée par l'enzyme DpnI (10U/μl) au niveau des sites 5' GmATC 3'. 1 μl d'enzyme DpnI est ajouté à 50 μl de produit PCR et la réaction est incubée 1 heure à 37°C. Une transformation bactérienne est ensuite réalisée dans des bactéries Top 10. Après une nuit d'incubation à 37°C, 8 clones ont été amplifiés et des mini-préparations ont été réalisées à l'aide du kit NucleoSpin Multi-8 Plus Plasmid (Machery-Nagel). Afin de vérifier la présence de l'insert mMSTN tronquée / propeptide muté, une double digestion non séquentielle par les enzymes BamHI et EcoRV est réalisée (Fig. 152). Le vecteur final pGG2 présente 2 sites de restriction uniques à ces 2 enzymes, ces derniers entourant en 5' et 3' l'insert mMSTN tronquée / propeptide muté.



**Figure 152 :** Digestions contrôles de la construction pGG2-mMSTN tronquée / propeptide muté par les enzymes BamHI et EcoRV.

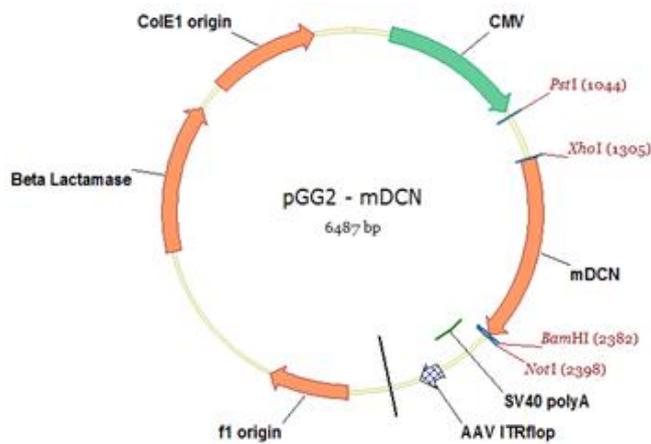
On observe une bande de l'ordre de 1100 pb (insert de mMSTN tronquée / propeptide muté = 1049 pb). L'ensemble des clones obtenus est validé par digestions contrôles et un séquençage a été fait afin de valider la construction pGG2-mMSTN tronquée / propeptide muté (Fig. 153).

	478	480	490	500	510	520	530
Contig 1	478	GCC	AAG	AGC	CGC	CTC	CACTCCG
MSTN Tronquée (ADNC)	246	GCC	AAG	AGC	CGC	CTC	CACTCCG

**Figure 153 :** Résultats du séquençage de la construction pGG2-mMSTN Tronquée / propeptide muté.

#### 2.4 La cassette pGG2 – mDCN

Contrairement à la cassette précédente, la construction pGG2-mDCN (Fig. 154) est réalisée sans l'étape intermédiaire qu'est le clonage de l'insert mDCN dans le vecteur pCR2.1 Topo. Le clonage a été réalisé directement dans le vecteur final pGG2 qui présente un promoteur CMV.



**Figure 154 :** La construction pGG2-mDCN.

Pour réaliser ce clonage, l'échantillon d'ADNc total obtenu après transcription réverse d'un ARN total extrait d'un quadriceps de souris B10 a été utilisé. Une PCR ciblée « mDCN » via les amorces mDeco1s\_Xho1 (5'-CCGCTCGAGCGGATGAAGGCAACTCTCATCTT-3') et mDeco2AS\_BamH1 (5'-CGCGGATCCGCGTTACTTGTAGTTTCCAAGTTGAA-3') a été effectuée (Tab. 31 et Fig. 155). Il est à noter que ces 2 amorces apportent les sites de restriction uniques aux enzymes XhoI et BamH1 permettant un clonage direct dans le vecteur pGG2, ce dernier présentant également 2 sites de restriction uniques à ces 2 enzymes.

	<b>Composition de l'échantillon (en µl)</b>
5X DNA Synthesis Buffer	10
5mM dNTP Mix	2
Oligo mDeco1s_Xho1 – 10 µM	2.5
Oligo mDeco2AS_BamH1 – 10 µM	2.5
Taq Polymérase Fusion	0.5
DMSO	1.5
H <sub>2</sub> O MQ	21

Volume final = 40 µl Mix + 10 µl d'échantillon

**Tableau 31** : Composition du MIX PCR « mDCN ».

Conditions utilisées pour la PCR « mDCN » :

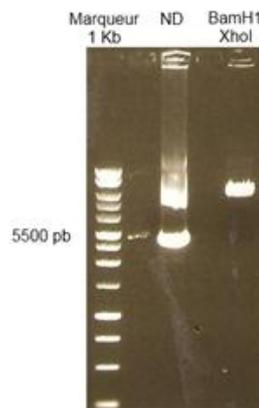
- 95°C, 5 minutes
  - 98°C, 20 secondes
  - 45°C, 30 secondes
  - 72°C, 2 minutes
- } x10
- 98°C, 20 secondes
  - 65°C, 30 secondes
  - 72°C, 2 minutes
- } x25
- 72°C, 10 minutes
  - +4°C, ∞

Un gel d'agarose 1% est réalisé puis une purification de l'insert mDCN effectuée à l'aide du kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel). On observe une bande ayant la taille attendue de 1065 pb (Fig. 155).



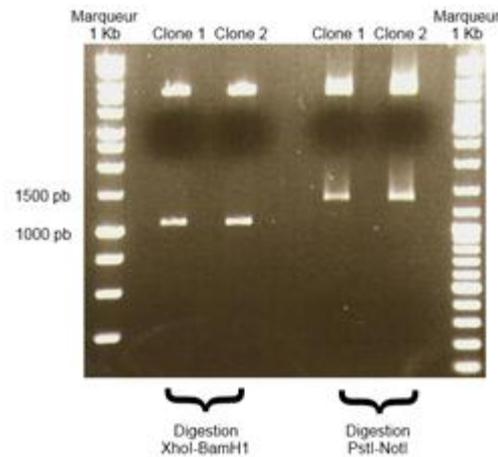
**Figure 155 :** Amplification et purification de la mDÉcorine.

Suite à la purification de la mDCN, on réalise une double digestion de l'insert mDCN par les enzymes BamH1 et XhoI, permettant ainsi de rendre compatibles les extrémités 5' et 3' de l'insert mDCN avec le vecteur pGG2. En effet, le vecteur pGG2 est également digéré par les enzymes BamH1 et XhoI et une déphosphorylation de ce vecteur est effectuée (Fig. 156). 100  $\mu$ l de plasmide pGG2 [1  $\mu$ g/ $\mu$ l] digéré sont mélangés à 2  $\mu$ l d'Antartic Phosphatase (5000U/ml, BioLabs, M0289L) et 10  $\mu$ l de tampon 10X. L'ensemble de la réaction est placé 1 heure à 37°C. Une fois la déphosphorylation opérée, l'enzyme est inactivée 10 minutes à 65°C.



**Figure 156 :** Double digestion du vecteur pGG2 par les enzymes BamH1 et XhoI.

La ligation de l'insert mDCN purifié et du vecteur pGG2 a été effectuée en utilisant un rapport 1 (vecteur) / 2 (insert). Suite à la transformation dans des bactéries Top10, 3 clones sont obtenus 16 h après étalement sur boîte de Pétri Ampicilline. Deux clones ont été mis en culture pendant 12-16 h dans du LB + Ampicilline, puis des mini-préparations ont été effectuées. Enfin, des doubles digestions par les enzymes BamH1/XhoI et PstI/NotI ont été réalisées (Fig. 157).



**Figure 157** : Digestions BamHI/XhoI et PstI/NotI des clones 1 et 2.

L'insert de mDécorine (1065 pb) est entouré des sites de restriction uniques aux enzymes XhoI et BamHI. Comme l'indique la *figure 157*, une bande de l'ordre de 1100 pb est observée et confirme la présence de l'insert mDCN. Une double digestion par les enzymes PstI et NotI permet également de confirmer la présence de l'insert mDécorine (bande de 1360 pb). Suite à la validation des clones 1 et 2 par digestions, un séquençage a permis de valider totalement la construction pGG2 - mDCN. Une maxi-préparation Endotoxin Free a été effectuée grâce au kit EndoFree Plasmid Mega Kit.

## 2.5 Production des vecteurs AAV

La production des vecteurs AAV est réalisée par transfection transitoire de cellules du tissu épithélial du rein, HEK-293 (ATCC : CRL-1573), avec les plasmides suivants :

- Le plasmide pXX6 permettant l'apport en *trans* des protéines adénovirales nécessaires à la réplication de l'AAV. La production est donc réalisée dans un système exempt d'adénovirus.
- Le plasmide vecteur pGG2 contenant la cassette d'intérêt encadrée d'ITR (Internal Terminal Repeat) de sérotype 2.
- Les plasmides « helper » pAAV1pLT-RCO2 apportant les protéines de la capsid AAV de sérotype 1.

### 2.5.1 Culture et tri-transfection

La transfection est effectuée en boîtes de culture de 175 cm<sup>2</sup>. La culture cellulaire est effectuée dans un incubateur thermostaté à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, et toute la procédure décrite ci-après est rapportée à une boîte de culture.

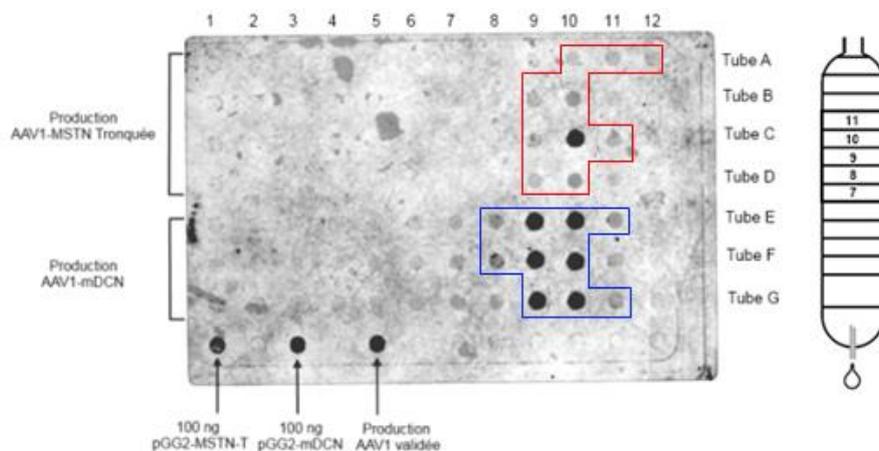
Des complexes transfectants sont générés dans 2 ml final de NaCl 150 mM par incubation à température ambiante durant 20 minutes de 28,125 µg de polyéthylèneimine branchée (B-PEI 25 kDa; Sigma) avec 50 µg d'un mélange des 3 plasmides décrits précédemment selon les proportions suivantes : 25 µg de pXX6, 12,5 µg de plasmide helper et 12,5 µg de plasmide vecteur. Les cellules sont cultivées dans le milieu suivant : DMEM 4,5 g/l de glucose, Glutamax-1 1 mM, sérum de veau foetal (SVF) 10 %, pyruvate de sodium 1 mM, pénicilline 50 U/ml, streptomycine 50 µg/ml. Les cellules sontensemencées à 5.10<sup>6</sup> par boîte 3 jours avant la transfection. Le milieu de transfection déposé sur les cellules est un milieu de culture appauvri en sérum (1% SVF), et contenant 1/7<sup>ème</sup> de complexes transfectants (v/v) ; 14 ml sont distribués par boîte. Après 6 h d'incubation du milieu de transfection sur les cellules, le taux de glucose du milieu est baissé à 2,5 g/l et la concentration de SVF est montée à 5 % par ajout de 12 ml de milieu à 1 g/l glucose et 10 % de SVF par boîte. Les cellules sont alors cultivées dans ces conditions durant 72 h, au-delà desquelles elles sont récoltées par grattage, culottées par centrifugation à 700 g durant 10 minutes et re-suspendues dans 1 ml d'un tampon contenant : Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Cette suspension est lysée par 4 cycles de congélation/décongélation afin de libérer le vecteur qui est essentiellement cytoplasmique.

### 2.5.2 Purification du vecteur AAV

Le lysat brut obtenu est centrifugé à 1 500 g pendant 15 minutes à 4°C pour séparer les débris cellulaires (culot) du surnageant contenant le vecteur. Celui-ci est traité par 25 U/ml de benzonase durant 30 minutes à 37°C afin de digérer les acides nucléiques contaminants, puis le lysat est centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes à 4°C afin de culotter les débris cellulaires restants. Le vecteur présent dans le surnageant est alors précipité par ajout d'un volume équivalent de sulfate d'ammonium saturé froid à 1 M et pH 7, et incubé une heure sur glace avant de procéder à une centrifugation de 12 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot d'AAV est re-suspendu dans du PBS contenant des ions calcium et magnésium (CaCl<sub>2</sub> 0,9 M et MgCl<sub>2</sub> 0,5 M).

Les AAV sont alors purifiés par une première ultracentrifugation en gradient discontinu de chlorure de césium (CsCl), et un réfractomètre est utilisé pour collecter les fractions ayant une densité comprise entre 1,368 et 1,376. Une seconde ultracentrifugation isopycnique des fractions sélectionnées est alors réalisée en CsCl. Des aliquots des différentes fractions de gradient récoltées sont traités à la soude NaOH/EDTA (0,4 N/10 mM) 5 minutes à 95°C, ce

qui libère les génomes viraux des capsides. Un « dot blot » est alors réalisé avec une sonde froide spécifique du génome viral afin de sélectionner les fractions les plus riches en vecteur (Fig. 158).



**Figure 158** : Exemple de résultat obtenu en « dot blot ».

12 fractions sont récoltées pour chaque tube (noté de A à G ; ici une tri-transfection de 120 boîtes) à l'aide d'une aiguille insérée à la base du tube. La sonde marquée par la phosphatase alcaline (kit AlkPhos, Amersham) permet une révélation chimioluminescente dont l'intensité est déterminée pour chaque fraction du dot blot à l'aide d'un scanner Storm 840 (Molecular Dynamics) et du logiciel ImageQuantTL. Seules les fractions ayant une intensité  $\geq$  au tiers de l'intensité maximale trouvée dans chaque tube sont sélectionnées (ici 10 fractions de 500  $\mu$ l encadrées). Les tubes A, B, C et D correspondent tous à une production d'AAV1-CMV-mMSTN tronquée et les tubes E, F et G à une production d'AAV1-CMV-mDCN. Les fractions les plus riches en vecteur ont été dialysées ensemble (5 ml).

La purification est finalisée par une dialyse des fractions les plus riches en vecteur contre du PBS contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  dans une cassette possédant une membrane à limite d'exclusion de 10 kDa (4 bains successifs de 2 heures et un bain de 12 heures). Les productions AAV sont récupérées à l'aide d'une aiguille 18G et d'une seringue 10 ml puis aliquotées par 500  $\mu$ l et conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.5.3 Titration des productions AAV

Les génomes viraux sont extraits sur 5  $\mu$ l de la production de vecteur AAV à l'aide du kit « High Pure Viral Nucleic Acid » (Roche) selon le protocole du fournisseur (destruction des capsides à l'aide de protéinase K après une étape de digestion des ADN contaminants par la DNase I et purification finale sur colonne de silice). Les génomes viraux purifiés sont alors dilués en série (en duplicat) et soumis à une réaction de PCR quantitative utilisant la sonde Taqman et les amorces CMV présentées au *tableau 32*.

		séquence
CMV	amorce amont	5'-CATCAATGGGCGTGGATAGC-3'
	amorce aval	5'-GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA-3'
	sonde Taqman	5'-ATTTCCAAGTCTCCACCC-3'
Titin	amorce amont	5'-AAAACGAGCAGTGACGTGAGC-3'
	amorce aval	5'-TTCAGTCATGCTGCTAGCGC-3'
	sonde Taqman	5'-TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC-3'

**Tableau 32 :** Sondes et amorces de Q-PCR.

La réaction de PCR est réalisée sur 70 ng d'ADN génomique dilués dans du milieu Q-PCR ROX Mix (Thermo Fischer scientific), avec 0,1  $\mu$ M de sonde Taqman, et 0,2  $\mu$ M des amorces (amont et aval) dans un volume final de 18  $\mu$ l. La PCR est réalisée sur un thermocycleur 7900 HT (Applied Biosystem) en utilisant les conditions suivantes : une phase d'activation de la Taq ADN polymérase à 95°C durant 15 minutes, suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C et une élongation de 1 minute à 60°C. Chaque plaque 96 puits de Q-PCR comprenait une gamme du plasmide standard pGG2-Titine dilué en série, contenant la séquence du promoteur CMV et l'exon 362 du gène de la titine. Les réactions sont opérées en duplicat sur chaque échantillon et le résultat exprimé en copies de génomes viraux (vg) par ml. Un volume de 3 ml de vecteurs AAV pour 60 boîtes transfectées dont les titres sont donnés au *tableau 33* a ainsi été obtenu.

Vecteur	Titre moyen (vg/ml)
AAV1-CMV-mDCN	4,2 x 10 <sup>11</sup>
AAV1-CMV-MSTN tronquée	9,1 x 10 <sup>10</sup>

**Tableau 33 :** Titre obtenu pour les 2 productions AAV1.

### 3. Expérimentation animale

#### 3.1 Souris

Les souris B10 (C57BL/10ScSn/J) et *mdx* (C57BL/10ScSn-*DmD*<sup>mdx</sup>/J) proviennent des colonies entretenues à Généthon. Toutes les souris provenant de Charles Rivers ou de Généthon sont élevées dans des conditions exemptes de pathogènes spécifiques (ou EOPS pour Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques), et elles ont accès à volonté à la nourriture et à l'eau. Les souris *mdx* sont sevrées à 4 semaines.

Les souris Gamma-sarcoglycan<sup>-/-</sup> proviennent du fournisseur Charles Rivers et aucune expérimentation n'était effectuée avant une période d'acclimatation minimale d'une semaine à l'animalerie de Généthon.

Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec les règles européennes d'éthique concernant l'utilisation des animaux pour la recherche expérimentale.

### 3.2 Anesthésie

Les souris sevrées ont été anesthésiées avant chaque injection intramusculaire et avant chaque prélèvement de sang par une injection intrapéritonéale d'un mélange de Kétamine à 100 mg/kg et de Xylazine à 1 mg/kg (0,1 ml/10 g).

### 3.3 Injections

- **Intramusculaire :**

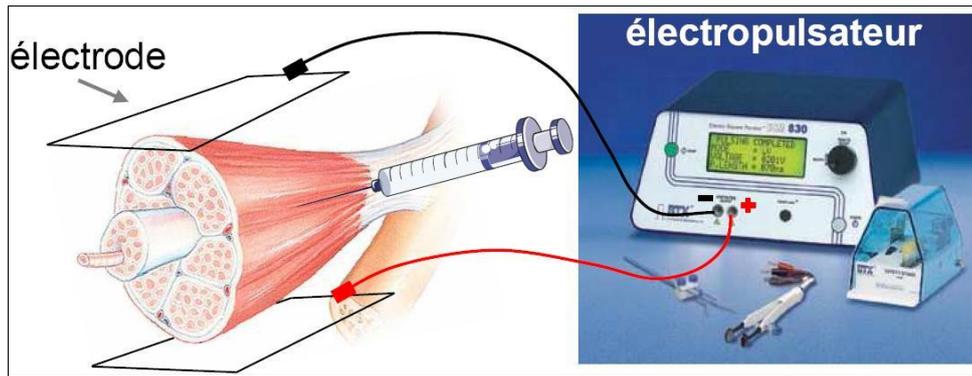
L'injection intramusculaire est réalisée sur animal anesthésié au niveau du muscle tibialis antérieur gauche (TAG). Le volume injecté a été, sauf indications contraires, de 25 µl (AAV ou plasmide) et les injections ont été réalisées en utilisant une seringue Hamilton équipée d'une aiguille de 27G. L'injection est réalisée au milieu du TAG. Un volume de 25 µl de NaCl 150 mM a été systématiquement injecté dans le tibial antérieur droit (TAD) afin de servir comme contrôle.

- **Intraveineuse :**

Le prélèvement de sang contrôle (« J0 ») est réalisé la veille des expériences impliquant une injection intraveineuse (IV). Le jour de l'injection les souris sont placées sous une lampe chauffante avec accès à la boisson, puis elles sont placées dans un cylindre de contention et l'injection est réalisée dans la veine caudale à l'aide d'une seringue à insuline (29G). Le vecteur AAV injecté en IV a été dilué dans un volume final de 450 µl de PBS contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ .

### 3.4 Electroporation

L'électroporation est une technique d'introduction d'ADN dans les cellules par la création de pores dans les membranes cellulaires induite par des chocs électriques.



**Figure 159** : Schéma de la technique d'électrotransfert appliquée au muscle.

Les souris sont anesthésiées et les pattes postérieures sont rasées au niveau du muscle injecté (TAG) et contrôle (TAD) à l'aide d'une tondeuse. Un volume de 35  $\mu$ l de plasmide pGG2-MSTN tronquée ou de plasmide pGG2-MSTN tronquée / propeptide muté en solution dans NaCl 150 mM est alors injecté de façon « centrée » dans le TAG à l'aide d'une seringue hamilton (27G). Le TAD reçoit l'équivalent volume de NaCl 150 mM. La patte injectée est ensuite recouverte par un gel de conduction (MI3.G250.US, Comepa Solutions) et, dans la minute suivant l'injection, des impulsions électriques unipolaires carrées sont délivrées par un électropulsateur ECM 830 (BTX) à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable placées de chaque côté de la patte (champ électrique perpendiculaire aux faisceaux de fibres) (Fig. 159). Une vis en téflon permet d'ajuster l'écart entre les électrodes par rapport à la taille de la patte de l'animal, et l'intensité du champ électrique appliqué est calculée en fonction de l'écartement des électrodes afin d'obtenir une valeur effective de 200 V/cm. Tous les électrotransferts sont effectués en délivrant 8 impulsions d'une durée de 20 ms, à la fréquence de 2 Hz, et d'une intensité effective de 200 V/cm [371].

Ces conditions permettent d'obtenir un taux élevé d'expression du transgène tout en minimisant les dommages tissulaires. En effet, le voltage optimal pour transférer le muscle sain est, entre nos mains, de 250V/cm dans le TAG, mais nous avons jugé que cela n'est pas applicable au muscle dystrophique.

### 3.5 Prélèvements de sang

Le sang est prélevé au niveau du sinus rétro-orbitaire à l'aide d'un capillaire hépariné sur la souris anesthésiée. Le plasma est collecté après une étape de centrifugation de 3 minutes à 8000 g et 4°C, puis conservé à -20°C en attendant l'analyse. Dans le cas des protocoles impliquant un prélèvement chaque 2 jours, une alternance est réalisée entre le prélèvement au sinus droit et le prélèvement au sinus gauche des souris.

### 3.6 Prélèvement et préparation des tissus

Toutes les souris ont été sacrifiées par élongation cervicale. Les prélèvements ont été recueillis immédiatement après le sacrifice. Si les prélèvements sont destinés à une analyse biochimique, ils ont été directement congelés dans de l'azote liquide dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml, puis conservés à -80°C en attendant d'être analysés. Dans les cas où une analyse histologique est prévue, les prélèvements ont été montés sur des bouchons de liège surplombés de gomme tragacanth (Sigma), puis congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Une fois les tissus congelés, les prélèvements ont été placés à -80°C en vue d'une coupe au cryostat.

### 3.7 Évaluation fonctionnelle

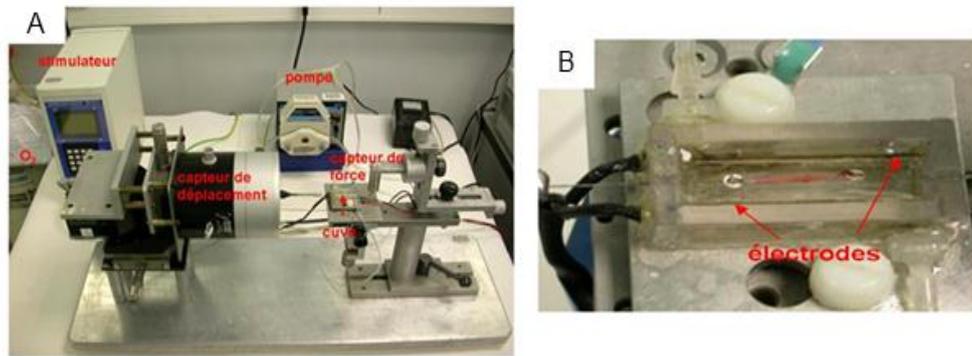
Afin de déterminer si nos différentes approches anti-myostatine permettent d'augmenter la force, différentes études d'évaluation fonctionnelle ont été réalisées par le service « Evaluation fonctionnelle » du laboratoire Généthon.

#### 3.7.1 Etudes de force sur muscle isolé EDL

La propriété contractile du muscle de la souris *mdx* a été évaluée « *in vitro* » sur muscles isolés en mesurant différents paramètres lors de stimulations électriques. Ces mesures de mécanique musculaire ont été réalisées sur le muscle EDL (*Extensor Digitorum Longus*). L'individualisation des tendons à chaque extrémité de l'EDL permet un isolement complet et sans lésion du muscle.

La stimulation nerveuse de ces muscles est artificiellement reproduite par une stimulation électrique. Celle-ci agit sur les terminaisons nerveuses motrices du muscle et sur les fibres musculaires. La contraction musculaire résulte de raccourcissements des myofibrilles qui composent les fibres. Le raccourcissement de la fibre se répercute sur la matrice extracellulaire jusqu'aux tendons. De plus, des forces externes s'exerçant sur le muscle contribuent au changement ou non de sa longueur.

On distingue ainsi trois types de contractions : (i) contraction isométrique qui se produit quand le muscle engendre une tension sans changer de longueur, (ii) une contraction isotonique produite quand le muscle se raccourcit et déplace une charge, (iii) une contraction excentrique produite quand la charge externe exercée sur le muscle est supérieure à la tension musculaire, ce qui provoque l'allongement du muscle au cours de la période d'activité contractile.

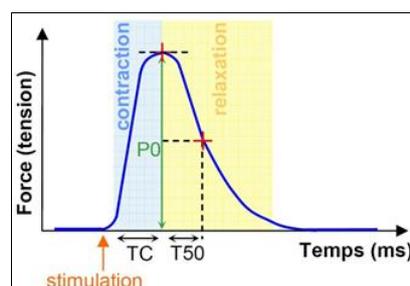


**Figure 160** : Dispositif expérimental de mesure des propriétés mécaniques du muscle isolé.

**A.** Le dispositif expérimental comprend un stimulateur électrique, un capteur de force, un capteur de déplacement (ou pot vibrant), un circuit d'asservissement permettant de maintenir la longueur du muscle constante lors de la stimulation, une pompe permettant de faire circuler une solution physiologique oxygénée à température constante et un dispositif d'enregistrement. **B.** Le muscle est placé dans la cuve et relié au capteur de force et au pot vibrant. Il est stimulé électriquement à l'aide d'électrodes situées le long de la cuve, parallèlement au muscle.

Le dispositif expérimental du laboratoire Généthon (Fig. 160) permet d'étudier différents paramètres musculaires. Il permet non seulement de réaliser des contractions isométriques mais aussi de faire subir au muscle un allongement ou un raccourcissement lors de sa stimulation. Nous avons réalisé trois types de contractions *in vitro* et mesuré différents paramètres décrits ci-après :

- **La secousse** :



**Figure 161** : Secousse musculaire.

Le nombre de fibres musculaires parallèles et leur diamètre déterminent la force maximale que le muscle peut développer. Cette force est mesurée suite à l'application d'un stimulus électrique unique de 60 mA qui produit une « secousse musculaire ». La *figure 161* présente les 2 phases de la secousse : la phase de contraction et la phase de relaxation. La secousse est caractérisée par la durée de sa phase de contraction (TC), son amplitude maximale développée

(P0) et par son temps de relâchement nécessaire pour obtenir une chute de tension de 50 % (T50).

Différentes secousses musculaires sont effectuées pour déterminer la longueur optimale  $L_0$ . La longueur optimale ( $L_0$ ) est la longueur pour laquelle le muscle développe la plus grande force lors d'une contraction isométrique (en l'absence de toute contrainte externe). Ce paramètre important, mesuré pour chaque muscle testé, nous permettra de normaliser les forces mesurées.  $L_0$  doit également être connue pour effectuer des contractions excentriques comme nous le verrons plus loin.

Les paramètres TC et T50 sont donnés en millisecondes. La force P0 (exprimée en milli-Newton) est traduite en tension P0 N (force normalisée par unité de surface exprimée en  $\text{mN}/\text{mm}^2$ ) en prenant en compte différents paramètres du muscle (longueur de fibres, densité et poids du muscle) selon la formule suivante :  $P0\text{ N} = (P0 \times A \times 1,06 \times L_0) / \text{masse du muscle}$ . Ici A est un facteur sans échelle correspondant à la longueur des fibres dans un muscle donné. La littérature indique que A est égal à 0,48 pour l'EDL. Le facteur 1,06 correspond à la densité du muscle en  $\text{mg}/\text{mm}^3$ , et  $L_0$  est la longueur optimale du muscle.

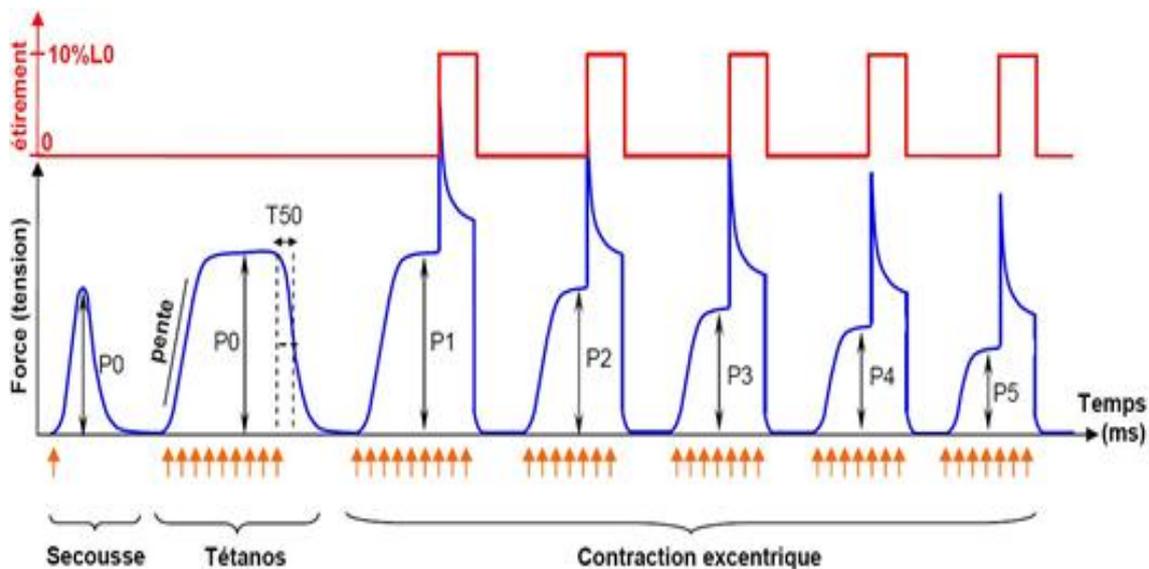


Figure 162 : Myogramme des tests *in vitro* sur muscle isolé.

- **Le téтанos :**

Pour obtenir un téтанos, la fréquence des stimulations électriques est augmentée, ce qui permet d'aboutir à une sommation et une fusion des secousses. En étude *in vitro*, la fréquence référence pour le téтанos est de 125 Hz pendant 300 ms à 60 mA. Si la fréquence est assez

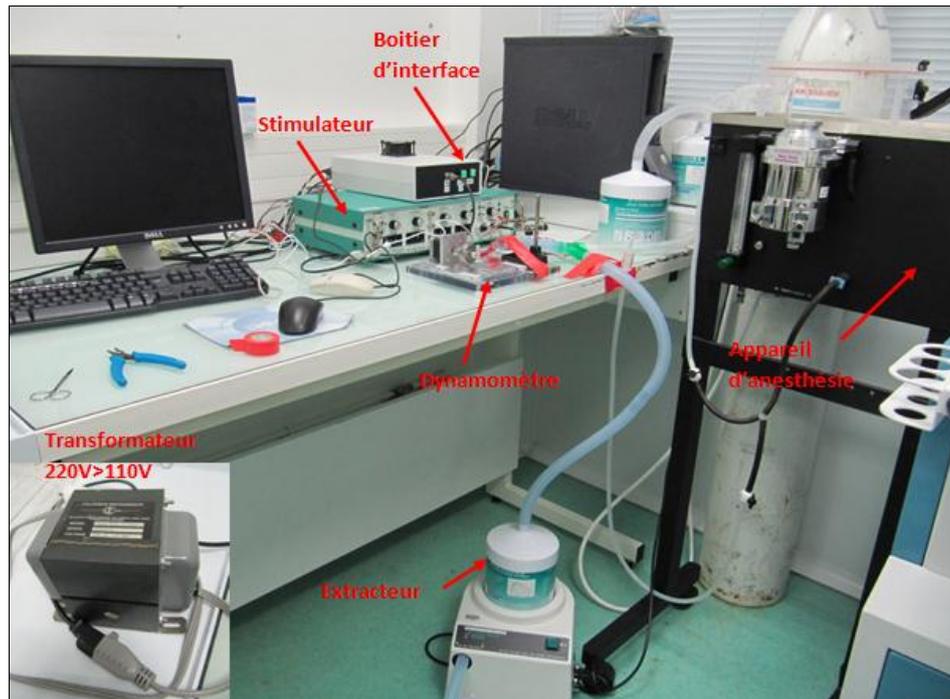
grande, le plateau est rectiligne et le téтанos est dit parfait ou fusionné. Le myogramme obtenu présente alors une allure de plateau comme on peut le voir dans la *figure 162*. Chaque muscle est stimulé à sa longueur optimale. Tout comme la secousse, le téтанos est caractérisé par son amplitude maximale développée (P0) et son temps de relâchement nécessaire pour obtenir une chute de force de 50 % (T50). P0 sera traduit en tension (P0 N), et la pente de contraction sera également mesurée (en mN/ms).

- **Contraction excentrique :**

Les contractions excentriques se retrouvent en situation physiologique, par exemple dans le cas de la descente d'un escalier, où le muscle activé est étiré par un groupe de muscles antagonistes également activés mais développant une force supérieure. Sur muscle isolé, la contraction excentrique est reproduite en appliquant un étirement de 10 % de sa longueur optimale  $L_0$  sur un muscle en contraction. Le muscle est soumis à 5 contractions excentriques successives espacées de 3 minutes. Cela produit une chute progressive de la force isométrique (avant étirement) qui peut être quantifiée en exprimant sa chute relative entre la première (F1) et la cinquième (F5) contraction excentrique (Fig. 162). Cette mesure n'est pas effectuée sur le muscle soléaire, les muscles lents étant insensibles à l'exercice excentrique. La chute de force peut être observée dans un muscle rapide comme l'EDL, elle est  $\leq$  à 20 % dans le cas du muscle sain de la souris C57BL/10ScSn. Le muscle dystrophique est particulièrement sensible à l'exercice excentrique : on observe une chute de force supérieure chez la souris *mdx* qui est directement corrélée à la déficience de la membrane musculaire.

### 3.7.2 Études de force sur la loge antérieure (EDL + TA)

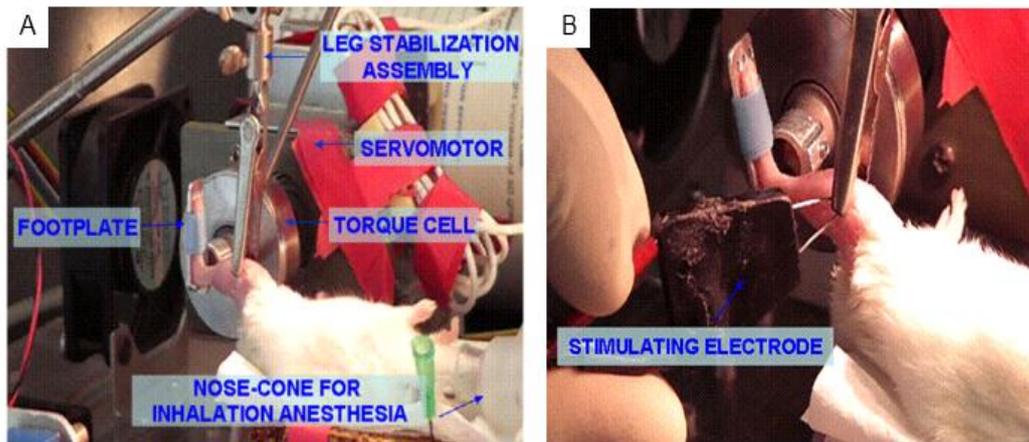
Suite à l'injection de décorine ou de peptides décorine, des tests fonctionnels sur les muscles dorsiflecteurs de souris C57Bl/10 et *mdx* ont été réalisés. A l'aide d'un dispositif nommé Dynamomètre, il est possible de réaliser, sur la loge antérieure gauche constituée du tibialis antérieur et de l'EDL gauche, des exercices excentriques consistant en une série répétée de contractions musculaires par stimulation électrique, simultanément à un étirement forcé du muscle. Ce dispositif développé par Roche JA et al. [349, 350] et illustré aux *figures 163* et *164* permet donc de mesurer différents paramètres tels que la secousse ou le téтанos sur la loge antérieure de souris.



**Figure 163 :** Dispositif complet du Dynamomètre.

Afin de vérifier si la décorine murine et le peptide 31-71 mDCN conduisent à un surplus de force dans la loge antérieure de souris *mdx*, 4 souris par groupe ont respectivement reçu en intramusculaire dans le TAG : 25  $\mu\text{g}$  de mDCN + 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 25  $\mu\text{l}$  NaCl 150 mM et 50  $\mu\text{g}$  de peptide 31-71 mDCN + 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 25  $\mu\text{l}$  NaCl 150 mM ainsi que 8  $\mu\text{g}$  de mDCN + 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 8  $\mu\text{l}$  NaCl 150 mM et 25  $\mu\text{g}$  de peptide 31-71 mDCN + 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 8  $\mu\text{l}$  NaCl 150 mM dans le muscle EDL gauche. Un groupe de 4 souris C57Bl/10 et un groupe de 4 souris *mdx* injectées 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 25  $\mu\text{l}$  NaCl 150 mM dans le TAG et 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  / 8  $\mu\text{l}$  NaCl 150 mM dans l'EDLG ont complété cette étude.

Après 19 jours de traitement, les mesures de force sur la loge antérieure de toutes les souris impliquées ont été réalisées. Suite à l'anesthésie de l'animal sous isoflurance, la patte gauche de chaque souris est épilée à la crème dépilatoire. La souris est ensuite positionnée sur le dynamomètre. Pour ce faire, une aiguille 27G stérile est alors introduite dans la jonction du genou au niveau de la tête tibiale et prise dans l'épaisseur de la patte, perpendiculaire au tibia de façon à constituer un axe tibial de rotation. A l'aide de la pince crocodile du dynamomètre, l'axe tibial est fixé afin que le tibia soit à  $90^\circ$  par rapport à l'axe de la pédale et parallèle au sol. Après avoir scotché le pied de la souris sur la pédale avec une bandelette adhésive et vérifié que le mouvement sur  $90^\circ$  est possible sans gêne, la patte est positionnée sur le dynamomètre (Fig. 164A).



**Figure 164 :** Fixation de l'axe tibial au dispositif Dynamomètre et application de l'électrode bipolaire provoquant la contraction musculaire.

La pédale est immobilisée à une valeur d'angle de 20° et une mesure de twitch et de téтанos sont réalisées afin de quantifier la force du modèle de souris étudié. L'acquisition des données et valeurs se réalise à l'aide du logiciel DYNAMOMETRE. Pour déclencher une contraction (twitch ou téтанos), les paramètres sur le stimulateur sont réglés manuellement en « single » ou train de pulses et, suite à la validation par le bouton "acquire" du logiciel DYNAMOMETRE, un ordre de stimulation au stimulateur lui-même relié à l'électrode est déclenché. La contraction est ainsi provoquée par application de l'électrode bipolaire sur la peau au niveau du point osseux où passe la branche du nerf sciatique innervant les muscles dorsiflecteurs (Fig. 164B). Cette première mesure est répétée autant de fois que nécessaire afin de mesurer la meilleure valeur de twitch et la meilleure valeur de téтанos en respectant un délai de 2 minutes entre chaque téтанos pour prévenir la fatigue musculaire. Le meilleur ampérage de twitch et la meilleure fréquence de téтанos sont ainsi retenus.

A la fin de l'étude, la patte gauche de la souris est libérée, l'axe métallique désinfecté à la Vétédine et l'axe du genou doucement retiré. Le masque d'anesthésie est retiré et l'extracteur d'air et l'appareil à anesthésie éteints. L'animal est ensuite sacrifié.

## 4. Histologie

### 4.1 Préparation des échantillons

A l'aide d'un cryostat (Leica CM3050, possédant une enceinte à -20°C), des coupes transversales de 8 µm d'épaisseur sont réalisées sur des muscles précédemment congelés et montés sur bouchon. Les coupes transversales sont réalisées au milieu des muscles et de façon aussi homogène que possible. Les coupes sont ensuite étalées sur lames et conservées à -80°C en attendant l'analyse.

## 4.2 Coloration HPS

L'Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) est une coloration histopathologique mettant en évidence les différentes structures tissulaires et cellulaires. L'hématoxyline (colorant basique) colore les acides nucléiques en bleu noir tandis que la phloxine (colorant acide) colore en rouge plus ou moins intense les cytoplasmes et certaines structures extracellulaires, qui sont dites « éosinophiles ». Enfin, le safran colore les fibres conjonctives (collagène) en jaune-orangé. Pour réaliser cette coloration, un premier bain de 3 minutes est effectué dans l'hématoxyline de Harris (Sigma), puis les lames sont lavées à l'eau puis plongées rapidement dans une solution d'alcool chlorhydrique à 0,2 % (v/v) pour éliminer l'excédent de colorant. Après un nouveau lavage à l'eau, les tissus sont bleuis dans l'eau de Scott (solution à 3,5 g/l de bicarbonate de sodium et 20 g/l de sulfate de magnésium) pendant 1 minute avant d'être de nouveau rincés à l'eau et colorés à la phloxine 1 % (Sigma) pendant 30 secondes. Après rinçage à l'eau, les coupes sont déshydratées à l'éthanol 70° pendant 1 minute, puis rincées dans l'éthanol absolu. Les tissus sont ensuite colorés au safran 1 % (v/v dans de l'éthanol absolu) pendant 3 minutes et rincés à l'éthanol absolu. Finalement, les lames sont montées en milieu Eukitt (Fluka) après 2 bains d'Histosol de 2 minutes.

## 4.3 Marquages histo-enzymatiques de la mSeAP

La révélation histo-enzymatique de la mSeAP est réalisée sur coupes histologiques décongelées puis fixées avec une solution de glutaraldéhyde 0,5 % (v/v) durant 10 minutes. Les coupes sont alors lavées 2 fois au PBS et les phosphatases alcalines endogènes sont inactivées par un bain de PBS chauffé à 65°C durant 30 minutes. La révélation de la mSeAP (en violet) est alors effectuée par une incubation d'une nuit dans une chambre humide à 37°C à l'aide d'une solution contenant 0,165 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP, Promega), 0,33 mg/ml de nitrobleu tétrazolium (NBT, Promega), 100 mM de Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM de NaCl et 50 mM de MgCl<sub>2</sub>. Les lames sont alors contre-colorées avec du rouge à noyau (1,2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazo(2,1-b)thiozole à 1 mM ; levamisole ; Sigma) par un traitement de 1 minute. Les lames sont finalement plongées 4 minutes dans du butanol, déshydratées par des bains d'alcool croissants suivis d'un bain de xylène, puis montées à l'Eukitt (Fluka).

## 4.4 Immuno-marquage

### 4.4.1 Marquage Laminine

Les laminines sont une famille de glycoprotéines qui forment, en dehors du collagène, le constituant majeur de la lame basale. En marquant ces protéines, il est donc possible de définir chaque fibre musculaire afin de les dénombrer et d'en étudier différentes

caractéristiques. Chaque lame à marquer est entourée de Dakopen (couche hydrophobe) et laissée sécher pendant 5 minutes. Les peroxydases endogènes sont ensuite inhibées avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  diluée pendant 30 min à température ambiante et en chambre humide. Les lames sont ensuite rincées dans du PBS pendant 5 min à température ambiante et sous légère agitation et les sites non spécifiques sont bloqués avec une solution de PBS / Sérum de chèvre 10% pendant 30 min à température ambiante et en chambre humide. L'anticorps primaire anti-laminine (DAKO®, Z0097), dilué au 1/1000<sup>ième</sup> dans une solution de PBS, est déposé sur la lame et incubé 1 nuit à 4°C en chambre humide. Trois lavages de 5 minutes au PBS sont ensuite réalisés et les lames incubées avec l'anticorps secondaire Envision lapin-HRP (DAKO®, K 4002) en chambre humide pendant 30 minutes. Trois lavages de 5 minutes au PBS sont à nouveau effectués. Un mélange DAB/diluant DAB est alors appliqué sur les coupes pendant 2 à 5 minutes, à température ambiante et en chambre humide. Les lames sont rincées pendant 5 minutes et sont montées sous hotte chimique à l'Eukitt (Fluka).

#### 4.4.2 Coloration P.A.S (Réactif de Schiff)

Cette méthode met en évidence les glucides, qu'ils soient neutres ou à fonction acide. Le mécanisme est le suivant : Un agent oxydant, l'acide périodique, rompt les liaisons entre 2 carbones de certains groupements chimiques (1-2-glycol, 2-amino-1-hydroxy, 2-alkamino-1-hydroxy et 1-hydroxy-2-oxo) en faisant apparaître des aldéhydes. Ces aldéhydes sont visualisés par le Réactif de Schiff (KAL, 320680-0500) qui forme avec eux un produit de condensation de coloration rouge. Les lames sont placées dans une solution aqueuse à 0,8% d'acide périodique pendant 5 minutes très exactement. Un lavage à l'eau courante est effectué pendant 10 minutes. Les lames sont ensuite plongées dans de l'eau distillée avant d'être placées 30 minutes dans le réactif de Schiff. Un lavage à l'eau courante de 5 minutes est réalisé et les noyaux sont marqués par l'Hémalum de Mayer pendant 5 minutes. Après rinçage à l'eau, les lames sont passées dans l'alcool 95°C puis dans 2 bains successifs d'alcool absolu puis de xylène. Les lames sont montées sous hotte chimique à l'Eukitt (Fluka).

#### 4.4.3 Coloration Lugol

Le soluté de Lugol ou soluté iodo-ioduré fort est une solution aqueuse iodo-iodurée à 1 % d'iode permettant, selon la nature du réactif utilisé (Lugol postsulfurique, Lugol, Melzer, iode chlorozincique) et la coloration obtenue (noir, violet, bleu foncé, bleu ciel, bruns divers, jaunes +/- intenses), de différencier sélectivement le glycogène, la cellulose, l'amidon ou encore les dextrines. Les lames sont placées dans une solution d'Iode-Potassium iodure (Riedel-de Haën , 32922) pendant 10 minutes. Après rinçage à l'eau, les lames sont montées en milieu aqueux sous hotte chimique à l'Eukitt (Fluka) et observées immédiatement.

## 5. Acquisition et analyse d'images de microscopie

### 5.1 Acquisition

Les photographies des colorations HPS et marquages de la mSeAP, Laminine, Schiff et Lugol ont été prises en transmission à l'aide d'un microscope Nikon ECLIPSE E600 équipé d'une caméra Sony 3CCD DSP et d'une plateforme motorisée.

Le logiciel Cartograph (Microvision) permet de réaliser des photographies de coupes transversales complètes de muscles en assemblant automatiquement des champs de microscopie non chevauchants pris avec un objectif 4X.

### 5.2 Analyses morphométriques

Les analyses morphométriques ont été réalisées sur des images de coupes transversales complètes en utilisant le logiciel ELLIX (Microvision). Suite à la mise au point d'un bruit de fond neutre, la première étape consiste à délimiter les contours du muscle à l'aide d'un champ d'origine et d'un champ de fin à définir. Le microscope va alors parcourir la région à analyser et l'ensemble des champs qu'elle contient.

- Dans le cadre d'un marquage laminine et donc d'une étude des phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie, le logiciel utilise les différences de contraste de couleurs afin de définir chaque fibre musculaire avec une forme ellipsoïdale. Le logiciel fournit l'ensemble des paramètres suivants propre à ces 2 phénomènes : nombre de cellules / surfaces, largeurs et longueurs moyennes des fibres. Chaque muscle est analysé individuellement.
- Dans le cadre d'un marquage au Lugol ou Réactif de Schiff, après avoir défini les champs d'études et un seuil minimal de détection, il est nécessaire de délimiter le muscle étudié afin de rapporter le seuil de glycogène total à l'aire d'intérêt. Un rapport pourcentage de fibres musculaire considérées comme positive pour le glycogène / aire du muscle est ainsi obtenu.
- Pour les études concernant la dystrophine, après avoir défini les champs d'études et un seuil minimal de détection, un comptage automatique des fibres musculaires positives pour la dystrophine est effectué par le logiciel.

## 6. Statistiques

L'analyse statistique de comparaison des moyennes a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad InStat 3.06.

Pour les études *in vivo* de comparaison de masse, de nombre et de surface des fibres musculaire, un test de normalité a été effectué pour évaluer la distribution des populations testées selon la méthode de Kolmogorov-Smirnov. En cas de distribution non Gaussienne un test non paramétrique Mann-Whitney est réalisé. En cas de distribution Gaussienne un test paramétrique est réalisé : le t-test apparié bilatéral de Student. L'ensemble des tests a été réalisé selon une hypothèse bilatérale, aucun a priori n'étant fixé quant au sens d'une différence entre les moyennes (augmentation ou baisse du poids du muscle injecté, du nombre et de la surface de fibres musculaire). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type, et le seuil de signification est défini par une valeur two-tail  $p < 0,05$  (5 %).

## BIBLIOGRAPHIE

### Par ordre d'apparition :

1. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. 1997. Proc Natl Acad Sci U S A. 11;94 (23):12457-61.
2. Grobet L, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Pirottin D, Michaux C, Ménéssier F, Zanotti M, Dunner S, Georges M. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. Mamm Genome. 9 (3):210-3.
3. Ansay M., Hanset R. Anatomical, physiological and biochemical differences between conventional and double-muscled cattle in the Belgian Blue and White breed. Livestock Production Science, 1979, 6, 5-13.
4. Gagnière H., Picard B., Jurie C., Geay Y. 1997. Comparative study of metabolic differentiation of foetal muscle in normal and double-muscled cattle. Meat Sci., 45, 145-152.
5. Bailey A.J., Enser M.B., Dransfield E., Restall D.J., Avery N.C., 1982. Muscle and adipose tissue from normal and double muscled cattle: collagen types, muscle fiber diameter, fat cell size and fatty acid composition and organoleptic properties. Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. King J.W.B., Ménéssier F. (Eds). Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, Martinus Nijhoff, The Netherlands, 16, 178-204.
6. Hanset R., Michaux C., Dessy-Doize C., Burtonboy G., 1982. Studies on the 7th rib in double muscled and conventional cattle. In: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. King J.W.B., Ménéssier F. (Eds). Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, Martinus Nijhoff, The Netherlands, 16, 341-349.
7. Ménéssier F., 1982. Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle. In: Muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. King J.W.B., Ménéssier F. (Eds). Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, Martinus Nijhoff, The Netherlands, 16, 387-428.
8. Clinquart A., Hornick J.L., Van Eenaeme C., Istasse L., 1998. Le caractère culard en Blanc Bleu Belge. INRA Prod. Anim., 11, 285-297.
9. Hanset R., Michaux C., 1985. On the genetic determinism of muscular hypertrophy in the Belgian White and Blue cattle breed .1. Experimental-Data. Genet. Sel. Evol., 17, 359-368.

10. Charlier C., Coppeters W., Farnir F., Grobet L., Leroy P.L., Michaux C., Mni M., Schwers A., Vanmanshoven P., Hanset R., 1995. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2. *Mammal. Genome*, 6, 788-792.
11. McPherron A.C., Lawler A.M., Lee S.J., 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387, 83-90.
12. Grobet L., Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Menissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M., 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling pheno-type in cattle. *Nature Genet.*, 17, 71-74.
13. Kambadur R, Sharma M, Smith TP, Bass JJ. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res*, 7(9), 910-916.
14. Marchitelli C, Savarese MC, Crisà A, Nardone A, Marsan PA, Valentini A. 2003. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mamm. Genome*, 14(6), 392-395.
15. Gonzalez-Cadavid N.F., Taylor W.E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I., Ma K., Ezzat S., Shen R., Lalani R., Asa S., Mamita M., Nair G., Arver S., Bhasin S., 1998. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95, 14938-14943.
16. Jeanplong F., Sharma M., Somers W.G., Bass J.J., Kambadur R., 2001. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. *Mol. Cell. Biochem.*, 220, 31-37.
17. Szabo G., Dallmann G., Muller G., Patthy L., Soller M., Varga L., 1998. A deletion in the myo-statin gene causes the compact (Cmpt) hyper-muscular mutation in mice. *Mammalian. Genome*, 9, 671-672.
18. Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet.* 2007 May 25;3(5):e79.
19. Clop A., Marcq F., Takeda H. et al. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics* 38, 813–8.
20. Boman I.A., Klemetsdal G., Blichfeldt T., Nafstad O. & Va° ge D.I. 2009. A frameshift mutation in the coding region of the myo-statin gene (MSTN) affect carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Animal Genetics* 40, 418–22.

21. Stinckens A., Bijttebier J., Luyten T., Van den Maagdenberg K., Harmegnies N., De Smet S., Georges M. & Buys N. 2005. Detection of polymorphisms in the myostatin gene in Belgian pietrain pigs. *Communication in Agricultural and Applied Biological Sciences* 70, 37–41.
22. Stinckens A., Luyten T., Bijttebier J., Van den Maagdenberg K., Dieltiens D., Janssens S., De Smet S., Georges M. & Buys N. 2008. Characterisation of the complete porcine MSTN gene and expression levels in pig breeds differing in muscularity. *Animal Genetics* 39, 586–96.
23. Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *New England Journal of Medicine* 350, 2682–8.
24. Smith T.P.L., Lopez-Corrales N.L., Kappes S.M., Sonstegard T.S., 1997. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mammalian Genome*, 8, 742-744.
25. Sonstegard T.S., Rohrer G.A., Smith T.P.L., 1998. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Anim. Genet.*, 29, 19-22.
26. Sazanov A., Ewald D., Buitkamp J., Fries R., 1999. A molecular marker for the chicken myo-statin gene (GDF8) maps to 7p11. *Anim. Genet.*, 30, 388-389.
27. Xu C., Wu G., Zohar Y., Du S.J., 2003. Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *J. Exp. Biol.*, 206, 4067-4079.
28. Kerr T., Roalson E.H., Rodgers B.D., 2005. Phylogenetic analysis of the myostatin gene sub family and the differential expression of a novel member in zebrafish. *Evol. Dev.*, 7, 390-400.
29. Rodgers B.D., Garikipati D.K., 2008. Clinical, agricultural and evolutionary biology of myostatin; a comparative review. *Endocrine Rev.*, er 2008-0003.
30. Rodgers B.D., Roalson E.H., Weber G.M., Roberts S.B., Goetz F.W., 2007. A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. *Am. J. Physiol., Endocrinol. And Metabolism*, 292, E371-E372.
31. Wolfman N.M., McPherron A.C., Pappano W.N., Davies M.V., Song K., Tomkinson K.N., Wright J.F., Zhao L., Sebald S.M., Greenspan D.S., Leet S.I., 2003. Activation of latent myo-statin by the BMP-1/tolloid family of metallo-proteinases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 100, 15842-15846.
32. Lee S.J., 2008. Genetic analysis of the role of proteolysis in the activation of latent myostatin. *PLoS ONE*, 3, e1628.
33. Ji S., Losinski R.L., Cornelius S.G., Frank G.R., Willis G.M., Gerrard D.E., Depreux F.F.S., Spurlock M.E., 1998. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and develop-mental and postnatal regulation. *Am. J. Physiol., Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 275, R1265-R1273.

34. Sharma M., Kambadur R., Matthews B.G., Somers W.G., Devlin G.P., Conaglen J.V., Fowke P.J., Bass J.J., 1999. Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J. Cell. Physiol.*, 180, 1-9.
35. Picard B., Lefaucheur L., Berri C., Duclos J.M., 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42, 415-431.
36. Oldham J.M., Martyn J.A.K., Sharma M., Jeanplong F., Kambadur R., Bass J.J., 2001. Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscled than normal-muscled cattle fetuses. *Am. J. Physiol., Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 280, R1488-R1493.
37. Deveaux V., Picard B., Bouley J., Cassar-Malek I., 2003. Location of myostatin expression during bovine myogenesis in vivo and in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.*, 43, 527-542.
38. Kocamis H., Richter J., Klandorf H., Killefer J., 1999. The ontogeny of myostatin and follistatin mRNA expression during chicken embryonic development. *FASEB J.*, 13, A356-A356.
39. Ferrell R.E., Conte V., Lawrence E.C., Roth S.M., Hagberg J.M., Hurley B.F., 1999. Frequent sequence variation in the human myostatin (GDF8) gene as a marker for analysis of muscle-related phenotypes. *Genomics*, 62, 203-207.
40. Mandler L., Zador E., Ver Heyen M., Dux L., Wuytack F., 2000. Myostatin levels in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 21, 551-563.
41. Kocamis H., Gahr S., Richter J.J., Killefer J., 2001. In ovo IGF-I effect on the developmental pattern of myostatin, follistatin, activin B, and TGF-beta 2 gene expression during chick embryonic development. *FASEB J.*, 15, A756-A756.
42. Ríos R., Carneiro I., Arce V.M., Devesa J., 2001. Myostatin regulates cell survival during C2C12 Myogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280, 561-566.
43. Carlson C.J., Booth F.W., Gordon S.E., 1999. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am. J. Physiol., Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 277, R601-R606.
44. Wehling M., Cai B.Y., Tidball J.G., 2000. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. *FASEB J.*, 14, 103-110.
45. Salerno M.S., Thomas M., Forbes D., Watson T., Kambadur R., Sharma M., 2004. Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. *Am. J. Physiol., Cell Physiology*, 287, C1031-C1040.
46. Allen DL, Unterman TG. 2007. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292(1):C188-9.

47. Sakuma K., Watanabe K., Sano M., Uramoto I., Totsuka T., 2000. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochim. Biophys. Acta, Molecular Cell Research*, 1497, 77-88.
48. Thomas, M., B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass, and R. Kambadur. 2000. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*. 275:40235-43.
49. Lee S.J., McPherron A.C., 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 98, 9306-9311.
50. Rebbapragada A., Benchabane H., Wrana J.L., Celeste A.J., Attisano L., 2003. Myostatin signals through a transforming growth factor  $\beta$ -Like signaling pathway to block adipogenesis. *American Society for Microbiology*, 23, 7230-7242.
51. Langley B., Thomas M., Bishop A., Sharma M., Gilmour S., Kambadur R., 2002. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J. Biol. Chem.*, 277, 49831-49840.
52. Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA, Wolfman NM. 2001. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors*, 18(4), 251-9.
53. Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, Sandri M. 2009. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol*. 296(6):C1248-57.
54. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol*. 296(6):C1258-70.
55. Miyazono K. TGF-beta signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000; 11:15-22.
56. Zhu X., Topouzis S., Liang L.F., Stotish R.L., 2004. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine*, 26, 262-272.
57. Forbes D., Jackman M., Bishop A., Thomas M., Kambadur R., Sharma M., 2006. Myostatin auto-regulates its expression by feedback loop through Smad7 dependent mechanism. *J. Cell Physiol.*, 206, 264-272.
58. B. Philip, Z. Lu, Y. Gao. 2005. Regulation of GDF-8 signaling by the p38 MAPK. *Cell. Signal*. 17 (2005) 365– 375.

59. W. Yang, Y. Chen, Y. Zhang, X.Y. Wang, N. Yang, D.H. Zhu. 2006. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res.* 66, 1320–1326.
60. Z.Q. Huang, D.W. Chen, K.Y. Zhang, B. Yu, X.L. Chen, J. Meng. 2007. Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. *Cell. Signal.* 19, 2286–2295.
61. C.A. Steelman, J.C. Recknor, D. Nettleton, J.M. Reecy. 2006. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB J.* 20, 580–582.
62. Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH Jr, Kull FC Jr, Gonzalez-Cadavid N.. 2001. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280(2):E221-8.
63. Braun T, Bober E, Rudnicki MA, Jaenisch R, Arnold HH. MyoD expression marks the onset of skeletal myogenesis in Myf-5 mutant mice. 1994. *Development.* 120(11):3083-92.
64. Arnold HH, Braun T. 1996. Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review. *Int J Dev Biol.* 40(1):345-53.
65. Ríos R, Carneiro I, Arce VM, Devesa J. 2002. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282(5):C993-9.
66. Guo K, Wang J, Andrés V, Smith RC, Walsh K. 1995. MyoD induced expression of p21 inhibits cyclin dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol.*
67. R. Bischoff. 1989/ Analysis of muscle regeneration using single myofibers in culture, *Med. Sci. Sports Exerc.* 21, S164 – S172.
68. Yoshida, N., S. Yoshida, K. Koishi, K. Masuda, and Y. Nabeshima. 1998. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates “reserve cells.” *J. Cell Sci.* 111:769–779.
69. Schmalbruch, H., and D.M. Lewis. 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 23:617–626.
70. Heslop, L., J.R. Beauchamp, S. Tajbakhsh, M.E. Buckingham, T.A. Partridge, and P.S. Zammit. 2001. Transplanted primary neonatal myoblasts can give rise to functional satellite cells as identified using the Myf5lacZ mouse. *Gene Ther.* 8:778–783.
71. Maina, F., F. Casagrande, E. Audero, A. Simeone, P.M. Comoglio, R. Klein, and C. Ponzetto. 1996. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell.* 87:531–542.

72. Flanagan-Steet, H., K. Hannon, M.J. McAvoy, R. Hullinger, and B.B. Olwin. 2000. Loss of FGF receptor 1 signaling reduces skeletal muscle mass and disrupts myofiber organization in the developing limb. *Dev. Biol.* 218:21–37.
73. Grounds, M.D., and Z. Yablonka-Reuveni. 1993. Molecular and cell biology of skeletal muscle regeneration. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.* 3:210–256.
74. Mesires, N.T., and M.E. Doumit. 2002. Satellite cell proliferation and differentiation during postnatal growth of porcine skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282:C899–C906.
75. Cornelison, D.D., and B.J. Wold. 1997. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 191:270–283.
76. Cornelison, D.D., B.B. Olwin, M.A. Rudnicki, and B.J. Wold. 2000. MyoD<sup>-/-</sup> satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev. Biol.* 224:122–137.
77. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. 2003. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol.* 162(6):1135-47.
78. Wagner KR, Liu X, Chang X, Allen RE. 2005. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(7):2519-24.
79. McFarlane C, Hennebry A, Thomas M, Plummer E, Ling N, Sharma M, Kambadur R. 2007. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *J Cell Biol.* 172(2):317-29.
80. S. Kuang, S.B. Charge, P. Seale, M. Huh, M.A. Rudnicki. 2006. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis, *J. Cell Biol.* 172:103– 113.
81. S. Oustanina, G. Hause, T. Braun. 2004. Pax 7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification. *EMBO J.* 23:3430– 3439.
82. F. Relaix, D. Montarras, S. Zaffran, B. Gayraud-More l, D. Rocancourt, S. Tajbakhsh, A. Mansouri, A. Cumano, M. Buckingham. 2006. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells, *J. Cell Biol.* 172:91– 102.
83. Amthor H, Otto A, Vulin A, Rochat A, Dumonceaux J, Garcia L, Mouisel E, Hourd e C, Macharia R, Friedrichs M, Relaix F, Zammit PS, Matsakas A, Patel K, Partridge T. 2009. Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(18):7479-84.

84. Nishi M, Yasue A, Nishimatu S, Nohno T, Yamaoka T, Itakura M, Moriyama K, Ohuchi H, Noji S. 2002. A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 293(1):247-51.
85. X. Zhu, M. Hadhazy, M. Wehling, J. Tidball, E.M.G. McNally. 2000. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle, *FEBS Lett.* 474:71–75.
86. Zachwieja, J.J., Smith, S.R., Sinha-Hikim, I., Gonzalez-Cadavid, N., Bhasin, S. 1999. Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *J. Gravit. Physiol.* 1999, 6: 11-15.
87. Reardon, K.A., Davis, J., Kapsa, R.M., Choong, P., Byrne, E. 2001. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 24: 893-899.
88. Yarasheski, K.E., Bhasin, S., Sinha-Hikim, I., Pak-Loduca, J., Gonzalez-Cadavid, N.F. 2002. Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *J. Nutr. Health Aging.* 6: 343-348.
89. Bouley J., Meunier B., Chambon C., De Smet S., Hocquette J.F., Picard B., 2005. Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. *Proteomics*, 5, 490-500.
90. Cassar-Malek I., Passelaigne F., Bernard C., Leger J., Hocquette J.F., 2007. Target genes of myostatin loss-of-function in muscles of late bovine fetuses. *BMC Genomics*, 8, 63.
91. Steelman C.A., Recknor J.C., Nettleton D., Reecy J.M., 2006. Transcriptional profiling of myostatin-knockout mice implicates Wnt signaling in postnatal skeletal muscle growth and hypertrophy. *FASEB J.*, 20, 580-582.
92. Chelh I., Meunier B., Picard B., Reecy M.J., Chevalier C., Hocquette J.F., Cassar-Malek I., 2009. Molecular profiles of Quadriceps muscle in myostatin-null mice reveal PI3K and apoptotic pathways as myostatin targets. *BMC Genomics*, 10, 196.
93. Downward J. 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol.* (2):177-82.
94. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordán J, Bellacosa A, Tsichlis PN, Hay N. 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 11(6):701-13.
95. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. 1996. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 6(3):184-192.

96. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. 2001. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 3(11):1014-9.
97. Blaauw B, Canato M, Agatea L, Toniolo L, Mammucari C, Masiero E, Abraham R, Sandri M, Schiaffino S, Reggiani C. 2009. Inducible activation of Akt increases skeletal muscle mass and force without satellite cell activation. *FASEB J.* (11):3896-905.
98. Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD, Glass DJ. 2004. Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol.* 24(21):9295-304.
99. Frost RA, Lang CH. 2007. Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass. *Appl Physiol.* 103(1):378-387.
100. Leger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Deriaz O, Crettenand A, Gobelet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F, et al. 2006. Akt signaling through GSK-3{beta}, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol.* 576(3):923-933
101. Yang W, Zhang Y, Li Y, Wu Z, Zhu D. 2007. Myostatin Induces Cyclin D1 Degradation to Cause Cell Cycle Arrest through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/GSK-3beta Pathway and Is Antagonized by Insulin-like Growth Factor 1. *J Biol Chem.* 282(6):3799-3808.
102. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. 2006. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 209(2):501-14.
103. Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssenet D. 2009. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology.* 150(1):286-94. Epub 2008 Sep 18.
104. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. 2009. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296(6):C1258-70. Epub 2009 Apr 8.
105. Rodriguez J, Vernus B, Toubiana M, Jublanc E, Tintignac L, Leibovitch S, Bonniou A. 2011. Myostatin inactivation increases myotube size through regulation of translational initiation machinery. *J Cell Biochem.* doi: 10.1002/jcb.23280.

106. Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE 3rd. 1973. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J Physiol.* 234(3):723-48.
107. Talmadge RJ, Roy RR, Edgerton VR. 1993. Muscle fiber types and function. *Curr Opin Rheumatol* 5: 695–705.
108. Pette D, Staron RS. 2000. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech.* 50(6):500-9.
109. Pette D, Staron RS. 2001. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. *Histochem Cell Biol.* (5):359-72.
110. Augusto V, Padovani CR, Campos GER. 2004. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Braz. J. morphol. Sci.* 21(2), 89-94.
111. Hennebry A, Berry C, Siriatt V, O'Callaghan P, Chau L, Watson T, Sharma M, Kambadur R. 2009. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296(3):C525-34. Epub 2009 Jan 7.
112. Artaza JN, Bhasin S, Magee TR, Reisz-Porszasz S, Shen R, Groome NP, Meerasahib MF, Gonzalez-Cadavid NF. 2005. Myostatin inhibits myogenesis and promotes adipogenesis in C3H 10T(1/2) mesenchymal multipotent cells *Endocrinology.* 146(8):3547-57.
113. Shibata M., Matsumoto K., Aikawa K., Muramoto T., Fujimura S., Kadowaki M., 2006. Gene expression of myostatin during development and regeneration of skeletal muscle in Japanese Black Cattle. *J. Anim. Sci.*, 84, 2983-2989.
114. Guo T., Jou W., Chanturiya T., Portas J., Gavrilova O., McPherron A.C., 2009. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One*, 4, e4937.
115. Hamrick M.W., Shi X., Zhang W., Pennington C., Thakore H., Haque M., Kang B., Isales C.M., Fulzele S., Wenger K.H., 2007. Loss of myostatin (GDF8) function increases osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells but the osteogenic effect is ablated with unloading. *Bone*, 40, 1544-1553.
116. Vecchione L, Miller J, Byron C, Cooper GM, Barbano T, Cray J, Losee JE, Hamrick MW, Sciote JJ, Mooney MP. 2010. Age-related changes in craniofacial morphology in GDF-8 (myostatin)-deficient mice. *Anat Rec (Hoboken).*293(1):32-41.
117. Elkasrawy MN, Hamrick MW. 2010. Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 10(1):56-63.

118. Abe S, Soejima M, Iwanuma O, Saka H, Matsunaga S, Sakiyama K, Ide Y. 2009. Expression of myostatin and follistatin in Mdx mice, an animal model for muscular dystrophy. *Zoolog Sci.* 26(5):315-20.
119. Nelson KA. 2000. The cancer anorexia-cachexia syndrome. *Semin Oncol* 27(1):64–68.
120. Tisdale MJ. 2003. The 'cancer cachectic factor'. *Support Care Cancer* 11(2):73–78.
121. Dardevet D, Sornet C, Savary I, Debras E, Patureau-Mirand P, Grizard J 1998 Glucocorticoid effects on insulin- and IGF-I-regulated muscle protein metabolism during aging. *J Endocrinol* 156:83– 89.
122. Kanda F, Takatani K, Okuda S, Matsushita T, Chihara K 1999 Preventive effects of insulinlike growth factor-I on steroid-induced muscle atrophy. *Muscle Nerve* 22:213–217.
123. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J, Salehian B. 2003. Glucocorticoid induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285(2):E363-71.
124. Gilson, H., Schakman, O., Combaret, L., Lause, P., Grobet, L., Attaix, D., Ketelslegers, J.M., Thissen, J.P. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology.* 148: 452-460.
125. Siriatt V, Platt L, Salerno MS, Ling N, Kambadur R, Sharma M. 2006. Prolonged absence of myostatin reduces sarcopenia. *J Cell Physiol.* 209(3):866-73.
126. Mitchell MD, Osepchok CC, Leung KC, McMahon CD, Bass JJ. 2006. Myostatin is a human placental product that regulates glucose uptake. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(4):1434-7.
127. Chen Y, Ye J, Cao L, Zhang Y, Xia W, Zhu D. 2010. Myostatin regulates glucose metabolism via the AMP-activated protein kinase pathway in skeletal muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 42(12):2072-81.
128. Zhao B, Wall RJ, Yang J. 2005. Transgenic expression of myostatin propeptide prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 11;337(1):248-55.
129. Wilkes JJ, Lloyd DJ, Gekakis N. 2009. Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor alpha production and protects liver against obesity-induced insulin resistance. *Diabetes.* 58(5):1133-43.
130. Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. 2009. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One.* 4(3):e4937.

131. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M. Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose). 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examinations surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*. 2011 Jul 2;378(9785):31-40. Epub 2011 Jun 24.
132. Sweeney HL. 2004. Gene doping. *Sci Am*. 291(1):62-9.
133. Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L, Wolfman NM. 2003. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun*. 300(4):965-71.
134. Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS, Khurana TS. 2002. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*. 420(6914):418-21.
135. Krivickas LS, Walsh R, Amato AA. 2009. Single muscle fiber contractile properties in adults with muscular dystrophy treated with MYO-029. *Muscle Nerve*. 39(1):3-9.
136. Wagner KR, Fleckenstein JL, Amato AA, Barohn RJ, Bushby K, Escolar DM, Flanigan KM, Pestronk A, Tawil R, Wolfe GI, Eagle M, Florence JM, King WM, Pandya S, Straub V, Juneau P, Meyers K, Csimma C, Araujo T, Allen R, Parsons SA, Wozney JM, Lavallie ER, Mendell JR. 2008. A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 63(5):561-71.
137. Yang J, Ratovitski T, Brady JP, Solomon MB, Wells KD, Wall RJ. 2001. Expression of myostatin pro domain results in muscular transgenic mice. *Mol Reprod Dev*. 60(3):351-61.
138. Lee SJ, McPherron AC. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(16):9306-11.
139. Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Whittemore LA, Khurana TS. 2005. Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *J Neurosci*. 19(6):543-9.
140. Qiao C, Li J, Zheng H, Bogan J, Li J, Yuan Z, Zhang C, Bogan D, Kornegay J, Xiao X. 2009. Hydrodynamic limb vein injection of adeno-associated virus serotype 8 vector carrying canine myostatin propeptide gene into normal dogs enhances muscle growth. *Hum Gene Ther*. 20(1):1-10.

141. Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS, Lee SJ. 2003. Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23; 100(26):15842-6.
142. Duguez S, Bartoli M, Richard I. 2006. Calpain 3: a key regulator of the sarcomere ? *FEBS J*; 273: 3427–3436.
143. Lim LE, Campbell KP. 1998. The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol.* 11: 443–452.
144. Bartoli M, Poupiot J, Vulin A, Fougerousse F, Arandel L, Daniele N, Roudaut C, Noulet F, Garcia L, Danos O, Richard I. 2007. AAV-mediated delivery of a mutated myostatin propeptide ameliorates calpain 3 but not alpha-sarcoglycan deficiency. *Gene Ther.* 14(9):733-40.
145. Siriett V, Salerno MS, Berry C, Nicholas G, Bower R, Kambadur R, Sharma M. 2007. Antagonism of myostatin enhances muscle regeneration during sarcopenia. *Mol Ther.* 15(8):1463-70.
146. McCroskery, S, Thomas, M, Platt, L, Hennebry, A, Nishimura, T, McLeay, L et al. 2005. Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *J Cell Sci* 118: 3531–3541.
147. Ueno N, Ling N, Ying SY, Esch F, Shimasaki S, Guillemin R. 1987. Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(23):8282-6.
148. Robertson DM, Klein R, de Vos FL, McLachlan RI, Wettenhall RE, Hearn MT, Burger HG, de Kretser DM. 1987. The isolation of polypeptides with FSH suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun.* 16; 149(2):744-9.
149. Lee SJ, McPherron AC. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31;98(16):9306-11.
150. Lee SJ. 2007. Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS One.* 29;2(8):e789
151. Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, Patel K. 2004. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol.* 1;270(1):19-30.
152. Guo Q, Kumar TR, Woodruff T, Hadsell LA, DeMayo FJ, Matzuk MM. 1998. Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol.* 12(1):96-106.

153. Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C, Kaspar BK, Mendell JR. 2009. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. *Muscle Nerve*. 39(3):283-96.
154. Kota J, Handy CR, Haidet AM, Montgomery CL, Eagle A, Rodino-Klapac LR, Tucker D, Shilling CJ, Therlfall WR, Walker CM, Weisbrode SE, Janssen PM, Clark KR, Sahenk Z, Mendell JR, Kaspar BK. 2009. Follistatin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates. *Sci Transl Med*. 11;1(6):6ra15.
155. Hill, J.J., Davies, M.V., Pearson, A.A., Wang, J.H., Hewick, R.M., Wolfman, N.M., Qiu, Y. 2002. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J. Biol. Chem*. 277: 40735-40741.
156. Hill, J.J., Qiu, Y., Hewick, R.M., Wolfman, N.M. 2003. Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and fol-listatin domains. *Mol. Endocrinol*. 17: 1144-1154.
157. Nicholas, G., Thomas, M., Langley, B., Somers, W., Patel, K., Kemp, C.F., Sharma, M., Kambadur, R. 2002. Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J. Cell. Physiol*. 193: 120-131.
158. Moreira, E.S., Wiltshire, T.J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O.T., Valle, G., Reeves, R., Zatz, M., Passos-Bueno, M.R., Jenne, D.E. 2000. Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat. Genet*. 24: 163-166.
159. Wang, H., Zhang, Q., Zhu, D. 2003. hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 311: 877-883.
160. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, et al. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411: 494–498.
161. 162. Magee TR, Artaza JN, Ferrini MG, Vernet D, Zuniga FI, Cantini L, Reisz-Porszasz S, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF. 2006. Myostatin short interfering hairpin RNA gene transfer increases skeletal muscle mass. *J Gene Med*.8(9):1171-81.
162. 163. Kemaladewi DU, Hoogaars WM, van Heiningen SH, Terlouw S, de Gorter DJ, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Aartsma-Rus A, ten Dijke P, 't Hoen PA. 2011. Dual exon skipping in myostatin and dystrophin for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genomics*. 20; 4:36.
163. Chekulaeva M, Filipowicz W. 2009. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 21: 452-460.

164. Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eycheenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C, Georges M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet.* 38(7):813-8.
165. Allen DL, Loh AS. 2011. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 300(1):C124-37.
166. Bell ML, Buvoli M, Leinwand LA. 2010. Uncoupling of expression of an intronic microRNA and its myosin host gene by exon skipping. *Mol Cell Biol* 30: 1937–1945.
167. Rachagani S, Cheng Y, Reecy JM. 2010. Myostatin genotype regulates muscle-specific miRNA expression in mouse pectoralis muscle. *BMC Res Notes.* 2010 Nov 11; 3:297.
168. Personius KE, Jayaram A, Krull D, Brown R, Xu T, Han B, Burgess K, Storey C, Shah B, Tawil R, Welle S. 2010. Grip force, EDL contractile properties, and voluntary wheel running after postdevelopmental myostatin depletion in mice. *J Appl Physiol.* 109(3):886-94.
169. Miller TM, Kim SH, Yamanaka K, Hester M, Umapathi P, Arnson H, Rizo L, Mendell JR, Gage FH, Cleveland DW, Kaspar BK. 2006. Gene transfer demonstrates that muscle is not a primary target for non-cell-autonomous toxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19; 103(51):19546-51.
170. Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umapathi P, Eagle A, Shilling C, Boue D, Martin PT, Sahenk Z, Mendell JR, Kaspar BK. 2008. Long- term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18; 105(11):4318-22.
171. Amthor H, Macharia R, Navarrete R, Schuelke M, Brown SC, Otto A, Voit T, Muntoni F, Vrbóva G, Partridge T, Zammit P, Bunger L, Patel K. 2007. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6; 104(6):1835-40.
172. Dumonceaux J, Marie S, Beley C, Trollet C, Vignaud A, Ferry A, Butler-Browne G, Garcia L. 2010. Combination of myostatin pathway interference and dystrophin rescue enhances tetanic and specific force in dystrophic mdx mice. *Mol Ther.* 2010 May;18(5):881-7.
173. Iozzo RV. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 67:609-52.

174. Iozzo, R. V. and I. Cohen. 1993. Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. *Experientia* 49(5): 447-55.
175. Iozzo, R. V. and J. D. San Antonio. 2001. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* 108(3): 349-55.
176. Timar, J., K. Lapis, et al. 2002. Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer." *Semin Cancer Biol* 12(3): 173-86.
177. Delehedde, M. 2002. Heparan sulfate as a key player in the regulation of growth factor activities. *Recent Res Devel Biol Chem* 1: 133-149.
178. Sanderson, R. D., Y. Yang, et al. 2004. Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis. *Matrix Biol* 23(6): 341-52.
179. Delehedde, M., Lortat-Jacob H., Gallagher JT., Bonaffe D., Adam E., Querolle O., Lequien S., Degove S., Lassalle P., Bécharde D. 2005. Proteoglycan involvement in inflammatory diseases. New developments in GAG-based therapies. *Current Med. Chem.*
180. Delehedde M., S. Sarrazin, E. Adam, V. Motte, C. Vanpouille. 2006. 'Proteoglycans and glycosaminoglycans: Complex Molecules with modulating activity. In "New developments in Therapeutic Glycomics". Eds. Maryse Delehedde and Hugues Lortat-Jacob. Chapter 1.
181. Huxley-Jones J, Robertson DL, Boot-Handford RP. 2007. On the origins of the extracellular matrix in vertebrates. *Matrix Biol.* 26:2– 11.
182. Iozzo RV. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67:609 –652.
183. McEwan PA, Scott PG, Bishop PN, Bella J. 2006. Structural correlations in the family of small leucine-rich repeat proteins and proteoglycans. *J Struct Biol* 155:294– 305.
184. Schaefer L, Iozzo RV. 2008. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem* 283:21305 – 21309.
185. Iozzo RV. 1999. The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem.* 2; 274(27):18843-6.
186. Krusius T, Ruoslahti E. 1986. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(20):7683-7.

187. Fisher LW, Termine JD, Young MF. 1989. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *Biol Chem.* 15; 264(8):4571-6.
188. Sawhney, R. S., T. M. Hering, et al. 1991. Biosynthesis of small proteoglycan II (decorin) by chondrocytes and evidence for a procore protein." *J Biol Chem* 266(14): 9231-40.
189. Oldberg, A., P. Antonsson, et al. 1996. Amino-terminal deletions in the decorin core protein leads to the biosynthesis of proteoglycans with shorter glycosaminoglycan chains." *FEBS Lett* 386(1): 29-32.
190. Hocking, A. M., R. A. Strugnell, et al. 1996. Eukaryotic expression of recombinant biglycan. Post-translational processing and the importance of secondary structure for biological activity." *J Biol Chem* 271(32): 19571-7.
191. Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegård D. 1989. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* 8(9):2601-4.
192. Blochberger TC, Vergnes JP, Hempel J, Hassell JR. 1992. cDNA to chick lumican (corneal keratan sulfate proteoglycan) reveals homology to the small interstitial proteoglycan gene family and expression in muscle and intestine. *J Biol Chem.* 5;267(1):347-52.
193. Funderburgh JL, Funderburgh ML, Brown SJ, Vergnes JP, Hassell JR, Mann MM, Conrad GW. 1993. Sequence and structural implications of a bovine corneal keratan sulfate proteoglycan core protein. Protein 37B represents bovine lumican and proteins 37A and 25 are unique. *J Biol Chem.* 5;268(16):11874-80
194. Bengtsson E, Neame PJ, Heinegård D, Sommarin Y. 1995. The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *J Biol Chem.* 27;270(43):25639-44.
195. Corpuz LM, Funderburgh JL, Funderburgh ML, Bottomley GS, Prakash S, Conrad GW. 1996. Molecular cloning and tissue distribution of keratocan. Bovine corneal keratan sulfate proteoglycan 37A. *J Biol Chem.* 19;271(16):9759-63.
196. Sommarin Y, Wendel M, Shen Z, Hellman U, Heinegård D. 1998. Osteoadherin, a cell-binding keratan sulfate proteoglycan in bone, belongs to the family of leucine-rich repeat proteins of the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 3;273(27):16723-9.
197. Shinomura T, Kimata K. 1992. Proteoglycan-Lb, a small dermatan sulfate proteoglycan expressed in embryonic chick epiphyseal cartilage, is structurally related to osteoinductive factor. *J Biol Chem.* 15;267(2):1265-70.

198. Iwata Y, Shinomura T, Kurita K, Zako M, Kimata K. 1998. The gene structure and organization of mouse PG-Lb, a small chondroitin/dermatan sulphate proteoglycan. *Biochem J.* 1;331 ( Pt 3):959-64.
199. Johnson HJ, Rosenberg L, Choi HU, Garza S, Höök M, Neame PJ. 1997. Characterization of epiphycan, a small proteoglycan with a leucine-rich repeat core protein. *J Biol Chem.* 25;272(30):18709-17.
200. Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Funderburgh ML, Tasheva ES, Conrad GW. 1997. Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem.* 31;272(44):28089-95.
201. 202. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Sparkes RL, Koop B, Birch DG, Bergen AA, Prinsen CF, Polomeno RC, Gal A, Drack AV, Musarella MA, Jacobson SG, Young RS, Weleber RG. 2000. Mutations in NYX, encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 26(3):319-23.
202. Pusch CM, Zeitz C, Brandau O, Pesch K, Achatz H, Feil S, Scharfe C, Maurer J, Jacobi FK, Pinckers A, Andreasson S, Hardcastle A, Wissinger B, Berger W, Meindl A. 2000. The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. *Nat Genet.* 26(3):324-7.
203. Ohta K, Lupo G, Kuriyama S, Keynes R, Holt CE, Harris WA, Tanaka H, Ohnuma S. 2004. Tsukushi functions as an organizer inducer by inhibition of BMP activity in cooperation with chordin. *Dev Cell.* 7(3):347-58.
204. Chen XD, Fisher LW, Robey PG, Young MF. 2004. The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *FASEB J.* 18 (9):948-58.
205. Moreno M, Muñoz R, Aroca F, Labarca M, Brandan E, Larraín J. 2005. Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway. *MBO J.* 6; 24(7):1397-405.
206. Ohta K, Kuriyama S, Okafuji T, Gejima R, Ohnuma S, Tanaka H. 2006. Tsukushi cooperates with VG1 to induce primitive streak and Hensen's node formation in the chick embryo. *Development.* 133(19):3777-86.
207. Shimizu-Hirota R, Sasamura H, Kuroda M, Kobayashi E, Saruta T. 2004. Functional characterization of podocan, a member of a new class in the small leucine-rich repeat protein family. *FEBS Lett.* 9;563(1-3):69-74.
208. Rosenberg LC, Choi HU, Tang LH, Johnson TL, Pal S, Webber C, Reiner A, Poole AR. 1985. Isolation of dermatan sulfate proteoglycans from mature bovine articular cartilages. *J Biol Chem.* 25;260(10):6304-13.

209. Fleischmajer, R., Fisher, L.W., MacDonald, E.D., Jacobs Jr., L., Perlish, J.S., Termine, J.D., 1991. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J. Struct. Biol.* 10 6, 82 –90.
210. Bidanset, D.J., Guidry, C., Rosenberg, L.C., Choi, H.U., Timpl, R., Hook, M., 1992. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J. Biol. Chem.* 267, 5250 –5256.
211. Danielson KG, Fazio A, Cohen I, Cannizzaro LA, Eichstetter I, Iozzo RV. 1993. The human decorin gene: intron-exon organization, discovery of two alternatively spliced exons in the 5' untranslated region, and mapping of the gene to chromosome 12q23. *Genomics.* Jan;15(1):146-60.
212. Orgel JP, Eid A, Antipova O, Bella J, Scott JE. 2009 Decorin core protein (decoron) shape complements collagen fibril surface structure and mediates its binding. *PLoS One.* 15;4(9):e7028
213. Seo NS, Hocking AM, Höök M, McQuillan DJ. 2005. Decorin core protein secretion is regulated by N-linked oligosaccharide and glycosaminoglycan additions. *J Biol Chem.* 30; 280(52):42774-84.
214. Kitagawa, H., Egusa, N., Tamura, J. I., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U. and Sugahara, K. 2001. Rib-2, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the human tumor suppressor EXT genes encodes a novel  $\alpha$ 1,4-N-acetylglucosaminyltransferase involved in the biosynthetic initiation and elongation of heparan sulfate. *J Biol Chem.* 276, 4834-4838.
215. Yada, T., Gotoh, M., Sato, T., Shionyu, M., Go, M., Kaseyama, H., Iwasaki, H., Kikuchi, N., Kwon, Y. D and Togayachi, A. 2003. Chondroitin sulfate synthase-2. Molecular cloning and characterization of a novel human glycosyltransferase homologous to chondroitin sulfate glucuronyltransferase, which has dual enzymatic activities. *J Biol Chem.* 278, 30235-30247.
216. Yada, T., Sato, T., Kaseyama, H., Gotoh, M., Iwasaki, H., Kikuchi, N., Kwon, Y. D., Togayachi, A., Kudo, T. and Watanabe, H. 2003. Chondroitin sulfate synthase-3. Molecular cloning and characterization. *J Biol Chem.* 278, 39711-39725.
217. Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. 1996. Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem.* 13; 271(50):31767-70.
218. Kobe B, Deisenhofer J. 1993. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature.* 23-30; 366(6457):751-6.
219. Kobe B, Deisenhofer J. 1995. A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature.* 9; 374(6518):183-6.
220. Kobe B, Kajava AV. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 11(6):725-32.

221. Huizinga EG, Tsuji S, Romijn RA, Schiphorst ME, de Groot PG, Sixma JJ, Gros P. 2002. Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*. 16; 297(5584):1176-9.
222. Uff S, Clemetson JM, Harrison T, Clemetson KJ, Emsley J. 2002. Crystal structure of the platelet glycoprotein Ib (alpha) N-terminal domain reveals an unmasking mechanism for receptor activation. *J Biol Chem*. 20; 277(38):35657-63.
223. Barton WA, Liu BP, Tzvetkova D, Jeffrey PD, Fournier AE, Sah D, Cate R, Strittmatter SM, Nikolov DB. 2003. Structure and axon outgrowth inhibitor binding of the Nogo-66 receptor and related proteins. *EMBO J*. 22(13):3291-302.
224. He XL, Bazan JF, McDermott G, Park JB, Wang K, Tessier-Lavigne M, He Z, Garcia KC. 2003. Structure of the Nogo receptor ectodomain: a recognition module implicated in myelin inhibition. *Neuron*. 2003 Apr 24;38(2):177-85.
225. Papageorgiou AC, Shapiro R, Acharya KR. 1997. Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *EMBO J*. 1997 Sep 1;16(17):5162-77.
226. Scott PG, McEwan PA, Dodd CM, Bergmann EM, Bishop PN, Bella J. 2004. Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2;101(44):15633-8
227. Scott PG, Grossmann JG, Dodd CM, Sheehan JK, Bishop PN. 2003. Light and X-ray scattering show decorin to be a dimer in solution. *J Biol Chem*. 2003 May 16; 278(20):18353-9.
228. Scott PG, Dodd CM, Bergmann EM, Sheehan JK, Bishop PN. 2006. Crystal structure of the biglycan dimer and evidence that dimerization is essential for folding and stability of class I small leucine-rich repeat proteoglycans. *J Biol Chem*. 12; 281(19):13324-32.
229. Goldoni S, Owens RT, McQuillan DJ, Shriver Z, Sasisekharan R, Birk DE, Campbell S, Iozzo RV. 2004. Biologically active decorin is a monomer in solution. *J Biol Chem*. 20; 279(8):6606-12.
230. Yang VW, LaBrenz SR, Rosenberg LC, McQuillan D, Höök M. Decorin is a Zn<sup>2+</sup> metalloprotein. 1999. *J Biol Chem*. 30; 274(18):12454-60.
231. Dugan TA, Yang VW, McQuillan DJ, Höök M. 2003. Decorin binds fibrinogen in a Zn<sup>2+</sup>-dependent interaction. *J Biol Chem*. 18; 278(16):13655-62.
232. Dugan TA, Yang VW, McQuillan DJ, Höök M. 2006. Decorin modulates fibrin assembly and structure. *J Biol Chem*. 15; 281(50):38208-16.
233. Heinegård, D, Oldberg, A. 1993. Glycosylated matrix proteins in Connective tissue and its heritable disorders (Royce, P. M. & Steinmann, B., eds) pp. 189-209, Wiley-Liss, New-York.

234. Iozzo, R. V. & Murdoch, A. D. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function, *FASEB J.* 10, 598- 614.
235. Fleischmajer R, Fisher LW, MacDonald ED, Jacobs L Jr, Perlish JS, Termine JD. 1991. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J Struct Biol.* 106(1):82-90.
236. Reed CC, Iozzo RV. 2002. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J.* 19(4-5):249-55.
237. A.A. Day, C.I. McQuillan, J.D. Termine, M.R. Young. 1987. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for small proteoglycan II of bovine bone, *Biochem. J.* 248:801–805.
238. Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. 1990. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem.* 38(11):1549-63.
239. N. Parthasarathy, M.L. Tanzer. 1987. Isolation and characterization of a low molecular weight chondroitin sulfate proteoglycan from rabbit skeletal muscle, *Biochemistry* 26:3149–3156.
240. K.H. Eggen, A. Malmstrøm, S.O. Kolset. 1994. Decorin and a large dermatan sulfate proteoglycan in bovine striated muscle, *Biochim. Biophys. Acta* 1204:287–297.
241. Nishimura T, Oyama K, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A. 2007. Spatiotemporal expression of decorin and myostatin during rat skeletal muscle development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Oct 5;361(4):896-902.
242. T. Nishimura, E. Futami, A. Taneichi, T. Mori, A. Hattori. 2002. Decorin expression during development of bovine skeletal muscle and its role in morphogenesis of the intramuscular connective tissue, *Cells Tissues Organs* 171:199–214.
243. Abe S, Hirose D, Kado S, Iwanuma O, Saka H, Yanagisawa N, Ide Y. 2009. Increased expression of decorin during the regeneration stage of mdx mouse. *Anat Sci Int.* 84(4):305-11.
244. Bulfield, G., et al., 1984. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81(4): p. 1189-92.
245. Hoffman, E.P. and J.R. Gorospe. 1991. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency, in *Current Topics in Membranes: Ordering the Membrane Cytoskeleton Trilayer*, M.S. Mooseker and J.S. Morrow, Editors. Acad. Press, Inc., Orlando, FL. p. 113-154.

246. Mitchell, C.A., J.K. McGeachie, and M.D. Grounds. 1992. Cellular differences in the regeneration of murine skeletal muscle: a quantitative histological study in SJL/J and BALB/c mice. *Cell Tissue Res.* 269(1): p. 159-66.
247. Gorospe, J.R., B.K. Nishikawa, and E.P. Hoffman. 1996. Recruitment of mast cells to muscle after mild damage. *J Neurol Sci.* 135(1): p. 10-7.
248. Hiroki E, Abe S, Iwanuma O, Sakiyama K, Yanagisawa N, Shiozaki K, Ide Y. 2011. A comparative study of myostatin, follistatin and decorin expression in muscle of different origin. *Anat Sci Int.* 86(3):151-9.
249. Muller J, Vayssiere N, Royuela M et al. 2001. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masse-ter muscles from old male mdx mice. *J Muscle Res Cell Motil* 22:133-139.
250. Zanotti S, Negri T, Cappelletti C, Bernasconi P, Canioni E, Di Blasi C, Pegoraro E, Angelini C, Ciscato P, Prella A, Mantegazza R, Morandi L, Mora M. 2005. Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. *Brain.* 128(Pt 11):2546-55.
251. Ameye L, Young MF. 2002. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology.* 12(9):107R-16R.
252. Danielson, K., Baribault, H., Holmes, D., Graham, H., Kadler, K., and Iozzo, R. 1997 Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.*, 136, 729–749.
253. Schaefer, L., Macakova, K. Raslik, I., Micegova, M., Girone, H.J., Schönherr, E., Robenek, H., Echtermeyer, F.G., Grässel, S., Bruckner, P., and others. 2002. Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction. *Am. J. Pathol.*, 160, 1181–1191.
254. Mao, J.R. and Bristow, J. 2001. The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *J. Clin. Invest.*, 107, 1063–1069.
255. Vogel KG, Paulsson M, Heinegård D. 1984. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J.* 1; 223(3):587-97.
256. Fleischmajer, R., Fisher, L.W., MacDonald, E.D., Jacobs Jr., L., Perlish, J.S., Termine, J.D. 1991. Decorin interacts with fibrillar collagen of embryonic and adult human skin. *J. Struct. Biol.* 106, 82–90.
257. Geng Y, McQuillan D, Roughley PJ. 2006. SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol.* 25(8):484-91.

258. Kalamajski S, Aspberg A, Oldberg A. 2007. The decorin sequence SYIRIADTNIT binds collagen type I. *J Biol Chem.* 1; 282(22):16062-7.
259. Hedbom E, Heinegård D. 1993. Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem.* 25; 268(36):27307-12.
260. Kalamajski S, Oldberg A. 2007. Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich repeat 11. *J Biol Chem.* 14; 282(37):26740-5.
261. Kalamajski S, Oldberg A. 2009. Homologous sequence in lumican and fibromodulin leucine-rich repeat 5-7 competes for collagen binding. *J Biol Chem.* 2;284(1):534-9
262. Kalamajski S, Oldberg A. 2010. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol.* 29(4):248-53.
263. Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, Choi HU, Timpl R, Hook M. 1992. Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J. Biol Chem* 267:5250 – 5256.
264. Font B, Eichenberger D, Rosenberg LM, van der Rest M. 1996. Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol.* 15(5):341-8
265. Ehnis T, Dieterich W, Bauer M, Kresse H, Schuppan D. 1997. Localization of a binding site for the proteoglycan decorin on collagen XIV (undulin). *J Biol Chem* 272:20414 –20419.
266. Rühland C, Schönherr E, Robenek H, Hansen U, Iozzo RV, Bruckner P, Seidler DG. 2007. The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *FEBS J.* 2007 Aug; 274(16):4246-55.
267. Seidler DG, Faiyaz-Ul-Haque M, Hansen U, Yip GW, Zaidi SH, Teebi AS, Kiesel L, Götte M. 2006. Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (beta4GalT-7). *J Mol Med (Berl).* 84(7):583-94.
268. Raspanti M, Viola M, Forlino A, Tenni R, Gruppi C, Tira ME. 2008. Glycosaminoglycans show a specific periodic interaction with type I collagen fibrils. *J Struct Biol* 164:134 – 139.
269. Elefteriou F, Exposito JY, Garrone R, Lethias C. 2001. Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Lett* 495:44 – 47.

270. Guidetti GF, Bartolini B, Bernardi B, Tira ME, Berndt MC, Balduini C, Torti M. 2004. Binding of von Willebrand factor to the small proteoglycan decorin. *FEBS Lett.* 2004 Sep 10; 574(1-3):95-100.
271. Winnemoller M, Schmidt G, Kresse H. 1991. Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin. *Eur J Cell Biol* 54:10 –17.
272. Kielty CM, Whittaker SP, Shuttleworth CA. 1996. Fibrillin: evidence that chondroitin sulfate proteoglycans are components of microfibrils and associate with newly synthesised monomers. *FEBS Lett* 386:169 – 173.
273. Reinboth B, Hanssen E, Cleary EG, Gibson MA. 2002. Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1. *J Biol Chem.* 8; 277(6):3950-7.
274. Trask BC, Trask TM, Broekelmann T, Mecham RP. 2000. The microfibrillar proteins MAGP-1 and fibrillin-1 form a ternary complex with the chondroitin sulfate proteoglycan decorin. *Mol. Biol Cell* 11:1499 – 1507.
275. Schaefer L, Tsalastra W, Babelova A, Baliova M, Minnerup J, Sorokin L, Grone HJ, Reinhardt DP, Pfeilschifter J, Iozzo RV, Schaefer RM. 2007. Decorin-mediated regulation of fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin. *Am J Pathol* 170:301–315.
276. Schaefer L, Macakova K, Raslik I, Micegova M, Grone HJ, Schonherr E, Robenek H, Echtermeyer FG, Grassel S, Bruckner P, Schaefer RM, Iozzo RV, Kresse H. 2002. Absence of decorin adversely influences tubulointerstitial fibrosis of the obstructed kidney by enhanced apoptosis and increased inflammatory reaction. *Am J Pathol* 160:1181–1191.
277. Schonherr E, Sunderkotter C, Iozzo RV, Schaefer L. 2005. Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem* 280:15767 – 15772.
278. Merline R, Lazaroski S, Babelova A, Tsalastra-Greul W, Pfeilschifter J, Schlütter KD, Günther A, Iozzo RV, Schaefer RM, Schaefer L. 2009. Decorin deficiency in diabetic mice: Aggravation of nephropathy due to overexpression of profibrotic factors, enhanced apoptosis and mononuclear cell infiltration. *J Physiol Pharmacol* 60, Suppl 4.
279. Fukushima K, Badlani N, Usas A, Riano F, Fu F, Huard J. 2001. The use of an antifibrosis agent to improve muscle recovery after laceration. *Am J Sports Med.* 29(4):394-402.

280. Li Y, Li J, Zhu J, Sun B, Branca M, Tang Y, Foster W, Xiao X, Huard J. 2007. Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration. *Mol Ther.* 15(9):1616-22.
281. Duguez, S, Feasson, L, Denis, C and Freyssenet, D. 2002. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E802–E809.
282. Lin, J, Wu, H, Tarr, PT, Zhang, CY, Wu, Z, Boss, O et al. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418: 797–801.
283. Kishioka Y, Thomas M, Wakamatsu J, Hattori A, Sharma M, Kambadur R, Nishimura T. 2008. Decorin enhances the proliferation and differentiation of myogenic cells through suppressing myostatin activity. *J Cell Physiol.* 2008 Jun;215(3):856-67.
284. Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B, Cabello G. 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp. Cell Res* 286:263–275.
285. Hausser, H., Ober, B., Quentin-Hoffmann, E., Schmidt, B., Kresse, H., 1992. Endocytosis of different members of the small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycan family. *J. Biol. Chem.* 267, 11559 –11564.
286. Truppe, W., Kresse, H., 1978. Uptake of proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans by cultured skin fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 85, 351– 356.
287. Brandan, E., Retamal, C., Cabello-Verrugio, C., Marzolo, M.P. 2006. The low density lipoprotein receptor-related protein functions as an endocytic receptor for decorin. *J. Biol. Chem.* 281, 31562 –31571.
288. Herz, J., Strickland, D.K., 2001. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* 108, 779– 784.
289. Mikhailenko, I., Kounnas, M.Z., Strickland, D.K., 1995. Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates the cellular internalization and degradation of thrombospondin. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 270, 9543 – 9549.
290. Salicioni, A.M., Mizelle, K.S., Loukinova, E., Mikhailenko, I., Strickland, D.K., Gonias, S.L., 2002. The low density lipoprotein receptor-related protein mediates fibronectin catabolism and inhibits fibronectin accumulation on cell surfaces. *J. Biol. Chem.* 277, 16160–16166.

291. Yang, Z., Strickland, D.K., Bornstein, P., 20 01. Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J. Biol. Chem.* 276, 8403 –8408.
292. Segarini, P.R., Nesbitt, J.E., Li, D., Hays, L.G., Yates 3rd, J.R., Carmichael, D.F., 20 01. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *J. Biol. Chem.* 276, 40 659 – 40 667.
293. Hildebrand, M. Romaris and L.M. Rasmussen et al. 1994. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor  $\beta$ , *Biochem. J.* 302 302–527.
294. E Schönherr, M. Broszat, E Brandan, P. Bruckner and H. Kresse. 1998. Decorin core protein fragment Leu 155-Val 260 interacts with TGF- $\beta$  but does not compete for decorin binding to type I collagen, *Arch. Biochem. Biophys.* 355 241–248.
295. Markmann A, Hausser H, Schönherr E, Kresse H. 2000. Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction. *Matrix Biol.* 19(7):631-6.
296. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. 1995. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995, 19:183-232.
297. Yarden Y, Sliwkowski MX. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:127-137.
298. Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV. 1995. De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18; 92(15):7016-20.
299. Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B, Iozzo RV. 1997. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest.* 1;100(1):149-57.
300. Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. 1998. Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest.* 15; 101(2):406-12.
301. Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I. 1999. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 19;274(8):4489-92.

302. Santra M, Reed CC, Iozzo RV. 2002. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem.* 20; 277(38):35671-81.
303. Csordás G, Santra M, Reed CC, Eichstetter I, McQuillan DJ, Gross D, Nugent MA, Hajnóczky G, Iozzo RV. 2000. Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J Biol Chem.* 20; 275(42):32879-87.
304. Santra M, Eichstetter I, Iozzo RV. 2000. An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem.* 10; 275 (45):35153-61.
305. Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. 2006. Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 8; 281(36):26408-18.
306. Hu Y, Sun H, Owens RT, Wu J, Chen YQ, Berquin IM, Perry D, O'Flaherty JT, Edwards IJ. 2009. Decorin suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways. *Neoplasia.* 11(10):1042-53.
307. Khan GA, Girish GV, Lala N, Di Guglielmo GM, Lala PK. 2011. Decorin Is a Novel VEGFR-2-Binding Antagonist for the Human Extravillous Trophoblast. *Mol Endocrinol.* 25(8):1431-43.
308. Bredrup, C., Knappskog, P.M., Majewski, J., Rodahl, E., Boman, H., 2005. Congenital stromal dystrophy of the cornea caused by a mutation in the decorin gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 420 e 426.
309. Mohan RR, Tandon A, Sharma A, Cowden JW, Tovey JC. 2011. Significant inhibition of corneal scarring in vivo with tissue-selective, targeted AAV5 decorin gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1; 52(7):4833-41.
310. Sulochana KN, Fan H, Jois S, Subramanian V, Sun F, Kini RM, Ge R. 2005. Peptides derived from human decorin leucine-rich repeat 5 inhibit angiogenesis. *J Biol Chem.* 29; 280(30):27935-48. Epub 2005 May 27.
311. Strazynski M, Eble JA, Kresse H, Schönherr E. 2004. Interleukin (IL)-6 and IL-10 induce decorin mRNA in endothelial cells, but interaction with fibrillar collagen is essential for its translation. *J Biol Chem.* 14;279(20):21266-70.
312. Santra M, Katakowski M, Zhang RL, Zhang ZG, Meng H, Jiang F, Chopp M. 2006. Protection of adult mouse progenitor cells and human glioma cells by de novo decorin expression in an oxygen- and glucose-deprived cell culture model system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26(10):1311-22.
313. H. Kresse, E. Schönherr. 2002. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control, *J. Cell. Phys.* 189 266–274.

314. J. Taipale, J. Keski-Oja. 1997. Growth factors in the extracellular matrix, *FASEB J.* 11 51–59.
315. T. Gumienny, R.W. Padgett. 2002. The other side of TGF- $\beta$  superfamily signal regulation: thinking outside the cell, *Trends Endocrinol. Metab.* 13 295–299.
316. C. Cabello-Verrugio, E. Brandan. 2007. A novel modulatory mechanism of transforming growth factor- $\beta$  signaling through decorin and LRP-1. *J. Biol. Chem.* 282 18842–18850.
317. R. Droguett, C. Cabello-Verrugio, C. Riquelme, E. Brandan. 2006. Extracellular proteoglycans modify TGF- $\beta$  bio-availability attenuating its signaling during skeletal muscle differentiation, *Matrix Biol.* 25 332–341.
318. Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A, Hennebry A, Berry CJ, Sharma M, Kambadur R, Nishimura T. 2006. Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 10;340(2):675-80.
319. Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, Nozaki M, Branca MF, Huard J. 2007. Relationships between transforming growth factor- $\beta$ 1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem.* 31;282(35):25852-63.
320. Giri SN, Hyde DM, Braun RK, Gaarde W, Harper JR, Pierschbacher MD. 1997. Antifibrotic effect of decorin in a bleomycin hamster model of lung fibrosis. *Biochem Pharmacol.* 1; 54(11):1205-16.
321. Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA. 2004. Localization and early time course of TGF- $\beta$  1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve.* 30(5):645-53.
322. Grande JP, Melder DC, Zinsmeister AR. 1997. Modulation of collagen gene expression by cytokines: stimulatory effect of transforming growth factor- $\beta$ 1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor- $\alpha$  on collagen type I and collagen type IV. *J Lab Clin Med.* 130:476 – 486.
323. Igotz RA, Massague J. 1986. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 261:4337– 4345.
324. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor- $\beta$  1 in human fibro-blasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem.* 266:14064 – 14071.
325. Sharma K, Ziyadeh FN. 1994. The emerging role of transforming growth factor- $\beta$  in kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 266:F829–F842.

326. Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, Usas A, Fu FH, Huard J. 2003. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle Nerve*. 28(3):365-72.
327. Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A, Nishimura T. 2010. Interaction between myostatin and extracellular matrix components. *Anim Sci J*. 81(1):102-7.
328. Torres, L.F. and L.W. Duchen. 1987. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*. 110 (Pt 2): p. 269-99.
329. Gillis, J.M. 1999. Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse. *J Muscle Res Cell Motil*. 20(7): p. 605-25.
330. Coulton, G.R., et al. 1988. The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 14(1): p. 53-70.
331. Nonaka, I., 1998. Animal models of muscular dystrophies. *Lab Anim Sci*, 48(1): p. 8-17.
332. Lefaucheur, J.P., C. Pastoret, and A. Sebille. 1995. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec*. 242(1): p. 70-6.
333. Bobet, J., R.F. Mooney, and T. Gordon. 1998. Force and stiffness of old dystrophic (mdx) mouse skeletal muscles. *Muscle Nerve*. 21(4): p. 536-9.
334. Pastoret, C. and A. Sebille, 1993. Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul Disord*. 3(5-6): p. 471-5.
335. De la Porte, S., S. Morin, and J. Koenig. 1999. Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int Rev Cytol*. 191: p. 99-148.
336. Mitchell, C.A., J.K. McGeachie, and M.D. Grounds. 1992. Cellular differences in the regeneration of murine skeletal muscle: a quantitative histological study in SJL/J and BALB/c mice. *Cell Tissue Res*. 269(1): p. 159-66.
337. Louboutin, J.P., et al. 1993. Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hindlimb muscles. *Neuromuscul Disord*. 3(5-6): p. 463-9.
338. Pastoret, C. and A. Sebille. 1995. mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci*. 129(2): p. 97-105.
339. Mathews KD, Moore SA. 2003. Limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 3(1):78-85.
340. Campbell, K.P. 1995. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extra-cellular matrix linkage. *Cell*. 80:675-679.

341. Duggan, D.J., J.R. Gorospe, M. Fanin, E.P. Hoffman, and C. Angelini. 1997. Mutations in the sarcoglycan genes in patients with myopathy. *N. Engl. J. Med.* 336:618–624.
342. Straub, V., and K.P. Campbell. 1997. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr. Opin. Neurol.* 10:168–175.
343. Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM. 1998. Gamma- sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J Cell Biol.* 7;142(5):1279-87.
344. Kotin, R.M., R.M. Linden, and K.I. Berns. 1992. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J.* 11:5071-8.
345. Athanasopoulos, T., Graham, I. R., Foster, H., and Dickson, G. 2004. Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther* 11 Suppl 1: S109.
346. Donahue, B. A., McArthur, J. G., Spratt, S. K., Bohl, D., Lagarde, C., Sanchez, L., Kaspar, B. A., Sloan, B. A., Lee, Y. L., Danos, O., and Snyder, R. O. 1999. Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *J Gene Med* 1: 31.
347. Linden, R. M., and Woo, S. L. 1999. AAVant-garde gene therapy. *Nat Med* 5: 21.
348. Roche JA, Lovering RM, Bloch RJ. 2008. Impaired recovery of dysferlin-null skeletal muscle after contraction-induced injury in vivo. *Neuroreport* 19:1579–1584.
349. Roche JA, Lovering RM, Roche R, Ru LW, Reed PW, Bloch RJ. 2010. Extensive mononuclear infiltration and myogenesis characterize recovery of dysferlin-null skeletal muscle from contraction-induced injuries. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:298-312.
350. Burgering BM, Coffey PJ. 1995. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.* 17;376(6541):599-602.
351. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 2; 15(23):6541-51.
352. Takahashi A, Kureishi Y, Yang J, Luo Z, Guo K, Mukhopadhyay D, Ivashchenko Y, Branellec D, Walsh K. 2002. Myogenic Akt signaling regulates blood vessel recruitment during myofiber growth. *Mol Cell Biol.* 22(13):4803-14.

353. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ. 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14: 395–403.
354. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 21-28; 378(6559):785-9.
355. Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. 2001. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of glucose transport? *FEBS Lett.* 16; 492(3):199-203.
356. Welsh GI, Wilson C, Proud CG. 1996. GSK3: a SHAGGY frog story. *Trends Cell Biol.* 6(7):274-9.
357. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 21-28; 378(6559):785-9.
358. Benabdallah BF, Bouchentouf M, Rousseau J, Bigey P, Michaud A, Chapdelaine P, Scherman D, Tremblay JP. 2008. Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice. *Cell Transplant.* 17(3):337-50.
359. Benabdallah BF, Bouchentouf M, Rousseau J, Tremblay JP. 2009. Overexpression of follistatin in human myoblasts increases their proliferation and differentiation, and improves the graft success in SCID mice. *Cell Transplant.* 18(7):709-18.
360. Benabdallah BF, Bouchentouf M, Tremblay JP. 2005. Improved success of myoblast transplantation in mdx mice by blocking the myostatin signal. *Transplantation.* 27; 79(12):1696-702.
361. Fakhfakh R, Michaud A, Tremblay JP. 2011. Blocking the myostatin signal with a dominant negative receptor improves the success of human myoblast transplantation in dystrophic mice. *Mol Ther.* 19(1):204-10.
362. Gerard X, Vignaud L, Charles S, Pinset C, Scherman D, Kichler A, Israeli D. 2009. Real-time monitoring of cell transplantation in mouse dystrophic muscles by a secreted alkaline phosphatase reporter gene. *Gene Ther.* 16(6):815-9.
363. Pogany, G., Hernandez, D.J., Vogel, K.G., 1994. The in vitro interaction of proteoglycans with type I collagen is modulated by phosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 313, 102–111.

364. Moreno, M., Munoz, R., Aroca, F., Labarca, M., Brandan, E., Larrain, J., 2005. Biglycan is a new extracellular component of the Chordin-BMP4 signaling pathway. *Embo J.* 24, 1397–1405.
365. Chakravarti, S., T. Magnuson, et al. 1998. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican. *J Cell Biol* 141(5): 1277-86.
366. Grover J, Lee ER, Mounkes LC, Stewart CL, Roughley PJ. 2007. The consequence of PRELP overexpression on skin. *Matrix Biol.* 26(2):140-3.
367. Lewis M. 2003. PRELP, collagen, and a theory of Hutchinson-Gilford progeria. *Ageing Res Rev.* 2(1):95-105.
368. Yang Zhang. 2007. Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7. *Proteins*, vol 69 (Suppl 8), 108-117.
369. Yang Zhang. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, vol 9, 40.
370. Ambrish Roy, Alper Kucukural, Yang Zhang. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, vol 5, 725-738.
371. Mir, L.M., et al. 1999. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(8): p. 4262-7.
372. Munoz-Delgado, E., Morote-Garcia, J. C., Romero-Romero, R., Lopez-Garcia, I., and Hernandez-Cordoba, M. 2006. Determination of zinc in tissues of normal and dystrophic mice using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry sampling. *Anal Biochem* 348, 64-68.

## *Publications*

- **Guiraud S**, Van Wittenberghe L, Georger C, Scherman D, Kichler A. Identification of Decorin Derived Peptides with a Zn<sup>2+</sup> Dependent Anti-myostatin Activity. *Soumis*
- **Guiraud S**, Alimi-Guez D, van Wittenberghe L, Scherman D, Kichler A. The Reverse Block Copolymer Pluronic 25R2 Promotes DNA Transfection of Skeletal Muscle. *Macromol Biosci.* 2011, 12;11(5):590-4.
- Callier P, Faivre L, Thauvin-Robinet C, Marle N, Mosca AL, D'Athis P, Guy J, Masurel-Paulet A, Joly L, **Guiraud S**, Teyssier JR, Huet F, Mugneret F. Array-CGH in a series of 30 patients with mental retardation, dysmorphic features, and congenital malformations detected an interstitial 1p22.2-p31.1 deletion in a patient with features overlapping the Goldenhar syndrome. *Am J Med Genet A.* 2008,146A(16):2109-15.

## *Communications scientifiques*

- **Guiraud S**, Van Wittenberghe L, Georger C, Scherman D, Kichler A. "Evaluation of positive regulators of muscle growth in a murine dystrophic model." 9<sup>th</sup> Annual Meeting of the "French Society of Cell and Gene Therapy", Paris, Juin 2010. *Poster*
- **S Guiraud**, L Van Wittenberghe, C Georger, D Scherman, A Kichler. « Evaluation de régulateurs positifs de la croissance musculaire chez un modèle dystrophique murin. » AFM - Colloque Jeunes Chercheurs, 1-2 juillet 2010, Evry, France. *Poster*

## *Brevet*

N° de brevet: FR2943249 (A1). Date de publication : 2010-09-24. Inventeur(s): KICHLER ANTOINE[FR]; SCHERMAN DANIEL [FR]. Demandeur(s): GENETHON [FR].

L'invention concerne la décorine pour augmenter la masse musculaire, notamment dans le traitement des dystrophies musculaires.

## RÉSUMÉ

En 1997, le caractère culard, un phénotype hypermusclé chez le bovin, est attribué à des mutations dans le gène de la myostatine (MSTN). Depuis, il a été confirmé qu'une baisse de l'activité de la MSTN conduisait à une augmentation de la masse musculaire chez d'autres espèces, y compris chez l'Homme. L'identification de ce facteur et des conséquences de son invalidation sur le développement musculaire ouvre de nombreuses perspectives en médecine humaine comme, par exemple, chez des personnes ayant eu une fonte musculaire importante suite à une immobilisation prolongée ou en conséquence du vieillissement ou d'une maladie chronique. L'objectif majeur de ce projet de recherche a consisté à évaluer de nouvelles stratégies permettant d'augmenter la masse musculaire chez la souris. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à une métalloprotéine de la matrice extracellulaire (MEC), la décorine (DCN), dont l'interaction avec la MSTN a été caractérisée comme étant zinc dépendante. Suite à l'injection de ce *Small Leucine Rich Proteoglycan* (SLRP) chez la souris dystrophique *mdx* et *Gamma-sarcoglycan*<sup>-/-</sup>, nous avons constaté une augmentation de la masse musculaire consécutive à un phénomène d'hypertrophie associé ou non à de l'hyperplasie. Des études de dose/cinétique ont montré que l'effet positif de la décorine sur la croissance musculaire était maximal 21 jours après administration. Nous avons également découvert qu'un fragment peptidique de 41 acides aminés du domaine N-terminal de la protéine DCN murine conservait une activité anti-myostatine et induisait une hypertrophie musculaire chez la souris dystrophique. Ce domaine, site de l'interaction directe entre la MSTN et la DCN, présente un motif CX3CXCX6C, caractéristique des SLRPs de classe I, dont le cluster de cystéines et son interaction avec le zinc ont été décrits comme indispensables à l'activité anti-MSTN de la DCN. Différentes études concernant les mécanismes induits lors de la séquestration de la MSTN par la DCN dans la MEC ont également été conduites afin d'expliquer les phénomènes observés chez la souris. Enfin, nous avons étudié le potentiel de la DCN pour favoriser la greffe de cellules myogéniques et développé différentes approches de thérapie génique.

## MOTS-CLÉS

Myostatine, décorine, small leucine rich proteoglycans, muscle squelettique, dystrophie musculaire.

## ABSTRACT

In 1997, the double-muscling phenotype, a marked hypermuscularity in cattle, was related to mutations in the myostatin (MSTN) gene. Since, it was confirmed that a decrease of the myostatin's activity drives an increase of the muscular mass in others species, including Human. The identification of this factor and the consequences of its invalidation on the muscular development open many perspectives in human medicine, as, for example, for people whom have an important muscular loss follow up an extended immobilization or in consequence of old age or a chronic disease. The main purpose of this research project was to evaluate some new strategies permitting the increase of the muscular mass in mice. To achieve that, we investigated in detail the decorin (DCN), a metalloprotein of the extracellular matrix (ECM), interacting with MSTN in a zinc-dependent manner. After intramuscular injection of this *Small Leucine Rich Proteoglycan* (SLRP) in *mdx* and Gamma-Sarcoglycan<sup>-/-</sup> dystrophic mice, we observed a significant increase of the muscle mass conducted by hypertrophy associated or not with hyperplasia. Dose and cinetic studies showed that the positive effect of the decorin on muscular growth was maximal 21 days after administration. Furthermore, we showed that a peptide encompassing the 31-71 sequence retains full myostatin binding capacity and intramuscular injection of this peptide induces muscle hypertrophy in dystrophic mice. This direct interaction site between MSTN and DCN contains a conserved CX3CXCX6C pattern of class I SLRPs, whose cluster of cysteins and its interaction with zinc were shown to be crucial in the anti-MSTN activity of DCN. Various studies of the mechanism resulting of the sequestration of MSTN by DCN in ECM were conducted in order to explain the phenomenom observed in mice. Al last, we have studied the potential of DCN in the cellular transplantation and developped different anti-myostatin strategies of genetic therapy.

## KEYWORDS

Myostatin, decorin, small leucine rich proteoglycans , skeletal muscle , muscular dystrophy.

Généthon, Evry - UMR 8151 CNRS-U1022 INSERM  
Université René Descartes, Chimie Paristech, Paris  
Université d'Évry-Val d'Essonne, Evry