UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

———

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2009

N° attribué par la bibliothèque

Étude des voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt dans deux modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne : la souris *mdx* et le chien GRMD

———

THÈSE DE DOCTORAT
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Spécialité : Biologie moléculaire

Présentée
et soutenue publiquement par

Marie FERON

Le 30 janvier 2009, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs	M. Damien FREYSSENET, Ingénieur de Recherche, Saint-Étienne Mme Isabelle RICHARD, Directeur de Recherche, Évry
Examinateurs	Mme Josiane FONTAINE-PÉRUS, Directeur de Recherche, Nantes Mme Hélène TRONCHÈRE, Chargée de recherche, Toulouse
Membre invité	M. Karl ROUGER, Chargé de Recherche, Nantes
Directeur de thèse	M. Vehary SAKANYAN, Professeur des Universités, Nantes
Co-encadrant de thèse	Mme Laetitia GUEVEL, Maître de Conférences, Nantes

N° ED : 502

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Vehary SAKANYAN, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour avoir dirigé ce travail, ainsi que pour ses encouragements et ses conseils scientifiques.

Je remercie tout particulièrement Laëtitia GUÉVEL, qui a co-encadré cette thèse, avant tout pour avoir su me donner l'envie de faire de la recherche. Je lui suis également reconnaissante pour ses conseils et pour son soutien de tous les jours et ce, malgré la distance la dernière année. J'ai apprécié son dynamisme et son optimisme et j'espère que nous aurons, à l'avenir, à nouveau l'opportunité de travailler ensemble.

Je remercie également profondément Karl ROUGER, de l'UMR INRA703, de l'École Nationale Vétérinaire de Nantes, avec lequel nous avons établi une collaboration fructueuse. Ses conseils m'ont énormément apporté, dans le cadre précis de cette thèse, mais également d'un point de vue scientifique de manière plus générale. Un remerciement particulier également à Laurence DUBREIL, sans laquelle cette thèse n'aurait pas eu les mêmes couleurs. Merci également à Yan CHÉREL, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et à Mireille LEDEVIN, pour son aide technique.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance et mon amitié à Marie-Claire ARNAUD, qui a toujours une solution ou une idée pour tout, et qui va certainement me manquer.

Je remercie également chaleureusement Aude LAFOUX et Pascal GERVIER, et plus particulièrement Corinne HUCHET-CADIOU, pour ses conseils toujours avisés.

Je tiens également à remercier Thierry ROUAUD et Gwenola AUDA-BOUCHER, pour leur aide et leur disponibilité, ainsi que le Professeur Marie-France GARDAHAUT.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à Isabelle RICHARD, du Généthon, à Damien FREYSSENET, de l'Université de Saint-Étienne et à Hélène TRONCHÈRE, de l'Unité INSERM U563 de Toulouse, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je remercie également le Docteur Josiane FONTAINE-PÉRUS, directrice de notre Unité, qui a accepté de faire partie de ce jury.

Merci également à Damien MARQUIS et Carine PRUVOST pour leur aide et leur disponibilité.

Merci aussi à Marie ANGELINI, Audrey BROSSARD, et Michèle LECOCQ, de la société ProtNeteomix, à Thierry, Milena, Julian, Coraline, Susan, Laurent, Fabrice, Martine, Gwennina, Alain et tous les membres de l'U3B. Et un merci tout particulier à Adrien HERLÉDAN.

Enfin, je voudrais terminer en remerciant tous ceux qui étaient là pour moi au quotidien tout au long de cette thèse : Lucía, ma famille (et plus particulièrement les "Cocagne"), et mes amis (Freddy et Pauline entre autres).

À Lucía
Fières et visibles !

Abréviations

AAV, adeno-associated virus
ADAM, A disintegrin and metalloproteinase
ADN, acide désoxyribonucléique
Akt ou **PKB**, protéine kinase B
ANOVA, analyse de variance
AP, activator protein
ARN, acide ribonucléique
ASK, apoptosis signal-regulating kinase
ATF, activating transcription factor
ATP, adénosine tri-phosphate
Bad, Bcl-X_L/Bcl-2-associated death promoter
Bak, Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax, Bcl-2-associated X protein
BCA, acide bicinchoninique
Bcl, B cell lymphoma
Bim, Bcl-2 like 11 (apoptosis facilitator)
BMD, dystrophie musculaire de Becker
BSA, sérum albumin bovine
CaMK, calcium/calmodulin-dependent protein kinase
CaMKK, CaMK kinase
CANP, calcium-activated neutral proteinase
cdc, cell division cycle
c-FLIP, c-FLICE-inhibitory protein
CK, créatine kinase
CNM, myopathie centronucléaire
DAG, dystrophin associated glycoprotein
DAP, dystrophin associated protein
DG, dystroglycane
DGC, dystrophin-glycoprotein complex
DIA, diaphragme
DMD, dystrophie musculaire de Duchenne
DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium
EDMD, dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss
EDTA, acide éthylène-diamine-tétraacétique
eEF, eukaryotic elongation factor
eEF2K, eEF2 kinase
EGF, epidermal growth factor
EGTA, acide éthylèneglycol tétraacétique
eIF, eukaryotic initiation factor
eNOS, endothelial nitric oxyde synthase
ErbB ou **EGFR**, EGF receptor
ERK, extracellular signal-regulated kinase
FAK, focal adhesion kinase
FGF, fibroblast growth factor
Foxo, forkhead box, class O
GAPDH, glycéraldehyde-3-phosphate déhydrogenase
GβL ou **mLST8**, mammalian lethal with sec thirteen
GDP, guanosine diphosphate
Grb2, growth factor receptor-bound protein 2
GRMD, Golden retriever muscular dystrophy
GSK3, glycogen synthase kinase-3
GTP, guanosine triphosphate
HEPES, acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HES, hématoxyline/éosine/safran
HFH, hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue
HGF, hepatocyte growth factor
HRP, horseradish peroxidase
Ig, immunoglobuline
IGF, insulin-like growth factor
IGFBP, IGF binding protein
IHC, immunohistochimie
IκB, inhibitor of NF-κB
IKK, IκB kinase
IL, interleukine
IRD, infrared dye
IRS, insulin receptor substrate
JNK, c-jun N-terminal kinase
LGMD, limb-girdle muscular dystrophy
MAFbx/atrogin1, muscle-atrophy F-box
MAPK, mitogen-activated protein kinase
MAP2K, MAPK kinase
MAP3K, MAP2K kinase
mAVO3, mammalian adheres voraciously3
MDC, cellules dérivées du muscle
MDSC, cellules souches dérivées du muscle
mdx, X-linked muscular dystrophy
MEC, matrice extracellulaire
MEK, MAPK/ERK kinase
MEKK, MEK kinase
MKK, mitogen-activated protein kinase kinase

MLK, mixed-lineage kinase
MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification
MMAC, mutated in multiple advanced cancers
MOPS, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
mTOR, mammalian target of rapamycin
MTT, myoblast transfer therapy
MuRF1, muscle RING-finger protein 1
NFAT, nuclear factor of activated T-cells
NF-κB, nuclear factor kappa B
nNOS, neuronal nitric oxyde synthase
NP40, Nonidet-P40
PAK, p21-activated kinase
PBS, phosphate buffer saline
PCR, polymerase chain reaction
PDGF, platelet-derived growth factor
PDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PH, pleckstrin homology
PiP ou **PtdInsP**, phosphatidylinositol
PiP_2 ou **PtdInsP2**, PtdIns(4,5)P_2
PiP_3 ou **PtdInsP3**, PtdIns(3,4,5)P_3
PI3K, phosphatidyl inositol 3-kinase
PLC, phospholipase C
PLV, phospholipid vesicles
PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor
PP2A, protéine phosphatase 2A
PRSS, protease serine member S
PSF, pénicilline/streptomycine/fungizone
PTEN, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase
PYK, pyruvate kinase
p70S6K ou **S6K**, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase
Raptor, rapamycin (TOR)
Ras, rat sarcoma
Rheb, Ras homologue enriched in brain
Rictor, rapamycin insensitive companion of mTOR
RTK, récepteurs tyrosine kinases
SAPK/JNK, stress-activated protein kinase/c-jun NH_2-terminal kinase
SDS, sodium dodécyl sulfate
SERCA, sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases
SG, sarcoglycane
SH, Src-homology
SHIP, SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase
SOD, superoxyde dismutase
Sos, son of sevenless
Src, steroid receptor activator
SVF, sérum de veau fœtal
TA, *tibialis anterior*
TAK, thylakoid-associated kinase
TEP1, TGFbeta regulated and epithelial cell enriched phosphatase
TGF, transforming growth factor
TNF, tumor necrosis factor
TO-PRO-3, iodide (642/661)-monomeric cyanine nucleic acid stains
Trk, tyrosine kinase receptor
Tsc, tuberous sclerosis complex
Tw, Tween-20
UV, ultra violet
WB, western Blot
4EBP1/PHAS-1, eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) binding protein-1

Introduction bibliographique

Figure 1 Anatomie du muscle squelettique
Figure 2 Organisation schématique de la dystrophine
Figure 3 La dystrophine et le complexe dystrophine-glycoprotéines associées (DGC)
Figure 4 Le système ubiquitine protéasome

Schéma 1 Les 3 voies MAPK présentes chez les mammifères
Schéma 2 La voie PI3K/Akt et la régulation de la masse musculaire

Matériel et Méthodes

Figure 1 Principe des puces à anticorps à façon
Figure 2 Plan de la puce dédiée muscle et signalisation
Figure 3 Analyse des puces par le logiciel GenePix
Figure 4 Principe et plan de la puce Phospho-MAPK

Tableau 1 Liste des anticorps utilisés pour les études en Western Blot et en immunohistochimie
Tableau 2 Les 128 anticorps présents sur la puce MAGY, avec le rôle principal des protéines correspondantes

Résultats et Discussion

Figure 1 Exemple de Western Blot avec un anticorps secondaire anti-mouse, révélant la présence dans les extraits murins de deux protéines abondantes, d'environ 55 et 25 kDa
Figure 2 Déplétion en IgG d'extraits murins à l'aide de la protéine G
Figure 3 Efficacité et impact sur la détection des protéines d'intérêt des différentes conditions de déplétion
Figure 4 Niveau d'expression et de phosphorylation de ERK1/2 dans le TA et le diaphragme de souris Bl10 et *mdx* âgées de 1, 4 et 12 mois
Figure 5 Niveau d'expression et de phosphorylation d'Akt dans le TA et le diaphragme de souris Bl10 et *mdx* âgées de 1 et 4 mois
Figure 6 Profil d'expression de 44 protéines du muscle et des voies MAPK et PI3K/Akt dans les cellules dérivées du muscle de souris saines et *mdx*
Figure 7 Puce MAGY array sur extrait total
Figure 8 Puce MAGY array sur la fraction nucléaire
Figure 9 Niveau de phosphorylation de ERK1/2 dans la fraction nucléaire du muscle de chiens sain et GRMD
Figure 10 Les puces phospho-MAPK ont été testées sur le muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois
Figure 11 Profil de phosphorylation des kinases des voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois
Figure 12 Niveau d'expression et de phosphorylation de ERK1/2 dans les muscles de chiens sains et GRMD
Figure 13 Niveau d'expression d'Akt1 dans le muscle de chiens sain et GRMD
Figure 14 Immunohistochimie avec un anticorps anti-Akt1 sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD
Figure 15 Analyse par Western Blot de la phosphorylation d'Akt dans les fractions subcellulaires du muscle de chiens sains et GRMD

Figure 16 Immunohistochimie avec un anticorps anti-phospho-Akt (Ser473) sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD
Figure 17 Activité relative d'Akt dans le muscle de chiens sain et GRMD
Figure 18 Niveau de phosphorylation de GSK3β (Ser9) dans les muscles sains et GRMD
Figure 19 Niveau d'expression de GSK3β dans les extraits totaux et les fractions subcellulaires préparés à partir de muscles de chiens sain et GRMD
Figure 20 Immunohistochimie avec un anticorps anti-GSK3β sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD
Figure 21 Activité relative de GSK3β dans le muscle de chiens sain et GRMD
Figure 22 Immunohistochimie avec un anticorps anti-GSK3β, marquage au rouge Alizarine et marquage H&E sur des coupes sériées de muscle GRMD
Figure 23 Niveau de phosphorylation et niveau d'expression de p70S6K dans le muscle de chiens sain et GRMD
Figure 24 Immunohistochimie avec un anticorps anti-phospho-p70S6K (Thr389) sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD
Figure 25 Niveau d'expression de MAFbx et MuRF1 dans les extraits totaux et les fractions subcellulaires de muscles de chiens sain et GRMD
Figure 26 Niveau de phosphorylation de PDK1 (Ser241) et niveau d'expression de PP2A et PTEN dans le muscle de chiens sain et GRMD
Figure 27 Activité relative de PP2A dans le muscle de chiens sain et GRMD
Figure 28 Activité relative de PTEN dans le muscle de chiens sain et GRMD
Figure 29 Immunohistochimie avec un anticorps anti-PTEN sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD
Figure 30 Marquage H&E et immunohistochimie avec des anticorps anti-PTEN et anti-GSK3β sur des coupes sériées de muscle de chiens GRMD âgés de 3, 4 et 36 mois
Figure 31 Niveau de phosphorylation d'Akt (Ser473), niveau d'expression de PTEN et niveaux de phosphorylation (Ser9) et d'expression de GSK3β dans les MDC saines et GRMD aux stade prolifératif et différencié

Schéma 1 Enzymes intervenant dans la régulation d'Akt

Tableau 1 Marquage des protéines totales extraites du muscle de chiens sain et GRMD
Tableau 2 Marquage des protéines nucléaires extraites du muscle de chiens sain et GRMD

Discussion générale

Figure 1 Représentation schématique des différents modes de liaison de PTEN à la membrane

Schéma 1 Les voies de signalisation ERK/MAPK et PI3K/Akt, avec les dérégulations détectées dans le muscle GRMD

Sommaire

Avant-propos 1

Introduction bibliographique 3
1. La dystrophie musculaire de Duchenne 3
1.1. Généralités 3
1.2. Signes cliniques 5
1.3. Lésions du muscle dystrophique 6
1.3.1. Muscle squelettique, cellules satellites et régénération 6
1.3.2. Le muscle dystrophique 7
1.3.2.1. Lésions du muscle strié squelettique 7
1.3.2.2. Lésions des muscles cardiaque et gastro-intestinaux 7
1.4. Diagnostic et dépistage de la DMD 8
1.5. Traitements actuels 8
2. Dystrophine, protéines associées et pathogénie de la DMD 9
2.1. La dystrophine 9
2.1.1. Les différentes isoformes 9
2.1.2. L'isoforme musculaire ou M-dystrophine 10
2.2. Le complexe dystrophine-glycoprotéines associées 11
2.2.1. Le complexe des dystroglycanes 12
2.2.2. Le complexe des sarcoglycanes 12
2.2.3. Le complexe cytoplasmique 13
2.2.3.1. Les syntrophines 13
2.2.3.2. L'α-dystrobrévine 14
2.2.4. Autres protéines associées au complexe 14
2.2.4.1. nNOS 14
2.2.4.2. La cavéoline 3 15
2.3. Pathogénie de la DMD 15
3. Les modèles animaux de la DMD 16
3.1. La souris *mdx* 16
3.1.1. Lésions des muscles striés squelettiques autres que le diaphragme 17
3.1.1.1. Stade pré-nécrotique 17
3.1.1.2. Stade nécrotique 17
3.1.1.3. Stade hypertrophié 18
3.1.1.4. Stade terminal 18
3.1.2. Le diaphragme 18
3.2. Le chien GRMD 19
3.2.1. Signes cliniques 19
3.2.2. Lésions des muscles striés squelettiques 20
3.3. Autres modèles animaux 21
4. Pistes thérapeutiques pour le traitement de la DMD 21
4.1. La thérapie génique 22
4.1.1. Le transfert de gènes 22
4.1.2. Le saut d'exon 22
4.1.3. La translecture des codons stop prématurés 23
4.2. La thérapie cellulaire 24
4.2.1. La thérapie de transfert de myoblastes 24
4.2.2. Les cellules souches 24
4.3. Les approches pharmacologiques 26

4.3.1. Sur-expression de l'utrophine 26
4.3.2. Stimulation de l'hypertrophie et réduction de la fonte musculaire 27
5. Implication d'un dérèglement des voies de signalisation cellulaire 28
5.1. Les voies MAPK 28
5.1.1. La voie ERK 29
5.1.2. La voie SAPK/JNK 30
5.1.3. La voie p38 30
5.2. La voie PI3K/Akt 31
5.3. Statut des voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle dystrophique 35
5.4. Dérégulations de ces voies dans d'autres pathologies neuro-musculaires 38
6. Les apports de la génomique et de la protéomique dans l'étude de la DMD 39

Matériel et méthodes 43
1. Matériel biologique 43
1.1. Souris *mdx* (muscles) 43
1.2. Chien GRMD 43
1.2.1. Cellules dérivées du muscle 43
1.2.2. Muscles 44
2. Anticorps 44
3. Etude biochimique 46
3.1. Extraction protéique 46
3.1.1. Protéines totales 46
3.1.1.1. Extraction 46
3.1.1.1.1. MDC 46
3.1.1.1.2. Muscles murins 46
3.1.1.1.3. Muscles canins 47
3.1.1.2. Dosage protéique (BCA) 48
3.1.2. Dystrophine 48
3.1.2.1. Extraction 48
3.1.2.2. Dosage protéique (kit RC DC) 48
3.1.3. Fractionnement subcellulaire 49
3.1.3.1. Extraction 49
3.1.3.2. Dosage protéique (kit DC) 49
3.2. Western Blot 50
3.3. Puces à anticorps 51
3.3.1. Puces à anticorps maison 51
3.3.1.1. Marquage des extraits 51
3.3.1.2. Puce dédiée muscle et signalisation 52
3.3.1.3. Puce MAGY array 53
3.3.1.4. Analyse 54
3.3.2. Puce Phospho-MAPK 55
3.4. Tests d'activité enzymatique 56
3.4.1. Tests d'activité kinase 56
3.4.1.1. Akt 56
3.4.1.2. GSK3β 57
3.4.2. Tests d'activité phosphatase 57
3.4.2.1. PP2A 57
3.4.2.2. PTEN 58
4. Histologie et immunohistochimie 58

Résultats 60
1. Statut des voies de signalisation chez la souris *mdx* 60
1.1. Étude à l'aide de méthodes conventionnelles 60
1.1.1. Déplétion en immunoglobulines 60
1.1.2. Niveau d'expression et de phosphorylation de ERK1/2 63
1.1.3. Niveau d'expression et de phosphorylation d'Akt 64
1.2. Application des puces à anticorps à l'étude globale des voies 65
2. Statut des voies de signalisation chez le chien GRMD 67
2.1. Étude globale à l'aide des puces à anticorps 67
2.1.1. Puce à anticorps MAGY array 67
2.1.1.1. Analyse sur extrait total 68
2.1.1.2. Analyse sur la fraction nucléaire 69
2.1.2. Puce à anticorps dédiée aux voies MAPK et PI3K/Akt 71
2.2. Étude des kinases ERK1/2 72
2.3. Étude détaillée de la voie PI3K/Akt 74
2.3.1. Expression, phosphorylation et activité d'Akt 74
2.3.2. Expression, phosphorylation et activité de GSK3β 77
2.3.3. Expression et phosphorylation de p70S6K 80
2.3.4. Étude des marqueurs de l'atrophie musculaire 82
2.3.5. Étude des kinases et phosphatases régulant Akt 82
2.3.5.1. PDK1 84
2.3.5.2. PP2A 84
2.3.5.3. PTEN 84
2.3.6. Étude comparative à 3 stades de la pathologie 86
2.4. Étude dans les cellules dérivées du muscle 87

Discussion générale 89
1. Positionnement de l'étude 89
2. Aspects techniques 90
3. Étude détaillée de la voie PI3K/Akt dans le muscle GRMD 91
3.1. La voie PI3K/Akt et le contrôle de la masse musculaire 91
3.2. Dérégulations dans le muscle GRMD et conséquences probables 92
4. Étude des kinases ERK1/2 dans le muscle GRMD 93
4.1. Rôle de la voie ERK/MAPK dans le muscle squelettique 93
4.2. Dérégulations dans le muscle GRMD et hypothèses 94
5. Comparaison avec les observations faites dans les muscles *mdx* et DMD 94
6. PTEN semble à l'origine de la dérégulation d'Akt dans le muscle GRMD 95
7. Autres pathologies associées à PTEN ou à d'autres phosphatases 97
8. Hypothèses sur l'origine de l'activation de PTEN dans le muscle GRMD 98
8.1. Taux d'association à la membrane plasmique 98
8.2. Modifications post-traductionnelles (phosphorylation) 99
8.3. régulation par les cavéoles 100
9. Perspectives 101
9.1. Étude comparée d'autres pathologies musculaires 101
9.2. Étude de la voie PI3K/Akt dans les biopsies humaines 101
9.3. Inhiber PTEN ou activer Akt 101
10. Conclusion 102

Références bibliographiques 103

Avant-propos

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) touche chaque année à la naissance un garçon sur 3500 et représente la forme la plus fréquente et la plus sévère des dystrophies musculaires. Elle se caractérise par une perte progressive et irréversible de la masse musculaire, conduisant au décès des patients au début de l'âge adulte. Son origine génétique est liée à des mutations localisées dans le gène codant la dystrophine, une protéine sous-sarcolemmale de 427 kDa, essentielle à la stabilité des fibres musculaires. Par l'intermédiaire d'un complexe multi-protéique transmembranaire appelé DGC (dystrophin-glycoprotein complex), la dystrophine établit un lien physique entre le cytosquelette sous-sarcolemmal et la matrice extracellulaire. Dans les fibres dystrophiques, son absence entraîne délocalisation du DGC, perte d'intégrité du sarcolemme et apparition dans la membrane de lésions, ce phénomène étant accentué par les cycles de contraction-relaxation. Ces lésions permettent l'entrée de calcium dans les cellules, avec pour conséquence l'activation de protéases calcium-dépendantes (les calpaïnes) et la nécrose des fibres musculaires (Deconinck&Dan, 2007). Ce rôle structural de la dystrophine ne suffit cependant pas à expliquer pleinement les mécanismes moléculaires conduisant de son absence à la nécrose des fibres dystrophiques, et les mécanismes globaux définissant la pathogénie n'ont toujours pas été élucidés.

Il a été montré récemment que l'absence de dystrophine avait des répercussions sur l'état de plusieurs voies de signalisation cellulaire, mais la participation éventuelle des modulations détectées à la pathogénie de la DMD n'a pas été clairement établie. Les voies de signalisation cellulaire contrôlent de nombreux phénomènes cruciaux pour les cellules, tels que la mitogénèse, la différenciation ou la survie cellulaire, et des dérèglements ont été associés à plusieurs pathologies, dont le cancer. Dans le but de définir de façon précise les dysfonctionnements touchant le muscle dystrophique, nous avons décidé d'effectuer une recherche approfondie sur le niveau d'expression et de phosphorylation de protéines clés impliquées dans des voies de signalisation majeures, et nous avons cherché à comprendre les conséquences des dérégulations détectées. Nous avons mené cette étude en parallèle sur deux modèles animaux de la DMD : la souris *mdx* (Bulfield *et al.*, 1984), modèle classique, et le chien GRMD (Valentine *et al.*, 1986), seul modèle reproduisant de façon fidèle le phénotype humain. Nous avons utilisé la technologie des puces à anticorps pour obtenir une vision globale des modulations touchant les voies de signalisation dans les muscles déficients en dystrophine. Nous avons également utilisé des approches conventionnelles, telles que le

Western Blot, l'immunohistochimie et les tests d'activité kinases et phosphatases, afin d'étudier en détail le statut des voies MAPK et PI3K/Akt.

Nos résultats révèlent avant tout une atteinte profonde, et sur le long-terme, de la voie PI3K/Akt chez le chien GRMD. Cette voie est impliquée dans la régulation de la synthèse et de la dégradation protéiques, et de façon plus générale dans le contrôle de la masse musculaire, et il nous est donc apparu intéressant de l'étudier plus en profondeur. Nous avons pu montrer qu'une réduction du niveau de phosphorylation et de l'activité kinase d'Akt était à l'origine d'une phosphorylation réduite de ses cibles directe et indirecte GSK3β et p70S6K, et d'une augmentation de l'activité kinase de GSK3β. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'origine de la dérégulation d'Akt dans le muscle dystrophique, et avons pu démontrer que les mécanismes moléculaires faisaient intervenir une activation de la phosphatase PTEN. Cette observation majeure démontre pour la première fois qu'une dérégulation de la phosphatase est associée à une pathologie neuro-musculaire. Dans leur ensemble, nos résultats, s'ils sont confirmés dans les biopsies de patients, pourraient permettre une meilleure compréhension de la pathogénie de la DMD, ce qui pourrait, à terme, ouvrir la voie à de nouvelles pistes thérapeutiques.

Introduction bibliographique

1. La dystrophie musculaire de Duchenne

1.1. Généralités

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) doit son nom au physiologiste français Duchenne de Boulogne qui décrit la pathologie pour la première fois en 1868, sous le terme de paralysie musculaire pseudo-hypertrophique (ou paralysie myo-sclérosique) (Duchenne, 1868). On peut toutefois noter que le médecin anglais Edward Meryon avait déjà rapporté le cas de neuf garçons atteints par la pathologie lors du Royal Medical and Chirurgical Society de Londres, en 1851 (Emery, 2001). Dans la classification internationale des maladies (CIM), on trouve la DMD dans les maladies du système nerveux (G00-G99), les affections musculaires et neuro-musculaires (G70-73), les affections musculaires primitives (G71) et enfin les dystrophies musculaires (G71.0). Les dystrophies musculaires regroupent l'ensemble des pathologies dégénératives affectant directement la fibre musculaire striée. Parmi elles, les dystrophinopathies désignent plus particulièrement les dystrophies musculaires dues à un déficit total ou partiel en dystrophine. La DMD représente la forme la plus fréquente et la plus sévère de dystrophie musculaire. Elle se caractérise par la perte progressive et irréversible à la fois de la masse et de la fonction musculaires et il n'existe, à ce jour, aucun traitement curatif. C'est une pathologie récessive liée au chromosome X qui touche 1 garçon nouveau-né sur 3500 (Emery, 1993). Cela représente actuellement en France environ 110 naissances par an. Dans plus de deux tiers des cas, la mère d'un garçon dystrophique (appelée mère porteuse) porte l'anomalie sur l'un de ses chromosomes X. Pour le petit tiers restant, une mutation *de novo* dans les gamètes de la mère est responsable de l'apparition de la maladie dans un terrain sans antécédent familial (Brown&Hoffman, 1988, Barbujani *et al.*, 1990). C'est la fréquence particulièrement élevée de ces mutations sporadiques (due en partie à la taille extrêmement importante du gène) qui explique que le taux d'incidence de la maladie soit stable alors que les garçons atteints ne deviennent jamais pères. On peut enfin noter quelques rares cas d'atteinte chez les filles, associés à un syndrome de Turner, la translocation d'un chromosome X et d'un autosome, ou l'inactivation préférentielle du chromosome X sain (Lescaut *et al.*, 2004).

Le gène DMD a pu être localisé au niveau du locus Xp21 (bras court du chromosome X) presque simultanément par trois approches distinctes : 1) l'étude des translocations chromosomiques *de novo* entre un chromosome X et un autosome chez les rares filles

atteintes de DMD, 2) l'étude dans différentes familles du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) et 3) l'étude de quelques rares cas de patients atteints simultanément par la DMD et par une ou plusieurs autres affections liées au chromosome X (Worton&Thompson, 1988). Les premières séquences du gène ont été isolées en 1985, aboutissant rapidement à son séquençage complet, et marquant ainsi l'un des tous premiers succès du clonage positionnel (Kunkel *et al.*, 1985, Monaco *et al.*, 1985, Monaco *et al.*, 1986). Peu après, un ADNc de 14 kb, correspondant au transcrit du gène dans le muscle squelettique fœtal, était cloné (Koenig *et al.*, 1987), puis la protéine était identifiée chez l'homme et chez la souris (Hoffman *et al.*, 1987). Cette découverte marqua l'un des tous premiers succès de la génétique inverse (c'est à partir du gène que la protéine a été identifiée). Avec ses 2,4 millions de paires de bases et ses 79 exons, le gène DMD représente le plus grand gène humain identifié à ce jour. On estime qu'il couvre 1 à 1,5% de la longueur totale du chromosome X et 0,05 à 0,1% du génome humain (Brown&Hoffman, 1988, Hoffman&Kunkel, 1989). Il comprend des introns de très grande taille, qui couvrent 99,4% de sa longueur. Il code la dystrophine, une protéine de 427 kDa (Koenig *et al.*, 1987, Koenig *et al.*, 1988). La dystrophine est localisée sous le sarcolemme des fibres musculaires et elle est absente des fibres DMD (Bonilla *et al.*, 1988, Zubrzycka-Gaarn *et al.*, 1988).

Dans près de deux tiers des cas, les mutations conduisant à un phénotype DMD sont de larges délétions touchant 1 ou plusieurs exons. Deux "points chauds" concentrent 75% des délétions, l'un se trouvant à l'extrémité 5' du gène et l'autre, dans la moitié distale du domaine central. Un petit tiers des cas sont quant à eux dus à des mutations ponctuelles, qui semblent réparties de façon aléatoire le long du gène : mutations non sens aboutissant à un codon stop prématuré ou, plus rarement, mutations faux sens. Enfin, 5 à 8% des cas sont causés par des duplications, qui semblent se répartir de la même façon entre les deux points chauds, et qui aboutissent soit à un décalage du cadre de lecture soit au contraire, à la formation d'une protéine plus longue (Koenig *et al.*, 1987, Worton&Thompson, 1988, Hoffman&Kunkel, 1989, Roberts *et al.*, 1994). La théorie de "l'interruption du cadre de lecture", énoncée en 1988, et vérifiée par la suite dans 92% des cas (sur 258 délétions analysées), stipule que le phénotype dépendrait des répercussions de la délétion sur le cadre de lecture. Les décalages dans le cadre de lecture, en provoquant l'apparition d'un codon stop prématuré et la formation d'une protéine tronquée et instable, seraient à l'origine d'un phénotype sévère de type Duchenne. Les délétions n'entraînant pas de décalage, en générant une protéine plus ou moins tronquée mais partiellement fonctionnelle, conduiraient au contraire à un phénotype moins sévère, dit de type Becker (Hoffman *et al.*, 1987, Koenig *et*

al., 1987, Monaco *et al.*, 1988, Koenig *et al.*, 1989). La dystrophie musculaire de Becker (BMD), décrite pour la première fois en 1955, est 10 fois plus rare que la DMD (Becker&Kiener, 1955, Hoffman *et al.*, 1987, Koenig *et al.*, 1987).

1.2. Signes cliniques

La DMD est une pathologie à caractère évolutif qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme. La dégénérescence est dans un premier temps suivie par une régénération efficace puis, la capacité régénérative diminuant, le tissu musculaire est progressivement remplacé par du tissu fibro-conjonctif ou adipeux (Willig, 1992, Arthuis *et al*., 1990).

Les premiers signes cliniques n'apparaissent généralement pas avant l'âge de 3 ans, même si l'apprentissage de la marche peut être retardé. L'enfant tombe facilement, éprouve des difficultés à courir et à monter les escaliers et des difficultés pour se relever. Une pseudo-hypertrophie des mollets (et éventuellement d'autres muscles) est observée, en raison de l'augmentation de la composante non musculaire du muscle. Une hypertrophie réelle est également parfois observée, dans les rares muscles qui sont relativement épargnés. Une rétraction tendineuse touche les fléchisseurs de la hanche, obligeant l'enfant à marcher sur la pointe des pieds. La station debout devient difficile à partir généralement de l'âge 6 ans et l'enfant a recours à l'utilisation d'un fauteuil roulant, de façon occasionnelle vers 8-9 ans, puis définitive dès l'âge de 10-12 ans. La faiblesse musculaire s'étend alors aux membres supérieurs, limitant peu à peu leur utilisation. Une scoliose grave se développe avec la perte de la marche, parfois même avant celle-ci et des contractures musculaires entraînent des déformations des membres. L'atteinte des muscles respiratoires donne lieu à une hypoventilation alvéolaire et rend l'enfant particulièrement sensible aux infections broncho-pulmonaires. Des troubles cardiaques (cardiomyopathie) peuvent également être présents, de même que des troubles digestifs et une ostéoporose entraînant fractures et obésité. Un retard intellectuel est possible même s'il ne concerne qu'un tiers des cas. Grâce à une prise en charge globale et adaptée, les patients atteignent le plus souvent l'âge de 20-30 ans. Dans 70% des cas, ce sont les problèmes cardiaques et/ou respiratoires qui sont à l'origine du décès.

La classification phénotypique Duchenne/Becker repose sur deux critères. Un phénotype DMD est défini par une perte de l'indépendance locomotrice intervenant avant 12 ans (entre 12 et 16 pour un phénotype intermédiaire et après 16 ans pour un phénotype Becker) et par une quantité de dystrophine dans le muscle inférieure à 3% de la quantité normale (de 3 à 20% pour un phénotype intermédiaire et supérieure à 20% pour un phénotype Becker).

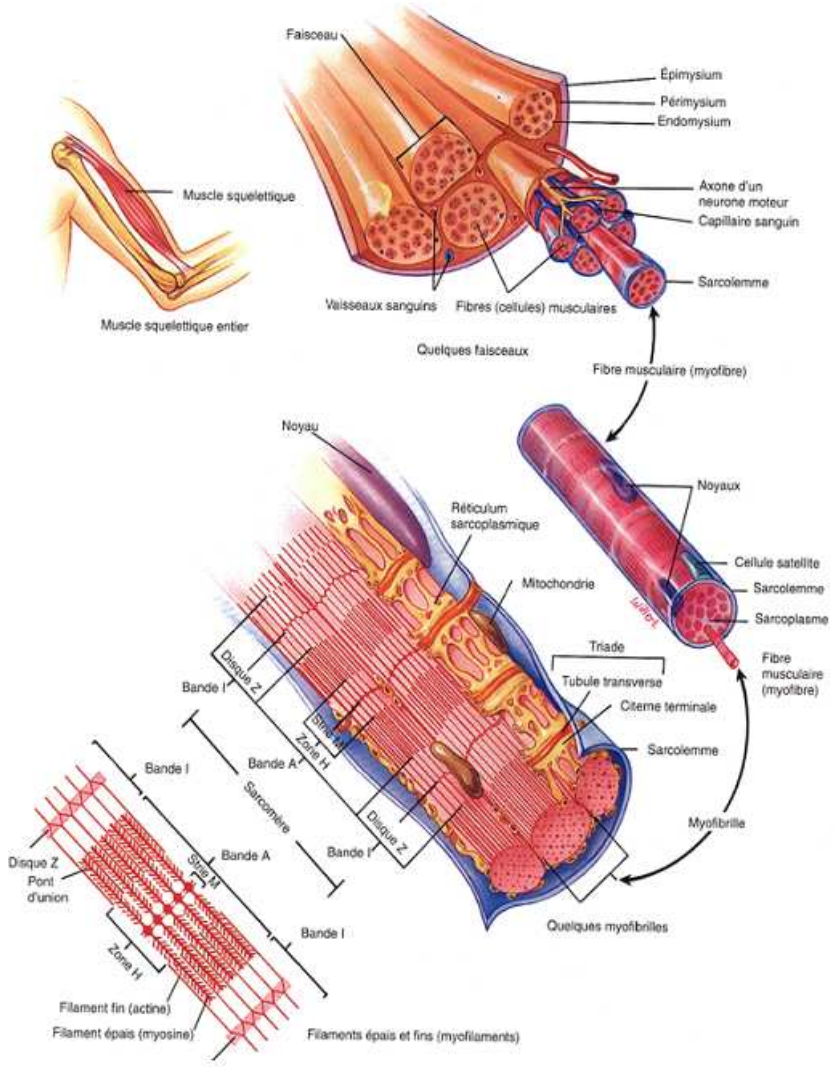


Figure 1 Anatomie du muscle squelettique. Image macroscopique et microscopique du muscle strié squelettique : du muscle entier au sarcomère. Chaque muscle squelettique est constitué de faisceaux, eux-mêmes composés de myofibres (ou fibres musculaires). Chaque fibre musculaire est elle-même constituée de myofibrilles (matériel contractile), dont l'unité de base est le sarcomère (Tortora *et al*., 1994).

1.3. Lésions du muscle dystrophique

1.3.1. Muscle squelettique, cellules satellites et régénération

Le muscle représente entre 40 et 50% de la masse corporelle et c'est par conséquent le tissu le plus abondant de l'organisme. Il est contractile, extensible et élastique, joue un rôle à la fois postural et dynamique et participe à la thermogénèse. On en distingue trois types : les muscles striés squelettiques, les muscles striés cardiaques et les muscles lisses. La DMD touche principalement les muscles squelettiques, même si les muscles cardiaques et les muscles lisses sont également atteints, et ce sont ceux que nous détaillerons un peu plus avant. Les muscles squelettiques assurent la mobilisation des os les uns par rapport aux autres. Chaque muscle est formé d'environ 2000 faisceaux, regroupant chacun 10 à 100 fibres musculaires, et il est entouré et protégé par plusieurs couches de tissu conjonctif : le fascia superficiel, le fascia profond, l'épimysium (autour du muscle), le périmysium (autour des faisceaux) et l'endomysium (lame réticulaire et lame basale, autour de chaque fibre). L'ensemble de ces tissus forme la MEC (Figure 1). Le matériel contractile correspond aux myofibrilles, structures tubulaires allongées de 1 à 2 μm de diamètre et constituées de myofilaments : filaments fins d'actine (associée à la tropomyosine et à la troponine) et filaments épais de myosine. De nombreux sarcomères (unité de base des myofibrilles, correspondant à l'espace compris entre deux disques Z) sont alignés les uns à la suite des autres et l'aspect strié du muscle est dû à cette organisation (alternance de bandes sombres correspondent aux filaments épais et de bandes claires correspondant aux zones ne renfermant que des filaments fins). Les muscles répondent de façon volontaire aux stimuli générés par les motoneurones (c'est le couplage excitation-contraction) et chaque unité motrice comprend un moto-neurone et les fibres musculaires (environ 150) qui lui sont associées. Chaque fibre provient de la fusion de nombreux myoblastes et renferme donc plusieurs noyaux répartis en position sous-sarcolemmale.

Suite à un exercice ou à un traumatisme (blessure ou maladie musculaire dégénérative), les muscles squelettiques sont capables de régénérer. Cela est dû en grande partie aux cellules satellites, des cellules capables d'auto-renouvellement décrites pour la première fois en 1961 (Grefte *et al.*, 2007, Le Grand&Rudnicki, 2007). Les cellules satellites résident en périphérie des fibres musculaires, entre la lame basale et le sarcolemme (cette position satellite étant à l'origine de leur appellation). Elles sont normalement chez l'adulte dans un état de quiescence mitotique, au cours duquel elles expriment Pax7. L'activation suite au stress semble faire intervenir des facteurs de croissance (FGF, TGFβ, IGF-1 et 2, HGF et IL-6), des facteurs intrinsèques aux cellules et l'environnement, même si les mécanismes

précis ne sont pas encore totalement compris. La voie p38/MAPK s'est entre autres révélée nécessaire à la régulation de l'état de quiescence et à l'activation. La myogénèse adulte est contrôlée de façon similaire à la myogénèse embryonnaire. Suite à leur activation, les cellules satellites commencent par surexprimer MyoD, Myf5, ou éventuellement les deux, et se mettent à proliférer activement (on parle alors de myoblastes ou de précurseurs myogéniques). La down-régulation de Pax3 et Pax7 et l'up-régulation de la myogénine et de Mrf4 conduisent ensuite à la différenciation terminale. Les cellules satellites fusionnent soit avec les fibres endommagées, permettant leur réparation, soit entre-elles, pour former de nouveaux myotubes. Les fibres régénérées sont de petit calibre et les noyaux sont localisés en position centrale. Leur maturation est caractérisée par une augmentation de la taille et la migration des noyaux vers la périphérie.

1.3.2. Le muscle dystrophique

1.3.2.1. Lésions du muscle strié squelettique

Le muscle dystrophique est caractérisé par l'existence de fibres nécrotiques, souvent regroupées en cluster, de petites myofibres centronucléées (signe d'une étape de régénération), de fibres hypertrophiées (dont certaines sont fragmentées), de fibres hyalines (fibres arrondies hypertrophiées au cytoplasme homogène et hyperacidophile rempli de calcium) et par une fibrose endomysiale multifocale précoce, à laquelle succèdent une fibrose périmysiale et une infiltration par du tissu adipeux. Les fibres révertantes (qui expriment la dystrophine) représentent généralement moins de 1% des fibres. Une expression d'utrophine (protéine homologue de la dystrophine, normalement exprimée principalement durant le développement embryonnaire et au niveau des jonctions neuro-musculaires dans le muscle l'adulte) est observée dans certaines fibres en régénération et certaines fibres matures mais son intensité, bien que croissante dans le temps, reste insuffisante pour avoir un effet significatif.

1.3.2.2. Lésions des muscles cardiaque et gastro-intestinaux

Deux types de lésions cardiaques sont observées : une dilatation sévère du ventricule gauche et une cardiomyopathie dilatée. On peut également observer des lésions gastro-intestinales (atrophie et parfois vacuolisation de la musculaire-muqueuse et de la musculeuse qui sont progressivement remplacées par du tissu fibreux).

1.4. Diagnostic et dépistage de la DMD

Le diagnostic est généralement prescrit suite à l'observation d'un déficit moteur associé à une pseudo-hypertrophie des mollets. La prise de sang permet de doser certaines enzymes musculaires libérées en cas de lésions, dont entre autres la créatine kinase (CK). Le taux de CK est considérablement augmenté dès la naissance, avec un pic intervenant entre 1 et 3 ans. Il diminue ensuite progressivement mais il reste plus de 20 fois supérieur à la normale (avec toutefois une diminution brutale lors de la cessation de l'activité ambulatoire). Le prélèvement d'une biopsie musculaire et son observation au microscope permettent de constater les lésions éventuelles et de déterminer la quantité de dystrophine exprimée. Un électrocardiogramme et un électromyogramme peuvent aussi être pratiqués, afin de mesurer l'activité cardiaque et l'activité musculo-squelettique, mais ils ne permettent pas à eux seuls de discriminer la DMD d'une autre pathologie. Deux kits PCR multiplexe de neuf exons chacun ont été développés, qui permettent de détecter 95% des délétions (Chamberlain *et al.*, 1988, Beggs *et al.*, 1990). Pour la recherche des duplications, une nouvelle méthode quantitative portant le nom de MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) a été développée récemment, qui permet de cribler simultanément les 79 exons du gène (Schwartz&Duno, 2004, Lalic *et al.*, 2005). Enfin, pour les mères porteuses déjà identifiées, et s'il s'agit d'un garçon, une biopsie du trophoblaste peut permettre de savoir s'il est ou non porteur de l'anomalie génique.

1.5. Traitements actuels

A ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible pour la DMD et seuls des traitements palliatifs, dits aussi freinateurs, sont prescrits, dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients. Les corticostéroïdes, en contribuant au maintien des fibres musculaires et à une réduction de l'inflammation, peuvent permettre de préserver la force musculaire et retarder l'utilisation du fauteuil roulant mais ils ne sont pas toujours efficaces et les effets secondaires sont nombreux. Les deux corticostéroïdes les plus utilisés sont la Prednisone et le Déflazacort. Des médicaments sont également proposés en cas de palpitations cardiaques. La chirurgie permet de corriger ou tout du moins de réduire les déformations (la chirurgie du rachis en particulier peut être envisagée afin de rigidifier la colonne vertébrale dans une position "correcte") et différents appareillages peuvent être utilisés pour guider, limiter voire supprimer certains mouvements. Les patients bénéficient par ailleurs de rééducation : kinébalnéothérapie, massages et kinésithérapie. Une ventilation nocturne puis diurne peut-être associée à de la kinésithérapie respiratoire ou de désencombrement. Enfin, des traitements

nutritionnels (supplémentation en calcium et en vitamine D, pour réduire le risque de fractures) et l'école de la déglutition (pour éduquer l'enfant à bien avaler) peuvent être proposés.

2. Dystrophine, protéines associées et pathogénie de la DMD

2.1. La dystrophine

2.1.1. Les différentes isoformes

Différentes isoformes de dystrophine, transcrites à partir du gène DMD, ont été identifiées dans le muscle comme dans les tissus non musculaires. Elles proviennent de l'existence de huit promoteurs différents (souvent tissu-spécifiques), d'un épissage alternatif et de l'utilisation de différentes séquences polyA (http://www.dmd.nl/isoforms.html).

On distingue tout d'abord quatre isoformes "longues", d'un poids moléculaire calculé de 427 kDa :

- la Dp427-M ou M-dystrophine (M pour "muscle").
- la Dp427-B ou B-dystrophine (B pour "brain"), exprimée dans les neurones du cortex et dans l'hippocampe.
- la Dp427-P ou P-dystrophine (P pour "Purkinje cells"), exprimée dans les cellules cérébelleuses de Purkinje et, dans une moindre mesure, dans le muscle squelettique.
- la Dp427-L ou L-dystrophine (L pour "lymphocytes"), exprimée dans les lymphocytes.

Quatre isoformes courtes, d'un poids moléculaire inférieur à 427 kDa, et qui sont tronquées à l'extrémité N-terminale, ont également été décrites :

- la Dp260 (260 kDa), exprimée dans la rétine.
- la Dp140 (140 kDa), exprimée dans l'encéphale et dans le rein.
- la Dp116 ou apodystrophine-2 (116 kDa), exprimée dans les cellules de Schwann du Système Nerveux Périphérique et dans l'encéphale embryonnaire.
- la Dp71 (71 kDa), ubiquitaire et produit principal du gène DMD dans les tissus non musculaires.

2.1.2. L'isoforme musculaire ou M-dystrophine

La protéine M-dystrophine, plus généralement appelée dystrophine, est exprimée dans tous les types de muscle (muscle strié squelettique, muscle strié cardiaque et muscle lisse) et dans certains neurones (Hoffman *et al.*, 1988, Boyce *et al.*, 1991). Elle représente environ 0,002% des protéines totales du muscle strié et 5% des protéines liées au sarcolemme (Hoffman *et al.*, 1987, Koenig *et al.*, 1988). Dans les fibres musculaires, elle est localisée en position sous-sarcolemmale et on la retrouve préférentiellement au niveau des costamères, en regard des bandes I (zones d'ancrage des filaments d'actine) et au niveau des jonctions myo-tendineuses et neuro-musculaires (Bonilla *et al.*, 1988, Zubrzycka-Gaarn *et al.*, 1988). Dans les fibres musculaires striées cardiaques, on la retrouve en plus au niveau des tubules T, sauf au niveau des *fascia adherens* des disques intercalaires. Dans les fibres musculaires lisses enfin, elle est observée le long du sarcolemme, mais en alternance avec la vinculine. Au niveau structural, la dystrophine est une protéine articulée de forme allongée présentant quatre domaines distincts (Figure 2).

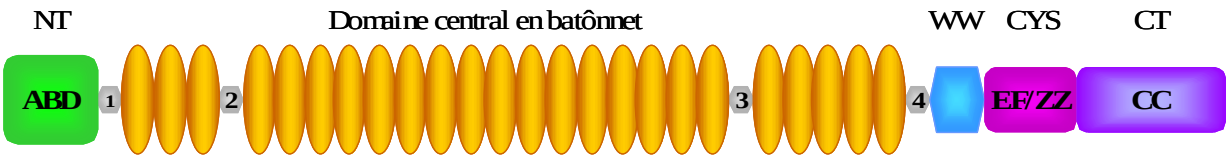


Figure 2 Organisation schématique de la dystrophine. NT : domaine N-terminal, ABD : domaine de liaison à l'actine, 1-4 : les 4 régions charnières riches en proline fournissant à la structure sa flexibilité, WW : domaine WW (deux résidus tryptophane conservés), CYS : domaine riche en cystéines, EF : sites de fixation au calcium (EF hand calcium-binding domains), ZZ : site potentiel de fixation au zinc (zinc finger domain), CC : coiled-coil domain, CT : domaine C-terminal.

Le domaine N-terminal est composé de plus de 240 acides aminés et possède un domaine de liaison à l'actine (ABD pour actin binding domain) (Rybakova *et al.*, 2000). Une homologie a été montrée avec l'α-actinine, la β-spectrine et la calponine (Koenig *et al.*, 1988, Lapidos *et al.*, 2004). Le domaine central en bâtonnet est composé de 2840 acides aminés, pour une longueur de 125 à 175 nm. Il présente 24 séquences répétées de 109 acides aminés, similaires aux éléments hélicoïdaux de l'α-actinine et de la β-spectrine. Trois hélices s'alignent pour former chaque domaine répété et confèrent à la structure sa rigidité (Davison&Critchley, 1988, Koenig *et al.*, 1988). La flexibilité est quant à elle apportée par quatre régions charnières riches en résidus proline (Koenig&Kunkel, 1990). Un domaine WW (deux résidus tryptophane conservés) lie les régions riches en proline de façon analogue aux domaines SH3 et est impliqué dans l'interaction de la dystrophine avec le β-dystroglycane (β-

DG) (Einbond&Sudol, 1996, Sudol, 1996a, b). Le domaine riche en cystéines est composé de plus de 280 acides aminés. Il renferme deux sites essentiels de fixation au calcium (EF1 et EF2) et un site potentiel de fixation au zinc (ZZ), qui interviennent dans l'interaction avec le β-DG. Le domaine C-terminal enfin est composé de 320 acides aminés. Il contient des sites de liaison à la dystrobrévine, aux syntrophines et à l'actine. Il interagit également avec le β-DG.

2.2. Le complexe dystrophine-glycoprotéines associées

La dystrophine fait partie d'un complexe multi-protéique appelé "dystrophin-glycoprotein associated complex" (DGC). Le DGC est constitué de protéines intracellulaires, membranaires et extracellulaires et il peut être subdivisé en trois sous-complexes : le complexe des dystroglycanes (DG), le complexe des sarcoglycanes (Mayer *et al.*) comprenant en plus le sarcospan, et le complexe cytoplasmique (Figure 3). Par l'intermédiaire de ce complexe, la dystrophine établit un lien physique entre les filaments d'actine du cytosquelette sous-sarcolemmal (avec lesquelles elle interagit *via* son domaine N-terminal) et la matrice extracellulaire (MEC) des fibres musculaires. En effet, le domaine C-terminal de la dystrophine lie le β-DG qui interagit lui-même avec l'α-DG, permettant la liaison avec la laminine 2, ou mérosine, une protéine de la MEC des fibres musculaires (Campbell&Kahl, 1989, Ervasti&Campbell, 1991, Ozawa *et al.*, 1995).

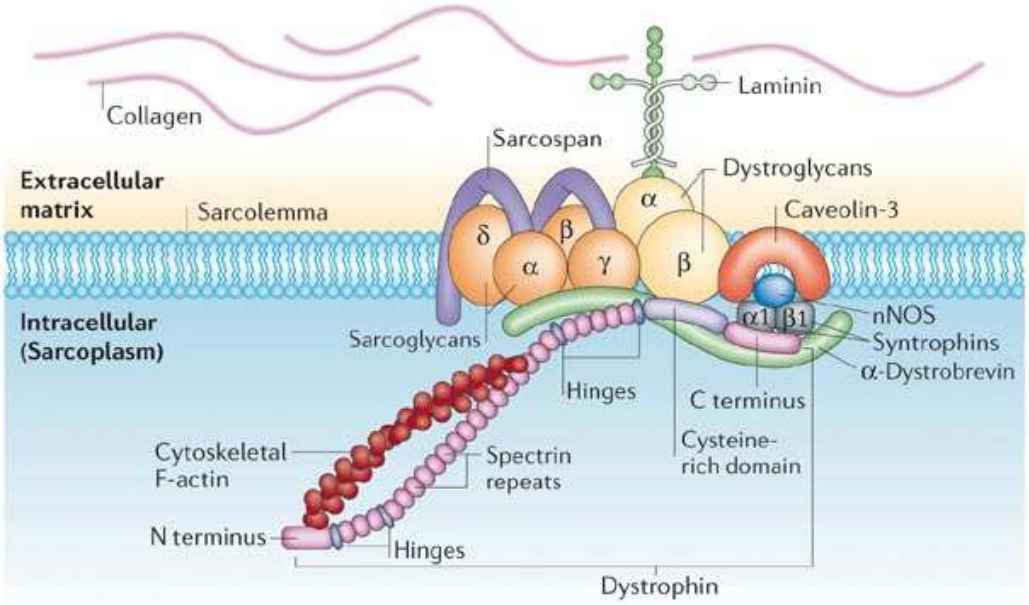


Figure 3 La dystrophine et le complexe dystrophine-glycoprotéines associées (DGC). Les principales protéines du DGC sont représentées : le complexe des dystroglycanes (α et β-DG), le complexe des sarcoglycanes (α, β, γ et δ-SG), avec le sarcospan, la nNOS et la cavéoline 3 (Davies&Nowak, 2006).

2.2.1. Le complexe des dystroglycanes

Le complexe des dystroglycanes comprend l'α et le β-DG, deux glycoprotéines identifiées en 1990 dont la glycosylation (de type O) est cruciale à la fonction (Ervasti *et al.*, 1990). Un gène unique (DAG1) code un précurseur protéique, exprimé de façon ubiquitaire et rapidement clivé en deux sous-unités (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992, Winder, 2001). L'α-DG, anciennement dénommée 156-DAG (glycoprotéine associée à la dystrophine), en raison de sa masse moléculaire, est une protéine exclusivement extracellulaire, qui lie la chaîne α2 de la laminine 2 de manière Ca^{2+}-dépendante (Ervasti&Campbell, 1993). Des interactions ont également été rapportées avec la laminine 4, la laminine 1, l'agrine (Bowe *et al.*, 1994, Campanelli *et al.*, 1994, Gee *et al.*, 1994, Sugiyama *et al.*, 1994) et le perlecan (Peng *et al.*, 1998). Le β-DG (ou 43-DAG) possède un court domaine C-terminal intracellulaire, qui interagit avec le domaine riche en cystéines de la dystrophine, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire qui interagit avec l'α-DG. Il interagit également avec l'utrophine et la cavéoline 3 (Huang *et al.*, 2000, Sotgia *et al.*, 2000).

Aucune pathologie neuro-musculaire associée directement à des mutations dans le gène des DG n'a jusqu'à présent été identifiée mais des mutations dans des gènes impliqués dans la glycosylation de l'α-DG conduisent à des formes de dystrophie musculaire congénitale (CMD) appelées α-dystroglycanopathies. L'hypoglycosylation de l'α-DG réduit son interaction avec la laminine-2. Ces pathologies regroupent des formes sévères, telles que la MEB (muscle-eye-brain disease), la CMD de Fukuyama, le syndrome de Walker-Warburg (WWS) ou la CMD de type 1D, et des formes plus légères, telles que la CMD de type 1C et des dystrophies musculaires des ceintures (LGMD, pour Limb-Girdle Muscular Dystrophy) de type 2 (Sciandra *et al.*, 2003, Lapidos *et al.*, 2004, Muntoni *et al.*, 2008).

2.2.2. Le complexe des sarcoglycanes

On distingue six isoformes différentes de sarcoglycanes: l'α (ou adhaline), la β, la δ, la γ, l'ε (hautement homologue à l'α) et la ζ-SG, identifiée plus récemment. (Ettinger *et al.*, 1997, McNally *et al.*, 1998b, Hack *et al.*, 2000, Wheeler *et al.*, 2002). Elles ont une masse moléculaire respective de 50, 43, 35, 35, 45 et 40 kDa, et ce sont des protéines transmembranaires qui contiennent au moins un site de glycosylation (Ozawa *et al.*, 1998). L'isoforme ε est ubiquitaire, chez l'adulte comme chez l'embryon, alors que les cinq autres sont exclusivement musculaires, l'α et la γ-SG étant spécifiques du muscle strié. Le complexe observé dans le muscle squelettique comprend les isoformes α, β, δ et γ. Enfin, nous pouvons

noter que les sarcoglycanes étaient, comme les dystroglycanes, anciennement dénommées DAG.

Des mutations dans les gènes des SG sont à l'origine de formes autosomiques récessives de LGMD, aussi appelées sarcoglycanopathies. On distingue les formes LGMD2C (déficit en γ-SG), 2D (déficit en α-SG), 2E (déficit en β-SG) et 2F (déficit en δ-SG) (Sciandra *et al.*, 2003, Lapidos *et al.*, 2004).

Le sarcospan est une protéine de 25 kDa qui appartient à la superfamille des tétraspanines (Crosbie *et al.*, 1997). Il présente deux transcrits de taille différente : l'un spécifique du cœur et l'autre spécifique du muscle squelettique. Il est hautement hydrophobe, possède quatre segments transmembranaires et ses extrémités N et C-terminales sont tournées vers le cytoplasme. On le trouve tout le long du sarcolemme, même s'il est particulièrement présent dans la membrane post-synaptique des jonctions neuro-musculaires et myo-tendineuses des fibres musculaires striées squelettiques, où il s'associe soit avec la dystrophine, soit avec l'utrophine. Il est essentiel à l'ancrage membranaire du complexe des SG et la présence du complexe est quant à elle nécessaire à la stabilité du sarcospan à la membrane. Le complexe sarcospan-SG stabilise la localisation membranaire du β-DG.

2.2.3. Le complexe cytoplasmique

2.2.3.1. Les syntrophines

Les syntrophines, anciennement dénommées DAP (dystrophin associated proteins), sont des protéines intracellulaires associées à la dystrophine. Elles représentent une famille multigénique de protéines qui comprend : l'α1-syntrophine (SNT-A1, homologie avec le domaine riche en cystéines et le domaine C-terminal de la dystrophine), la β1-syntrophine (SNT-B1) et la β2-syntrophine (SNT-B2). Chaque isoforme contient deux domaines PH (pleckstrin homology domains) : PH1 (qui renferme un domaine PDZ) et PH2. Tous les tissus expriment deux voire les trois isoformes. Les syntrophines se retrouvent préférentiellement au niveau des jonctions neuro-musculaires (exclusivement pour la β2) dont elles favorisent le fonctionnement en permettant l'accumulation des canaux sodiques voltage-dépendants. L'α1-syntrophine est exprimée essentiellement dans le cœur, dans le muscle squelettique et, dans une moindre mesure, dans le cerveau. Les isoformes β1 et β2 sont ubiquitaires. Dans le muscle, l'α1-syntrophine prédomine (on la retrouve tout le long du sarcolemme) et la β1-syntrophine se distribue le long du sarcolemme des fibres de type

rapide. Les syntrophines interagissent avec la dystrophine, les dystrobrévines, le $PtdInsP_2$, nNOS, la calmoduline et Grb2 (Kramarcy *et al.*, 1994, Peters *et al.*, 1994).

2.2.3.2. L'α-dystrobrévine

L'α-dystrobrévine est une protéine homologue de la dystrophine et elle est associée au DGC par une liaison directe avec les syntrophines. On la trouve au niveau du sarcolemme des fibres musculaires et des jonctions neuro-musculaires. L'α-dystrobrévine 1, l'isoforme la plus longue, contient un domaine de liaison au Ca^{2+} (EF hand), un site potentiel de liaison au zinc (domaine ZZ), un domaine superenroulé de type "coiled-coil" (interaction avec la dystrophine) et un domaine tyrosine kinase. Elle interagit avec la nNOS (Roberts, 2001). L'isoforme β, identifiée plus récemment, lie la syntrophine à l'utrophine. Elle est exprimée dans le cerveau, les reins et les poumons mais est absente du muscle.

2.2.4. Autres protéines associées au complexe

La nNOS (monoxyde d'azote synthétase neuronale) et la cavéoline 3 sont également associées au DGC, mais par une interaction de moindre intensité.

2.2.4.1. nNOS

L'isoforme nNOSμ est exprimée le long du sarcolemme des muscles squelettiques (Stamler&Meissner, 2001). De par son interaction avec l'α1-syntrophine (Brenman *et al.*, 1996), on la retrouve plus spécifiquement au niveau des jonctions neuro-musculaires et myo-tendineuses et des sarcomères. Elle catalyse la transformation de la L-arginine en oxyde nitrique (NO), un radical libre, et participerait à la modulation de nombreux phénomènes (couplage excitation/contraction, respiration mitochondriale, métabolisme glucidique, transmission de l'influx nerveux et activation des cellules satellites entre autres). Une perte sélective de la nNOS au niveau du sarcolemme a été montrée chez la souris *mdx* comme chez les patients DMD (Brenman *et al.*, 1995, Chang *et al.*, 1996). Chez la souris, l'enzyme est relocalisée à l'intérieur des fibres musculaires, où elle continue à produire du NO (Stamler&Meissner, 2001). Les souris déficientes en dystrophine et en nNOS développent un phénotype comparable à celui des souris *mdx*, suggérant que la perte de l'enzyme ne participerait pas à la pathogénie (Crosbie *et al.*, 1998a). Enfin, nNOS interagit directement avec la cavéoline 3, ce qui l'inactive (Venema *et al.*, 1997).

2.2.4.2. La cavéoline 3

Les cavéolines sont des protéines de 18 à 24 kDa intégralement membranaires. Elles s'oligomérisent pour former des cavéoles, rafts lipidiques correspondant à des invaginations de 50 à 100 nm de diamètre, présents dans la plupart des tissus et jouant un rôle dans l'endo- et l'exocytose et dans l'homéostasie du cholestérol. Elles sont au nombre de trois : la cavéoline 1 (isoformes α et β), la cavéoline 2 (isoformes α, β et γ) et la cavéoline 3 (de Laurentiis *et al.*, 2007, Thomas&Smart, 2008). La cavéoline 3 est spécifique du muscle strié et c'est la seule isoforme exprimée dans les cellules musculaires squelettiques post-mitotiques pleinement différenciées. Elle interagit avec le DGC, son domaine WW-like reconnaissant le motif PPXY de l'extrémité cytoplasmique du β-DG (Song *et al.*, 1996, Crosbie *et al.*, 1998b, Sotgia *et al.*, 2000). Il a d'ailleurs été montré qu'elle pouvait bloquer l'interaction de la dystrophine avec le β-DG, suggérant qu'elle pourrait réguler le recrutement de la dystrophine à la membrane (Sotgia *et al.*, 2000). Outre leur rôle structural, il est maintenant clairement établi que les cavéoles interviennent aussi dans la régulation d'un grand nombre de voies de signalisation cellulaire, dont les voies MAPK et PI3K/Akt. On y trouve des molécules de signalisation (h-Ras, petite protéine G_q, kinases Src, eNOS, PI3K et PLC entre autres), ainsi que des récepteurs (récepteurs au PDGF, à l'EGF, à l'IGF-1 et récepteurs c-Kit, TrkA et CD36). Cependant, le rôle précis joué par les cavéoles dans la régulation de ces voies demeure controversé. Certaines études tendent par exemple à montrer que la signalisation par les récepteurs au PDGF et à l'EGF est initiée dans les cavéoles alors que d'autres suggèrent au contraire un effet inhibiteur de ces dernières (de Laurentiis *et al.*, 2007, Thomas&Smart, 2008). La densité des cavéoles est augmentée dans les muscles *mdx* et DMD (Vaghy *et al.*, 1998, Repetto *et al.*, 1999, Galbiati *et al.*, 2001).

Des mutations dans le gène de la cavéoline 3 sont à l'origine d'une forme autosomique dominante de LGMD (la forme 1C), aussi appelée cavéolinopathie (Sciandra *et al.*, 2003).

2.3. Pathogénie de la DMD

Malgré des avancées importantes dans la compréhension de la pathogénie de la DMD, les mécanismes globaux ne sont à l'heure actuelle toujours pas élucidés. La dystrophine et le DGC jouent avant tout un rôle structural et les mécanismes "structuraux" conduisant de l'absence de dystrophine à la nécrose des fibres dystrophiques sont bien décrits. La contraction musculaire correspond à une déformation et à un raccourcissement des myofibres et, pendant ce phénomène, la machinerie contractile doit rester intimement connectée avec le

sarcolemme, au risque de l'endommager. La dystrophine, en établissant un lien physique entre la MEC et le cytosquelette des fibres musculaires, contribue au maintien de l'intégrité du sarcolemme lors des cycles de contraction-relaxation (Carpenter *et al.*, 1990, Petrof *et al.*, 1993, Lapidos *et al.*, 2004). L'absence de dystrophine résulte en une réduction, voire en une absence complète, des composants du DGC (devenus instables) à la membrane (Straub&Campbell, 1997, Straub *et al.*, 1997). Cela conduit à une instabilité du sarcolemme et à l'apparition de dommages, appelés lésions delta (Helliwell *et al.*, 1994). Ce phénomène peut être accentué par les contractions, notamment par les contractions excentriques (Petrof *et al.*, 1993). Cette perte d'intégrité du sarcolemme va entraîner un influx de calcium, l'activation des protéases calcium-dépendantes (calpaïnes) et la nécrose des fibres dystrophiques (*via* la dérégulation de mécanismes régulateurs et/ou *via* une augmentation globale de la protéolyse) (Turner *et al.*, 1993, Straub&Campbell, 1997, Tidball&Spencer, 2000, Bartoli&Richard, 2005). Le DGC protège donc le sarcolemme contre les dommages induits par les contractions. Des études plus ou moins récentes ont par ailleurs montré que des évènements secondaires, tels que l'inflammation, le stress oxydatif, l'altération de la régénération musculaire, et la fibrose, participaient aussi au phénotype dystrophique (Disatnik *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2000, Spencer *et al.*, 2001, Spencer&Tidball, 2001, Khurana&Davies, 2003, Tidball&Wehling-Henricks, 2004, Wehling-Henricks *et al.*, 2004, Deconinck&Dan, 2007). Cependant, il faut ajouter à ces mécanismes le rôle probable joué par des dérèglements des voies de signalisation cellulaire.

3. Les modèles animaux de la DMD

3.1. La souris *mdx*

La souris *mdx* (X-linked muscular dystrophy), premier et principal modèle animal de la DMD, a été découverte par hasard au sein d'une colonie de souris C57/BL10ScSn, suite à l'observation de mutants spontanés présentant des niveaux plasmatiques élevés de créatine et de pyruvate kinases musculaires et des lésions histologiques caractéristiques de la DMD (la transmission du phénotype se faisant selon un mode récessif lié au chromosome X) (Bulfield *et al.*, 1984). L'absence de dystrophine chez la souris *mdx* est due à une mutation ponctuelle dans l'exon 23 (C3185T), conduisant à un codon stop prématuré (Sicinski *et al.*, 1989, Nonaka, 1998) et à la synthèse d'une protéine tronquée, faisant 27% de la taille normale (et correspondant au domaine N-terminal et à sept séquences répétées). Cette forme tronquée étant instable, elle est rapidement dégradée (Sicinski *et al.*, 1989, De la Porte *et al.*, 1999) et la dystrophine est complètement absente du muscle squelettique, à l'exception de quelques rares

fibres révertantes. Cependant, le phénotype de la souris *mdx* est beaucoup moins sévère que celui observé chez l'homme et les mutants sont viables et fertiles, avec une durée de vie presque similaire à celle des souris saines (Bulfield *et al.*, 1984, Carnwath&Shotton, 1987, Torres&Duchen, 1987, Coulton *et al.*, 1988). La faiblesse musculaire est minime et la prise de poids est comparable sinon supérieure à celle des animaux sains. Les fibres *mdx* sont remplacées de façon continue et efficace, et cette régénération, avec le fait que les fibres musculaires perdues ne soient pas remplacées par du tissu fibro-adipeux, préservent la souris *mdx* du stade terminal observé chez l'homme. Seul le diaphragme est sévèrement atteint et présente un phénotype se rapprochant de celui des muscles DMD (un paragraphe spécial lui est consacré). La cardiomyopathie est beaucoup moins marquée que chez l'homme (DiMario *et al.*, 1991) et les lésions, lorsqu'elles sont observées, se présentent sous forme de foyers de nécrose dans le ventricule gauche (Torres&Duchen, 1987, Coulton *et al.*, 1988). Contrairement à l'évolution lentement progressive observée chez l'homme, la dystrophie évolue, dans les muscles squelettiques de la souris *mdx*, selon quatre phases distinctes, décrites ci-après.

3.1.1. Lésions des muscles striés squelettiques autres que le diaphragme

3.1.1.1. Stade pré-nécrotique

Jusqu'à 3 semaines, le seul signe distinguant une souris *mdx* de son homologue sain est la présence de rares fibres hyalines et une légère hypertrophie des muscles (Torres&Duchen, 1987, Coulton *et al.*, 1988, Pastoret&Sebille, 1993, De la Porte *et al.*, 1999).

3.1.1.2. Stade nécrotique

À partir de 3 semaines, des vagues de nécrose successives entraînent la perte des fibres musculaires normales. Elles affectent des clusters regroupant jusqu'à une centaine de fibres et les muscles des membres sont les plus sévèrement atteints. Ils développent une atrophie, associée à une faiblesse musculaire transitoire. Certaines zones présentent des variations dans la taille des fibres. Des fibres en dégénération sont observées, de même que des fibres centronucléées. Les zones nécrotiques sont envahies par des macrophages, entraînant une inflammation mononucléée. Le *tibialis anterior* (TA) présente toutefois une régénération efficace associée à de l'hypertrophie (Bulfield *et al.*, 1984, Coulton *et al.*, 1988, Partridge *et al.*, 1989, Louboutin *et al.*, 1993, Pastoret&Sebille, 1993, Nonaka, 1998).

3.1.1.3. Stade hypertrophié

La nécrose est suivie d'une régénération compensatrice intense et efficace qui va durer plusieurs mois. Vers deux-trois mois, 70 à 80% des fibres sont centronucléées (Bulfield *et al.*, 1984, Torres&Duchen, 1987, Coulton *et al.*, 1988, Partridge *et al.*, 1989) et une variabilité considérable est observée dans le diamètre des fibres (Louboutin *et al.*, 1993). La dégénération et la nécrose de certaines fibres s'accompagnent de la prolifération de cellules phagocytaires et de fibroblastes. La présence de fibres hypertrophiées fait, qu'à six mois, les fibres *mdx* ont en moyenne un diamètre augmenté de 50% par rapport aux fibres normales (Pastoret&Sebille, 1993). Beaucoup de ces fibres hypertrophiées sont fragmentées (Louboutin *et al.*, 1993). Malgré une faible fibrose et la phagocytose des fibres nécrotiques, le tissu perdu n'est pas remplacé par des cellules graisseuses. L'accumulation de tissu conjonctif est très restreinte et ne semble pas affecter la capacité musculaire (Bulfield *et al.*, 1984, Partridge *et al.*, 1989, Pastoret&Sebille, 1993, Lefaucheur *et al.*, 1995).

3.1.1.4. Stade terminal

Chez la souris *mdx* âgée, les résultats concernant une éventuelle diminution de la force musculaire sont contradictoires (Lefaucheur *et al.*, 1995, Pastoret&Sebille, 1995, Bobet *et al.*, 1998). À partir de douze mois, les fibres hypertrophiées et en cours de régénération se raréfient. Quelques fibres dégénératives et nécrotiques persistent mais ce qui est surtout observé, ce sont des fibres fragmentées et une atrophie accompagnée d'une fibrose endomysiale (Pastoret&Sebille, 1993). Dans les derniers mois de la vie, la fibrose est parfois accompagnée d'infiltration de tissu adipeux et, à partir de 65 semaines, les muscles squelettiques présentent un phénotype lésionnel sévère (Pastoret&Sebille, 1995).

3.1.2. Le diaphragme

Le diaphragme est le seul muscle de la souris *mdx* présentant un phénotype comparable à celui des patients DMD. Les lésions sont observées à partir de 25 jours (Stedman *et al.*, 1991, Louboutin *et al.*, 1993) et la nécrose (accompagnée d'une inflammation mononucléée) touche d'abord de petits amas de fibres. La régénération est bien moins efficace que dans les muscles squelettiques (Louboutin *et al.*, 1993) et dès six mois, le nombre de fibres diminue, alors que la nécrose continue à progresser (Stedman *et al.*, 1991). La taille des fibres est très hétérogène, mais la taille moyenne est inférieure à celles des fibres saines (Louboutin *et al.*, 1993). Les fibres *mdx* sont progressivement remplacées par du tissu

conjonctif (Stedman *et al.*, 1991) et, dans une moindre mesure, par du tissu adipeux (Louboutin *et al.*, 1993).

En conclusion, la souris *mdx* représente un modèle prolifique, facile d'entretien et peu coûteux de la DMD. C'est un modèle extrêmement utilisé, notamment, en ce qui nous intéresse, pour la mise au point des études de génomique et de protéomique. C'est également un modèle peu affecté par l'absence de dystrophine, et qui peut être utilisé pour tenter de comprendre les mécanismes permettant la régénération musculaire. Le fait que le phénotype soit différent selon les muscles peut enfin être mis à profit pour tenter de distinguer les dérèglements des voies de signalisation associés à l'absence primaire de dystrophine (et que l'on devrait par conséquent observer dans tous les muscles), de ceux liés à la sévérité du phénotype (et qui devraient être plus marqués dans le diaphragme que dans le TA par exemple) (Lang *et al.*, 2004).

3.2. Le chien GRMD

Des chiens de lignée golden retriever (labrador) présentant spontanément une myopathie transmise comme un caractère lié au chromosome X ont été décrits (Valentine *et al.*, 1986, Kornegay *et al.*, 1988) et une colonie a été créé dès 1986, avec des chiens croisés Beagle et des chiens croisés Retriever (Valentine *et al.*, 1986, Cooper *et al.*, 1990). Le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), parfois appelé GXMD (Golden Retriever X-linked Muscular Dystrophy) ou CXMD (Canine X-linked Muscular Dystrophy) a été accepté comme modèle valide de la DMD en 1988, lorsque la preuve de l'absence de dystrophine a été apportée (Cooper *et al.*, 1988). Ces chiens présentent une mutation ponctuelle (G→A) dans le site d'épissage 3' de l'intron 6, avec pour conséquence la perte de l'exon 7 et un décalage dans le cadre de lecture conduisant à l'apparition prématurée d'un codon stop au niveau de l'exon 8 (domaine N-terminal) (Sharp *et al.*, 1992). Le chien GRMD représente le modèle animal le plus proche des patients DMD ; la patho-physiologie est extrêmement comparable à celle de l'homme, même si la dystrophie apparaît plus brutalement (avec une évolution très rapide la première année) (Partridge, 1991). En plus de la forme classique (utilisée dans cette étude et par conséquent décrite dans le paragraphe qui suit), une forme néonatale fulminante, fatale dans les vingt premiers jours a également été décrite.

3.2.1. Signes cliniques

Le taux de CK est anormalement élevé dès les premiers jours de vie mais les premiers signes cliniques de la pathologie n'apparaissent qu'entre 8 et 10 semaines, durant la période

de sevrage (Valentine *et al.*, 1986, Kornegay *et al.*, 1988, Valentine *et al.*, 1988). Les chiots présentent une fatigabilité excessive, une démarche anormale et leur course prend un aspect de "sauts de lapin". Ils éprouvent des difficultés à ouvrir la gueule, un aboiement faible, une posture anormale, des troubles de la marche, une activité restreinte et une amyotrophie de la musculature du tronc et de la musculature temporale. Dès trois mois, un exercice même modéré provoque une respiration abdominale et une polypnée, témoignant d'une insuffisance respiratoire. Une hypertrophie de la base de la langue et une atteinte œsophagienne entraînent une dysphagie (gêne à la préhension et à la mastication des aliments), des régurgitations et une hypersalivation. L'amyotrophie s'aggrave ensuite progressivement. Les muscles proximaux des membres, qui ne sont pas touchés par l'atrophie, se fibrosent, empêchant l'extension totale des articulations. A huit mois, la plupart des chiens éprouvent de grosses difficultés à marcher, même si la perte totale de la fonction locomotrice n'est généralement pas observée. La dysphagie et la quantité accrue de métabolites nécessaires pour la synthèse protéique dans les fibre en régénération entraînent un retard de croissance. L'atteinte des muscles pharyngés provoque en plus une atteinte sévère du tractus digestif. Vers un an, la colonne vertébrale se déforme. Les muscles respiratoires sont également touchés. La fonction cardiaque reste longtemps normale mais elle peut, chez certains chiens âgés, rapidement se détériorer, entraînant alors insuffisance cardiaque et mort par cardiomyopathie (Valentine *et al.*, 1988). La mort survient généralement avant l'âge de deux ans. Une euthanasie est pratiquée pour insuffisance cardiaque terminale ou détresse respiratoire fatale (due à une pneumonie par fausse déglutition). La reproduction est difficile car la dystrophie s'accompagne d'une immaturité sexuelle.

3.2.2. Lésions des muscles striés squelettiques

Les muscles squelettiques peuvent être d'apparence normale ou être au contraire pâles et fermes. La plupart sont atrophiés mais certains sont au contraire hypertrophiés (langue, musculeuse œsophagienne et piliers du diaphragme entre autres). Les lésions sont similaires à celles observées dans les muscles des patients DMD. Les lésions précoces correspondent uniquement, comme chez l'enfant, à la présence de fibres hyalines. À partir de quelques semaines, les lésions ressemblent déjà à ce qui est observé chez un enfant de deux à cinq ans : hétérogénéité du diamètre, fibres nécrotiques envahies de macrophages, petites fibres en régénération, fibres dégénératives (fibres de grand calibre, arrondies, hyperéosinophiles et au cytoplasme granuleux et/ou fragmenté), fibres hypercontractées, fibres fragmentées et fibres matures centronucléées. Lorsque la pathologie progresse, quelques fibres minéralisées sont

observées. Le nombre de fibres en phagocytose et de fibres centronucléées augmente, de même que la quantité de tissu conjonctif endo- et périmysial, et l'infiltration par du tissu adipeux (non systématique toutefois).

3.3. Autres modèles animaux

Outre la souris *mdx* et le chien GRMD, qui représentent les deux modèles animaux les plus utilisés pour la DMD, plusieurs autres modèles (naturels ou non) ont également été décrits (Collins&Morgan, 2003). Une souris *mdx/utrn*$^{-/-}$ (déficiente en dystrophine mais également en utrophine) a été générée, qui développe un phénotype beaucoup plus sévère que la souris *mdx*, et comparable à celui des muscles DMD. Des mutations spontanées dans le gène de la dystrophine ont par ailleurs été identifiées chez deux autres races de chien (le Rottweiler et le pointer allemand à poils ras) et un modèle Beagle a été produit. Un modèle félin est également disponible, mais l'absence de dystrophine chez le chat aboutit à une dystrophie musculaire hypertrophique (HFMD, hypertrophic feline muscular dystrophy), associée à des cycles de nécrose/régénération des muscles squelettiques, et à une cardiomyopathie. Les modèles animaux non mammaliens, tels que le poisson zèbre et le ver *Caenorhabditis elegans*, qui possèdent des homologues de la dystrophine et du DGC, présentent l'avantage, bien que la musculature et la pathogénie soient très différentes de ce qui est observé chez l'homme, de pouvoir être manipulés en grand nombre et d'être facilement modifiables sur le plan génétique. Ils peuvent permettre le criblage à haut-débit de molécules potentiellement intéressantes en vue d'une thérapie pharmacologique ou d'une thérapie génique.

4. Pistes thérapeutiques pour le traitement de la DMD

La DMD fait partie des pathologies les plus difficiles à soigner et deux grandes approches sont actuellement à l'étude. La première vise à rétablir l'expression de la dystrophine par thérapie cellulaire ou génique (transfert de gène ou réparation du gène endogène) et la seconde, cible les voies moléculaires localisées en aval de l'absence de dystrophine (approches pharmacologiques). Les stratégies de thérapie génique et cellulaire se devant, pour être efficaces, aboutir à la restauration de l'expression de la dystrophine dans l'ensemble des muscles de l'organisme, les difficultés rencontrées sont importantes. Une description de quelques unes des pistes thérapeutiques les plus prometteuses est donnée ci-après. Elle ne se veut pas exhaustive.

4.1. La thérapie génique

L'expression du produit d'un gène défectueux (quel que soit ce gène) par une stratégie de thérapie génique peut s'accompagner de la mise en place d'une réaction immunitaire. Cependant, des études ont suggéré que l'existence, chez les patients DMD, de fibres révertantes pourrait permettre de pallier à ce problème (Ferrer *et al.*, 2004). Une limite importante de la thérapie génique pour la DMD est par contre liée à la diffusion du vecteur, une injection intra-musculaire transduisant des cellules dans une zone située en moyenne seulement quelques centimètres autour du site d'injection (Hartigan-O'Connor&Chamberlain, 2000, O'Hara *et al.*, 2001).

4.1.1. Le transfert de gènes

Les vecteurs AAV (adeno-associated vectors) ont une taille réduite et une immunogénicité, bien que significative, limitée et ils représentent actuellement les vecteurs de choix (Goyenvalle *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2007). A cause de leur capacité limitée, ils ne peuvent cependant pas être utilisés pour transporter la dystrophine entière et des mini-gènes ont été construits, avec un nombre réduit de domaines répétés centraux mais des domaines N et C-terminaux conservés. Les minidystrophines se sont révélées capables de remplacer la protéine normale chez la souris *mdx*, même si elles se sont avérées moins efficaces chez le chien GRMD (Sampaolesi *et al.*, 2006). Chez ce dernier, des études récentes semblent cependant indiquer qu'il soit possible d'éviter la réponse immune contre les protéines virales (Wang *et al.*, 2007). Un essai clinique de phase 1, utilisant des vecteurs AAV exprimant une minidystrophine sous le contrôle d'un promoteur CMV (cytomegalovirus) est en cours (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00428935?term=duchenne+muscular+dystrophy&rank=11).

4.1.2. Le saut d'exon

Le saut d'exon est une thérapie potentielle prometteuse dont l'idée vient entre autres de l'observation dans le muscle dystrophique de fibres révertantes, exprimant la dystrophine suite à un saut d'exon naturel. L'idée est de sauter l'exon du gène DMD contenant la mutation, afin de restaurer le cadre de lecture et de produire une protéine, certes un peu plus courte, mais quasi fonctionnelle (Cossu&Sampaolesi, 2007). La stratégie développée par l'équipe de Luis Garcia utilise des oligonucléotides anti-sens (AON) ou des AAV exprimant de petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP, pour small nuclear ribonucleoproteins) U7. Après les résultats prometteurs obtenus chez la souris *mdx* (Goyenvalle *et al.*, 2004), les

travaux sont actuellement poursuivis chez le chien GRMD, à l'aide de vecteurs AAV1 et d'ARN U7 ciblant les exons 6-8 (Cossu&Sampaolesi, 2007). Il a en outre été montré récemment qu'une immunosuppression transitoire de 5 jours semblait suffisante pour empêcher toute formation d'anticorps anti-AAV1 et pour permettre des injections répétées, suggérant qu'il serait possible de corriger la dystrophie dans plusieurs muscles (Lorain *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'injection (intra-musculaire ou intra-artérielle) chez des souris *scid/mdx* de cellules humaines $CD133^+$ corrigées génétiquement par exon skipping s'est révélée capable d'aboutir à une expression de dystrophine, à une relocalisation des protéines du complexe au niveau du sarcolemme et à une amélioration fonctionnelle, et des cellules greffées ont pu être observées en position satellite des fibres musculaires. Ces résultats suggèrent que l'injection de cellules $CD133^+$ autologues génétiquement modifiées pourrait être envisagée pour traiter la DMD. Outre l'accessibilité de ces cellules (elles sont isolées à partir du sang circulant), cette approche permettrait d'éviter les réactions immunitaires et de répéter les traitements (Benchaouir *et al.*, 2007).

Puisque certaines délétions et duplications sont plus fréquentes que d'autres, il a été estimé que le saut de 12 exons permettrait de traiter 73,3% des délétions (le saut de l'exon 51 permettant à lui seul de traiter environ 20% des cas). Après que la preuve de principe de l'approche ait été apportée, deux essais cliniques de phase 1/2, utilisant des oligonucléotides antisens dirigés contre l'exon 51, l'AVI-5648 (un morpholino injecté en intramusculaire) et le PRO051 (un 2' O-méthyl injecté de façon systémique) ont été lancés (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00159250?term=duchenne+muscular+dystrophy&rank=5, http://www.treat-nmd.eu/userfiles/file/general/2008%20Prosensa%20Interview.pdf,).

4.1.3. La translecture des codons stop prématurés

Environ 15% des cas de DMD sont causés par une mutation non sens induisant un codon stop prématuré. Pour provoquer la translecture (la lecture "forcée") de ces codons stop, on peut envisager d'utiliser des antibiotiques de la famille des aminoglycosides (Howard *et al.*, 2004) ou le PTC124, apparu plus récemment (Hirawat *et al.*, 2007, Welch *et al.*, 2007). Deux essais cliniques de phase 1 avec la gentamicine (un aminoglycoside), et un essai clinique de phase 2b avec le PTC24 sont actuellement en cours (http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=duchenne+muscular+dystrophy&pg=1).

4.2. La thérapie cellulaire

Le muscle squelettique est multinucléé et provient de la fusion de précurseurs mononucléés, les myoblastes. Ce phénomène de fusion, qui intervient naturellement lors de la réparation musculaire, peut être utilisé afin de tenter de délivrer des noyaux musculaires normaux dans les fibres dystrophiques, permettant ainsi une ré-expression de la dystrophine. Dans cette optique, une thérapie dite de transfert de myoblastes, ainsi que différents types de cellules souches sont actuellement à l'étude (Grounds&Davies, 2007).

4.2.1. La thérapie de transfert de myoblastes

La Thérapie de Transfert de Myoblastes (MTT) utilise des myoblastes obtenus à partir de biopsies musculaires de donneurs normaux, qui sont amplifiés en culture et injectés directement dans les muscles de receveurs dystrophiques (Smythe *et al.*, 2000). Les premiers résultats ont été obtenus chez la souris *mdx* dès 1989 (Partridge *et al.*, 1989) mais l'injection intramusculaire s'est révélée être suivie d'une mort cellulaire intense et rapide, 80% des myoblastes du donneur mourant souvent dans les jours suivant l'injection (Lee-Pullen *et al.*, 2004). Les essais cliniques chez l'homme, qui ont commencé dès le début des années 90, se sont révélés sûrs mais malheureusement peu efficaces sur le plan clinique (Smythe *et al.*, 2000, Skuk *et al.*, 2006). Les principaux problèmes de cette approche sont liés à la disponibilité des myoblastes, leur survie après l'injection et leur pouvoir de dispersion et de fusion, auxquels peut venir s'ajouter une éventuelle réponse immune (Mouly *et al.*, 2005, Grounds&Davies, 2007). Cependant, il a été montré récemment que la sur-expression de follistatine, un antagoniste de la myostatine (voir plus loin), était capable, en plus d'induire l'hypertrophie, d'améliorer l'efficacité de la MTT chez la souris *mdx* (Benabdallah *et al.*, 2008).

4.2.2. Les cellules souches

Plusieurs types de cellules souches capables de donner vie à un grand nombre de myoblastes ont été isolés : cellules souches dérivées de la moelle épinière (population totale ou cellules SP), cellules $CD133^+$ dérivées du sang et du muscle, cellules souches dérivées du muscle (MDSC ou MDC, population hétérogène contenant entre autres les précurseurs des cellules satellites) et mésoangioblastes. Certaines sont déjà utilisées dans des modèles pré-cliniques de dystrophie musculaire (Cossu&Sampaolesi, 2007, Peault *et al.*, 2007).

Des cellules $CD34^+$, associées aux vaisseaux et exprimant des marqueurs de cellules endothéliales (mais pas de marqueurs myogéniques) ont été purifiées à partir de muscles

fœtaux de souris. Elles se sont révélées capables, suite à une injection dans le muscle de souris *mdx*, de se différencier en muscle squelettique, de fusionner avec les fibres musculaires existantes et d'occuper la niche des cellules satellites. Plus de 50% des fibres de l'hôte contenaient des noyaux du donneur, répartis sur 80 à 90% de la longueur du sarcolemme et l'expression d'une quantité significative de dystrophine (environ 60 à 70% de la quantité normale) a pu être montrée. Une amélioration fonctionnelle était aussi visible puisque, 1 mois après l'injection, le muscle receveur présentait une résistance à l'effort plus importante que le muscle *mdx* contrôle (Auda-Boucher *et al.*, 2007).

Les vaisseaux sanguins ont de plus récemment été identifiés comme la source d'un nouveau genre de cellules souches appelées mésoangioblastes. Ces cellules, initialement extraites de l'aorte dorsale d'embryons murins, se sont révélées capables de reconstituer les muscles squelettiques de souris déficientes en α-sarcoglycane (Galvez *et al.*, 2006), résultats qui ont pu, par la suite, être étendus au chien GRMD (Sampaolesi *et al.*, 2006). Des mésoangioblastes ont été extraits des vaisseaux sanguins situés dans le muscle squelettique de jeunes chiens et injectés par voie systémique dans l'artère fémorale de chiens dystrophiques. 4 chiens GRMD ont reçu des cellules autologues corrigées génétiquement (transduction *in vitro* avec un lentivirus exprimant la microdystrophine humaine), et 6 ont reçu des cellules hétérologues issues de donneurs sains. Les chiens du deuxième groupe étaient sous traitement immunosuppresseur et tous étaient traités quotidiennement avec des stéroïdes. Les auteurs ont conclu de cette étude que l'injection intra-artérielle de mésoangioblastes hétérologues restaurait l'expression de la dystrophine et une morphologie normale du muscle, conduisant à une amélioration clinique et à la préservation de la mobilité. Ces résultats doivent cependant être pris avec précaution puisque plusieurs observations suggèrent que les améliorations rapportées pourraient être dues au simple traitement immunosuppresseur utilisé (Davies&Grounds, 2006, Brunelli *et al.*, 2007, Grounds&Davies, 2007). Un premier essai clinique de phase I/II est prévu chez l'homme, dans lequel des mésoangioblastes devraient être injectés dans un petit muscle de la main de patients DMD âgés de 14 à 16 ans (Cossu, Myology 2008).

Enfin, après avoir démontré chez la dinde que les cellules dérivées du muscle présentaient un diamètre extrêmement variable, et proportionnel à la progression dans le lignage myogénique (Jouvion *et al.*, 2006), l'équipe de Yan Chérel a pu isoler (à l'aide d'une technique de pré-plating) une population marginale, présentant un défaut initial d'adhésion. Ces cellules à adhérence tardive, ou LAC (late adherent cells) correspondent à de petites cellules arrondies, initialement dans un état de quiescence, puis qui prolifèrent de façon

atypique, en formant des colonies en forme de microsphères. Elles présentent plusieurs caractéristiques des cellules primitives, et correspondent essentiellement à des cellules myogéniques au stade précoce et à des progéniteurs immatures des cellules satellites. Cela démontre que la technique de pré-plating peut être utilisée pour isoler parmi les MDC des progéniteurs immatures des cellules satellites (Rouger *et al.*, 2007).

4.3. Les approches pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques que l'on cherche actuellement à développer pour la DMD visent entre autres à : sur-exprimer l'utrophine, stimuler l'hypertrophie et réduire la fonte musculaires, améliorer les capacités fonctionnelles du muscle, combattre l'inflammation, inhiber les histones déacétylases, compenser la perte de dystrophine et de NO en utilisant la L-arginine, augmenter la synthèse protéique *via* une supplémentation en acides aminés, réduire le stress oxydatif, inhiber les canaux calciques et les protéases calcium-dépendantes et inhiber le protéasome (Nowak&Davies, 2004, Cossu&Sampaolesi, 2007, Radley *et al.*, 2007). Cette liste ne se veut pas exhaustive et nous nous contenterons ici de développer les recherches menées pour tenter de sur-exprimer l'utrophine et de stimuler l'hypertrophie musculaire.

4.3.1. Sur-expression de l'utrophine

L'utrophine est une protéine homologue de la dystrophine, localisée sous le sarcolemme des fibres musculaires et interagissant globalement avec les mêmes protéines (Love *et al.*, 1989, Tinsley *et al.*, 1992, Pearce *et al.*, 1993, Kramarcy *et al.*, 1994). Elle est exprimée abondamment durant le développement embryonnaire puis elle est remplacée par la dystrophine, son expression se restreignant chez l'adulte aux jonctions neuro-musculaires et myo-tendineuses (Khurana *et al.*, 1991, Ohlendieck *et al.*, 1991, Gramolini&Jasmin, 1997). La sur-expression de l'utrophine chez les patients DMD est un phénomène naturel (compensateur mais insuffisant), que l'on peut chercher à amplifier. Il est maintenant bien établi que l'expression ectopique d'utrophine empêche ou diminue fortement la mise en place de la dystrophie musculaire chez les souris *mdx* et les souris *mdx/utrn*$^{-/-}$ (Campbell&Crosbie, 1996, Tinsley *et al.*, 1996, Rafael *et al.*, 1998, Tinsley *et al.*, 1998, Wakefield *et al.*, 2000, Squire *et al.*, 2002). De même, des résultats prometteurs ont été obtenus chez le chien, suite à l'injection intra-musculaire d'un vecteur adénoviral exprimant une mini-utrophine synthétique (Cerletti *et al.*, 2003). Après une analyse détaillée du promoteur du gène de l'utrophine, des tests de criblage ont été entrepris par l'équipe de Kay Davies (Summit plc, anciennement

VASTox) afin d'identifier des molécules pharmacologiques susceptibles de stimuler l'expression de la protéine. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont d'ores et déjà conduit à l'identification de plusieurs molécules prometteuses. Une molécule candidate, le SMT C1100, a passé les tests d'efficacité *in vivo* et un premier essai clinique est prévu chez l'homme (Cossu&Sampaolesi, 2007).

4.3.2. Stimulation de l'hypertrophie et réduction de la fonte musculaire

Des expériences visant à augmenter le niveau d'expression de gènes impliqués dans la croissance musculaire ont donné des résultats encourageants *in vitro* et *in vivo*. Différents agents ont été testés : l'IGF-1, la nNOS, la L-arginine (un substrat de nNOS), l'intégrine-$\beta_7\beta_1$, le Galgt2 (synaptic cytotoxic T-cell GalNAc transferase), la calpastatine (inhibiteur des calpaïnes) et la métalloprotéase ADAM12 (Nowak&Davies, 2004).

L'IGF-1 agit sur la voie PI3K/Akt et stimule la régénération, l'hypertrophie musculaire et la synthèse protéique. Une expression muscle-spécifique du facteur de croissance chez la souris *mdx* a conduit à une activation d'Akt et à une hypertrophie significative, accompagnée d'une augmentation du nombre de fibres, une augmentation de la masse et de la force musculaires, et une réduction de la fibrose et de la nécrose (Barton *et al.*, 2002). Une administration, à raison de 1 mg par kg et par jour pendant 8 semaines, toujours chez la souris *mdx*, s'est également révélée capable d'augmenter la fonction contractile et la résistance à la fatigue du diaphragme comme des muscles squelettiques des membres postérieurs (Gregorevic *et al.*, 2002, Gregorevic *et al.*, 2004). Cependant, l'administration systémique d'IGF-1 à faible dose, bien que réduisant les dommages créés par les contractions dans les muscles *mdx*, ne semblait pas avoir d'effet sur le calibre des fibres, sur la masse musculaire ou sur la force maximale (Schertzer *et al.*, 2006). L'efficacité d'une administration systémique (1,5 mg par kg et par jour) a été comparée avec celle d'un transfert de gène en terme de réparation fonctionnelle du TA suite à une blessure. L'IGF-1 s'est révélé capable d'induire la réparation quelque soit le mode d'administration, mais le transfert de gène paraissait plus efficace (il entraînait une activation d'Akt, provoquait une hypertrophie plus importante et une réparation plus rapide) (Schertzer&Lynch, 2006).

La myostatine, qui appartient à la famille du TGFβ, est un régulateur négatif de la myogénèse et de la croissance des muscles squelettiques durant la vie post-natale précoce. Elle réduit la taille et le nombre des fibres musculaires en inhibant la prolifération et la différenciation des myoblastes. Des dérégulations ont été associées à des dérèglements de la masse musculaire chez l'adulte et plusieurs études ont montré l'intérêt de contrer cette voie

dans le muscle dystrophique. L'utilisation d'anticorps anti-myostatine (Bogdanovich *et al.*, 2002), de même qu'une délétion du gène (Wagner *et al.*, 2002), ont permis une amélioration fonctionnelle chez la souris *mdx*. Plus récemment, un inhibiteur de la myostatine dérivé de la follistatine (le FS I-I), a été sur-exprimé sous le contrôle d'un promoteur spécifique du muscle squelettique puis les souris transgéniques ont été croisées avec des souris *mdx*, aboutissant à une augmentation de la masse et de la force musculaire (Nakatani *et al.*, 2008). Enfin, une injection intra-musculaire unique, chez la souris *mdx*, de vecteurs AAV exprimant différentes protéines de liaison à la myostatine a abouti à une augmentation de la masse et à une amélioration de la fonction pendant plus de deux ans, même lorsque l'injection avait lieu chez des souris âgées (Haidet *et al.*, 2008).

5. Implication d'un dérèglement des voies de signalisation cellulaire

Les voies de signalisation cellulaire servent à relayer, amplifier et intégrer les signaux reçus par les cellules, dans le but de déclencher une réponse génomique et physiologique adaptée (McKay&Morrison, 2007, Weston&Davis, 2007). Elles sont également impliquées dans la régulation de processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la migration. La signalisation est initiée par l'activation, en réponse à différents stimuli (stress, dont le stress mécanique et le stress oxydatif, hormones, facteurs de croissance, cytokines, mitogènes, médicaments, interactions cellules-cellules, interactions cellules-matrice, etc.), de récepteurs membranaires ou intracellulaires qui vont alors recruter les cascades de signalisation correspondantes, les facteurs de transcription servant ensuite de lien majeur avec l'expression des gènes (Whitmarsh&Davis, 2000, White, 2008).

5.1. Les voies MAPK

Les voies MAPK (mitogen-activated protein kinases) sont des voies de signalisation restreintes aux eucaryotes qui correspondent à des cascades de sérine/thréonine kinases, activées de façon séquentielle par phosphorylation. Les MAP3K (MAP kinase kinase kinases) activent et phosphorylent les MAP2K (MAP kinase kinases), qui à leur tour activent et phosphorylent les MAPK (MAP kinases), aboutissant enfin à l'activation des facteurs de transcription correspondants. Trois voies majeures sont présentes dans les cellules de mammifères : la voie ERK (extracellular signal-regulated kinase), la voie SAPK/JNK (stress-activated protein kinase/c-jun NH_2-terminal kinase) et la voie p38 (Schéma 1).

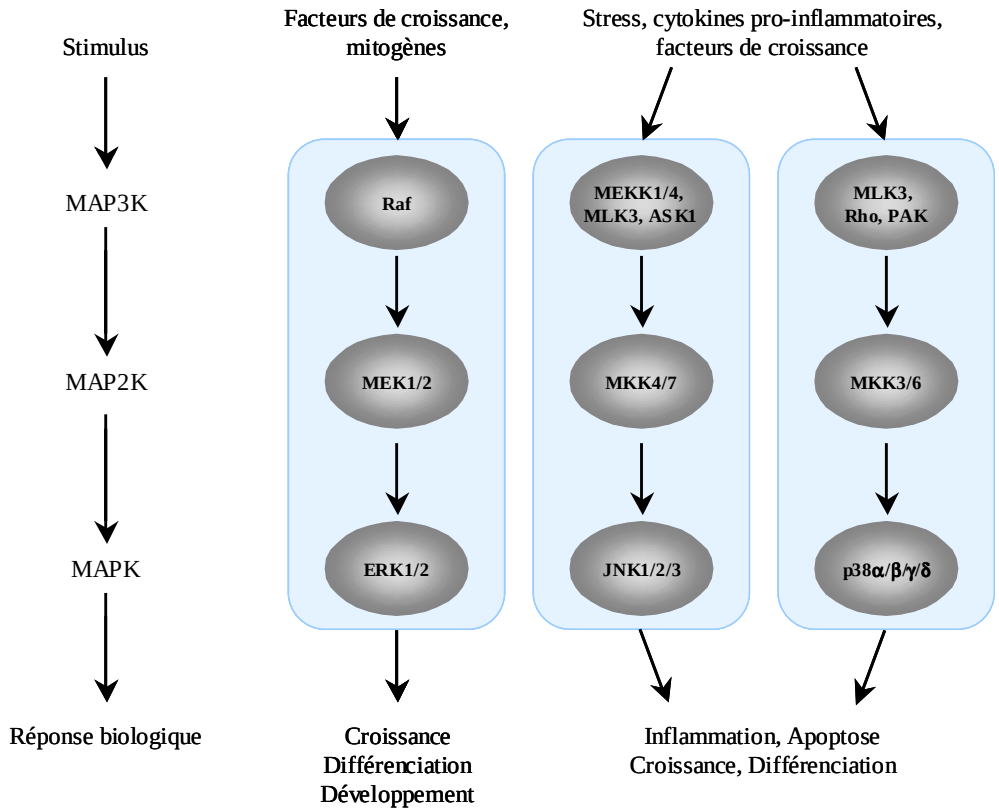


Schéma 1 Les 3 voies MAPK présentes chez les mammifères. Les voies ERK, JNK et p38 sont constituées d'une cascade de sérine/thréonine kinases activées séquentiellement. En réponse à un stimulus extracellulaire, les MAP3K activent et phosphorylent les MAP2K qui activent et phosphorylent à leur tour les MAPK qui activent enfin les facteurs de transcription correspondant, générant une réponse biologique adaptée.

5.1.1. La voie ERK

La voie ERK est l'une des voies de signalisation les mieux caractérisées et elle a été impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la croissance cellulaire, la progression dans le cycle cellulaire, la survie et le métabolisme (Lloyd, 2006, Yoon&Seger, 2006). Elle est déclenchée par des récepteurs de type tyrosine kinase (RTK), protéines transmembranaires possédant un domaine extracellulaire responsable de la liaison au ligand et un domaine intracellulaire responsable de l'activité tyrosine kinase (Schlessinger, 2000, Pawson, 2002, McKay&Morrison, 2007). La liaison du ligand sur les RTK provoque leur dimérisation, leur activation et l'auto-phosphorylation de résidus tyrosine du domaine intracellulaire. Ce dernier provoque alors le recrutement à la membrane de protéines contenant un domaine SH2 (Src-homology 2) ou PTB (phosphotyrosine binding domain), telles que les molécules adaptatrices Grb2 et Shc. Sos est recruté à la membrane *via* son interaction avec Grb2, Shc ou l'une des protéines d'ancrage liées au récepteur activé. Son interaction avec la GTPase Ras provoque l'échange du GDP en GTP et l'activation de celle-ci. Ras interagit et active alors (par phosphorylation)

les kinases Raf (A, B et C). Les Raf, qui sont des MAP3K, activent ensuite MEK1 et MEK2, des MAP2K qui vont à leur tour activer ERK1 et ERK2 (MAPK), tout cela se faisant par simple phosphorylation de résidus situés dans le domaine kinase. ERK peut alors phosphoryler ses cibles (plus de 160 substrats ont été décrits), situées majoritairement dans le noyau, mais également dans le cytoplasme : facteurs de transcription, kinases et phosphatases, éléments du cytosquelette et régulateurs de l'apoptose entre autres.

5.1.2. La voie SAPK/JNK

La voie SAPK/JNK, plus communément appelée JNK, a été impliquée, entre autres, dans la réponse au stress, la régulation de la survie et de la mort cellulaires (apoptose, mais également nécrose et autophagie) et la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaires (Davis, 2000, Weston&Davis, 2002, 2007). Trois isoformes de la MAPK JNK ont été identifiées chez les mammifères : JNK1, JNK2 et JNK3. Elles sont activées par les cytokines inflammatoires, le stress environnemental (dont les rayons UV et les rayons γ) et des facteurs de croissance. Les MAP3K (typiquement MEKK1, MEKK4, MLK3 et ASK1), lorsqu'elles sont activées, phosphorylent et activent les MAP2K (MKK4 et MKK7) qui à leur tour phosphorylent et activent JNK. Les facteurs de transcription sous le contrôle de JNK comprennent, entre autres, c-jun, ATF2, p53, AP1 (activator protein-1), NFAT4 et NFATc1 (Davis, 2000, Weston&Davis, 2002, 2007). Les mitochondries sont également la cible des signaux pro-apoptotiques médiés par JNK, puisque la kinase régule Bax et Bak (Davis, 2000, Tournier *et al.*, 2000, Tournier *et al.*, 2001, Weston&Davis, 2007). Enfin, JNK phosphoryle IRS-1 (insulin recpetor substrate-1), conduisant à son inactivation et s'opposant ainsi à la signalisation induite par le récepteur à l'insuline (Aguirre *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2003, Weston&Davis, 2007).

5.1.3. La voie p38

La voie p38 a été impliquée dans la régulation de l'inflammation, du cycle cellulaire, de la mort cellulaire, du développement, de la prolifération, de la différenciation cellulaire et de la sénescence (Zarubin&Han, 2005). Quatre isoformes résultant d'un épissage alternatif ont été identifiées : p38α, p38β, p38γ (ERK6 ou SAPK3) et p38δ (SAPK4). Les isoformes α et β sont ubiquitaires alors que les isoformes γ et δ sont exprimées de façon tissu-spécifique, les isoformes α et γ étant celles exprimées le plus abondamment dans le muscle squelettique adulte. L'activation de p38 a été observée en réponse à de nombreux stimuli extracellulaires

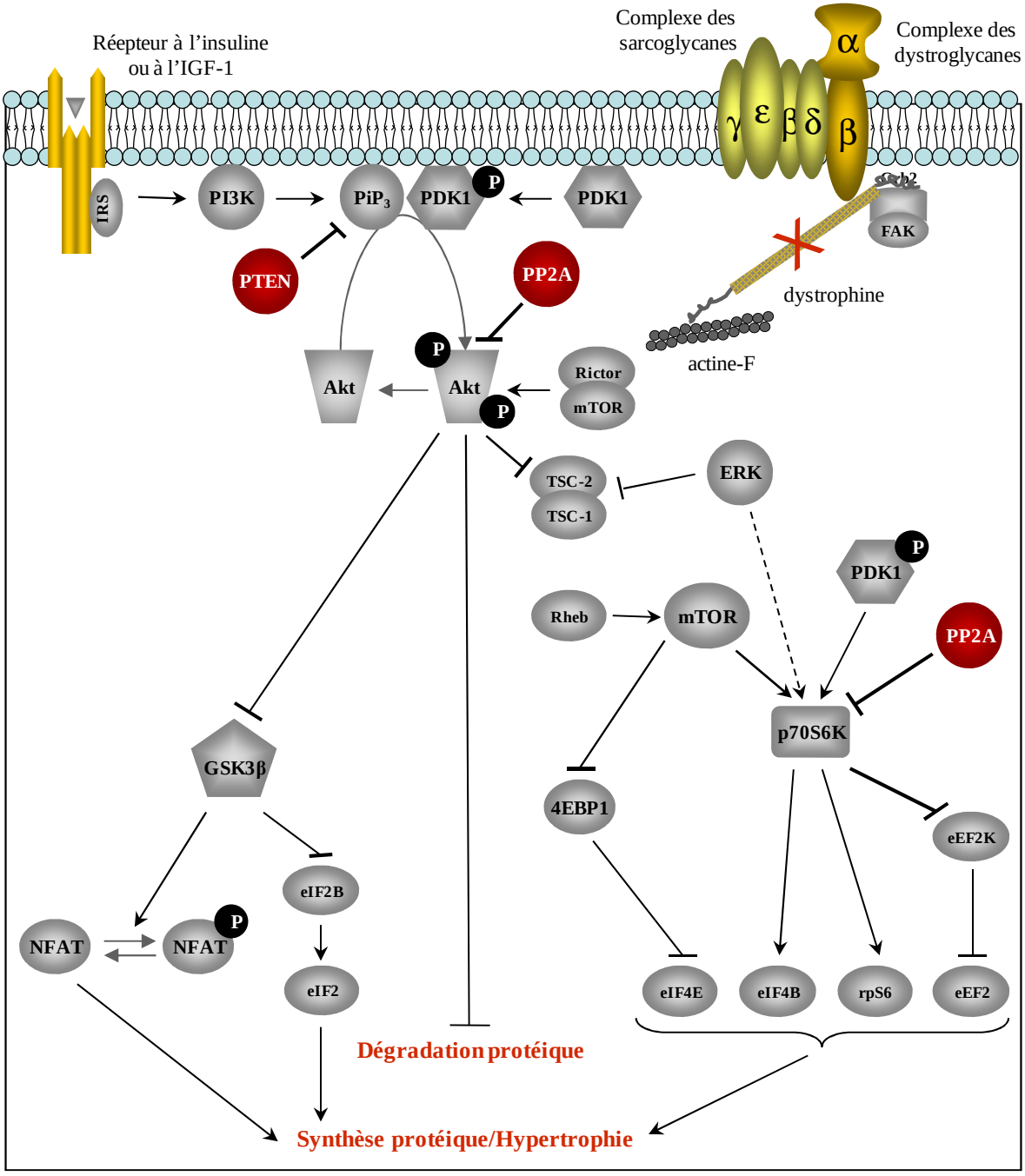


Schéma 2 La voie PI3K/Akt et la régulation de la masse musculaire. *Via* les voies mTOR/p70S6K et GSK3β, Akt stimule la synthèse protéique et l'hypertrophie. Parallèlement, elle bloque aussi les voies de la dégradation protéique et de l'atrophie.

tels que les UV, les chocs thermiques, les stress oxydatifs et osmotiques, les cytokines inflammatoires (TNFα et IL-1), les rayons ionisants et les facteurs de croissance. Des MLK (qui conduisent également à l'activation de JNK), des protéines de la famille Rho (Rac1 et cdc42), et des kinases activées par p21 (PAK) conduisent à l'activation des MAP2K (MKK3 et MKK6 entre autres). Ces MAP2K, mais également TAB1 (TAK-binding protein), conduisent alors à l'activation de p38. Les substrats de p38 incluent des protéines kinases, des facteurs de transcription, cPLA2 (phospholipase cytosolique A2), NHE-1 (isoforme 1 de l'échangeur Na^+/H^+), tau, la kératine 8 et la stathmine (pour une revue, voir (Zarubin&Han, 2005)).

5.2. La voie PI3K/Akt

Dans le muscle squelettique, la voie PI3K/Akt intervient entre autres dans le contrôle de la masse cellulaire et des phénomènes d'atrophie et d'hypertrophie musculaires. Les sérine/thréonine kinases Akt (ou PKB), p70S6K (ou S6K, 70-kDa ribosomal protein S6 kinase) et mTOR (mammalian target of rapamycin) représentent les enzymes clés de la cascade (Glass, 2005a, Pende, 2006, Favier *et al.*, 2008). Trois isoformes d'Akt, présentant une homologie de séquence et une certaine redondance fonctionnelle, ont été identifiées chez les mammifères : Akt1 (α), Akt2 (β) et Akt3 (γ) (Jones *et al.*, 1991, Cheng *et al.*, 1992, Konishi *et al.*, 1995). Akt1 et Akt2 sont fortement exprimées dans le muscle squelettique (Dogra *et al.*, 2006) et elles sont activées, en particulier l'isoforme Akt1, en réponse à l'insuline (Walker *et al.*, 1998). Concernant p70S6K, deux gènes existent, p70S6K1 (codant les p70 et p85 S6K) et p70S6K2 (Mieulet *et al.*, 2007). Enfin, concernant TOR, un seul gène est présent chez les mammifères, mais la protéine peut se trouver au sein de deux complexes différents : mTORC1 (mammalian TOR complex 1) et mTORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006).

Suite à la fixation, sur le récepteur correspondant, d'une molécule d'insuline ou d'IGF-1 (insulin-like growth factor-1), des protéines IRS (insulin receptor substrate) sont recrutées à la membrane plasmique et phosphorylées (Schéma 2). Elles recrutent alors une PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase) de classe Ia, qui va phosphoryler le $PtdInsP_2$ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) de la membrane pour générer du $PtdInsP_3$ (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) (Whitman *et al.*, 1988). Akt est recrutée par le $PtdInsP_3$ à la membrane plasmique (*via* son domaine PH). Elle est alors phosphorylée par PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1), qui possède également un domaine pH interagissant avec le $PtdInsP_3$, sur le résidu Thr308 (Alessi *et al.*, 1997). L'activation complète d'Akt nécessite la phosphorylation supplémentaire du résidu Ser473, qui est assurée

par le complexe Rictor-mTOR (qui forme, avec mLST8/GβL, mTORC2) (Hresko&Mueckler, 2005, Sarbassov *et al.*, 2005). Akt, lorsqu'elle est activée, phosphoryle le résidu Ser9 de GSK3β (glycogen synthase kinase-3β), conduisant ainsi à son inactivation (Cross *et al.*, 1995) et à l'activation des voies de la synthèse protéique et de l'hypertrophie. La forme non-phosphorylée et active de GSK3β catalyse la phosphorylation et l'inhibition du facteur eucaryotique d'initiation de la traduction eIF2B (qui active normalement eIF2). Elle inhibe par ailleurs différents facteurs de transcription, dont le NFAT (nuclear factor of activated T-cells) (Rommel *et al.*, 2001, Vyas *et al.*, 2002, Glass, 2005a, Favier *et al.*, 2008) qui stimule normalement les gènes sensibles à l'IGF-1 et le gène de l'utrophine (St-Pierre *et al.*, 2004). La déphosphorylation (par la calcineurine) du NFAT conduit à son entrée dans le noyau, sa phosphorylation par GSK3β provoquant au contraire sa séquestration dans le cytosol.

Akt conduit par ailleurs à la phosphorylation de Tsc2 (tuberous sclerosis complex-2), provoquant la rupture et l'inactivation du complexe Tsc1/Tsc2, la levée de l'inhibition du complexe sur la GTPase Rheb, et l'activation de mTOR (au sein du mTORC1 qui contient, outre mTOR, raptor et mLST8) (Inoki *et al.*, 2002, Glass, 2005a). L'activation de mTORC1 nécessite la présence combinée des facteurs de croissance et des nutriments (*via* une PI3K de classe III) et le complexe est inhibé par la rapamycine. mTORC2 est lui activé par les facteurs de croissance indépendamment de la rapamycine (et possiblement des nutriments). La disponibilité des nutriments contrôle aussi indirectement mTOR, en modulant le statut énergétique des cellules. De niveaux d'ATP conduisent à l'activation de mTOR alors qu'une augmentation du ratio AMP/ATP, en activant la kinase AMPK (AMP-activated protein kinase), l'inhibe. Akt est elle-même capable d'augmenter le niveau d'ATP et ainsi d'activer mTOR. Par ailleurs, les muscles délétés en p70S6K1/2 exhibent un ratio AMP/ATP élevé, associé à une activation de l'AMPK, démontrant que la relation entre mTOR/p70S6K et AMPK fonctionne dans les deux sens. Il a été proposé que cela pourrait permettre d'éviter l'activation simultanée des voies de la synthèse et de la dégradation protéiques (Aguilar *et al.*, 2007, Frost&Lang, 2007, Pende, 2006).

En fonction du complexe au sein duquel il se trouve, mTOR semble donc phosphoryler différents substrats (les mécanismes sont complexes et ils ne sont, à l'heure actuelle pas totalement élucidés). Alors que mTORC2 phosphoryle Akt et est impliqué dans la régulation de l'autophagie, mTORC1 semble responsable des effets sur la synthèse protéique et l'hypertrophie (De Virgilio&Loewith, 2006, Wullschleger *et al.*, 2006). mTOR phosphoryle et inactive 4EBP1/PHAS-1 (eIF4E binding protein-1) (Proud, 1996, Hara *et al.*,

1997, Choi *et al.*, 2003), stimulant ainsi la liaison de eIF4E à eIF4G, et l'initiation de la traduction. Il catalyse également la phosphorylation, sur la Thr389, de p70S6K (Chung *et al.*, 1994), la kinase étant par ailleurs phosphorylée par PDK1, sur les Thr229 et 252 (Alessi *et al.*, 1998, Pullen *et al.*, 1998) et *in vitro*, sur la Thr421 et la Ser424, par les kinases ERK (Mukhopadhyay *et al.*, 1992)). Dans les cellules au repos, p70S6K1 est liée à un complexe de pré-initiation de la traduction comprenant eIF3. Suite à sa phosphorylation par mTOR et PDK1, la kinase se dissocie de eIF3 et phosphoryle eIF4B (Raught *et al.*, 2004), la protéine ribosomale rpS6 (Proud, 1996) et eEF2K (ce qui aboutit à son inactivation et à l'activation du facteur d'élongation eEF2), jouant ainsi un rôle important dans la traduction et le contrôle de la taille cellulaire. Les mécanismes moléculaires précis par lesquels p70S6K module le métabolisme et la croissance cellulaire ne sont cependant toujours pas entièrement compris (Aguilar *et al.*, 2007, Wullschleger *et al.*, 2006). mTOR semble par ailleurs contrôler le cycle cellulaire et l'initiation de la traduction d'un côté, et la taille cellulaire de l'autre, par des mécanismes différents. Il a été montré que la délétion de p70S6K1 réduisait la taille cellulaire et l'hypertrophie développée en réponse à l'IGF-1, aux nutriments ou à une activation d'Akt, mais sans affecter la prolifération des myoblastes (Ohanna *et al.*, 2005). D'un autre côté, l'inactivation de p70S6K semble affecter la croissance et la phosphorylation des cibles traductionnelles rpS6 et eIF4B, tout en maintenant une régulation correcte de l'initiation globale de la traduction et du turn-over protéique (Mieulet *et al.*, 2007).

Il est de plus maintenant clairement établi que p70S6K1 exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie PI3K/Akt/mTOR. Outre un rôle dans la phosphorylation de mTOR (sur la Ser2448), ce qui pourrait interférer avec la composition du complexe mTORC (Pende, 2006), p70S6K1 s'est révélée capable de réguler IRS1. Elle semble moduler la protéine à la fois au niveau transcriptionnel et au travers d'une phosphorylation directe (sur les résidus Ser307 et Ser636/Ser639) conduisant à une inhibition de son interaction avec la PI3K. Ce rétrocontrôle négatif fait que l'activation continue de p70S6K1 (en cas de satiété ou dans le cadre de l'obésité) entraîne une désensibilisation du récepteur, et à une résistance à l'insuline (Um *et al.*, 2004, Wullschleger *et al.*, 2006). De façon très intéressante, il a été montré plus récemment que l'obésité et les désordres métaboliques et la résistance à l'insuline qui en découlent pouvaient être contrés par l'expression, dans le muscle squelettique, d'une forme constitutivement active d'Akt1. La surexpression de la kinase, en entraînant une hypertrophie des fibres rapides/glycolytiques de type 2b, semblait en effet capable de restaurer un phénotype métabolique normal, démontrant le rôle de ces fibres dans le métabolisme général (Izumiya *et al.*, 2008). Enfin, on peut noter que p70S6K1 contrôle l'activité de la kinase

AMPK et le programme métabolique qui en dépend, permettant ainsi aux cellules d'adapter leur croissance à la disponibilité des nutriments (Aguilar *et al.*, 2007).

Akt s'oppose également à la dégradation protéique du muscle squelettique (Sandri *et al.*, 2004, Stitt *et al.*, 2004, Latres *et al.*, 2005). Elle est transloquée directement dans le noyau, où elle phosphoryle et inactive des facteurs de transcription de type Foxo (forkhead box class O, *via* mTORC2) (Brunet *et al.*, 1999). Ces facteurs stimulent normalement l'expression des E3-ubiquitine ligases MAFbx (muscle-atrophy F-box, aussi appelée atrogine-1) et MuRF1, impliquées dans la protéolyse médiée par le système ubiquitine protéasome (et dirigé entre autres dans le muscle contre les protéines myofibrillaires) (Figure 4, Berthon *et al.*, 2007, Favier *et al.*, 2008).

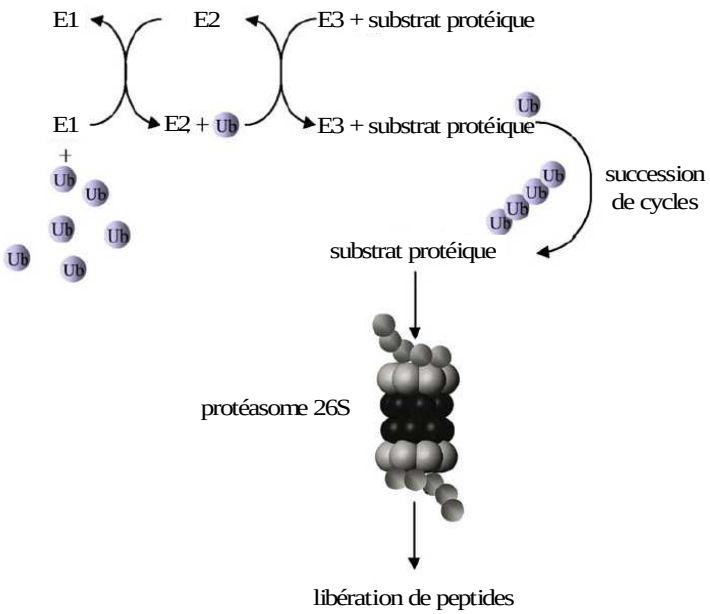


Figure 4 Le système ubiquitine protéasome. Les protéines ciblées pour la dégradation sont taggées avec de l'ubiquitine par un mécanisme en trois étapes impliquant des enzymes E1 (activation de l'ubiquitine), E2 (conjugaison de l'ubiquitine) et E3 (ligation de l'ubiquitine) (Berthon *et al.*, 2007).

Foxo3 s'est de plus révélé nécessaire et suffisant à l'induction de l'autre grand système de dégradation protéique du muscle squelettique, l'autophagie (médié, rappelons le, par les lysosomes), qui est apparue, elle aussi, induite durant l'atrophie. La voie PI3K/Akt semble en fait contrôler l'autophagie par deux mécanismes, un mécanisme rapamycine-dépendant (minoritaire, et faisant intervenir mTORC1) et un mécanisme rapamycine-indépendant, résultant de l'action de mTORC2 sur les facteurs de transcription Foxo (Mammucari *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2007). Akt, *via* l'inhibition des facteurs de transcription de type Foxo, s'oppose donc aux deux grands systèmes de dégradation du muscle squelettique : le système ubiquitine protéasome et l'autophagie. Bien qu'ils ne semble pas y

avoir d'interaction entre ces deux systèmes, ils apparaissent régulés, *via* Foxo, de façon coordonnée.

Akt s'oppose également à l'apoptose, en inactivant entre autres les protéines pro-apoptotiques Bad et Bim, et la caspase 9 (Frost&Lang, 2007). La kinase conduit aussi à l'activation du NF-κB. Le NF-κB, facteur de transcription ubiquitaire majeur, correspond à un dimère de deux sous-unités : p50 et p65 (RelA), c-Rel ou Rel B. Il est séquestré dans le cytoplasme *via* une interaction avec la protéine inhibitrice IκB (isoforme α, β, γ ou ε), qui masque le signal de localisation nucléaire de p65. Après activation, IKK phosphoryle le complexe IκBα/p65NF-κB, entraînant sa dissociation et la dégradation de IκB par la voie ubiquitine protéasome. NF-κB est alors transloqué dans le noyau, où il induit l'expression des gènes sous son contrôle. Il induit des gènes anti-apoptotiques mais dans le muscle squelettique, il médie aussi l'atrophie (il induit entre autres l'expression de MuRF1). Il induit également le gène de IκB et la protéine s'accumule dans le noyau, où elle se lie au NF-κB, inhibant son activité et provoquant son exportation dans le cytoplasme (grâce à un signal d'export nucléaire NES situé dans le domaine C-terminal) (Baghdiguian *et al.*, 1999, Frost&Lang, 2007).

PTEN (aussi appelée MMAC1 ou TEP1) est une phosphoinositide 3-phosphatase qui appartient à la superfamille des tyrosine protein phosphatases et qui présente une double spécificité protéines/lipides (l'activité envers les phospholipides prédominant). Elle hydrolyse la position D-3 du PtdIns3P (phosphatidylinositol 3 phosphate), du PtdIns(3,4)P2 et du PtdIns(3,4,5)P3 (appelé $PtdInsP_3$ dans cette étude), le substrat le plus important *in vivo* étant de loin le $PtdInsP_3$ (Blero *et al.*, 2007). En déphosphorylant le $PtdInsP_3$ de la membrane plasmique, elle s'oppose à l'action de la PI3K (Maehama&Dixon, 1998). PP2A déphosphoryle quant à elle les kinases Akt et p70S6K, plus bas dans la cascade (Millward *et al.*, 1999).

5.3. Statut des voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle dystrophique

Il est aujourd'hui clairement établi que le DGC possède, outre son rôle structural, une fonction de signalisation. On sait depuis longtemps que la dystrophine est phosphorylée à son extrémité C-terminale (Michalak *et al.*, 1996, Madhavan&Jarrett, 1999). Il a par ailleurs été montré que différents composants du DGC (dont la dystrophine) pouvaient interagir avec un certain nombre de molécules de signalisation : Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) (Yang *et al.*, 1995, Oak *et al.*, 2001), nNOS (neuronal nitric oxide synthase) (Brenman *et al.*,

1995, Brenman *et al.*, 1996), la calmoduline (qui active la CaMKK, aboutissant à la phosphorylation d'Akt sur la Thr308) (Madhavan *et al.*, 1992), FAK (focal adhesion kinase) (Cavaldesi *et al.*, 1999) et la cavéoline 3 (Song *et al.*, 1996, Crosbie *et al.*, 1998b, Sotgia *et al.*, 2000). De plus, les syntrophines, en réponse à la liaison du DGC à la laminine, semblent recruter Rac1 (par l'intermédiaire d'un complexe Grb2/Sos1) puis PAK1, aboutissant à la phosphorylation de JNK2 et à l'activation du facteur de transcription c-jun. JNK1 serait au contraire activée uniquement quand la laminine est déplétée ou que l'interaction avec le complexe est inhibée (Oak *et al.*, 2003). Des études *in vitro* ont par ailleurs révélé que le blocage, par un anticorps spécifique, de l'interaction entre l'α-DG et la laminine induisait un phénotype dystrophique, inductible uniquement dans les cultures différenciées, et caractérisé par une réduction de la taille des myotubes, une désorganisation des myofibrilles et une perte de l'activité contractile (Brown *et al.*, 1999). Il a également été montré que le blocage de l'interaction induisait aussi l'apoptose, en partie *via* une diminution du niveau de phosphorylation d'Akt et GSK3β, suggérant là encore que les composants du DGC pourraient agir comme des éléments de signalisation (Langenbach&Rando, 2002). Une étude plus récente portant sur la cachexie (perte musculaire associée au cancer) a de plus permis d'établir un lien direct entre la dystrophine, le DGC et les voies de l'atrophie. De façon surprenante, il a en effet été montré que la cachexie était accompagnée d'une diminution significative du niveau de dystrophine, ainsi que d'une glycosylation anormale du β-DG et du β-SG. De plus, la sur-expression de la dystrophine chez une souris transgénique s'est avérée capable de réduire la perte musculaire et la sur-expression de MuRF1 et MAFbx en réponse à la cachexie. Cependant, l'activité d'Akt est apparue inchangée entre les muscles contrôles et cachectiques, et les mécanismes par lesquels la perte de dystrophine pourrait participer à l'atrophie musculaire sont encore à déterminer (Acharyya *et al.*, 2005, Glass, 2005b).

Plusieurs études réalisées chez la souris *mdx* (Bulfield *et al.*, 1984) ont par ailleurs révélé des modulations des voies MAPK et PI3K/Akt. Les voies MAPK sont apparues particulièrement touchées, puisque des altérations ont été rapportées dans chacune des trois cascades. Concernant la voie ERK/MAPK, il a été montré que le niveau d'expression et le niveau de phosphorylation des kinases ERK1/2 étaient augmentés de façon modérée chez la souris *mdx*, aux stades 3 et 12 mois. Ces augmentations ne semblaient pas dépendre du phénotype du muscle, puisqu'elles étaient présentes dans le diaphragme comme dans le TA (Lang *et al.*, 2004). Une autre étude publiée la même année a montré que l'augmentation du niveau basal de phosphorylation de ERK1/2 dans le diaphragme *mdx* était présente dès un

stade très précoce (16-17 jours), et que les kinases étaient activées de façon anormale en réponse à l'étirement mécanique (Kumar *et al.*, 2004). Concernant la voie JNK/MAPK, une activation de JNK1 a été observée dans le diaphragme *mdx* (Kolodziejczyk *et al.*, 2001). Cette étude a de plus révélé que l'activation *in vitro* de la kinase conduisait à un phénotype de type dystrophique (caractérisé par un défaut de viabilité et d'intégrité des myotubes), suggérant que ce phénomène participerait à la pathogénie de la DMD. Cette hypothèse s'est trouvée confortée par l'observation que l'injection intra-musculaire d'une construction contenant l'inhibiteur de JNK1, JIP1 (JNK1 inhibitory protein) était capable de diminuer considérablement la progression de la destruction des fibres dystrophiques. L'effet délétère de l'activation de JNK1 semblait s'expliquer par une interaction accrue de la kinase avec le NFATc1, conduisant à l'exclusion nucléaire du facteur de transcription. Il a ensuite été montré que le déflazacort pouvait restaurer la viabilité des myotubes présentant une activation constitutive de JNK1 ou celle des fibres dystrophiques (St-Pierre *et al.*, 2004). Le glucocorticoïde ne semblait pas agir directement sur JNK1, mais activer la phosphatase calcineurine, entraînant la déphosphorylation et l'entrée dans le noyau du NFATc1, et stimulant ainsi les gènes impliqués dans la réponse hypertrophique (et le gène de l'utrophine). Enfin, concernant la voie p38/MAPK, une diminution de la phosphorylation a été rapportée dans le diaphragme *mdx* à 3 et 12 mois, sans changement dans le TA, indiquant que ce défaut de phosphorylation pourrait être lié au phénotype du muscle (Lang *et al.*, 2004). Enfin, une activation aberrante de ERK1/2, p38 et JNK2 a été observée chez la souris *mdx* en réponse à l'exercice (Nakamura *et al.*, 2005).

La voie PI3K/Akt s'est elle aussi révélée affectée chez la souris *mdx*. Une activation d'Akt a été détectée dans les muscles des membres aux stade pré-nécrotique, nécrotique et hypertrophique de la pathologie, cette activation semblant s'amplifier avec le temps. Elle était associée à une augmentation de la phosphorylation de p70S6K (une étude antérieure n'avait cependant détecté aucun changement dans le niveau de phosphorylation de la kinase aux stades 3 et 12 mois (Lang *et al.*, 2004)) mais également, de façon surprenante, à une diminution du niveau de phosphorylation de GSK3β (Peter&Crosbie, 2006). Une augmentation du niveau de phosphorylation d'Akt a également été détectée dans le diaphragme de souris *mdx*, aux stades pré-nécrotique et nécrotique, en association cette fois avec une augmentation du niveau de phosphorylation de GSK3β, mTOR et PDK1, et du niveau d'activité de la PI3K (Dogra *et al.*, 2006). Il avait auparavant déjà été montré que la phosphorylation de p70S6K était élevée de 40% dans le diaphragme *mdx* (Lang *et al.*, 2004).

Enfin, il a été montré que le niveau basal d'activation du NF-κB était plus élevé dans les fibres *mdx* que dans les fibres normales (en association avec une augmentation de l'activité kinase de IKK et de la dégradation de IκBα), et que ceci était médié par la voie PI3K/Akt (Kumar&Boriek, 2003). Plusieurs études ont d'ailleurs déjà montré que l'inhibition de la voie du NF-κB améliorait le phénotype et produisait un gain fonctionnel chez la souris *mdx* (Carlson *et al.*, 2005, Messina *et al.*, 2006a, Messina *et al.*, 2006b, Acharyya *et al.*, 2007). La voie du NF-κB s'est également révélée être fortement activée dans les biopsies de patients DMD (Monici *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2005).

5.4. Dérégulations de ces voies dans d'autres pathologies neuro-musculaires

Une activation d'Akt encore plus importante que celle observée chez la souris *mdx* a été détectée chez les souris déficientes en sarcoglycane, et plus encore chez les souris déficientes en dystrophine et en utrophine, suggérant que l'intensité de l'activation de la kinase serait proportionnelle à la sévérité du phénotype (Peter&Crosbie, 2006).

La dystrophie musculaire des ceintures LGMD2A, qui se caractérise par des sarcomères anormaux et une atrophie et une faiblesse des muscles proximaux des membres, est due à une mutation dans le gène de la calpaïne 3 (CANP3), une protéase exprimée spécifiquement dans le muscle (Richard *et al.*, 1995). Dans les biopsies de patients LGMD2A, l'apoptose myonucléaire s'est révélée être associée à une altération de la localisation subcellulaire de IκBα (accumulé dans le noyau) et NF-κB (accumulé sous le sarcolemme). La calpaïne 3 s'est en plus révélée capable de dégrader IκBα, suggérant que son absence dans les muscles des patients LGMD2A pourrait entraîner un défaut dans la protéolyse du IκBα, empêchant l'accumulation nucléaire de NF-κB, et entraînant ainsi l'apoptose. Une accumulation de IκBα a été observée dans tous les noyaux apoptotiques, de même que dans quelques noyaux non apoptotiques, suggérant qu'elle précéderait l'apoptose. La déficience en calpaïne 3, en provoquant une accumulation de IκBα (et bien qu'insuffisante à elle seule pour induire l'apoptose), sensibiliserait les cellules à n'importe quel signal de mort. Le taux d'apoptose, bien que beaucoup plus élevé que dans d'autres types de myopathies (dont la DMD) reste faible dans les biopsies LGMD2A (0,40%). Cependant, puisque l'apoptose semble concerner quelques cellules satellites, cela pourrait suffire pour affecter les capacités régénératives du muscle et contribuer à long-terme à la pathogénie (les fibres régénérées représentent d'ailleurs seulement 10% de ce qui est observé dans les muscles DMD) (Baghdiguian *et al.*, 1999, Richard *et al.*, 2000). Les mécanismes par lesquels la déficience en

calpaïne 3 perturberait la voie du NF-κB ont par la suite été mieux définis. Il a été montré que l'expression (NF-κB- dépendante) des facteurs anti-apoptotiques c-FLIP, Bcl-II et Bcl-X_L, était réduite dans des biopsies de patients LGMD2A, et que moins ils étaient exprimés, plus le nombre de noyaux apoptotiques était important. Dans les MDC LGMD2A, le NF-κB est apparu normalement activé par les cytokines (avec une translocation correcte dans le noyau), mais tous les gènes placés sous son contrôle n'étaient cependant pas activés. IκBα était exprimée suite à l'induction du NF-κB quelque soit le statut de la calpaïne 3 mais pas c-FLIP. Une hypothèse probable est que, suite à son induction, le NF-κB passe dans le noyau et induise la transcription de IκBα et d'autres gènes de réponse précoce. Par contre, l'expression de certains gènes anti-apoptotiques nécessiterait la présence de la calpaïne 3 (*via* une protéolyse de régulateurs du NF-κB) et le défaut d'induction de ces gènes entraînerait une persistance du signal apoptotique et donc de l'activation du NF-κB, conduisant finalement à une sur-expression de IκBα et à l'exclusion nucléaire du NF-κB (Benayoun *et al.*, 2008).

Il a enfin été montré, chez des souris modèles de la dystrophie musculaire autosomique dominante d'Emery-Dreifuss (EDMD, due à une mutation dans le gène des lamines nucléaires A/C), que le développement de la cardiomyopathie impliquait une activation des voies ERK et JNK, et que cette activation précédait l'apparition des signes cliniques et des marqueurs moléculaires de la cardiomyopathie, suggérant qu'elle pourrait participer à la pathogénie (Muchir *et al.*, 2007a, Muchir *et al.*, 2007b). Il a été observé en parallèle que les myoblastes de souris exprimant une lamine A mutée sortaient incomplètement du cycle cellulaire et se différenciaient en des myocytes avec un faible niveau de multinucléation (Favreau *et al.*, 2008).

6. Les apports de la génomique et de la protéomique dans l'étude de la DMD

La pathogénie de la DMD est extrêmement complexe, et elle semble faire intervenir la dérégulation de nombreux processus cellulaires. Une compréhension des mécanismes globaux pourrait permettre la mise au point de nouveaux traitements et les études globales apparaissent donc de premier intérêt. Parmi elles, la technologie des puces représente un outil de choix, puisqu'elle permet d'avoir accès, en une seule expérience, à une multitude d'informations. Nous nous limiterons dans ce paragraphe à citer quelques uns des apports de la génomique (puces à ADN) et de la protéomique (puces à protéines et électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse) dans la compréhension de la pathogénie de la DMD, en

détaillant en particulier les résultats concernant des dérèglements des voies de signalisation cellulaire.

La comparaison, à l'aide d'une puce à ADNc, du profil d'expression génique des muscles des membres et du diaphragme de souris contrôles et *mdx* a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression de la CaMK II et de l'IGF-2 dans les muscles *mdx* (Rouger *et al.*, 2002). Le profil d'expression génique des muscles des membres de souris contrôles et *mdx* a également été comparé à 9 temps différents, révélant, entre autres, un pic d'activation à 8 semaines de la plupart des gènes impliqués dans la régénération musculaire, dont ceux de la voie de la neuréguline 3. La neuréguline 3 interagit avec les voies p38 et MAPK et une down-régulation de cdc42 et de la MAPK12, ainsi qu'une up-régulation de PAK1, Grb2 et ErbB4 ont été détectées en association avec son activation (Turk *et al.*, 2005). Par ailleurs, suite à l'activation des voies MAPK, NF-κB, et PI3K/Akt précédemment rapportée dans le diaphragme *mdx* (Kumar&Boriek, 2003, Kumar *et al.*, 2004, Dogra *et al.*, 2006), l'équipe de Kumar a utilisé une approche de puce pour comparer le niveau d'activation de 345 facteurs de transcription dans le diaphragme de souris saines et *mdx* âgées de 6 semaines. De nombreux facteurs de transcription sont apparus sur-activés dans le diaphragme *mdx*, dont AP1, HFH-3, PPARα, ETF, Fra-1/jun, kBF-A, N-rasBP, p53, Myc-Max; c-Rel; NF-kB; Stat1 p84/p91, Stat3, AP3, p53, Stat4, AP4 et HFH-1 (Dogra *et al.*, 2008).

En plus de ces études chez la souris *mdx*, le profil d'expression génique a également été comparé entre les biopsies de patients sains et DMD. Les travaux de Chen et al., en 2000, ont révélé, dans les biopsies DMD, une sur-expression de l'IGFBP4 et une sous-expression de la MAPKAP kinase (3pK), de la CaMK II γ, de la protéine phosphatase-1, de ERK6 et de la protéine tyrosine phosphatase. Une sur-expression de l'IGF-1 et de l'IGF-2 a également été rapportée dans le muscle DMD, mais les effets potentiellement bénéfiques des facteurs de croissance semblaient contrés par la sur-expression de protéines régulatrices (IGFBP2, 4, 6 et 7 et PRSS11, une protéase de l'IGFBP5) (Bakay *et al.*, 2002). Une étude réalisée par la suite a confirmé que des gènes codant des facteurs de croissance ou des protéines liées aux facteurs de croissance étaient surexprimés dans les muscles DMD, dont le TGFβ, DDAH2 (diméthylarginine diméthylaminohydrolase 2), et l'IGFBP4 et la sérine protéase 11 (deux régulateurs de l'IGF) (Haslett *et al.*, 2002). La même équipe a ensuite publié une étude portant sur le profil d'expression de 50000 gènes dans laquelle 32% des gènes connus identifiés codaient des protéines impliquées dans la signalisation, dont l'interleukine 27, la sous-unité régulatrice 1A de la protéine phosphatase 1, RAB31 (un membre de la famille

Ras), Sos1 et le membre 21 de la superfamille des récepteurs au TNF (Haslett *et al.*, 2003). Le profil d'expression génique a aussi été analysé dans les muscles provenant de fœtus, d'enfants (âgés de 8 à 10 mois) et de patients DMD symptomatiques (âgés de 5 à 12 ans). Cette étude a révélé que l'induction de la voie du NF-κB avait lieu peu après la naissance mais n'a montré aucune activation des voies de l'atrogine 1 et de la myostatine (impliquées rappelons le dans la dégradation protéique). De plus, la voie du TGFβ était fortement induite chez les patients symptomatiques, avec une sous-expression du récepteur au TGFβ de type II et de ASK1 (Chen *et al.*, 2005). Une autre étude sur puce à ADN de biopsies de patients DMD âgés de moins de 2 ans a permis d'établir que le profil d'expression génique était extrêmement modulé dès la phase pré-symptomatique de la pathologie, avec entre autres l'induction de quelques gènes impliqués dans la signalisation (IGF-1 et 2, IGFBP4, sérine protéase 11, récepteur α1 de l'IL-13, intégrine β2 et TGFβ 1 et 3) (Pescatori *et al.*, 2007).

L'analyse génomique du muscle dystrophique (murin ou humain) a donc permis à plusieurs reprises de mettre en évidence des dérèglements de l'expression de gènes impliqués dans la signalisation cellulaire. Cependant, du fait de la grande complexité du muscle squelettique, peu d'études protéomiques ont pu être conduites avec succès. Le protéome du muscle dystrophique a cependant parfois été étudié par électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse. Une étude des muscles des membres de souris saines et *mdx* âgées de 3 mois a entre autres révélé l'expression différentielle de 40 protéines de la fraction cytosolique et de 20 protéines de la fraction microsomale, avec une réduction dramatique du niveau de l'adénylate kinase 1 (AK1) (Ge *et al.*, 2003, 2004). Par ailleurs, nous pouvons noter qu'une analyse DIGE du diaphragme de souris saines et *mdx* a révélé l'expression différentielle de 35 protéines, 21 protéines étant sous-régulées (dont Fbxo-11 et l'adénylate kinase) et 14, étant au contraire up-régulées dans le muscle *mdx* (dont cvHSP, la "heat shock protein" cardiovasculaire) (Doran *et al.*, 2006). Nous pouvons également noter ici qu'une puce à anticorps globale (CSAA1 Panorama® Antibody Microarray - Cell Signaling Kit, Sigma), utilisée dans le laboratoire avant mon arrivée sur le projet, avait permis de mettre en évidence dans les muscles de patients DMD un défaut de phosphorylation de certaines kinases des voies MAPK (à savoir FAK, ERK et Raf). Enfin, l'étude du profil d'expression génique s'est également révélée être une méthode puissante pour l'évaluation préclinique de l'efficacité et de la sûreté du saut exon chez la souris *mdx*, permettant d'en détecter les effets bénéfiques comme les effets indésirables (t Hoen *et al.*, 2006).

Presque tous les aspects de la biologie et de la physiologie cellulaires sont régulés par des modifications post-traductionnelles, qui jouent sur la conformation des protéines, leur activation, leur dégradation, leur localisation subcellulaire et leurs interactions avec d'autres protéines. La plus étudiée de ces modifications est la phosphorylation réversible de résidus sérine, thréonine et tyrosine, et l'étude du phospho-protéome apparaît comme une stratégie prometteuse, pouvant aboutir à l'identification de bio-marqueurs et/ou à une connaissance accrue de la pathogénie de la DMD. Un des grands avantages des puces à protéines est lié au fait qu'elles permettent d'avoir accès non seulement au niveau d'expression des protéines, mais également aux modifications post-traductionnelles. Les difficultés de la phospho-protéomique, comme de la protéomique en général, sont liées à la quantité limitée d'échantillons, à la complexité de ces échantillons et aux différences énormes existant dans la représentativité des différentes protéines. De plus, la phosphorylation est un phénomène dynamique finement régulé et le faible niveau de représentation des protéines phosphorylées complique leur étude. En effet, bien que jusqu'à un tiers des protéines du protéome total puissent être phosphorylées, le niveau absolu de chaque protéine peut être très bas. Il faut donc mettre au point des méthodes sensibles, précises et des procédures de préparation des échantillons qui bloquent les processus enzymatiques, de façon à éviter toute dégradation ou déphosphorylation des protéines. Nous avons utilisé dans cette étude la technologie des puces à anticorps, en parallèle avec des approches plus ciblées, telles que l'analyse en western blot du niveau d'expression ou de phosphorylation des protéines, la localisation subcellulaire des protéines en immunohistochimie ou encore les tests d'activité enzymatique, afin de caractériser de façon précise les dérégulations touchant les voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle dystrophique.

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Souris *mdx* (muscles)

Les souris saines (C57 Black/10, appelées Bl10 dans cette étude) et *mdx* utilisées dans ce travail proviennent d'un élevage entretenu au niveau du laboratoire de Biorégulation, au sein de notre Unité. Les muscles *tibialis anterior* (TA) et diaphragme (DIA) sont prélevés, immédiatement après euthanasie, sur des souris Bl10 et *mdx* âgées de 1, 4 et 12 mois, rincés dans du PBS, pesés puis congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

1.2. Chien GRMD

Les chiens sains et GRMD proviennent d'une colonie localisée au niveau du centre de Thérapie Génique de Boisbonne (École Nationale Vétérinaire de Nantes), et nous avons pu accéder aux échantillons grâce à une collaboration avec l'UMR INRA703 (Unité d'Anatomie Pathologique). Les chiens sains et atteints sont discriminés au cours des premiers jours de vie par PCR et par marquage immunohistochimique de la dystrophine. Ils sont sacrifiés par injection intra-veineuse de pentobarbital de sodium et les muscles sont prélevés immédiatement après l'euthanasie.

1.2.1. Cellules dérivées du muscle

Les MDC canines sont isolées à partir de biopsies des muscles des membres (antérieurs et postérieurs) prélevées sur des chiens sains et GRMD âgés de 1 mois, selon le protocole décrit précédemment (Marelli *et al.*, 1992, Chiu *et al.*, 1995). Elles sont aliquotées et stockées dans l'azote liquide. Au moment de la mise en culture, elles sont décongelées au bain-marie (37°C) puis rincées 3 fois dans le milieu de décongélation : DMEM (VWR) 39%, M199 (VWR) 39%, SVF (Den Dunnen *et al.* 1989) 20%, PSF (pénicilline/streptomycine/fungizone, Sigma) 1% et L-Glutamine (Den Dunnen *et al.* 1989) 1%. La viabilité cellulaire est contrôlée à l'aide d'un marquage au bleu trypan (Biochrom AG) et les MDC sont comptées sur cellule de Mallassez. Elles sont ensemencées dans le milieu de décongélation à 25000 cellules.cm^{-2}, sur des flasques gélatinées de 75 cm^2 (Dutscher), et mises en culture à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. Le milieu est changé toutes les 48 heures et un passage est effectué à 50% de confluence, afin d'homogénéiser les cultures (les cellules sont trypsinées, numérées et réensemencées).

Pour les MDC en prolifération, la culture est effectuée dans un milieu contenant 10% de SVF (DMEM 44%, M199 44%, SVF 10%, PSF 1% et L-glutamine 1%), et elle arrêtée lorsque les myoblastes sont sub-confluents à confluents.

Pour les MDC en différenciation, la culture est effectuée à partir de J5 dans un milieu contenant 1% de sérum de cheval (HS, PAA) (DMEM 48%, M199 48%, HS 2%, PSF 1% et L-glutamine 1%), et les cultures sont arrêtées lorsque les myotubes sont sub-confluents à confluents et que les premiers signes de détresse, liés au manque de place dans la flasque, commencent à apparaître (mortalité cellulaire associée à un décollement de cellules).

Au moment de l'arrêt de la culture, les boîtes sont rincées deux fois dans du PBS, puis les MDC sont décollées à l'accutase (diluée au tiers dans du PBS tiédi, incubation à 37°C jusqu'à décollement des cellules). La solution est collectée et centrifugée (5 minutes à 1500 rpm) puis le culot contenant les cellules est rincé deux fois dans du PBS et congelé à sec à -80°C, jusqu'à utilisation.

1.2.2. Muscles

Les muscles *Vaste latéral*, *Biceps fémoral* et *Biceps brachial* sont prélevés sur des chiens sains et GRMD âgés de 4 et 5 mois. Chaque biopsie est divisée en deux, un bloc servant pour les études biochimiques (il est immédiatement congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C jusqu'à utilisation), et l'autre étant conservée pour l'observation histologique (il est plongé dans un composé d'inclusion de chez Sakura Finetek, puis congelé dans de l'isopentane refroidi dans l'azote liquide). Le *Vaste lateral* est également prélevé sur des chiens GRMD âgés de 3 et 36 mois, en vue des études histologiques.

2. Anticorps

Les anticorps utilisés pour les études en Western Blot et en immunohistochimie sont listés Tableau 1.

Tableau 1 Liste des anticorps utilisés pour les études en Western Blot et en immunohistochimie

Anticorps	Site P	Fournisseur	Mono/Poly	Source	Dilution WB	Dilution IHC
Akt1		BD PharMingen	monoclonal	mouse	2000^{e}	50^{e}
Akt	S473	CST	polyclonal	rabbit	250^{e}	
Akt	S473	CST	monoclonal (IHC specific)	rabbit		10^{e}
cavéoline-3		BD Transduction Lab.	monoclonal	mouse	25000^{e}	
dystrophine		Novocastra	monoclonal	mouse	10^{e}	
ERK1		BD PharMingen	monoclonal	mouse	1000^{e}	
ERK2		BD PharMingen	monoclonal	mouse	1000^{e}	
ERK1/2	T202/Y204	BD Transduction Lab.	monoclonal	mouse	100^{e}	
GAPDH		Santa Cruz	monoclonal	mouse	5000^{e}	
GSK3β		BD Transduction Lab.	monoclonal	mouse	1000^{e}	50^{e}
GSK3β	S9	CST	polyclonal	rabbit	50^{e}	
H2AX		Bethyl Laboratories	polyclonal	rabbit	750^{e}	
LDHA		CST	polyclonal	rabbit	750^{e}	
MAFbx		Santa Cruz	polyclonal	rabbit	500^{e}	
MuRF1		Santa Cruz	polyclonal	rabbit	500^{e}	
p70S6K		BD Transduction Lab.	monoclonal	mouse	1000^{e}	
p70S6K	T421/S424	CST	polyclonal	rabbit	100^{e}	
p70S6K	T389	CST	polyclonal	rabbit		10^{e}
PDK1	S241	CST	polyclonal	rabbit	250^{e}	
PP2A		BD Transduction Lab.	monoclonal	mouse	5000^{e}	
PTEN		BD PharMingen	monoclonal	mouse	500^{e}	
PTEN		CST	monoclonal	rabbit		10^{e}

Le nom de la protéine reconnue, le site de phosphorylation reconnu (site P) dans le cas des anticorps phospho-spécifiques, le fournisseur (BD Transduction Lab. = BD Transdcution Laboratories et CST = Cell Signaling Technology), le type et la source de l'anticorps, ainsi que les dilutions utilisées en Western Blot (WB) et en immunohistochimie (IHC) sont indiqués.

Des anticorps secondaires goat anti-mouse et anti-rabbit conjugués à l'AlexaFluor®680 ou à l'AlexaFluor®488 (Molecular Probes) sont utilisés au 10000^{e} pour détecter les anticorps I correspondants.

3. Etude biochimique

3.1. Extraction protéique

Afin d'éviter toute dégradation protéique et toute déphosphorylation, les cocktails d'inhibiteurs de phosphatases 1 et 2 et un cocktail d'inhibiteurs de protéases de chez Sigma sont systématiquement ajoutés extemponarément au tampon de lyse (au 100^{e} et 200^{e}, respectivement).

3.1.1. Protéines totales

3.1.1.1. Extraction

Pour les expériences de Western Blot, les protéines totales sont extraites dans un tampon de lyse NP40 (1% Nonidet-P40, 20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycérol, et 2 mM EDTA). Pour les expériences de puce, plusieurs tampons de lyse ayant été utilisé, la composition est spécifiée à chaque fois.

3.1.1.1.1. MDC

Le culot est sorti extemponarément du congélateur et placé immédiatement sur glace. En fonction de sa taille, il est repris à la pipette dans 50 à 200 µL de tampon de lyse. Le tube est placé sous agitation pendant 30 minutes à 4°C (le lysat est homogénéisé à la pipette toutes les 10 minutes) puis une sonication de 5 minutes est effectuée (4°C). Le tube est centrifugé 15 minutes à 13000 rpm et le surnageant, débarrassé des débris cellulaires, est récupéré, dosé, aliquoté et stocké à -80°C.

3.1.1.1.2. Muscles murins

Le muscle encore congelé est placé sur glace dans un tube contenant 5 mg d'oxyde d'alumine et 100 µL de tampon de lyse pour 10 mg de muscle, et il est finement haché aux ciseaux. Il est broyé pendant 1 minute à l'aide d'un broyeur manuel mécanique puis incubé pendant 30 minutes, avec un broyage réitéré toutes les 10 min. Une centrifugation de 15 minutes à 13000 rpm (4°C) permet de récupérer le surnageant débarrassé des débris cellulaires.

Les extraits protéiques sont ensuite systématiquement déplétés en IgG, à l'aide de la protéine G. Typiquement, 100 µL d'extrait sont mélangés avec 50 µL de protéine G préalablement lavée (Protein G Sepharose beads, Amersham) puis placés 30 minutes sous agitation (sur un agitateur magnétique). Une centrifugation de 20 secondes à 13000 rpm

permet de récupérer le surnageant (la protéine G précipitant au fond du tube) qui est alors dosé, aliquoté et stocké à -80°C.

Une variabilité inter-souris importante ayant été observée lors des expériences préliminaires, il nous est apparu indispensable de travailler sur un grand nombre d'animaux. Des pools d'extraits correspondant au minimum à 8 extractions réalisées à partir de muscles provenant de souris différentes sont donc réalisés.

3.1.1.1.3. Muscles canins

Avant d'entamer l'étude biochimique des biopsies musculaires canines, nous avons souhaité mettre au point un système nous permettant d'effectuer la lyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons, tout en augmentant la reproductibilité des expériences. Nous avons pour cela acquis le Tissue Lyser de chez Qiagen, un appareil utilisant un système de billes magnétiques agitées à haute fréquence. Les conditions données par le fournisseur ont été adaptées à la lyse des biopsies musculaires. Typiquement, le muscle est sorti du congélateur et placé immédiatement à 4°C dans du tampon de lyse. Après décongélation, il est découpé en fragments d'environ 5 mg et ceux apparaissant calcifiées ou fibreux sont éliminés. Les autres sont récupérés sur la balance, pour un rapport final de 100 µL de tampon pour 20 mg de muscle (et dans un volume minimal de 400 µL). La lyse est effectuée pendant 15 minutes à 30 Hz, en présence d'une bille en acier de 3 mm de diamètre. Le tube est alors centrifugé 10 minutes à 13000 rpm (4°C) et le surnageant est récupéré. Une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm permet d'éliminer les derniers débris cellulaires et le surnageant est récupéré, dosé, aliquoté et stocké à -80°C.

Les expériences préliminaires, réalisées sur des échantillons individuels (4 biopsies prélevées à des endroits distincts d'un même muscle), n'ayant pas révélé de différences majeures dans le niveau de détection des protéines totales ou phosphorylées entre les différentes biopsies, les extraits protéiques ont été par la suite poolés et analysés comme un seul extrait. Pour les expériences de Western Blot, le niveau d'expression et/ou de phosphorylation de ERK1/2, Akt, GSK3β, p70S6K, PDK1, PTEN et PP2A ont été étudiés dans le *Vaste latéral*. L'analyse de GSK3β et ERK a en plus été réalisée dans les muscles *Biceps fémoral* et *Biceps brachial*.

3.1.1.2. Dosage protéique (BCA)

Le dosage des extraits totaux est effectué selon la méthode du BCA (acide bicinchoninique, Sigma), basée sur la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La réduction par les protéines, en milieu basique, du Cu^{2+} en Cu^{+} aboutit à la formation d'un complexe BCA-Cu^{+} dont l'intensité de la couleur (bleu-violette) est proportionnelle à la quantité de protéines. L'étalonnage est réalisé grâce à une gamme de BSA, allant de 0 à 5 mg/mL, et le dosage est effectué en microplaque. La gamme et les échantillons (4 µL) sont incubés 15 minutes à 37°C avec 100 µL de réactif (BCA 50%, ddH_2O 50% et $CuS0_4$ 0,16%), puis la densité optique est lue à 562 nm, à l'aide d'un biophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf).

3.1.2. Dystrophine

3.1.2.1. Extraction

Les muscles sont disséqués dans un tampon de lavage contenant les inhibiteurs puis l'extraction est effectué avec le TissueLyser, dans un tampon contenant une concentration importante en détergents (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 0.1%; urée 2 M ; 2-mercaptoethanol 10% (vol./vol.) ; glycérol 10% (poids/vol.)) (Mann *et al.*, 2001, Auda-Boucher *et al.*, 2007).

3.1.2.2. Dosage protéique (kit RC DC)

Le tampon étant incompatible avec les dosages classiques, un dosage avec un kit RC DC (Biorad), basé sur la technique de Lowry mais compatible avec les détergents, est effectué. 25 µL de chaque point de la gamme de BSA (de 0 à 1,25 mg/mL) et de chaque échantillon sont déposés dans des tubes eppendorf puis 125 µL de Reagent I sont ajoutés et les tubes sont vortexés et incubés 1 minute à température ambiante. 125 µL de Reagent II sont alors ajoutés et les tubes sont vortexés et centrifugés 5 minutes à 11800 rpm. Le surnageant est éliminé et 127 µL de solution A' sont ajoutés (la solution A' est préparée extemponarément, 20 µL de solution S étant mélangés à chaque mL de solution A utilisé). Les tubes sont vortexés, incubés 5 minutes à température ambiante et vortexés à nouveau. 1 mL de solution B est alors ajouté et les tubes sont immédiatement vortexés. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la DO est lue à 750 nm (UV/VIS Photometer, Lambda 20, Perkin Elmer).

3.1.3. Fractionnement subcellulaire

3.1.3.1. Extraction

Les protéines appartenant aux différents compartiments subcellulaires (cytosol, membranes et noyau) sont extraites à l'aide du *ProteoExtract® subcellular proteome extraction kit*, de chez EMD Biosciences, selon les instructions du fournisseur. 75 mg de muscle sont sortis extemponarément du congélateur et placés dans un tube contenant 1 mL de Wash Buffer. Le muscle est haché aux ciseaux le plus finement possible (pendant plusieurs minutes) puis 1 mL de Wash Buffer est à nouveau ajouté. Le tube est homogénéisé par retournement et centrifugé 10 minutes à 1400 rpm (4°C). Le surnageant est éliminé puis ce lavage est réitéré. Après élimination du surnageant, le culot est remis délicatement en suspension dans 500 µL d'Extraction Buffer I (froid). Le tube est incubé 10 minutes à 4°C sous agitation (200 rpm) puis centrifugé 10 minutes à 2700 rpm (4°C). Le surnageant (contenant les protéines cytosoliques) est récupéré, aliquoté et stocké à -80°C. Le culot est alors remis délicatement en suspension dans 350 µL d'Extraction Buffer II (froid). Le tube est incubé 30 minutes à 4°C sous agitation, puis une centrifugation de 10 minutes à 7200 rpm permet de récupérer le surnageant (contenant les protéines des membranes) qui est aliquoté et stocké à -80°C. Le culot est enfin remis délicatement en suspension dans 250 µL d'Extraction Buffer III contenant, en plus des inhibiteurs, 375 unités/mL de benzonase. Après une incubation de 10 minutes à 4°C sous agitation, une centrifugation de 10 minutes à 8200 rpm permet de récupérer le surnageant (contenant les protéines du noyau), qui est aliquoté et stocké à -80°C.

3.1.3.2. Dosage protéique (kit DC)

Les tampons du kit de fractionnement étant incompatibles avec les dosages classiques, un dosage avec un kit DC (Biorad), basé sur la méthode de Lowry, est effectué. 5 µL de chaque point de la gamme BSA (de 0 à 1,25 mg/mL) et de chaque échantillon sont déposés au fond d'une microplaque et 25 µL de solution A' sont alors ajoutés (voir le dosage RC DC pour plus de détails). 200 µL de solution B sont ajoutés et le contenu des puits est homogénéisé à la pipette. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la DO est lue à 750 nm, à l'aide du BioPhotometer.

3.2. Western Blot

75 µg de protéines totales ou 10 µg de protéines cytosoliques, membranaires ou nucléaires sont chauffés pendant 10 minutes à 70°C, en présence de "sample buffer" 1X (composition du sample buffer 4X : Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 ; glycérol 20% ; SDS 2% ; 2-mercaptoethanol 5% ; bleu de bromophénol 5%) (Laemmli, 1970). Après dépôt sur un gel SDS-PAGE contenant 8 à 12% de polyacrylamide (en fonction de la taille des protéines étudiées), la migration est effectuée en conditions dénaturantes, dans du tampon Tris-Glycine-SDS (Tris base 25 mM pH 8,45 ; glycine 192 mM ; SDS 0,1%), pendant 15 minutes à 20 mA puis à 25 mA jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel. Pour la dystrophine, la séparation des protéines est effectuée à l'aide d'un gel à gradient NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12% (Invitrogen). 100 à 200 µg de protéines sont chauffées pendant 10 minutes à 70°C, en présence de NuPAGE® LDS Sample Buffer et de NuPAGE® Reducing Agent 1X. La migration est effectuée dans du Running Buffer MOPS SDS (contenant de l'anti-oxidant), pendant 1 heure à 200 V.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose Protran BA83 (Whatman), à l'aide d'un Mini Trans-Blot cell (BioRad), dans du tampon Tris-Glycine 1X contenant 20% d'éthanol (composition du tampon Tris-Glycine 10 X : Tris base 250 mM pH 8,3 et glycine 1,92 M). Le transfert est effectué sur la nuit à 90 mA, ou pendant 1h30 à 400 mA, sauf pour l'étude de la dystrophine, pour laquelle un transfert à 200 mA sur la nuit est effectué.

A l'issu du transfert, les membranes sont colorées au rouge ponceau, bloquées pendant 1 heure dans du PBS Tw 0,1% BSA 2,5% puis incubées avec l'anticorps I pendant 2 heures, dans du PBS Tw 0,1% BSA 1%. Après 3 lavages dans du PBS Tw 0,1% (30 minutes au total), les membranes sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps II correspondant, dans du PBS Tw 0,1% BSA 1%. Elles sont lavées 2 fois 7 minutes dans du PBS Tw 0,1% puis scannées grâce à un scanner infra-rouge, l'IR-Imager Odyssey (Li-COR Biosciences).

L'intensité du signal (pixel.mm^{-2}) est quantifiée à l'aide du logiciel Odyssey (Application Software Version 1.1, LI-COR Biosciences) et les valeurs sont normalisées par rapport à la GAPDH (sauf pour les fractions subcellulaires, pour lesquelles la charge est vérifiée visuellement à l'aide de la coloration au rouge Ponceau). Le niveau des protéines dans le muscle dystrophique (*mdx* ou GRMD) est comparé à celui du muscle sain, arbitrairement fixé à 100%. L'analyse statistique des résultats est effectuée à l'aide du logiciel statEL (Excel, Microsoft).

3.3. Puces à anticorps

3.3.1. Puces à anticorps maison

3.3.1.1. Marquage des extraits

L'utilisation des infra-rouges proches permet d'augmenter significativement la sensibilité de détection, tout en contribuant à diminuer le bruit de fond. Deux fluorophores sont utilisés : l'AlexaFluor®680 (Molecular Probes, détection à 700 nm) et l'IRD38 ou l'IRD800 (LI-COR Biosciences, détection à 800 nm). Les deux types de fluorophore se fixent sur les radicaux $-NH_2$ des protéines, mais l'AlexaFluor®680 possède un groupement isothiocyanate (NCS ou ITC) alors que l'IRD38 et l'IRD800 possèdent un groupement N-hydroxysuccinimidyl ester (NHS ester). Les protéines sont extraites des deux échantillons (sain et dystrophique), dans du PBS NaCl 500 mM NP40 1% contenant les cocktails d'inhibiteurs de phosphatases et de protéases, ainsi que de la benzonase à 375 unités/mL. Alternativement, le marquage est effectué sur la fraction nucléaire extraite du muscle de chiens sain et GRMD. Les protéines sont dosées en microplaque (dosage BCA) puis, pour chaque échantillon, un aliquot est marqué avec l'AlexaFluor®680 et l'autre avec l'IRD38 ou l'IRD800. Le marquage est effectué pendant 1 heure à 16°C, sous agitation (400 rpm), sur 100 µg de protéines (50 µL à 2 mg/mL dans du PBS) et en présence de 5 µL de $NaHCO_3$ 1 M (pH 8,3) et d'un aliquot de fluorophore (correspondant à environ 15 molécules de fluorophores par protéine). Les protéines marquées sont ensuite séparées des fluorophores libres par 2 étapes de gel filtration (sur des "Spin post-reaction Clean-up Columns" de chez Sigma), puis à nouveau dosées. L'AlexaFluor®680 est quantifié à 678 nm (dans du PBS) et l'IRD38 ou l'IRD800, à 774 nm (dans du PBS:méthanol). La DO obtenue permet de calculer le nombre de fluorophores par molécule, grâce à la formule suivante :

$$\text{Nombre fluorophores/molécule} = DO / (\varepsilon * [\text{protéine}])$$

ε désigne le coefficient d'extinction molaire des deux fluorophores à la longueur d'onde indiquée (240000 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour l'IRD38 et l'IRD800 et 184000 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour l'AlexaFluor®680).

[protéine] désigne la concentration en protéines exprimée en M ($mol.L^{-1}$). Elle est obtenue en divisant la concentration massique (mg/mL) par la masse molaire moyenne des protéines, estimée à 60000 $g.mol^{-1}$.

Pierce recommande de valider le marquage pour un rapport (nombre de fluorophores/molécule) supérieur ou égal à 2. Une lame est incubée avec l'échantillon sain marqué à l'AlexaFluor®680 et l'échantillon dystrophique marqué à l'IRD et l'autre, avec l'échantillon sain marqué à l'IRD et l'échantillon dystrophique marqué à l'AlexaFluor®680,

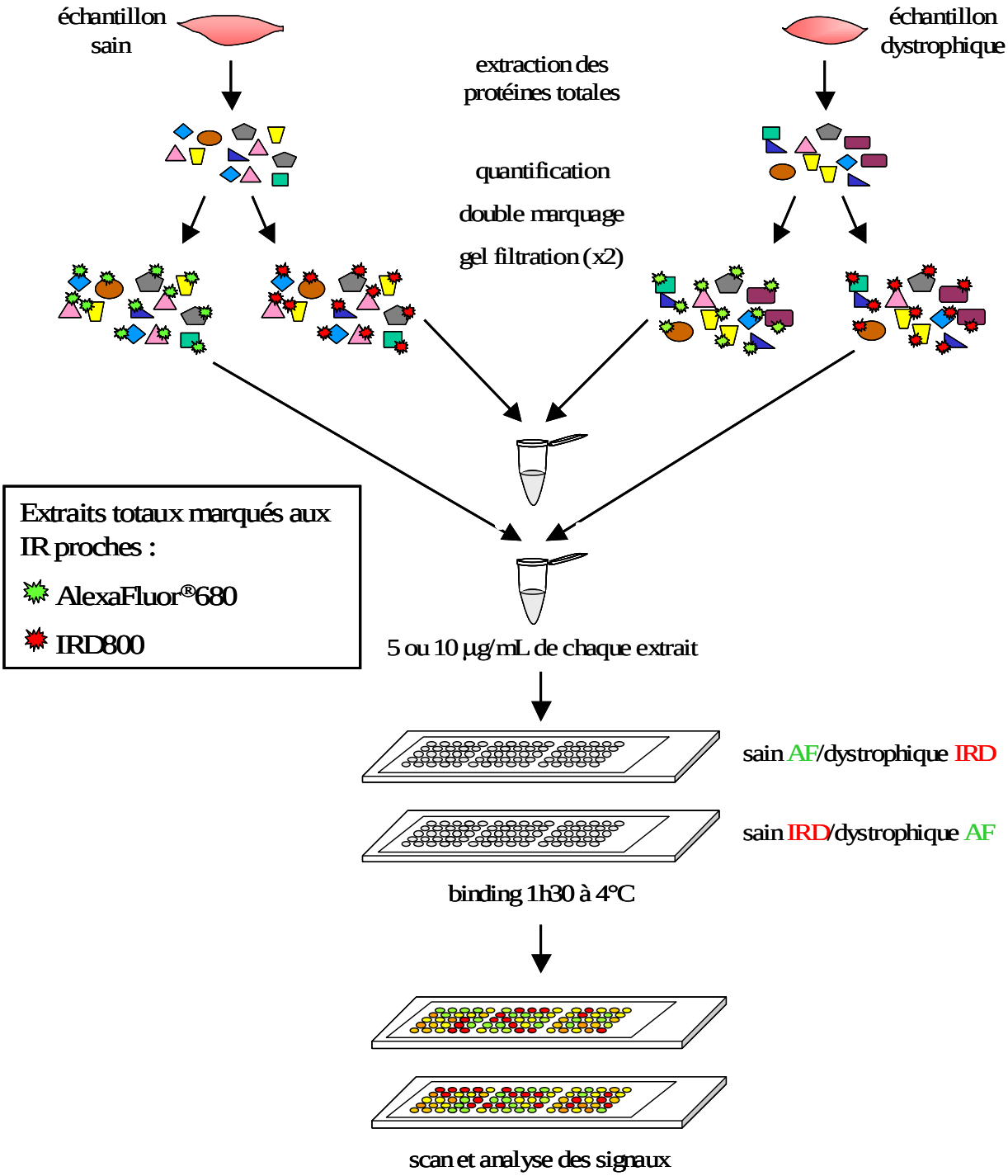


Figure 1 Principe des puces à anticorps à façon. Les puces correspondent à des lames de type FastSlides sur lesquelles les anticorps ont été spottés. Les deux échantillons sont lysés puis les protéines totales sont dosées. Pour chaque échantillon, 100 µg de protéines sont marquées avec l'AlexaFluor®680, et 100 µg, avec l'IRD38 ou l'IRD800. Après élimination des fluorophores libres par gel filtration, les protéines marquées sont dosées et les fluorophores sont quantifiés. Deux lames sont bloquées. Une sera incubée avec l'extrait sain marqué à l'AlexaFluor®680 et l'extrait dystrophique marqué à l'IRD800, et inversement pour l'autre. A l'issu de l'incubation, les lames sont scannées et analysées.

ce système de double marquage permettant de s'affranchir des différences inhérentes à l'utilisation de deux fluorophores différents. Le principe des puces est schématisé Figure 1.

3.3.1.2. Puce dédiée muscle et signalisation

Afin de pouvoir étudier de façon globale le profil d'expression protéique chez la souris *mdx*, nous avons développé une puce à anticorps dédiée au muscle et aux voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt.

Plusieurs anticorps correspondant à des protéines spécifiques du muscle ont tout d'abord été sélectionnés : dystrophine, utrophine, collagène III (composant de la MEC accumulé dans les muscles dystrophiques (Hantai *et al.*, 1985, Rampoldi *et al.*, 1986)), desmine et myosine, ainsi que des facteurs intervenant dans la régulation de la différenciation musculaire tels que MyoD, la myostatine et la myogénine. Les superoxyde dismutases SODcu (cuivre), SODmn (manganèse) et SOD1, la catalase et la peroxydase (marqueurs du stress oxydatif) ont également été incluses sur la puce, en raison de l'augmentation d'activité rapportée chez la souris *mdx* (Ragusa *et al.*, 1997). En ce qui concerne l'homéostasie calcique, nous avons choisi de spotter les anticorps reconnaissant SERCA IA, SERCA II (ATPases calciques du réticulum sarcoplasmique), le phospholamban (protéine régulatrice des SERCA), la calséquestrine (protéine de liaison au calcium localisée dans la lumière du réticulum sarcoplasmique et jouant un rôle tampon dans les échanges avec le cytosol) et une Calcium Binding Protein (CABP).

Afin de pouvoir étudier les 3 voies MAPK, ainsi que la voie PI3K/Akt, et ce à différents niveaux de la cascade, les anticorps dirigés contre les protéines suivantes ont été déposés : ERK1, ERK2, p44/42 (phospho-ERK), c-Raf, phospho-Raf, FAK, phospho-FAK, JNK1/2, SAPK/JNK, phospho-SAPK/JNK, c-jun, PYK2, phospho-PYK (Tyr580), phospho-PYK (Tyr881), phospho-p38, Akt et phospho-Akt. Enfin, deux marqueurs internes ont été utilisés, la β-actine et la GAPDH, la BSA servant quant à elle de témoin négatif.

Les 44 anticorps sélectionnés au total sont déposés à l'aide d'un spotteur manuel (MicroCASTer, Schleicher-Schuell), sur des lames de type FastSlide® (Whatman), correspondant à des lames de verre recouvertes d'une membrane de nitrocellulose (3 nL par spot). Chaque anticorps est spotté 6 fois (2 fois 3 répliques disposées à deux endroits différents de la lame). Les puces sont laissées toute la nuit à température ambiante puis conservées à 4°C. Le plan de la puce est donné Figure 2.

Bloc 1					
dystrophine	utrophine	dystrophine	utrophine	desmine	GAPDH
dystrophine	*	*	*	*	*
dystrophine	*	*	*	*	*
My32	myosine lente	myoD	myogénine	myostatine	collagène 3
*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*
SODcu	SERCA 1A	SERCA II	phosphoλ	calsequestrin	CABP
*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*
SODmn	SOD1	catalase	peroxydase	cycline D2	p53
*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*

Bloc 2					
ERK1	ERK2	c-Raf	Akt	β–actine	β–actine
ERK1	*	*	*	*	*
ERK1	*	*	*	*	*
p44-42	pp38	pRaf	pAkt	c-jun	GAPDH
*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*
FAK	PYK2	GAPDH	SAPK/JNK	BSA	VEGFR
*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*
pFAK	PYK p580	PYK p881	pSAPK/JNK	JNK1/2	cathepsine H
*	*	*	*	*	*
*	*	*	*	*	*

Bloc 2

Bloc 1

Figure 2 Plan de la puce dédiée muscle et signalisation. Les 44 anticorps de la puce ont été spottés selon le plan donné ci-dessus. Les anticorps du bloc 1 (en haut à gauche sur la figure et donc sur la lame) ont été spottés une deuxième fois en bas à droite, ainsi que ceux du bloc 2 (en haut à droite et en bas à gauche). Au sein de chaque bloc, chaque anticorps a été spotté 3 fois, les répliques étant indiqués par une astérisque.
My32, myosine de muscle squelettique (isoforme rapide) ; SODcu, superoxyde dismutase à cuivre ; phosphoλ, phospholamban ; SODmn, superoxyde dismutase à manganèse ; pp38, phospho-p38 ; pRaf, phospho-Raf ; pAkt, phospho-Akt ; pFAK, phospho-FAK ; PYK p580, phospho-PYK (tyrosine 580) ; PYK p881, phospho-PYK (tyrosine 881) ;pSAPK/JNK, phospho-SAPK/JNK.

Ces puces ont été testées sur les protéines extraites de cultures de MDC et sur le TA de souris saines et *mdx* âgées de 5 semaines. Les lames sont bloquées 1 heure dans du PBS Tw 2% puis lavées deux fois 5 minutes dans du PBS Tw 0,1% (4°C). L'échantillon sain marqué à l'AlexaFluor®680 est alors mélangé en quantité égale avec l'échantillon *mdx* marqué à l'IRD38 (lame 1), et inversement (lame 2), et les extraits sont incubés avec les lames pendant 30 minutes, à 4°C (5 µg/mL de protéines marquées pour chaque échantillon). Après 3 lavages dans du PBS Tw 0.1% (5, 10 et 10 minutes), les membranes sont scannées à 700 et 800 nm, à l'aide de l'IR-Imager Odyssey.

3.3.1.3. Puce MAGY array

Nous avons ensuite voulu développer, en collaboration avec la société ProtNeteomix, une puce à anticorps généraliste qui nous permettrait de regarder de façon encore plus globale le profil d'expression des protéines dans les muscles canins sain et dystrophique. 125 anticorps ont été sélectionnés au total. Des anticorps correspondant aux voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt ont été ajoutés à ceux présents sur la version générale de la puce MAGY array

Tableau 2 Les 128 anticorps présents sur la puce MAGY array, avec le rôle principal des protéines correspondantes

Anticorps	Rôle de la protéine
14-3-3 s	Signalisation (protéine régulatrice)
Actin Smooth Muscle	Cytosquelette
Actin skeletal muscle	Cytosquelette
Actin-b	Contrôle positif
Actinin-a	Cytosquelette
Akt 1	Signalisation, voie PI3K/Akt
Akt S473	Signalisation, voie PI3K/Akt
Ankyrin B	Ancrage membranaire
AP-2a	Facteur de transcription
AP-2g	Facteur de transcription
ATM	Cycle cellulaire, apoptose, réparation de l'ADN
ATM S1981	Cycle cellulaire, apoptose, réparation de l'ADN
Bad	Apoptose
Bad S112	Apoptose
BAX	Apoptose
BCl-2	Apoptose
BRCA1	Suppresseur de tumeur (cancer du sein)
c-Abl	Apoptose
Caspase 3	Protéase
CDC 25A	Phosphatases (cycle cellulaire, oncogène potentiel)
CDC 25B	Phosphatases (cycle cellulaire, oncogène potentiel)
CDC 25C	Phosphatases (cycle cellulaire, oncogène potentiel)
CDC 47	Cycle cellulaire
Cdc2 p34	Cycle cellulaire
Cdh1	Adhésion cellulaire (E-cadhérine)
Cdk1	Cycle cellulaire
Cdk2	Cycle cellulaire
Cdk4	Cycle cellulaire
Cdk5	Cycle cellulaire
Cdk6	Cycle cellulaire
Cdk7 / p40 MO15 / CAK	Cycle cellulaire
BSA	Contrôle négatif
Chk 1	Cycle cellulaire
Chk 2	Cycle cellulaire
Cited 2	
c-Myc	
CUL-1	Cycle cellulaire
Cyclin B1	Cycle cellulaire
Cyclin D1	Cycle cellulaire
Cyclin D2	Cycle cellulaire
Cyclin D3	Cycle cellulaire
Cyclin E	Cycle cellulaire
E2F-1	Cycle cellulaire
E2F-3	Cycle cellulaire
E2F-4	Cycle cellulaire
GAPDH	Contrôle positif
EGFR	Signalisation cellulaire, récepteur
EGFR Y1173	Signalisation cellulaire, récepteur
ERBb2	Signalisation cellulaire, récepteur
ErbB2 Y1248	Signalisation cellulaire, récepteur
ERK1	Signalisation, voie ERK
ERK2	Signalisation, voie ERK
ERK1/2 T202/Y204	Signalisation, voie ERK
ER	Facteur de transcription
FAK	Signalisation cellulaire
FAK Y397	Signalisation cellulaire
Fascin	Cytosquelette
Filamin	Cytosquelette
GSK-3a	Signalisation, voie PI3K/Akt
GSK-3a S21	Signalisation, voie PI3K/Akt
Hsp 27	Protéine chaperone
IkBa / MAD-3	Signalisation, voie NFkB
IkBa S32/36	Signalisation, voie NFkB
IKK Beta	Signalisation, voie NFkB

Anticorps	Rôle de la protéine
Integrin a2	Signalisation cellulaire, récepteur
Integrin a3	Signalisation cellulaire, récepteur
Integrin a5	Signalisation cellulaire, récepteur
Integrin a6	Signalisation cellulaire, récepteur
Integrin b1	Signalisation cellulaire, récepteur
Integrin b2	Signalisation cellulaire, récepteur
Integrin b3	Signalisation cellulaire, récepteur
Integrin b4	Signalisation cellulaire, récepteur
JNK 1/2	Signalisation, voie JNK
JUN	Signalisation, voie JNK
JNK 1/2 T183/Y185	Signalisation, voie JNK
Mucin 3	Signalisation et métastases
Keratin 8	Cytosquelette
Keratin 10	Cytosquelette
Keratin 14	Cytosquelette
Keratin 15	Cytosquelette
Keratin 16	Cytosquelette
Keratin 18	Cytosquelette
Keratin 19	Cytosquelette
Keratin 20	Cytosquelette
MDM2	Oncogène
MEK 1	Signalisation, voie ERK
MEK 2	Signalisation, voie ERK
MEK1/2 S218/222	Signalisation, voie ERK
Actin-b	Contrôle positif
MUC1	Signalisation et métastases
Mucin 2	Signalisation et métastases
Keratin 6	Cytosquelette
Mucin 5AC	Signalisation et métastases
Mucin 6	Signalisation et métastases
Neurofilament 200	Cytosquelette
Neurofilament 68	Cytosquelette
NFkB p65	Signalisation, voie NFkB
NFkB p65 S536	Signalisation, voie NFkB
p15 INK4b	Cycle cellulaire
p16 INK4a	Cycle cellulaire
p18 INK4c	Cycle cellulaire
p19 INK4d	Cycle cellulaire
p21CIP/WAF	Cycle cellulaire
p27 KIP1	Cycle cellulaire
p53	Suppresseur de tumeur
p57 KIP	Cycle cellulaire
p107	Cycle cellulaire
p130 / Rb2	Cycle cellulaire
p70	Signalisation, voie PI3K/Akt
p70 phospho	Signalisation, voie PI3K/Akt
Paxillin	Cytosquelette
PCNA	Cycle cellulaire
PGR	Signalisation cellulaire, récepteur
PI-3-Kp85a	Signalisation, voie PI3K/Akt
Rad51	Réparation de l'ADN
Raf S338	Signalisation cellulaire
Raf/c-Raf	Signalisation cellulaire
Rb1	Suppresseur de tumeur
Rb1 S608	Suppresseur de tumeur
STAT 3	Facteur de transcription
STAT 3 Y705	Facteur de transcription
Thymidylate synthase	Synthèse et réparation de l'ADN
TNF-a	Immunité et inflammation
Tubulin a	Cytosquelette
Tubulin g	Cytosquelette
uPA	Migration et métastases
VEGF	Signalisation cellulaire, récepteur
Vinculin	Cytosquelette

(correspondant entre autres à des protéines du cytosquelette, du cycle cellulaire et de la signalisation cellulaire). Ces anticorps ont été spottés en triplicate, à l'aide d'un spotteur automatique GMS 417 Arrayer (Affymetrix), sur des lames de type FastSlides® et la liste des anticorps, avec le rôle principal de la protéine correspondante, est donnée Tableau 2.

Les puces MAGY array ont été testées sur les protéines totales et sur les protéines nucléaires extraites du muscle de chiens sain et GRMD euthanasiés à l'âge de 5 mois. Deux lames sont incubées (après un blocage d'une heure dans du PBS Tw 2%) avec 10 µg/mL de protéines marquées, dans du PBS Tw 0,1%, pendant 1h30 à 4°C, sous agitation lente. A l'issu de l'incubation, les lames sont lavées 3 fois 5 minutes dans du PBS Tw 0,1% à 4°C, puis scannées une première fois, avant d'être lavées sur la nuit (PBS Tw 0,1%, 4°C). Les lames sont à nouveau scannées le lendemain matin puis lavées dans du PBS NaCl 500 mM pendant 30 minutes, à 4°C. Après deux lavages rapides dans du PBS Tw 0,1%, elles sont scannées une nouvelle fois puis fixées (par une incubation de 30 minutes dans du PBS éthanol 30%, à température ambiante), séchées (par centrifugation), scannées et enfin, analysées.

3.3.1.4. Analyse

Le logiciel GenePix (version Pro 4.0, Axon Instruments) calcule l'intensité moyenne de chaque spot (F, en pixels) ainsi qu'un bruit de fond moyen correspondant à une auréole dessinée autour du spot (B). Il affiche également pour chaque spot la valeur F-B, qui servira pour l'analyse (Figure 3).

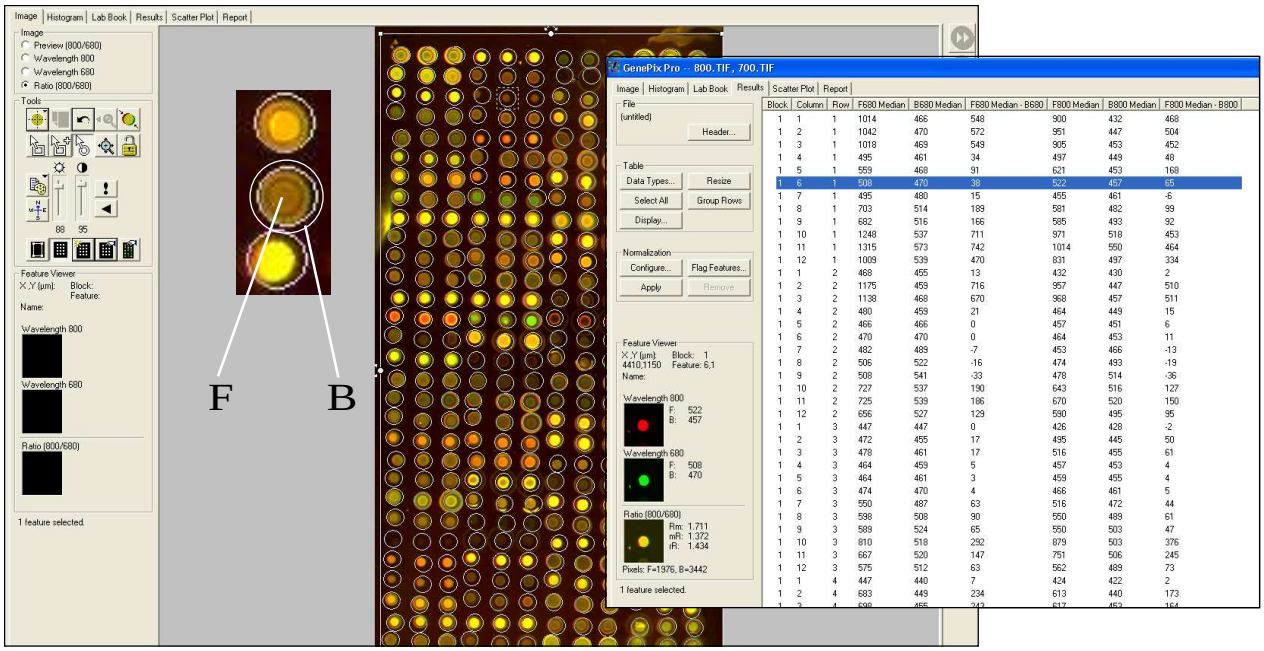
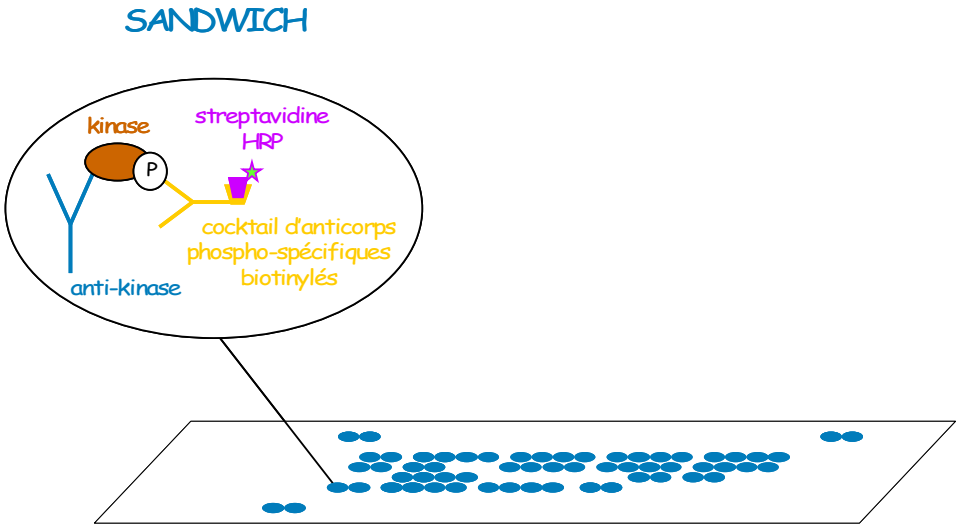
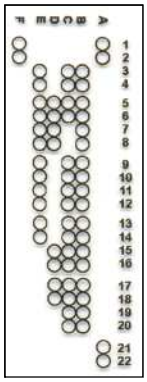


Figure 3 Analyse des puces par le logiciel GenePix.

A



B



Coordinate	Target/Control	Alternate Nomenclature	Phosphorylation Site Detected
A1, A2	Positive Control	Control (+)	—
A21, A22	Positive Control	Control (+)	—
B3, B4	ERK1	MAPK3, p44 MAPK	T202/Y204
B5, B6	JNK1	MAPK8, SAPK1γ	T183/Y185
B7, B8	JNK pan	—	T183/Y185, T221/Y223
B9, B10	p38γ	MAPK12, SAPK3, ERK6	T183/Y185
B11, B12	p38δ	MAPK13, SAPK4	T180/Y182
B13, B14	RSK1	MAPKAPK1α, RPS6KA1	S380
B15, B16	GSK-3α/β	GSK3A/GSK3B	S21/S9
B17, B18	Akt1	PKBα, RACα	S473
B19, B20	Akt2	PKBβ, RACβ	S474
C3, C4	ERK2	MAPK1, p42 MAPK	T185/Y187
C5, C6	JNK2	MAPK9, SAPK1α	T183/Y185
C9, C10	p38α	MAPK14, SAPK2A, CSBP1	T180/Y182
C11, C12	p38β	MAPK11, SAPK2B, p38-2	T180/Y182
C13, C14	RSK2	ISPK-1, RPS6KA3	S386
C15, C16	GSK-3β	GSK3B	S9
C17, C18	Akt3	PKBγ, RACγ	S472
C19, C20	Akt pan	—	S473, S474, S472
D5, D6	JNK3	MAPK10, SAPK1β	T221/Y223
D7, D8	MSK2	RSKβ, RPS6KA4	S360
D15, D16	HSP27	HSPB1, SRP27	S78/S82
D17, D18	p70 S6 Kinase	S6K1, p70α, RPS6KB1	T421/S424
E3, E4	Rabbit IgG	Control (-)	—
E5, E6	Mouse IgG_1	Control (-)	—
E7, E8	Mouse IgG_{2A}	Control (-)	—
E9, E10	Mouse IgG_{2B}	Control (-)	—
E11, E12	Goat IgG	Control (-)	—
E13, E14	PBS	Control (-)	—
F1, F2	Positive Control	Control (+)	—

Figure 4 Principe et plan de la puce Phospho-MAPK. **A.** La puce correspond à une membrane de nitrocellulose sur laquelle 21 anticorps spécifiques de kinases des voies MAPK et PI3K/Akt (plus quelques autres Ser-Thr kinases) ont été spottés en duplicate. Après fixation des kinases (phosphorylées ou non), les formes phosphorylées sont détectées à l'aide d'un cocktail d'anticorps phospho-spécifiques biotinylés (détection par chimio-luminescence). **B.** Le Tableau indique la position de chaque anticorps ainsi que le site de phosphorylation détecté.

Les données sont ensuite transférées sous Excel. L'expression différentielle des protéines entre les deux muscles est déterminée par le calcul du ratio muscle sain (S) / muscle dystrophique (D) :

ratio sain (S) / dystrophique (D) = √ ratio (800/700) lame1 / ratio (800/700) lame2

=**√ ratio (S800*D700) / (D800*S700)**

Selon le protocole donné par BD Biosciences, un ratio supérieur à 1,3 indique une sous-expression dans le muscle dystrophique alors qu'un ratio inférieur à 0,7 témoigne au contraire d'une sur-expression.

3.3.2. Puce Phospho-MAPK

La puce Phospho-MAPK (Human Phospho-MAPK Array Kit, R&D Systems) correspond à une membrane de nitrocellulose sur laquelle ont été spottés en duplicat 21 anticorps spécifiques de kinases, certains reconnaissant les différentes isoformes d'une protéine donnée (l'anti-JNK pan reconnaît par exemple à la fois JNK1, JNK2 et JNK3), et d'autres étant au contraire spécifiques d'une isoforme particulière. Les anticorps présents sur la puce sont dirigés contre des épitopes ne correspondant pas aux sites de phosphorylation, et les formes phosphorylées comme non phosphorylées des kinases sont donc reconnues. Seules les formes phosphorylées sont ensuite détectées, grâce à un cocktail d'anticorps phospho-spécifiques biotinylés. Une incubation avec de la streptavidine-HRP permet alors une détection par chimio-luminescence. Chaque kinase est donc liée d'un côté par l'anticorps présent sur la puce et de l'autre par un anticorps phospho-spécifique, et ce système de sandwich permet d'augmenter la sensibilité de détection et de limiter les éventuels problèmes de cross-réactivité. De plus, la détection se faisant à l'aide d'un cocktail d'anticorps phospho-spécifiques (et pas avec un anticorps anti-phospho-tyrosine par exemple), chaque spot correspond à une kinase phosphorylée sur un site précis (Akt1 phosphorylée sur la Ser473 par exemple). Sont également présents sur la puce 3 contrôles positifs et 6 contrôles négatifs (PBS et IgG). Le principe de cette puce ainsi la liste des anticorps spottés et les sites de phosphorylation reconnus sont donnés Figure 4.

Ces puces ont été testées sur le *Biceps brachial* de chiens sains et GRMD euthanasiés à l'âge de 4 mois. Les lames sont bloquées pendant 1 heure à 20°C dans l'Array Buffer 1 puis incubés toute la nuit à 4°C avec 300 µg de protéines diluées (dans l'Array Buffer 1). Elles sont alors lavées 3 fois 10 minutes à 20°C, puis incubées pendant 2 heures avec le cocktail

d'anticorps phospho-spécifiques (dans l'Array Buffer 2/3, à 20°C). Après trois lavages de 10 minutes, elles sont incubées avec la streptavidine-HRP diluée au 2000^{e} dans l'Array Buffer 2/3, pendant 30 minutes à 20°C, puis, après un dernier lavage, les signaux sont révélés et analysés.

L'expérience a été réalisée deux fois, et des résultats similaires ont été obtenus. Un bruit de fond moyen a été défini pour chaque puce (à l'aide de spots vides et des contrôles négatifs) et il a été soustrait à la valeur de chaque spot. Un ratio de l'intensité du signal GRMD/sain a été calculé pour chacun des 4 réplicats, et transformé en log base 2. Un seuil de significativité a ensuite été déterminé par une analyse ANOVA à 95% de confiance ($p<0,05$).

3.4. Tests d'activité enzymatique

Les tests d'activité enzymatique ont tous été réalisés sur du *Vaste latéral* prélevé sur des chiens sains et GRMD euthanasiés à l'âge de 4 mois.

3.4.1. Tests d'activité kinase

3.4.1.1. Akt

Les muscles sains et GRMD sont lysés dans un tampon RIPA modifié (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NP40 1%, glycérol 1%, EDTA 1mM), contenant les inhibiteurs de phosphatases et de protéases. 500 µg de protéines totales sont incubées avec 30 µL de protéine G, pendant 2 heures à 4°C (preclear). Les lysats sont alors incubés avec 5 µg d'un anticorps anti-Akt1/PKBα de chez Upstate Biotechnology, toute la nuit à 4°C sous agitation douce. Les complexes immuns sont immunoprécipités avec 20 µL de protéine G (incubation de 2 heures à 4°C) puis lavés deux fois avec le tampon de lyse et deux fois avec un tampon ADB (MOPS 100 mM pH 7,2, β-glycérol phosphate 125 mM, EGTA 25 mM, orthovanadate de sodium 5 mM et dithiothréitol 5 mM). Les réactions enzymatiques sont réalisées pendant 30 minutes à 30°C, en présence de 10 µL de tampon ADB, 10 µM de peptide inhibiteur de la PKA (protéine kinase A), 100 µM de peptide Akt/SGK (RPRAATF, Upstate Biotechnology), 10 uCi de [γ-^{32}P]ATP, 150 µM d'ATP et 20 mM de $MgCl_2$, dans un volume total de 40 µL. Les tubes sont centrifugés pendant 1 minute, les surnageant sont collectés et la réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout d'acide trichloroacétique à une concentration finale de 8%. 40 µL sont spottés sur un papier de phosphocellulose P81 (Whatman) qui est alors lavé 3 fois dans 0,75% d'acide phosphorique (45 minutes au total), rincé 5 minutes dans de l'acétone et séché à l'air. La radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation liquide. Les résultats obtenus sont exprimés en cpm (coups par minute) et la valeur dans le muscle GRMD

est exprimée sous forme de pourcentage relatif par rapport à celle détectée dans le muscle sain.

3.4.1.2. GSK3β

Les muscles sains et GRMD sont lysés dans un tampon RIPA modifié (voir plus haut pour la composition). 500 µg de protéines totales sont incubées avec 20 µL de protéine G pendant 2 heures à 4°C, puis avec 2,5 µg d'anticorps anti-GSK3β, toute la nuit à 4°C sous agitation douce. Les complexes immuns sont immunoprécipités avec 40 µL de protéine G pendant 4 heures à 4°C, puis lavés deux fois dans le tampon de lyse et deux fois dans un tampon contenant 25 mM d'HEPES pH 7,4, 10 mM de $MgCl_2$ et 1 mM de DTT. Les réactions enzymatiques sont conduites pendant 30 minutes à 30°C, dans un volume total de 30 µL et en présence de 10 uCi de [γ-^{32}P]ATP, 10 µM d'ATP et d'un substrat peptidique de GSK3β (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQpS, Upstate Biotechnology). Les tubes sont centrifugés pendant 1 minute, les surnageants sont collectés et 15 µL sont spottés sur du papier P81, qui est lavé et séché. La radioactivité est comptée dans un compteur à scintillation liquide (voir plus haut pour plus de détails).

3.4.2. Tests d'activité phosphatase

3.4.2.1. PP2A

L'activité de PP2A a été évaluée à l'aide d'un kit de chez Upstate Biotechnology. Les muscles sains et GRMD sont lysés dans un tampon RIPA modifié (voir plus haut pour la composition), contenant les inhibiteurs de protéases mais pas d'inhibiteurs de phosphatases. 500 µg de protéines totales sont incubées avec 4 µg d'un anticorps anti-PP2A de chez Upstate Biotechnology et 40 µL de protéine A pendant 2 heures à 4°C, sous agitation douce. Les complexes immuns immobilisés sont lavés trois fois dans du TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7, NaCl 150 mM) et une fois dans un tampon Ser/Thr assay (Tris-HCl 50 mM pH 7 et $CaCl_2$ 100 µM), puis remis en suspension dans 20 µL de ce dernier. 60 µL (750 µM) de phosphopeptide thréonine (KRpTIRR) sont ajoutés et la réaction est effectuée pendant 10 minutes à 30°C, sous agitation. Après une brève centrifugation, les surnageants sont transférés dans une plaque 96 puits et la réaction est arrêtée par l'ajout de 100 µL d'une solution de détection de vert malachite (Echelon Biosciences). Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, le phosphate libre est quantifié par la mesure de la DO à 650 nm et une courbe standard permet la conversion en pmol de phosphate relâché. L'activité dans le muscle

GRMD est exprimée sous forme de pourcentage relatif par rapport à celle détectée dans le muscle sain. La spécificité du test a été validée par l'inhibition de l'activité phosphatase de PP2A pendant l'étape de réaction enzymatique (à l'aide de 0,1 µM d'acide okaïdique).

3.4.2.2. PTEN

Les muscles sains et GRMD sont lysés dans un tampon RIPA modifié (voir plus haut pour la composition), contenant les inhibiteurs de protéases mais pas d'inhibiteurs de phosphatases. Les extraits totaux sont centrifugés pendant 40 minutes à 100000 g, puis, afin d'éliminer le phosphate libre, les surnageants sont immunoprécipités avec 6 µL d'anticorps anti-PTEN (CST), toute la nuit à 4°C, sous agitation douce. Les complexes immuns sont alors immunoprécipités par une incubation avec 30 µL de protéine G, pendant 3 heures à 4°C, puis lavés trois fois dans le tampon RIPA et une fois dans un tampon contenant 100 mM de TrisHCl (pH 8) et 10 mM de DTT. Les échantillons sont alors repris dans 50 µL de ce même tampon, et dessalés sur colonne PD-10 (GE Healthcare). Des vésicules de phospholipides (PLV) sont préparées par une sonication d'une heure à 4°C en présence de 100 µM de di(C8)-Pi(3,4,5)P_3 (Echelon Biosciences) et de 0,5 mM de phosphatidyl-sérine (Sigma), dans 20 mM d'HEPES pH 7,4 et 1 mM d'EGTA. La réaction enzymatique est conduite en incubant 10 µL de surnageant avec 10 µL de PLV et 10 µL de tampon (Tris-HCl 100 mM pH 8 et DTT10 mM), pendant 15 minutes à 37°C, et stoppée par l'ajout de 100 µL d'une solution de vert malachite. La DO à 650 nm est lue après 15 minutes d'incubation à température ambiante. L'activité dans le muscle GRMD est exprimée sous forme de pourcentage relatif par rapport à celle détectée dans le muscle sain.

4. Histologie et immunohistochimie

Des sections transversales de 8 µm d'épaisseur sont préparées à l'aide d'un cryostat CM 3050S (Leica). Après deux lavages dans de l'éthanol 100%, et une incubation de 6 minutes dans du Clearene (Surgipath Europe Ltd), elles sont préparées et montées à l'aide d'un milieu de montage Eukitt (O. Kindler GmbH).

Des sections sont marquées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E), afin de permettre la caractérisation histologique du muscle. Les noyaux sont tout d'abord colorés en bleu, par une incubation des sections encore congelées dans de l'hématoxyline Gill II (1 minute) puis, après un lavage dans l'eau de 10 minutes, le cytoplasme est coloré en rose, par une incubation de 2 minutes dans de l'éosine érythrosine.

Pour l'immunohistochimie, les sections sont perméabilisées par une incubation dans du PBS Tw 0.2% (pH 7.4), à température ambiante pendant 5 minutes, bloquées par une incubation de 30 minutes dans du PBS Tw 0.2% contenant 10% de sérum de chèvre, et incubées dans la solution de blocage toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires. Pour PTEN, du Triton X-100 est utilisé à la place du Tween (à 0,3% pour la perméabilisation et à 0,1% pour le blocage), et l'immunomarquage est toujours réalisé sur des coupes fraîches. Après lavage dans du PBS, les sections sont incubées avec l'anticorps secondaire correspondant (couplé à l'AlexaFluor®488) pendant 1 heure, à température ambiante. Après un dernier lavage dans du PBS, les noyaux sont enfin marqués par du TO-PRO-3 dilué au 1000^{e} (Invitrogen Life Technologies), et les sections sont recouvertes de milieu Mowiol (Calbiochem). Les anticorps secondaires seuls sont utilisés comme contrôles négatifs.

Toutes les sections immunomarquées sont scannées en série avec un laser argon (pour détecter le signal de l'AlexaFluor®488 ; émis par les enzymes marquées) et avec un laser hélium-néon (pour détecter le signal TO-PRO-3 à 633 nm), en utilisant un microscope confocal inversé TE-2000 C1 de chez Nikon. Chaque image est enregistrée dans un canal séparé (le vert pour les kinases et le bleu pour le TO-PRO-3).

Résultats

1. Statut des voies de signalisation chez la souris *mdx*

Nous avons dans un premier temps analysé les voies de signalisation chez la souris *mdx*, modèle animal le plus couramment utilisé de la DMD, et chez lequel des dérégulations des voies commençaient à être rapportées (Kolodziejczyk *et al.*, 2001, Kumar&Boriek, 2003, Kumar *et al.*, 2004, Lang *et al.*, 2004).

1.1. Étude à l'aide de méthodes conventionnelles

Des études préliminaires, réalisées au laboratoire à l'aide d'une puce à anticorps globale, avaient révélé un défaut de phosphorylation de plusieurs kinases dans les biopsies de patients DMD. Sur la base de ces résultats et de ceux décrits la littérature, nous avons tout d'abord décidé d'étudier le niveau d'expression et de phosphorylation des kinases ERK et Akt dans les muscles *mdx*, par la technique de Western Blot. Le muscle étant un tissu complexe, son analyse a nécessité au préalable un travail de mise au point des conditions de préparation des extraits protéiques.

1.1.1. Déplétion en immunoglobulines

Lors des expériences de Western Blot sur les extraits musculaires murins, l'utilisation d'un anticorps secondaire anti-mouse générait systématiquement la détection de deux bandes, correspondant à des protéines abondantes d'environ 55 et 25 kDa pour lesquelles l'anticorps présentait une réactivité croisée (Figure 1).

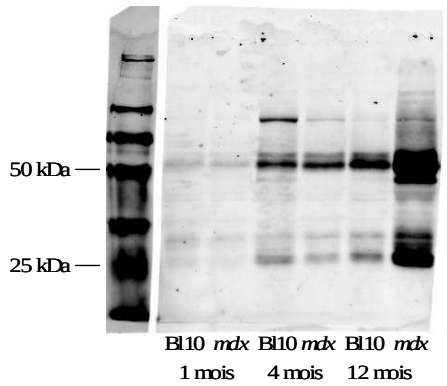


Figure 1 Exemple de Western Blot avec un anticorps secondaire anti-mouse, révélant la présence dans les extraits murins de deux protéines abondantes, d'environ 55 et 25 kDa. Les extraits protéiques du diaphragme de souris Bl10 et *mdx* âgées de 1, 4 et 12 mois ont été migrés sur gel SDS-PAGE puis incubés avec un anticorps anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®680.

Ces bandes gênaient, de part leur taille, la détection et la quantification de certaines kinases ciblées dans notre projet et nous avons cherché à identifier et à éliminer les protéines correspondantes. Nous avons pensé qu'il pourrait s'agir des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines G (Bushby *et al.*) de souris, encore présentes dans les extraits bien que les muscles soient systématiquement rincés après leur prélèvement. Nous avons utilisé la protéine G pour tenter de les éliminer, puis les extraits contrôle et déplété ont été déposés sur gel et analysés en Western Blot avec un anticorps secondaire anti-mouse (Figure 2).

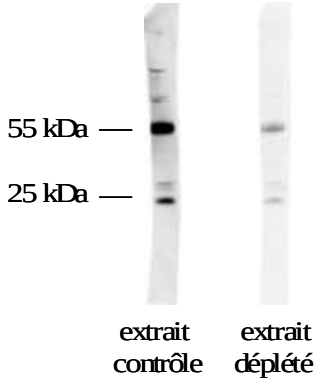


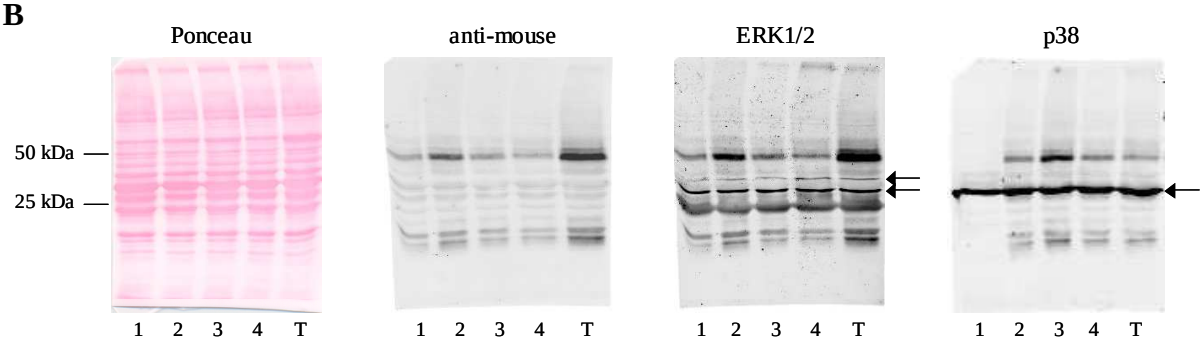
Figure 2 Déplétion en IgG d'extraits murins à l'aide de la protéine G. 75 µg de protéines totales provenant de l'extrait contrôle (non déplété) et de l'extrait incubé pendant 1 heure à 4°C avec la protéine G (diaphragme de souris Bl10 âgée de 4 mois) ont été migrés sur gel SDS-PAGE puis incubés avec un anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®680.

La très nette diminution, après le préclear, de l'intensité des deux bandes confirme la présence d'IgG dans les extraits murins. Elle démontre par ailleurs l'efficacité d'une déplétion avec la protéine G. Quatre conditions de déplétion ont été comparées, en termes d'efficacité et d'impact sur le niveau de détection des protéines d'intérêt (Figure 3).

A

	Volume de protéine G	Durée	Type d'agitation
Conditions 1	1 pour 2 volumes d'extrait	1 h	agitateur magnétique
Conditions 2	**1 pour 4** volumes d'extrait	1 h	agitateur magnétique
Conditions 3	1 pour 2 volumes d'extrait	1 h	agitateur **rotatoire** (150 rpm)
Conditions 4	1 pour 2 volumes d'extrait	**30 min**	agitateur magnétique
Conditions T	extrait non déplété		

B



C

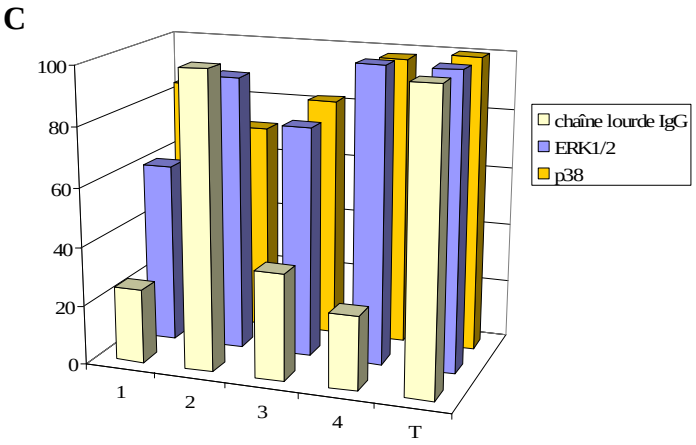


Figure 3 Efficacité et impact sur la détection des protéines d'intérêt des différentes conditions de déplétion. **A.** Les différentes conditions de déplétion en IgG testées. **B.** Les extraits déplétés ont été migrés sur gel SDS-PAGE, puis les membranes préalablement bloquées ont été incubées directement avec un anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®680, ou avec un anticorps anti-ERK1/2 ou anti-p38, puis avec l'anticorps secondaire. La coloration au rouge Ponceau est également montrée. **C.** Résultats quantifiés.

Les conditions offrant le meilleur compromis sont sans aucun doute les conditions 4, correspondant à un préclear de 30 minutes, avec un volume de protéine G égal à la moitié du volume d'extrait et une agitation sur agitateur magnétique. Elles permettent d'éliminer 75% des chaînes lourdes d'IgG, sans entraîner de variation dans le niveau de détection des kinases ERK1/2 et p38. Cette déplétion a été systématiquement effectuée pour l'analyse des extraits murins.

1.1.2. Niveau d'expression et de phosphorylation de ERK1/2

Nous avons comparé, en Western Blot, le niveau d'expression et de phosphorylation (Thr202/Tyr204) de ERK1/2 dans le TA et le diaphragme de souris Bl10 et *mdx* âgées de 1, 4 et 12 mois (Figure 4). Suite à l'observation, au cours des expériences préliminaires, d'une variabilité inter-souris importante, des pools correspondants à 8 extractions, réalisées sur des muscles provenant de souris différentes, ont été utilisés.

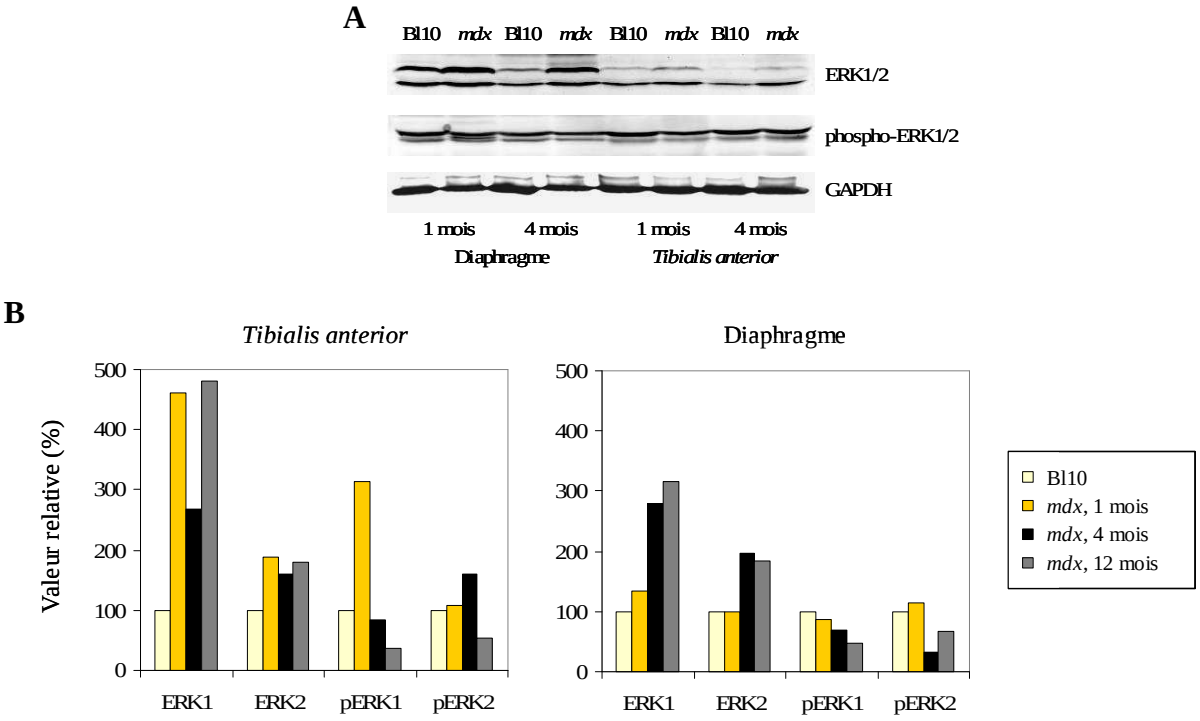


Figure 4 Niveau d'expression et de phosphorylation de ERK1/2 dans le TA et le diaphragme de souris Bl10 et *mdx* âgées de 1, 4 et 12 mois. **A.** Exemple de Western Blot obtenu avec des anticorps anti-ERK1/2, anti-phospho-ERK1/2 et anti-GAPDH aux stades 1 et 4 mois (détection : anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®680). **B.** Résultats quantifiés. La valeur dans le muscle *mdx* est exprimée sous forme de pourcentage relatif par rapport à celle du muscle sain correspondant (arbitrairement fixée à 100%). Les graphes représentent donc les variations *mdx*/Bl10 mais ne permettent pas de comparaison entre les trois stades testés pour un phénotype donné (Bl10 ou *mdx*).

Le niveau d'expression des kinases ERK1/2 est fortement augmenté chez la souris *mdx*. Cette surexpression est visible dès 1 mois dans le TA et à partir de 4 mois dans le diaphragme, et elle est plus marquée pour ERK1 que pour ERK2. Par ailleurs, une augmentation extrêmement importante du niveau de phosphorylation de ERK1 est observée dans le TA *mdx* à 1 mois (ratio supérieur à 3). Ceci n'est pas retrouvé à 4 mois et, à 12 mois, une diminution est même visible (-64%). Concernant ERK2, les changements sont moins intenses, mais une augmentation significative du niveau de phosphorylation est tout de même observée à 4 mois (+61%) et à 12 mois, nous observons à nouveau le défaut de

phosphorylation détecté pour ERK1 (-46%). Dans le diaphragme *mdx*, nous n'observons pas de variations significatives du niveau de phosphorylation de ERK1/2 à 1 mois mais un léger défaut de phosphorylation est visible à 4 mois (-31 et –67% pour ERK1 et ERK2, respectivement), et à 12 mois (-53 et –33%).

Le niveau d'expression comme le niveau de phosphorylation de ERK1/2 semblent donc modulés chez la souris *mdx* et les variations semblent dépendre du muscle et du stade de la pathologie. L'équipe de Lang avait au contraire rapporté des modulations similaires entre le TA et le diaphragme, et en avait par conséquent conclu que les dérégulations étaient liées à l'absence primaire de dystrophine, plus qu'au phénotype (nécrotique ou hypertrophié) du muscle (Lang *et al.*, 2004). De plus, une augmentation du niveau des protéines phosphorylées avait été rapportée à 3, mais également à 12 mois. La relativement faible intensité des lésions développées par les muscles *mdx*, la grande variabilité inter-souris observée et le caractère peu reproductible des expériences pourraient être à la base de ces discordances, et cela souligne plus encore la nécessité de travailler sur un nombre élevé d'animaux.

1.1.3. Niveau d'expression et de phosphorylation d'Akt

Les niveaux d'expression et de phosphorylation d'Akt (Ser473) ont été comparés dans le TA et le diaphragme de souris Bl10 et *mdx* âgées de 1 et 4 mois (Figure 5).

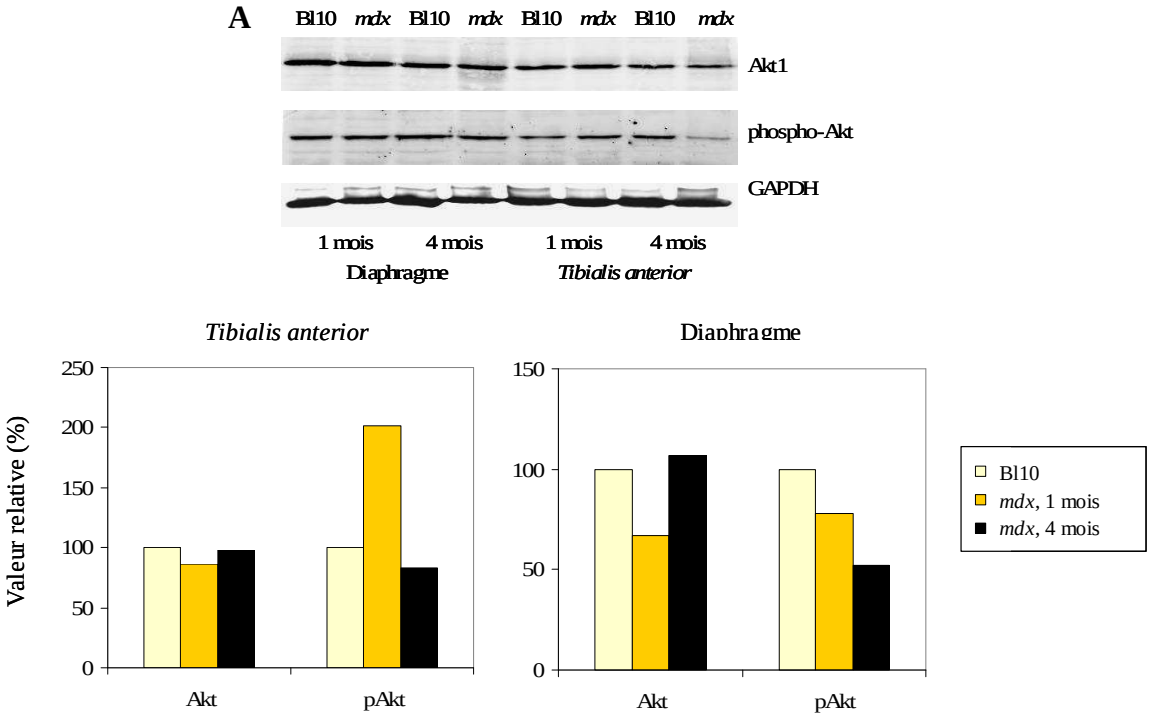


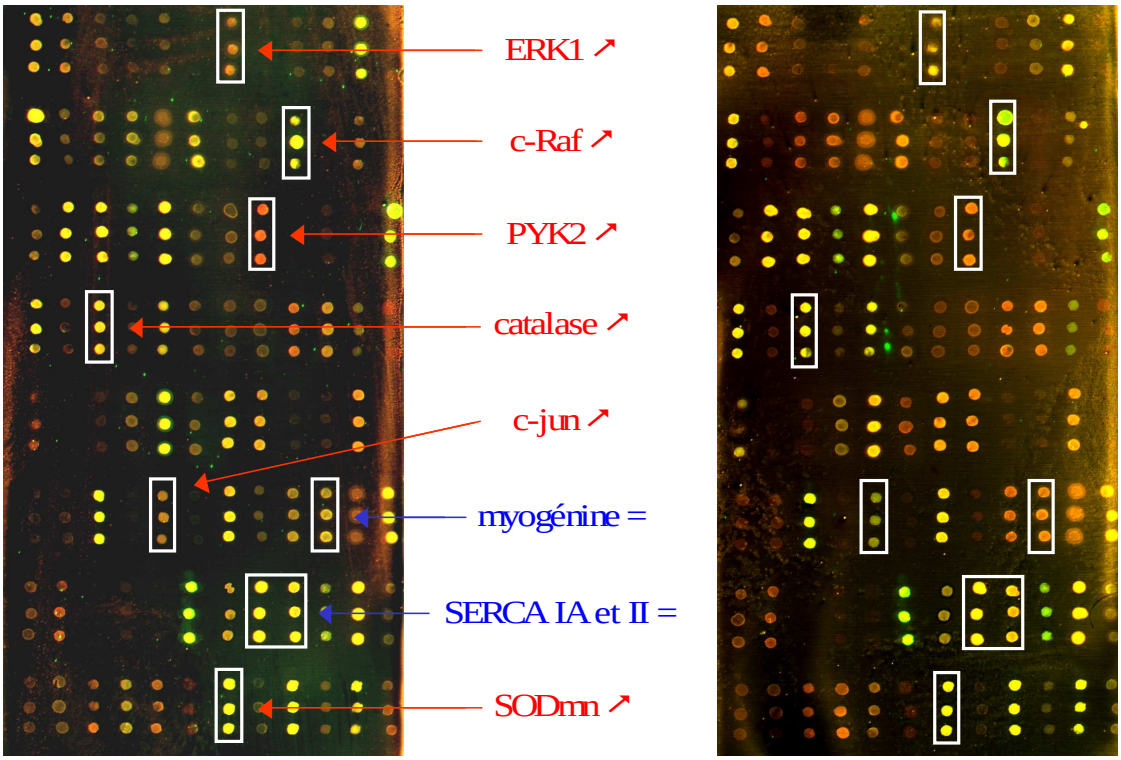
Figure 5 Niveau d'expression et de phosphorylation d'Akt dans le TA et le diaphragme de souris Bl10 et *mdx* âgées de 1 et 4 mois. **A.** Exemple de Western Blot. **B.** Résultats quantifiés. Pour plus de détails, voir Figure 4.

Le niveau d'expression d'Akt ne présente pas de variations majeures chez la souris *mdx*, mise à part une diminution dans le diaphragme à 1 mois (-33%). Le niveau de phosphorylation semble par contre plus nettement modulé. Une diminution est observée dans le diaphragme à 1 mois (-22%), mais surtout à 4 mois (-48%), alors qu'une très forte augmentation est au contraire visible dans le TA à 1 mois (ratio de 2), qui n'est pas retrouvée à 4 mois.

Akt semble donc également modulée chez la souris *mdx* et les variations détectées paraissent là encore plus liées au phénotype du muscle qu'à l'absence primaire de dystrophine. Dans le TA des souris *mdx* âgées de 1 mois, l'activation d'Akt pourrait être expliquée par l'enchaînement des cycles de nécrose/régénération, et par l'hypertrophie. A 4 mois, alors que la régénération devient moins importante, cette activation n'est d'ailleurs plus présente. Dans le diaphragme, le défaut de phosphorylation pourrait être lié à la nécrose, qui progresse avec l'âge, et cela pourrait expliquer qu'il soit plus marqué à 4 qu'à 1 mois. Ces résultats, suggérant que l'activation d'Akt serait liée à l'hypertrophie compensatoire du muscle, sont en désaccord avec la littérature. En effet, une activation d'Akt a été décrite dans les muscles squelettiques, mais également dans le diaphragme *mdx*, aux stades pré-nécrotique et nécrotique (Dogra *et al.*, 2006, Peter&Crosbie, 2006).

1.2. Application des puces à anticorps à l'étude globale des voies

Les analyses en Western Blot ne permettant que l'étude d'un nombre réduit de kinases (de plus préalablement identifiées comme cibles), nous avons dans un second temps décidé d'utiliser des méthodes plus globales, telles que la technologie des puces à anticorps, développée au laboratoire. En nous appuyant sur les résultats obtenus précédemment sur ERK et Akt, et à la lumière de ceux décrits dans la littérature (Kolodziejczyk *et al.*, 2001, Kumar&Boriek, 2003, Kumar *et al.*, 2004, Lang *et al.*, 2004), nous avons développé une puce à anticorps dédiée au muscle et aux voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt. Nous l'avons testé sur des cultures de cellules dérivées du muscle (MDC) et sur le TA de souris Bl10 et *mdx* âgées de 5 semaines. L'expérience réalisée sur le TA n'a pas donné de résultats analysables, en raison probablement de la complexité du tissu musculaire. L'image obtenue avec les MDC nous a en revanche permis de détecter des différences dans le niveau d'expression de certaines kinases (Figure 6).



Lame 1 : Bl10 AF680 / *mdx* IRD38

Lame 2 : Bl10 IRD38 / *mdx* AF680

Figure 6 Profil d'expression de 44 protéines du muscle et des voies MAPK et PI3K/Akt dans les cellules dérivées du muscle de souris saines et *mdx*. La lame 1 a été incubée avec des MDC saines marquées à l'AlexaFluor®680 et des MDC *mdx* marquées à l'IRD38, et inversement pour la lame 2. Les protéines indiquées en rouge présentent un niveau d'expression augmenté dans les MDC *mdx* et celles marquées en bleu, un niveau inchangé.

Cette puce met en évidence une augmentation de l'expression de la SOD manganèse et de la catalase dans les MDC *mdx*, et révèle que le niveau d'expression des SERCA (IA et II) est inchangé entre les deux conditions. Ces deux résultats sont en accord avec les précédentes observations faites dans le muscle (Ragusa *et al.*, 1997, Dowling *et al.*, 2004). Concernant la voie ERK/MAPK, une augmentation des protéines totales ERK1 est visible dans les MDC *mdx*, qui est en concordance avec nos résultats de Western Blot et avec ceux décrits dans la littérature sur le muscle (Lang *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'augmentation de c-jun confirme que la voie JNK/MAPK est également touchée chez la souris *mdx*, et elle est en accord avec l'augmentation de JNK1 précédemment décrite dans le muscle (Kolodziejczyk *et al.*, 2001). Nous détectons enfin une augmentation de c-Raf et de PYK2, une tyrosine cytoplasmique apparentée à FAK et jouant un rôle dans plusieurs voies de signalisation.

Cette expérience nous permet donc de confirmer dans les MDC plusieurs observations déjà décrites dans le muscle. Cependant, le faible niveau d'intensité des signaux semble limiter l'étude des extraits murins avec nos puces à anticorps. Les anticorps présents sur les

puces ont été générés contre des protéines humaines. Il existe normalement une réactivité croisée avec les protéines murines mais il est probable que la reconnaissance soit moins importante, ce qui pourrait contribuer à expliquer les difficultés rencontrées. Nous avons validé l'approche, et les résultats obtenus sont encourageants, mais à ce stade, et pour poursuivre l'étude chez la souris (en particulier sur les biopsies musculaires, qui représentent un matériel extrêmement complexe), il nous faudrait développer une puce dédiée au modèle murin, en sélectionnant des anticorps adaptés.

Le modèle de la souris *mdx* ne semble donc pas le plus adapté aux objectifs de ce travail. Le caractère limité des lésions provoquées par l'absence de dystrophine complique l'étude de l'implication des dérèglements des voies de signalisation rapportées dans la pathogénie (et l'extrapolation des résultats obtenus à l'homme). D'autres modèles murins de la DMD existent, notamment celui de la souris *mdx/utrn*$^{-/-}$ qui, suite à une déficience combinée en dystrophine et en utrophine, développe un phénotype sévère, plus proche de celui des muscles DMD. Elle serait certainement plus adaptée à notre étude que la souris *mdx* mais nous avons dans un second temps décidé de poursuivre nos travaux sur le modèle du chien GRMD.

2. Statut des voies de signalisation chez le chien GRMD

Le chien GRMD représente le seul modèle animal reproduisant de façon fidèle le phénotype développé par les patients DMD et nous avons décidé de nous en servir pour caractériser les dérèglements touchant les voies de signalisation cellulaire dans le muscle dystrophique, et pour tenter de définir, le cas échéant, leur implication dans la pathogénie.

2.1. Étude globale à l'aide des puces à anticorps

2.1.1. Puce à anticorps MAGY array

Suite aux difficultés rencontrées chez la souris *mdx* avec la technologie des puces à anticorps, les études ont été poursuivies chez le chien GRMD. Nous avons développé, en collaboration avec la société ProtNeteomix, une nouvelle puce à anticorps dédiée DMD, cycle cellulaire, cytosquelette et signalisation, afin d'étudier de façon globale le profil d'expression protéique des muscles canins, sain et dystrophique.

2.1.1.1. Analyse sur extrait total

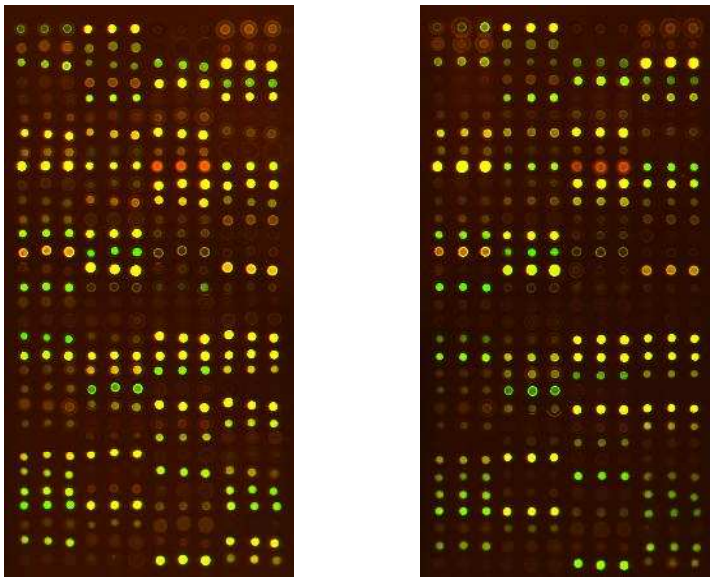
Les puces MAGY array ont dans un premier temps été testées sur les protéines totales extraites du muscle de chiens sain et GRMD âgés de 5 mois. Les résultats obtenus à l'issu du marquage sont indiqués Tableau 1.

Tableau 1 Marquage des protéines totales extraites du muscle de chiens sain et GRMD

	sain AF	GRMD AF	sain IRD	GRMD IRD
Concentration (mg/mL)	1,41	1,07	0,87	0,8
Nb fluorophores/molécule	1,39	1,37	1,44	1,25

Les protéines ont été extraites du *Triceps Brachial* de chiens sain et GRMD âgés de 5 mois. 100 µg de protéines ont été marqués à l'AlexaFluor®680 (AF) et 100 µg, à l'IRD800 (IRD). Le tableau présente la concentration protéique obtenue à l'issu du marquage, ainsi que le nombre moyen de fluorophores incorporés par molécule.

Le nombre moyen de fluorophores incorporés par molécule est inférieur à 2 mais il est relativement proche pour les quatre échantillons et nous décidons donc de valider le marquage, mais d'augmenter la quantité de protéines utilisée pour l'incubation avec les puces, ainsi que la durée de cette dernière. La lame 1 est incubée avec 10 µg/mL de protéines totales extraites du muscle de chien sain marquées à l'AlexaFluor®680 et 10 µg/mL de protéines totales extraites du muscle de chien GRMD marquées à l'IRD800, et inversement pour la lame 2 (pendant 1h30). Les images obtenues à l'issu de l'incubation et des différentes étapes de lavage sont présentées Figure 7.



Lame 1 : sain AF680 / GRMD IRD800 Lame 2 : sain IRD800 / GRMD AF680

Figure 7 Puce MAGY array sur extrait total. La lame 1 a été incubée avec l'extrait sain marquée à l'AlexaFluor®680 et l'extrait GRMD marqué à l'IRD800, et inversement pour la lame 2.

La plupart des spots sont visibles et le rapport signal/bruit de fond est élevé. Une analyse ANOVA à 90% de confiance révèle que 62 valeurs sont analysables, dont 7 sont significativement augmentées dans le muscle GRMD. Il s'agit des spots correspondant à l'actine du muscle lisse, à CDC25A, Cdk5, Cdk7, la cycline E, FAK et la kératine 20 (les expériences avec les puces MAGY array n'ayant été effectuée qu'une seule fois, nous avons choisi de ne pas effectuer d'analyse quantitative des résultats).

2.1.1.2. Analyse sur la fraction nucléaire

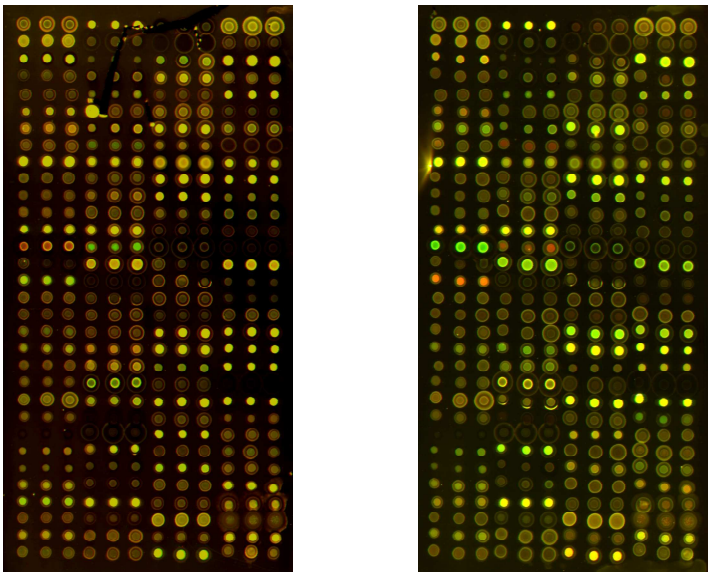
Nous avons ensuite cherché à améliorer les résultats obtenus avec les extraits totaux en recourant à du fractionnement subcellulaire. Les protéines nucléaires ont été extraites du muscle de chiens sain et GRMD, et marquées par les fluorophores (Tableau 2).

Tableau 2 Marquage des protéines nucléaires extraites du muscle de chiens sain et GRMD

	sain AF	GRMD AF	sain IRD	GRMD IRD
Concentration (mg/mL)	1,26	1,1	1,26	1,05
Nb fluorophores/molécule	1,09	1,44	0,96	1,07

Les protéines nucléaires ont été extraites du *Triceps Brachial* de chiens sain et GRMD âgés de 5 mois, et marquées avec les fluorophores. Pour plus de détails, voir Tableau 2.

Nous avons là encore obtenu un marquage faible mais relativement homogène et nous avons décidé de conduire l'expérience dans les mêmes conditions qu'avec les extraits totaux. Les résultats obtenus sont présentés Figure 8.



Lame 1 : sain AF680 / GRMD IRD800 Lame 2 : sain IRD800 / GRMD AF680

Figure 8 Puce MAGY array sur la fraction nucléaire. La lame 1 a été incubée avec l'extrait sain marqué à l'AlexaFluor®680 et l'extrait GRMD marqué à l'IRD800, et inversement pour la lame 2.

Comme avec les extraits totaux, les images présentent un bon rapport signal/bruit de fond. Une analyse ANOVA à 90% de confiance révèle que 68 valeurs sont analysables, dont 25 sont significativement différentes entre les muscles sain et GRMD. 14 protéines sont augmentées dans l'extrait nucléaire du muscle GRMD (actine β, actinine α, CDC25B, Cdk6, cycline B1, E2F-4, EGFR, intégrine-β4, p16 INK4a, p27KIP1, phospho-Raf, STAT3, phospho-p70 et vinculine) et 11 apparaissent diminuées (cycline D1, cycline D2, phospho-ERK1/2, filamine, jun, kératine 14, kératine 15, MEK1, mucine2, mucine3 et p19INK4d). Nous voyons par ailleurs que le niveau de p70S6K (protéines totales) semble identique entre les deux conditions.

Le travail sur la fraction nucléaire permet donc de mettre en évidence dans le muscle GRMD des variations qui n'étaient pas détectées dans l'extrait total. Globalement, ces deux expériences soulignent l'atteinte du cycle cellulaire (modulations de plusieurs protéines de type CDC, Cdk et cyclines, et de E2F-4, p16 INK4a et p27KIP1), et la modulation du cytosquelette (variations dans le niveau d'expression de l'actinine α, de la filamine, de certaines kératines et de la vinculine).

En ce qui concerne les voies de signalisation, la puce révèle une augmentation du niveau d'expression de FAK dans le muscle GRMD (un défaut de phosphorylation avait été observé dans les biopsies de patients DMD), ainsi que de celui de STAT3. De façon intéressante, elle révèle aussi une augmentation du niveau de phosphorylation de Raf (Ser338) et de p70S6K (Thr421/Ser424), et une diminution du niveau de phosphorylation de ERK1/2 (Thr202/Tyr204) dans la fraction nucléaire du muscle GRMD. Le défaut de phosphorylation de ERK1/2 a été validé en Western Blot (Figure 9).

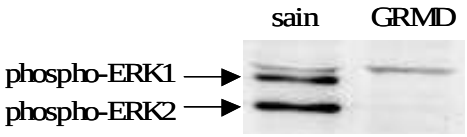


Figure 9 Niveau de phosphorylation de ERK1/2 dans la fraction nucléaire du muscle de chiens sain et GRMD. La fraction nucléaire a été extraite du muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois, migrée sur gel SDS-PAGE et incubée avec un anticorps anti-phospho-ERK1/2 puis avec un anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®680.

L'amélioration de la lyse des échantillons, ainsi que le travail sur la fraction nucléaire nous ont donc permis d'obtenir des images présentant un bruit de fond faible et de nombreux signaux analysables. De plus, la révélation d'une diminution du niveau de phosphorylation des kinases ERK1/2 dans le muscle GRMD (et sa confirmation en Western Blot) suggèrent

que les puces MAGY array peuvent être utilisées pour comparer, non seulement le niveau d'expression, mais également le niveau de phosphorylation des protéines. Un développement, portant notamment sur le choix des anticorps, est encore nécessaire avant de pouvoir utiliser les puces à anticorps MAGY array pour comparer de façon globale le profil d'expression protéique des muscles canins sain et dystrophique, mais les premières expériences sont encourageantes. Les résultats concernant d'éventuelles modulations des protéines des voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle GRMD étant cependant limités, nous avons ensuite cherché à développer des approches plus ciblées.

2.1.2. Puce à anticorps dédiée aux voies MAPK et PI3K/Akt

Nous avons testé une puce à anticorps dédiée aux voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt et permettant d'étudier, en une seule expérience, le niveau relatif de phosphorylation de 19 Ser/Thr kinases (R&D Systems) sur les protéines totales extraites du muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois (Figure 10).

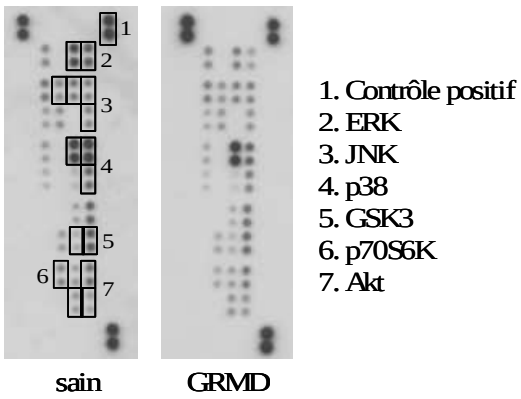


Figure 10 Les puces phospho-MAPK ont été testées sur le muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois. 1. Contrôle positif ; 2. ERK1 (à droite) et ERK2 (à gauche) ; 3. JNK pan (en bas à droite), JNK1 (en haut à droite), JNK2 (en haut au milieu) et JNK3 (en haut à gauche) ; 4. p38α (en haut à gauche), p38δ (en bas à droite) et p38γ (en haut à droite) ; 5. GSK3α/β (à droite) et GSK3β (à gauche) ; 6. p70S6K et 7. Akt pan (en bas à gauche), Akt1 (en haut à droite) et Akt2 (en bas à droite).

Pour chaque spot (et après soustraction du bruit de fond), un ratio de l'intensité du signal GRMD/sain a été calculé, puis transformé en log base 2. Une analyse ANOVA à 95% de confiance nous a alors permis de déterminer les valeurs significativement différentes dans le muscle GRMD (Figure 11).

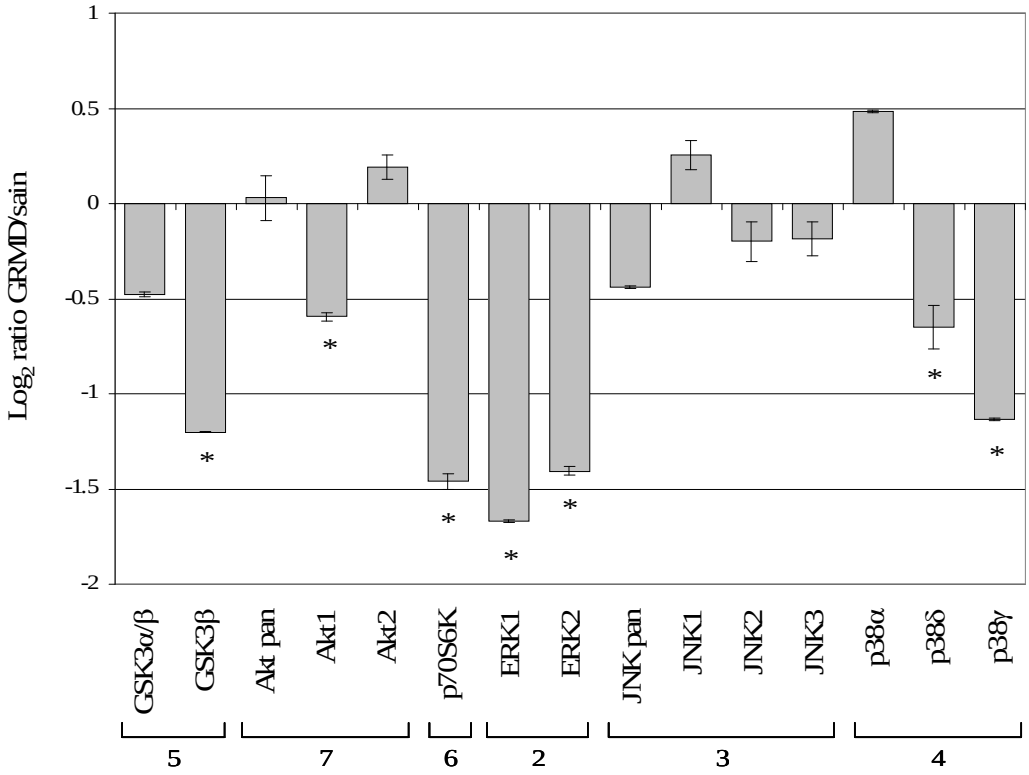


Figure 11 Profil de phosphorylation des kinases des voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois. Le graphe représente le $\log_2$ du ratio de l'intensité du signal GRMD/sain. * Statistiquement différent dans le muscle GRMD ($p<0,05$). Les numéros renvoient à la Figure 10.

Parmi les 15 spots qui ont pu être analysés statistiquement, 7 correspondent à des kinases qui présentent un niveau de phosphorylation réduit dans le muscle GRMD, révélant une modulation globale des voies MAPK et PI3K/Akt. Akt1 présente un défaut de phosphorylation dans le muscle GRMD, qui semble se répercuter sur les deux branches de la voie, puisque le niveau de phosphorylation de GSK3β et p70S6K est également réduit. Par ailleurs, ERK1, ERK2, p38δ et p38γ présentent toutes un défaut de phosphorylation dans le muscle GRMD, mettant en évidence une atteinte des voies ERK et p38/MAPK. Aucune variation significative n'est par contre observée dans le niveau de phosphorylation de JNK.

L'utilisation de cette puce à anticorps nous a donc permis de montrer, en une seule expérience, que trois voies de signalisation majeures, à savoir les voies PI3K/Akt et ERK et p38/MAPK, étaient modulées dans le muscle GRMD, plusieurs protéines clés de ces voies présentant un défaut de phosphorylation.

2.2. Étude des kinases ERK1/2

L'analyse sur puce a révélé, nous venons de le voir, un défaut de phosphorylation très marqué des kinases ERK1 et ERK2 dans le muscle GRMD. Nous avons voulu confirmer ces résultats

en Western Blot, tout en analysant en parallèle le niveau d'expression des kinases. Afin de voir si les dérégulations observées étaient spécifiques d'un muscle donné ou si elles étaient retrouvées de façon plus globale, trois muscles ont été analysés (Figure 12).

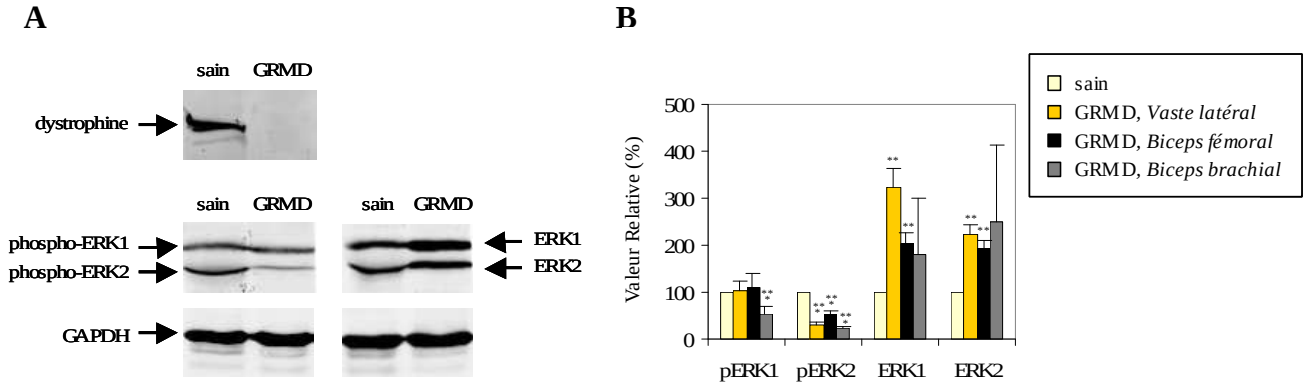


Figure 12 Niveau d'expression et de phosphorylation de ERK1/2 dans les muscles de chiens sains et GRMD. Les niveaux d'expression et de phosphorylation de ERK1 et ERK2 ont été étudiés en Western Blot dans les muscles *Vaste latéral*, *Biceps fémoral* et *Biceps brachial* prélevés sur des chiens sains et GRMD âgés de 4 mois. **A.** Exemple de Western Blot (un exemple de résultats obtenus avec l'anticorps anti-dystrophine est également montré). **B.** Résultats quantifiés. Le niveau dans le muscle sain a été arbitrairement fixé à 100% et le niveau dans le muscle GRMD correspondant est exprimé sous forme de pourcentage relatif. * Statistiquement différent dans le muscle GRMD (* $p<0,05$; ** $p<0,02$ et *** $p<0,002$).

Le niveau d'expression de ERK1 et ERK2 apparaît augmenté chez le chien GRMD et ce, dans les trois muscles testés. Nous confirmons par ailleurs le défaut de phosphorylation de ERK1 et ERK2 révélé en puce dans le *Biceps brachial*. Aucune variation du niveau de phosphorylation de ERK1 n'est détectée dans les deux autres muscles mais le niveau de phosphorylation de ERK2 apparaît quant à lui systématiquement réduit.

L'augmentation du niveau d'expression des kinases ERK1/2 révélée chez le chien GRMD est à rapprocher de ce qui avait déjà été observé chez la souris *mdx*, dans le TA comme dans le diaphragme. Parallèlement, le défaut de phosphorylation détecté rappelle aussi celui observé chez la souris, dans le TA à 12 mois et dans le diaphragme dès 4 mois. La phosphorylation réduite de ERK1/2, qui semblait dépendre du phénotype nécrotique du muscle chez la souris *mdx*, se retrouve donc dans les muscles GRMD. Ce défaut de phosphorylation semble de plus, dans deux des trois muscles testés, toucher préférentiellement l'isoforme ERK2. Étant donné le rôle joué par ERK dans la régulation de la prolifération et de l'hypertrophie musculaire (Haddad&Adams, 2004), nous pensons que ce défaut de phosphorylation pourrait limiter les phénomènes de régénération et d'hypertrophie musculaires qui pourraient éventuellement prendre place.

2.3. Étude détaillée de la voie PI3K/Akt

La puce à anticorps a par ailleurs révélé une atteinte importante de la voie PI3K/Akt dans le muscle GRMD et, étant donné son rôle dans la régulation de la masse musculaire (Glass, 2005a, Favier *et al.*, 2008), nous avons décidé d'approfondir son étude.

2.3.1. Expression, phosphorylation et activité d'Akt

Afin de voir dans un premier temps si le défaut de phosphorylation d'Akt1 détecté sur puce dans le muscle GRMD était associé à une perturbation du niveau d'expression de la kinase, des expériences de Western Blot ont été réalisées (Figure 13).

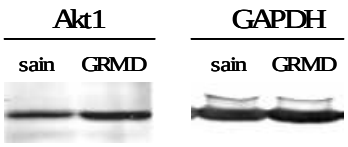


Figure 13 Niveau d'expression d'Akt1 dans le muscle de chiens sain et GRMD. Le niveau d'expression d'Akt1 a été étudié en Western Blot dans le muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois.

Le niveau d'expression d'Akt1 apparaît perturbé dans le muscle GRMD, puisqu'une augmentation des protéines totales est visible en Western Blot. Comme nous l'avons déjà souligné, le muscle, notamment celui des chiens GRMD, est un tissu complexe, dans lequel les fibres musculaires côtoient vaisseaux sanguins, tissu conjonctif et cellules immunitaires. Il nous est apparu important de compléter les études globales par des études d'immunohistochimie, afin de voir quels types de cellules étaient concernés par les variations détectées. Un immunomarquage avec un anticorps anti-Akt1 a été réalisé sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD (Figure 14).

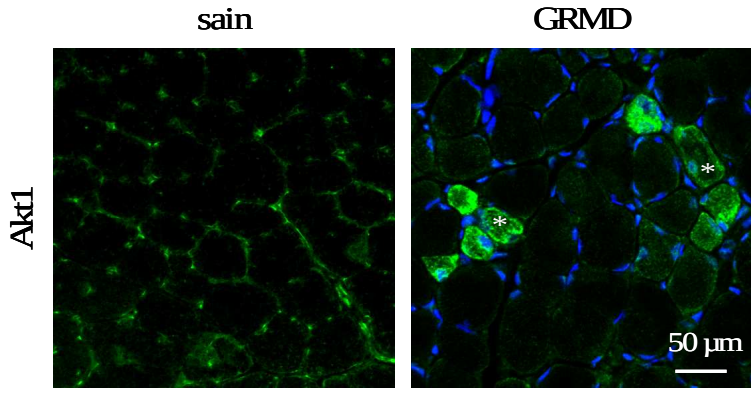


Figure 14 Immunohistochimie avec un anticorps anti-Akt1 sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD. Des coupes de muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois ont été incubées avec un anticorps anti-Akt1 puis avec un anticorps anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®688. Astérisque : cluster de fibres GRMD présentant une accumulation cytosolique d'Akt1.

Alors que les fibres saines présentent un marquage faible au niveau membranaire et nucléaire, un petit nombre de fibres GRMD, souvent organisées en cluster (astérisque), présentent une accumulation cytosolique extrêmement importante de la kinase, le reste des fibres ne présentant pas de dérégulations particulières. L'augmentation globale du niveau d'Akt1 détectée en Western Blot dans le muscle GRMD correspond donc en réalité à une forte accumulation de la kinase dans un nombre réduit de fibres.

Dans un second temps, afin de confirmer le défaut de phosphorylation d'Akt1 dans le muscle GRMD, et afin de voir comment cela se répercutait au niveau des différents compartiments cellulaires, des fractions subcellulaires ont été préparées à partir de muscles de chiens sain et GRMD, et analysées en Western Blot (Figure 15). La pureté des fractions a été vérifiée à l'aide d'anticorps anti-LDHA (marqueur cytosolique), anti-cavéoline-3 (marqueur membranaire) et anti-histone 2A (marqueur nucléaire).

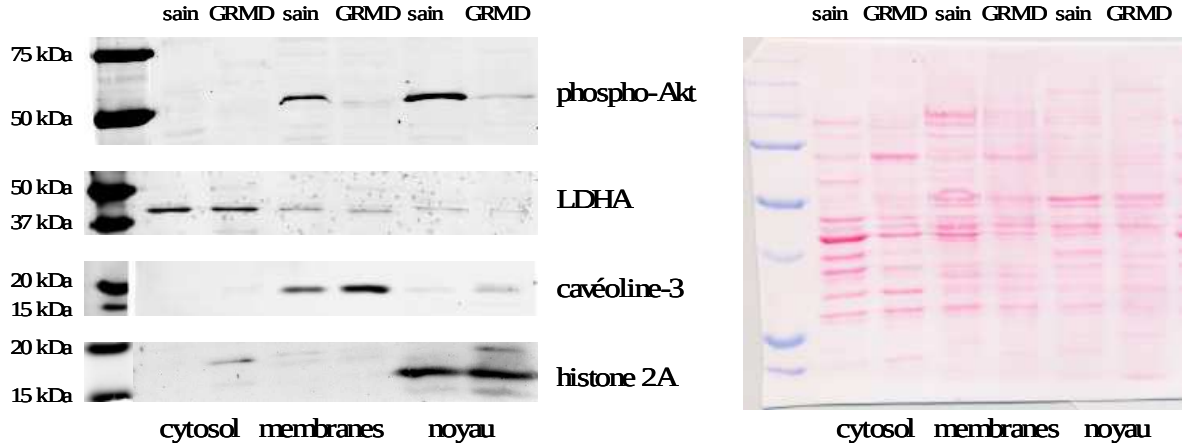


Figure 15 Analyse par Western Blot de la phosphorylation d'Akt dans les fractions subcellulaires du muscle de chiens sain et GRMD. Les protéines cytosoliques, membranaires et nucléaires du muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois ont été analysées par Western Blot avec un anticorps anti-phospho-Akt. La pureté des fractions a été vérifiée à l'aide des anticorps suivants : LDHA pour le cytosol, cavéoline-3 pour les membranes, et histone 2A pour le noyau. Le rouge Ponceau est également montré.

Le défaut de phosphorylation détecté en puce est confirmé par les expériences de Western Blot. Alors que dans le muscle sain, phospho-Akt est clairement visible dans les fractions membranaire et nucléaire, une réduction dramatique est observée dans ces deux compartiments pour le muscle GRMD (phospho-Akt n'est pas détectée dans le cytosol, que ce soit dans le muscle sain ou dans le muscle GRMD). Nous avons ensuite souhaité compléter ces résultats par des expériences d'immunohistochimie (Figure 16).

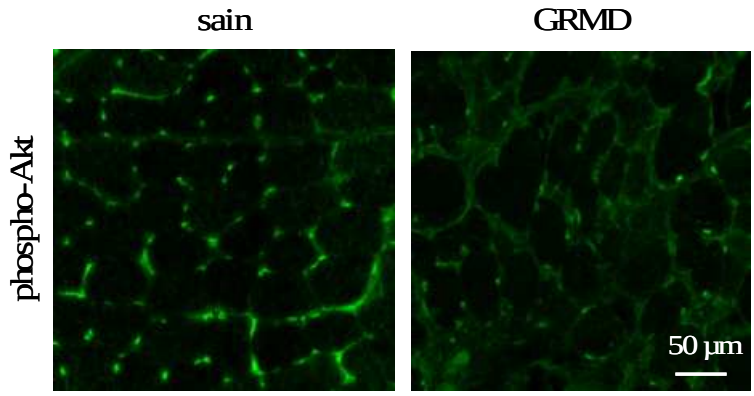


Figure 16 Immunohistochimie avec un anticorps anti-phospho-Akt (Ser473) sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD. Des coupes de muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois ont été incubées avec un anticorps anti-phospho-Akt (Ser473) puis avec un anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®688.

Alors que les fibres saines présentent de forts niveaux de phospho-Akt au niveau de la membrane plasmique et du noyau, les fibres dystrophiques présentent un marquage beaucoup moins intense. L'immunohistochimie permet donc de confirmer les résultats obtenus en puce et en Western Blot, à savoir que la phosphorylation d'Akt est fortement réduite dans le muscle GRMD.

La phosphorylation d'Akt sur les résidus Ser473 et Thr308 conduit à son activation et le défaut de phosphorylation détecté dans le muscle GRMD suggère fortement une réduction de son activité enzymatique. Afin de le vérifier, la kinase a été immunoprécipitée à partir d'extraits de muscles de chiens sain et GRMD et son activité a été testée (Figure 17).

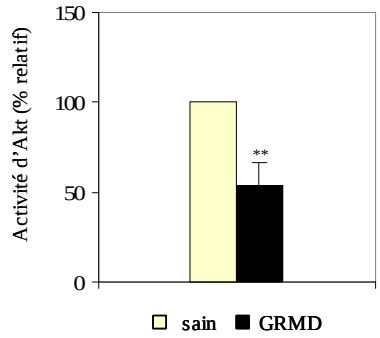


Figure 17 Activité relative d'Akt dans le muscle de chiens sain et GRMD. Akt a été immunoprécipitée à partir d'extraits de muscles de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois et son activité enzymatique a été testée. La valeur dans le muscle sain a été arbitrairement fixée à 100% et la valeur dans le muscle GRMD est exprimée sous forme de pourcentage relatif. ** Statistiquement différent dans le muscle GRMD ($p<0,02$).

Le test d'activité confirme notre hypothèse et révèle qu'Akt est presque deux fois moins active dans le muscle GRMD que dans le muscle sain.

Nous avons donc montré que le niveau d'expression d'Akt1 était augmenté dans le muscle GRMD, et nous avons mis en évidence un défaut de phosphorylation associé à une réduction importante de l'activité kinase.

2.3.2. Expression, phosphorylation et activité de GSK3β

Afin de confirmer le défaut de phosphorylation de GSK3β révélé en puce dans le muscle GRMD, et afin d'appréhender la variabilité inter-muscles, des expériences de Western Blot ont été conduites sur trois muscles différents (Figure 18).

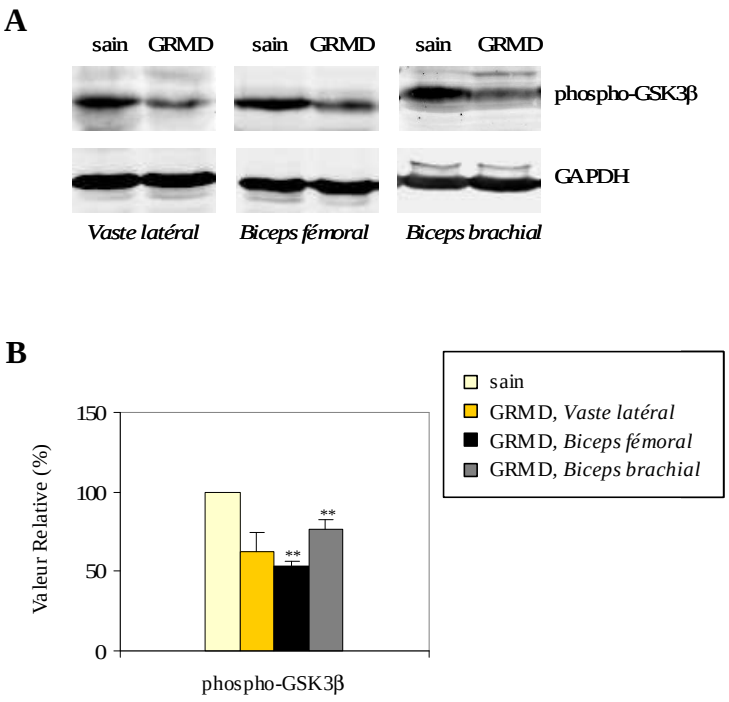


Figure 18 Niveau de phosphorylation de GSK3β (Ser9) dans les muscles sains et GRMD. **A.** Le niveau de phosphorylation de GSK3β (Ser9) a été étudié par Western Blot dans les muscles *Vaste latéral*, *Biceps fémoral* et *Biceps brachial* de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois. **B.** Résultats quantifiés. ** Statistiquement différent dans le muscle GRMD ($p<0,02$). Pour plus de détails, voir Figure 12.

Nous confirmons, chez le chien GRMD, le défaut de phosphorylation de GSK3β dans le *Biceps brachial* et nous observons que ce défaut est retrouvé dans le *Vaste latéral* et le *Biceps fémoral*. Les trois muscles ne seront pas forcément utilisés pour chaque expérience mais ce premier résultat permet de voir que les dérégulations observées ne semblent pas spécifiques d'un muscle.

Dans un second temps, afin de déterminer si la réduction de phospho-GSK3β détectée dans le muscle GRMD était associée à une augmentation de la forme non phosphorylée et active de la kinase, nous avons étudié son expression en Western Blot. Le niveau de GSK3β a

été comparé dans les extraits protéiques totaux et les fractions subcellulaires préparés à partir de muscles de chiens sains et GRMD (Figure 19).

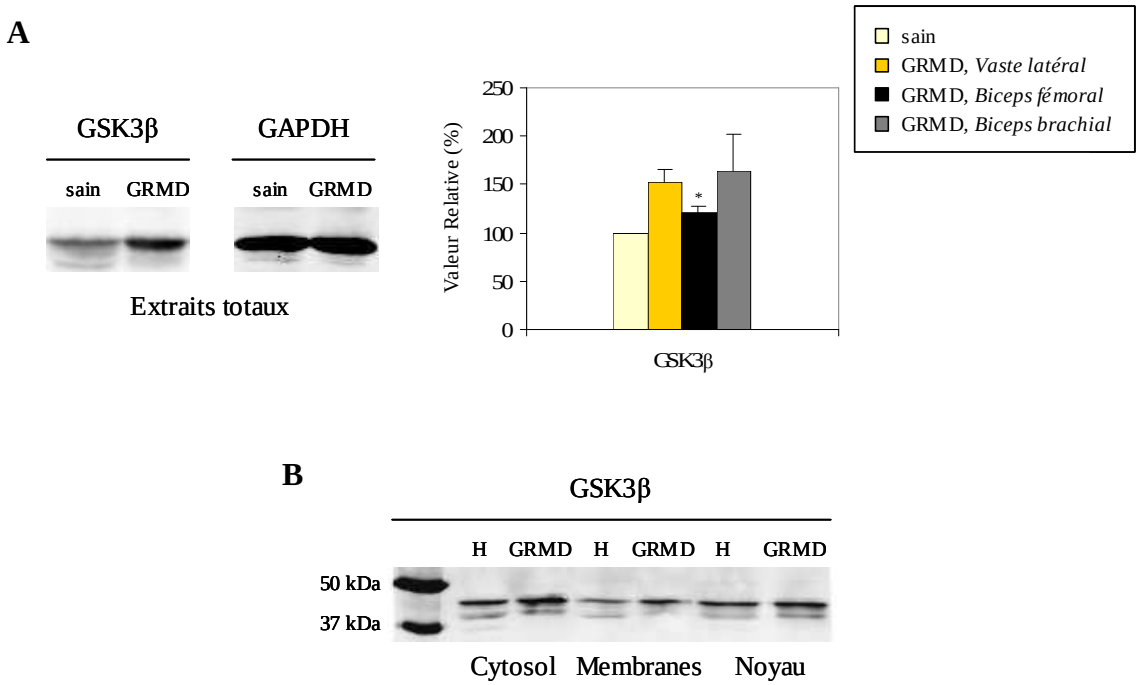


Figure 19 Niveau d'expression de GSK3β dans les extraits totaux et les fractions subcellulaires préparés à partir de muscles de chiens sain et GRMD. **A.** Le niveau d'expression de GSK3β a été étudié en Western Blot dans les extraits totaux préparés à partir des muscles *Vaste latéral*, *Biceps fémoral* et *Biceps brachial* prélevés sur des chiens sains et GRMD âgés de 4 mois. * Statistiquement différent dans le muscle GRMD ($p<0,05$). Pour plus de détails, voir Figure 12. **B.** Le niveau d'expression de la kinase a également été étudié en Western Blot dans les fractions subcellulaires préparées à partir du *Vaste latéral* de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois.

La synthèse de GSK3β est augmentée chez le chien GRMD (là-encore, pour les trois muscles testés), révélant une augmentation encore plus importante de la forme active de la kinase. Les expériences de Western Blot réalisées sur les fractions subcellulaires confirment la sur-expression de GSK3β dans le muscle GRMD mais ne révèlent aucune délocalisation particulière. Dans le muscle sain comme dans le muscle GRMD, GSK3β est présente dans les fractions cytosolique, membranaire et nucléaire, et l'accumulation dans le muscle GRMD est visible dans chacun de ces trois compartiments. Nous avons tout de même décidé de compléter cette étude par des expériences d'immunohistochimie (Figure 20).

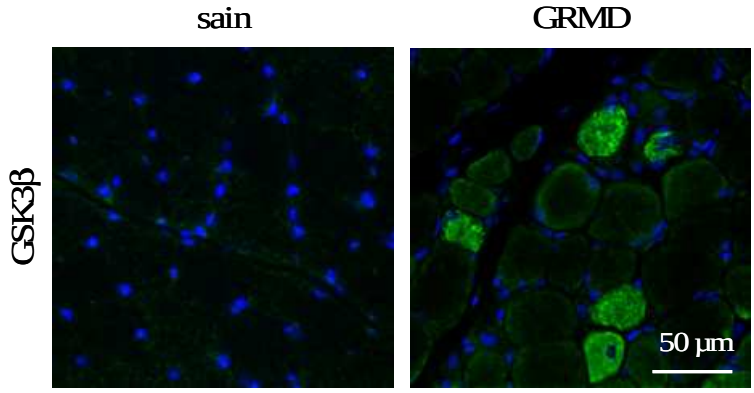


Figure 20 Immunohistochimie avec un anticorps anti-GSK3β sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD. Des coupes de muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois ont été incubées avec un anticorps anti-GSK3β puis avec un anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®688.

Ces expériences confirment l'augmentation de GSK3β dans le muscle GRMD mais surtout, comme cela était déjà le cas pour Akt1, elles révèlent que l'accumulation (cytosolique) de la kinase concerne seulement un petit nombre de fibres dystrophiques, l'intensité extrêmement importante du marquage dans ces fibres pouvant toutefois expliquer l'augmentation globale détectée en Western Blot.

L'augmentation de la synthèse et la diminution de la phosphorylation de GSK3β détectée dans le muscle GRMD suggèrent fortement une augmentation de son activité enzymatique et, afin de le vérifier, la kinase a été immunoprécipitée à partir d'extraits de muscles sain et GRMD et son activité a été testée (Figure 21).

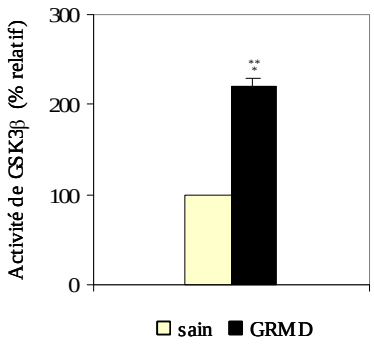


Figure 21 Activité relative de GSK3β dans le muscle de chiens sain et GRMD. GSK3β a été immunoprécipitée à partir d'extraits de muscles de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois et son activité enzymatique a été testée. *** Statistiquement différent dans le muscle GRMD ($p<0,002$). Pour plus de détails, voir Figure 17.

Ce test confirme notre hypothèse puisqu'il démontre que l'activité de GSK3β est plus que doublée dans le muscle GRMD.

Afin de nous assurer que l'accumulation de GSK3β ne concernait pas uniquement des fibres pré-nécrotiques ou nécrotiques, un immunomarquage avec un anticorps anti-GSK3β, un marquage au rouge Alizarine et un marquage H&E ont été réalisés sur des coupes sériées de muscle GRMD. Le rouge Alizarine est un colorant qui marque les dépôts calciques et qui permet de repérer les fibres pré-nécrotiques et nécrotiques présentant typiquement une perte d'intégrité du sarcolemme et une accumulation de calcium. Les résultats obtenus sont présentés Figure 22.

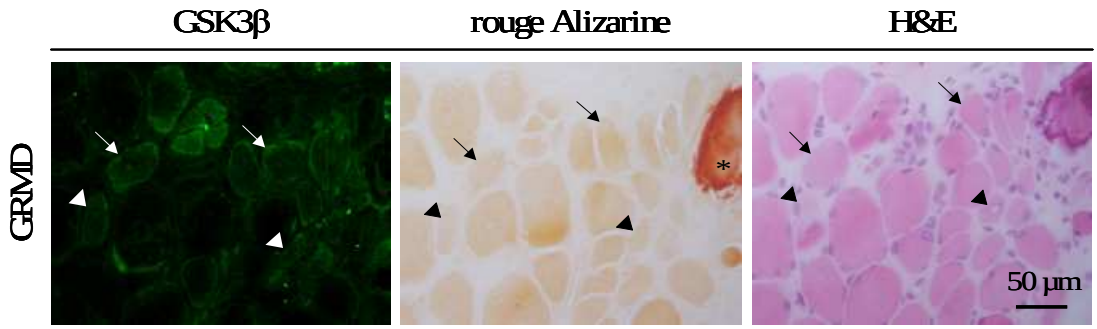


Figure 22 Immunohistochimie avec un anticorps anti-GSK3β, marquage au rouge Alizarine et marquage H&E sur des coupes sériées de muscle GRMD. Des coupes sériées, réalisées sur le muscle d'un chien GRMD âgé de 4 mois, ont été incubées avec un anticorps anti-GSK3β puis avec un anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®688, marquée au rouge Alizarine et marquée à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). Flèches et têtes de flèches : fibres présentant une accumulation cytosolique importante de GSK3β. Astérisque : fibres pré-nécrotiques ou nécrotiques.

Les fibres GSK3β-positives (flèches et têtes de flèche) ne correspondent pas à des fibres pré-nécrotiques ou nécrotiques (astérisque). De plus, le marquage H&E révèle que certaines fibres GSK3β-positives présentent une localisation centrale des noyaux (têtes de flèches), indiquant que la sur-expression de GSK3β concerne des fibres mâtures aussi bien que de jeunes myotubes.

Nous avons donc détecté dans le muscle GRMD un défaut de phosphorylation de GSK3β, accompagné d'une sur-expression de la kinase et d'une augmentation importante de son activité enzymatique.

2.3.3. Expression et phosphorylation de p70S6K

L'étude sur puce a également révélé un défaut de phosphorylation de p70S6K dans le muscle GRMD et nous avons voulu confirmer ces résultats en Western Blot, tout en voyant si cela était associé à un changement du niveau d'expression de la kinase (Figure 23).

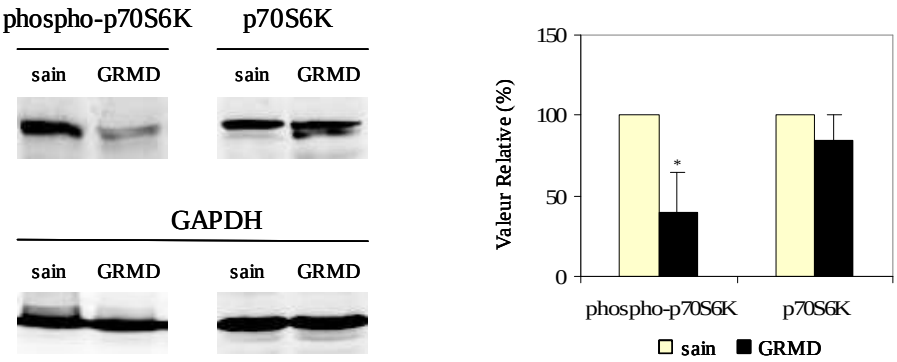


Figure 23 Niveau de phosphorylation et niveau d'expression de p70S6K dans le muscle de chiens sain et GRMD. **A.** Le niveau de phosphorylation et le niveau d'expression de p70S6K ont été étudiés par Western Blot dans le muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois. **B.** Résultats quantifiés. * Statistiquement différent dans le muscle GRMD ($p<0,05$). Pour plus de détails, voir Figure 12.

Ces expériences confirment que la phosphorylation de p70S6K est fortement réduite dans le muscle GRMD et elles révèlent par ailleurs que ce défaut de phosphorylation n'est associé à aucun changement dans le niveau d'expression de la kinase. Un immunomarquage de phospho-p70S6K a ensuite été réalisé sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD (Figure 24).

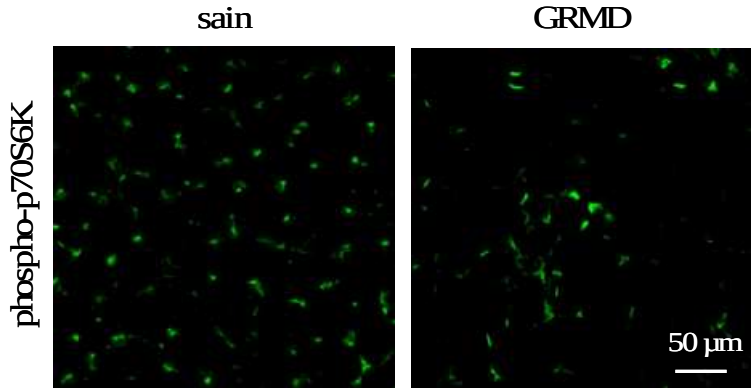


Figure 24 Immunohistochimie avec un anticorps anti-phospho-p70S6K (Thr389) sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD. Des coupes de muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois ont été incubées avec un anticorps anti-phospho-p70S6K (Thr389) puis avec un anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®688.

Ces expériences révèlent que la forme phosphorylée de p70S6K est présente dans presque tous les noyaux des fibres du muscle sain alors que dans le muscle GRMD, sa présence est limitée à quelques fibres (toujours en localisation nucléaire).

Nous avons donc pu confirmer le défaut de phosphorylation de p70S6K détecté sur puce et nous avons montré que cela n'était associé à aucun changement dans le niveau d'expression de la kinase.

2.3.4. Étude des marqueurs de l'atrophie musculaire

Nous avons pensé que la faible translocation de phospho-Akt dans le noyau des fibres du muscle GRMD pourrait conduire à une activation des facteurs de transcription de type Foxo, et par conséquent induire l'expression de MAFbx et MuRF1, et ainsi stimuler la dégradation protéique. Le niveau d'expression des deux protéines a été étudié en Western Blot dans les muscles sain et GRMD (Figure 25).

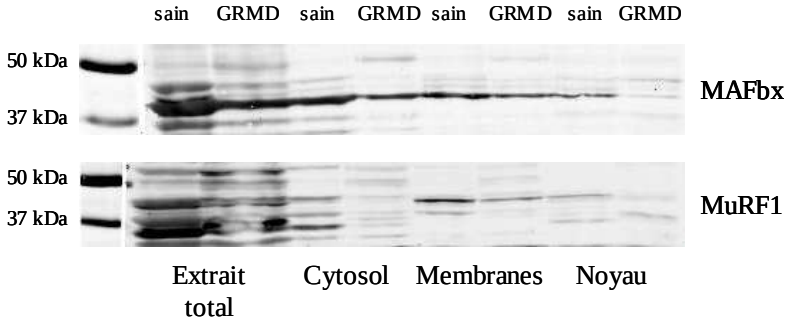


Figure 25 Niveau d'expression de MAFbx et MuRF1 dans les extraits totaux et les fractions subcellulaires de muscles de chiens sain et GRMD. Les protéines totales, cytosoliques, membranaires et nucléaires extraites de muscles de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois ont été analysées en Western Blot avec des anticorps anti-MAFbx et anti-MuRF1.

Contrairement à ce que nous aurions pu attendre, la quantité de MAFbx et MuRF1 est réduite dans le muscle GRMD, dans l'extrait total, comme dans les trois compartiments subcellulaires. L'activité réduite d'Akt dans le muscle GRMD n'entraîne donc pas d'augmentation des marqueurs de l'atrophie musculaire.

2.3.5. Étude des kinases et phosphatases régulant Akt

Afin de tenter de comprendre les mécanismes affectant la phosphorylation et la localisation subcellulaire d'Akt dans le muscle GRMD, trois enzymes intervenant dans sa régulation ont été analysées : la kinase PDK1 et les deux phosphatases PP2A et PTEN. Les mécanismes d'activation et d'inactivation d'Akt, décrits en détail dans l'Introduction bibliographique, sont résumés Schéma 1.

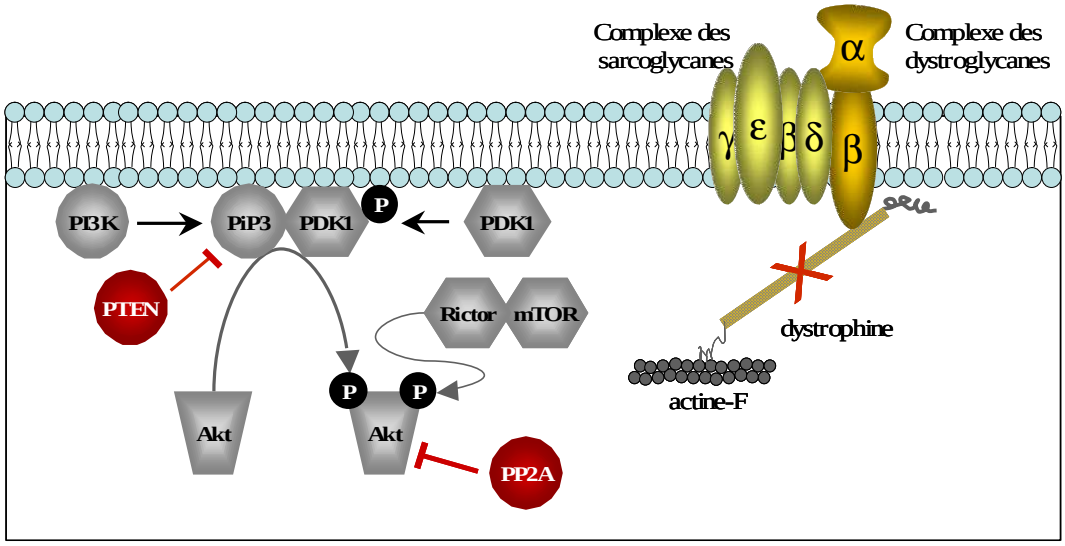


Schéma 1 Enzymes intervenant dans la régulation d'Akt. La kinase PI3K génère, en phosphorylant le $PtdInsP_2$, du $PtdInsP_3$. Akt est recrutée par le $PtdInsP_3$ à la membrane plasmique, où elle est phosphorylée par PDK1 sur la Thr308. Pour être entièrement activée, Akt doit ensuite être phosphorylée sur la Ser473, et cela est réalisé par le complexe Rictor/mTOR. PTEN s'oppose à l'action de la PI3K, et donc à l'activation d'Akt, en déphosphorylant le $PtdInsP_3$. PP2A déphosphoryle quant à elle directement Akt.

Nous avons commencé par réaliser des expériences de Western Blot afin de comparer, dans les muscles sain et GRMD, le niveau de phospho-PDK1 (forme active de la kinase) et de PP2A et PTEN (Figure 26).

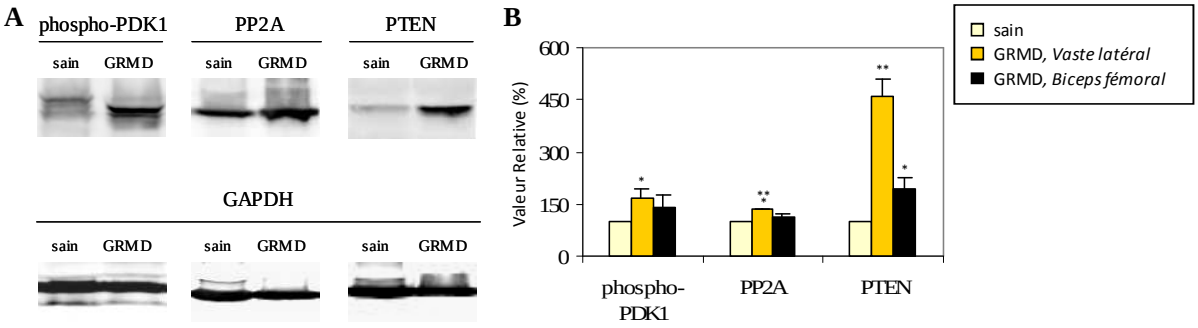


Figure 26 Niveau de phosphorylation de PDK1 (Ser241) et niveau d'expression de PP2A et PTEN dans le muscle de chiens sain et GRMD. **A.** Le niveau de phosphorylation de PDK1 (Ser241) et le niveau d'expression de PP2A et PTEN ont é té étudiés par Western Blot dans les muscles de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois. **B.** Résultats quantifiés. * Statistiquement différent dans le muscle GRMD (*p<0,05 ; **p<0,02 ; ***p<0,002). Pour plus de détails, voir Figure 12.

Le niveau de phosphorylation de PDK1 et le niveau d'expression de PP2A apparaissent légèrement augmentés dans le muscle GRMD. Ce qui est beaucoup plus frappant, c'est que le niveau d'expression de PTEN est quant à lui très fortement augmenté (ratio supérieur à 4).

2.3.5.1. PDK1

L'augmentation (même légère) du niveau de phospho-PDK1 détectée dans le muscle GRMD ne pouvant pas expliquer la réduction du niveau de phosphorylation d'Akt, les expériences sur la kinase n'ont pas été poussées plus avant.

2.3.5.2. PP2A

Afin de déterminer si l'augmentation du niveau d'expression de PP2A détectée dans le muscle GRMD était associée à une augmentation de son activité enzymatique, ce qui pourrait expliquer la diminution du niveau de phospho-Akt, la phosphatase a été immunoprécipitée à partir d'extraits du muscle de chiens sain et GRMD et son activité enzymatique a été testée (Figure 27).

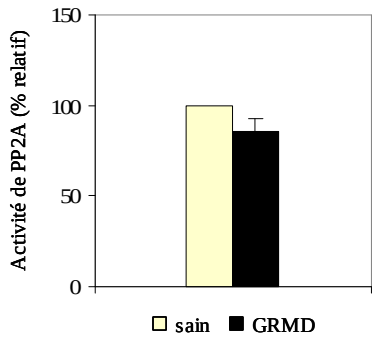


Figure 27 Activité relative de PP2A dans le muscle de chiens sain et GRMD. PP2A a été immunoprécipitée à partir d'extraits de muscles de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois. Pour plus de détails, voir Figure 17.

Aucune différence significative dans l'activité de PP2A n'est visible entre les muscles sain et GRMD, la phosphatase apparaissant même légèrement moins active dans ce dernier. PP2A ne semble donc pas non plus à l'origine de la dérégulation d'Akt.

2.3.5.3. PTEN

L'activité enzymatique de PTEN a été testée dans les extraits préparés à partir de muscles sain et GRMD (Figure 28).

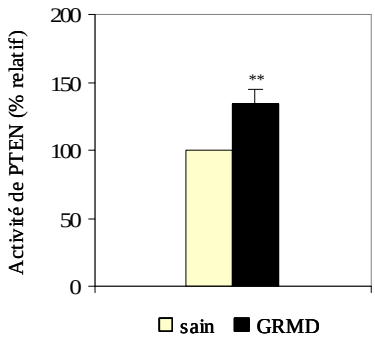


Figure 28 Activité relative de PTEN dans le muscle de chiens sain et GRMD. PTEN a été immunoprécipitée à partir d'extraits de muscles de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois et son activité a été testée. ** Statistiquement différent dans le muscle GRMD ($p<0,02$). Pour plus de détails, voir Figure 17.

Une augmentation significative de l'activité de PTEN est détectée dans le muscle GRMD, ce qui pourrait contribuer à expliquer le défaut de phosphorylation d'Akt. Nous nous sommes une fois de plus intéressés à la traduction au niveau histologique des variations observées au niveau global, et avons pour cela réalisé des expériences d'immunohistochimie (Figure 29).

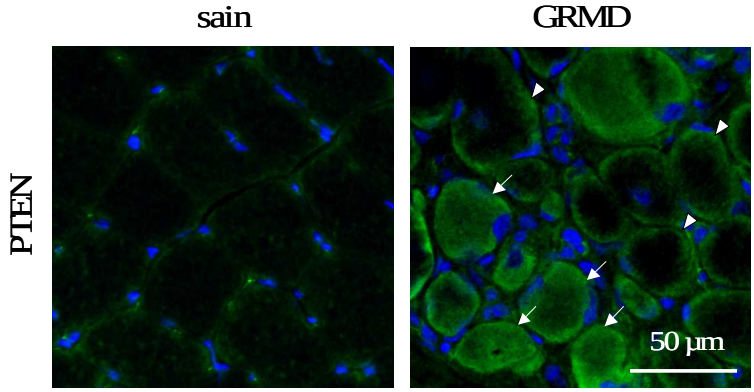


Figure 29 Immunohistochimie avec un anticorps anti-PTEN sur des coupes de muscle de chiens sain et GRMD. Des coupes de muscle de chiens sain et GRMD âgés de 4 mois ont été incubées avec un anticorps anti-PTEN puis avec un anticorps anti-mouse couplé à l'AlexaFluor®688. Têtes de flèches : fibres GRMD PTEN-positives présentant un marquage sous-sarcolemmal. Flèches : fibres GRMD PTEN-positives présentent un marquage plus intense et dispersé dans tout le cytosol.

Alors que les fibres du muscle sain présentent un marquage très faible, presque toutes les fibres du muscle GRMD sont PTEN-positives. Ces fibres présentent soit un marquage restreint au niveau sous-sarcolemmal (têtes de flèche), soit un marquage encore plus fort et dispersé dans tout le cytosol, évoquant une accumulation importante de la phosphatase (flèches).

Nous pensons que la sur-expression et l'augmentation de l'activité phosphatase de PTEN pourraient conduire à un niveau diminué de $PtdInsP_3$, limitant ainsi le recrutement d'Akt à la membrane plasmique et son activation.

2.3.6. Étude comparative à 3 stades de la pathologie

Afin de déterminer si la dérégulation de la voie PI3K/Akt était spécifique de l'âge de 4 mois, ou si elle pouvait être observée à différents stades de la pathologie, un marquage H&E et un immunomarquage de PTEN et GSK3β ont été réalisés sur des coupes sériées de muscle de chiens GRMD âgés de 3, 4 et 36 mois (Figure 30).

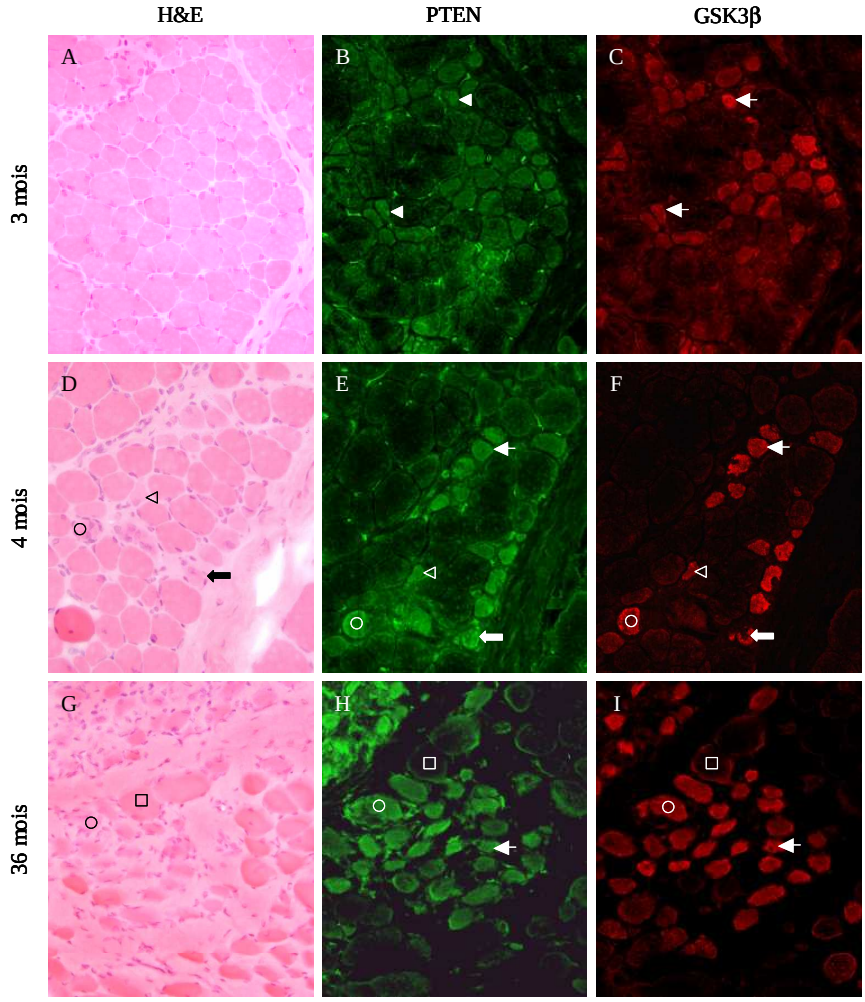


Figure 30 Marquage H&E et immunohistochimie avec des anticorps anti-PTEN et anti-GSK3β sur des coupes sériées de muscle de chiens GRMD âgés de 3, 4 et 36 mois. Des coupes sériées de muscle de chiens GRMD âgés de 3, 4 et 36 mois ont été marquées à l'H&E, immunomarquées avec un anticorps anti-PTEN et immunomarquées avec un anticorps anti-GSK3β. Tête de flèche : fibre PTEN-positive ; flèche : fibre PTEN/GSK3β-positive ; tête de flèche vide : petite fibre PTEN/GSK3β-positive ; flèche épaisse : fibre centronucléée ; rond : fibre nécrotique ; carré : fibre hypertrophiée PTEN/GSK3β-négative.

A 3 mois, alors que les signes de dystrophie musculaire sont encore très faibles, avec seulement une hétérogénéité du diamètre des fibres, quelques fibres centronucléées et des foyers locaux de cellules inflammatoires (A), un nombre important de fibres apparaissent déjà PTEN-positives (B, tête de flèche). Les fibres qui présentent une accumulation cytosolique importante de la phosphatase sont toutes GSK3β-positives (C, flèche), apportant la preuve

que la dérégulation de PTEN contribue à déréguler la voie PI3K/Akt. A 4 mois, alors que le muscle est caractérisé par des fibres hyalines isolées (résultant d'une accumulation sarcoplasmique anormale de calcium), une variation très importante du diamètre des fibres, la présence de fibres nécrotiques individuelles, de fibres centronucléées et par de la fibrose endo- et périmysiale (D), des fibres PTEN/GSK3β-positives sont également observées (E et F, flèche). Elles correspondent souvent à des fibres de petit calibre (D-F, tête de flèche vide) ou à des fibres présentant des noyaux centraux (D-F, flèche épaisse), signe d'une étape de régénération musculaire, mais également parfois à des fibres en train de subir une phagocytose (D-F, rond). Enfin, dans le muscle du chien GRMD âgé de 36 mois, qui présente de grandes zones de fibrose endomysiale, typiquement associée à une atrophie musculaire marquée et à une infiltration massive de cellules inflammatoires (G), une grande proportion de fibres présentent à la fois une accumulation de PTEN et de GSK3β (H et I, flèche). A ce stade, plusieurs de ces fibres PTEN/GSK3β-positives correspondent à des fibres nécrotiques, caractérisées par un cytoplasme pâle et homogène et par une invasion de macrophages (G-I, rond). Les quelques fibres hypertrophiées qui sont encore visibles sur la coupe sont PTEN et GSK3β-négatives (H et I, carré).

Une sur-expression et une activité enzymatique accrue de la phosphatase PTEN existent donc dans le muscle GRMD, et nous avons montré que cela contribuait à déréguler la voie PI3K/Akt. De plus, nous avons observé que l'expression altérée de PTEN et de GSK3β était présente dès 3 mois et jusqu'à un stade très tardif de la pathologie, témoignant d'une atteinte sur le long terme.

2.4. Étude dans les cellules dérivées du muscle

Enfin, nous avons voulu déterminer si les variations détectées dans le muscle étaient aussi présentes dans les MDC, qui représentent un modèle simplifié et relativement homogène. Des MDC saines et GRMD ont été étudiés à deux stades différents : un stade prolifératif (caractérisé par une majorité de myoblastes), et un stade très différencié, auquel la dystrophine est normalement exprimée (caractérisé par une majorité de myotubes, contenant jusqu'à plusieurs centaines de noyaux, et présentant un degré d'organisation élevé). Les extraits protéiques correspondants aux différentes conditions ont été analysés en Western Blot avec des anticorps anti-phospho-Akt, anti-phospho-GSK3β, anti-GSK3β et anti-PTEN (Figure 31).

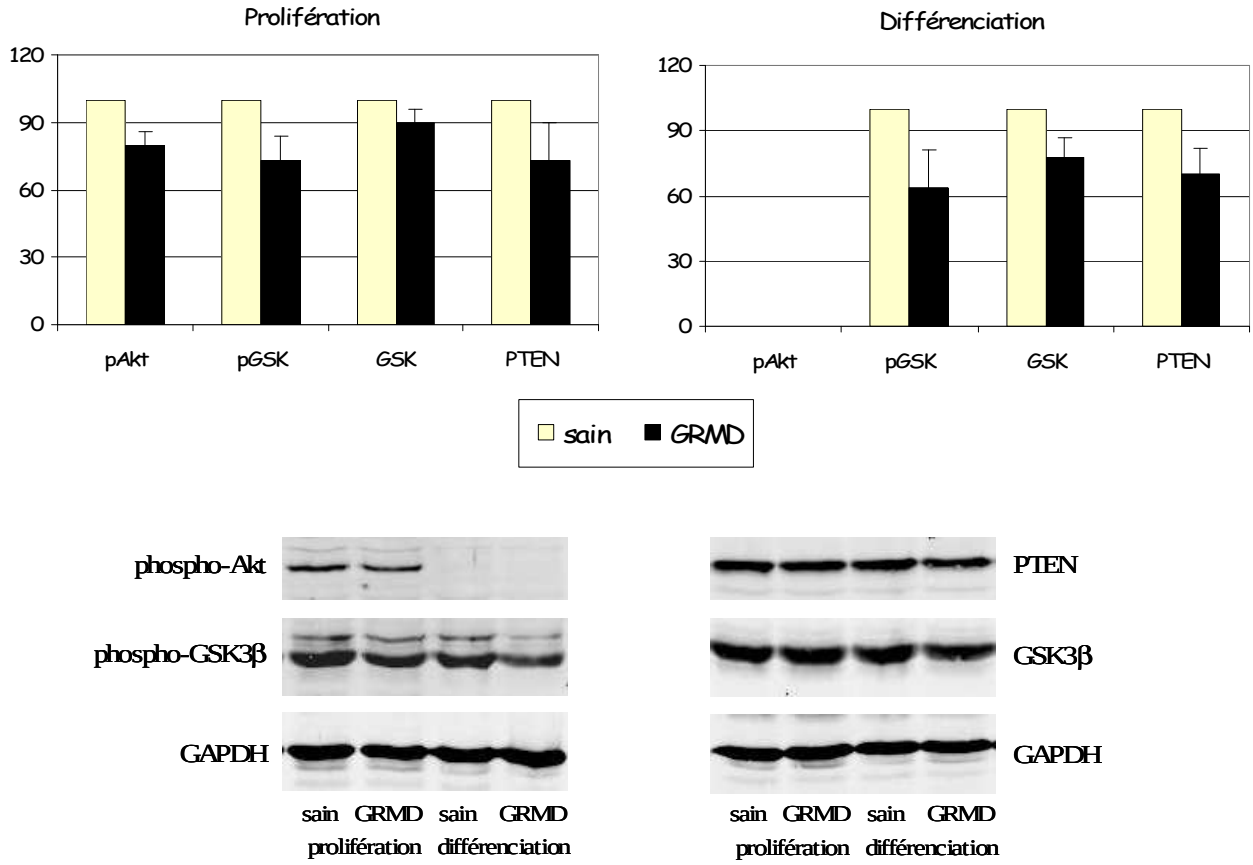


Figure 31 Niveau de phosphorylation d'Akt (Ser473), niveau d'expression de PTEN et niveaux de phosphorylation (Ser9) et d'expression de GSK3β dans les MDC saines et GRMD aux stade prolifératif et différencié. Les extraits protéiques correspondant aux différentes cultures ont été migrés sur gel SDS-PAGE et incubés avec des anticorps anti-phospho-Akt (Ser473), anti-PTEN, anti-phospho-GSK3β (Ser9) et anti-GSK3β. Pour chaque stade, le niveau dans les MDC saines a été fixé à 100% et le niveau dans les MDC GRMD est exprimé sous forme de pourcentage relatif.

Ce que nous pouvons tout d'abord noter, c'est que les variations GRMD/sain sont moins importantes dans les MDC que dans les biopsies musculaires. La forme phosphorylée d'Akt apparaît légèrement diminuée au stade prolifératif dans les MDC GRMD. De façon surprenante, elle n'est pas détectée dans les MDC en différenciation, ni chez le chien sain, ni chez le chien GRMD. Une légère diminution du niveau de phosphorylation, mais également du niveau d'expression de GSK3β est également observée dans les MDC GRMD, aux deux stades testés. Enfin, une diminution modérée de l'expression de PTEN est observée dans les MDC GRMD (là encore aux deux stades testés).

Les dérégulations que nous avions pu observer dans le muscle GRMD ne sont donc pas retrouvées dans les MDC (que ce soit dans les myoblastes en prolifération ou dans les myotubes différenciés), suggérant qu'il s'agirait d'une conséquence indirecte de l'absence de dystrophine.

Discussion générale

1. Positionnement de l'étude

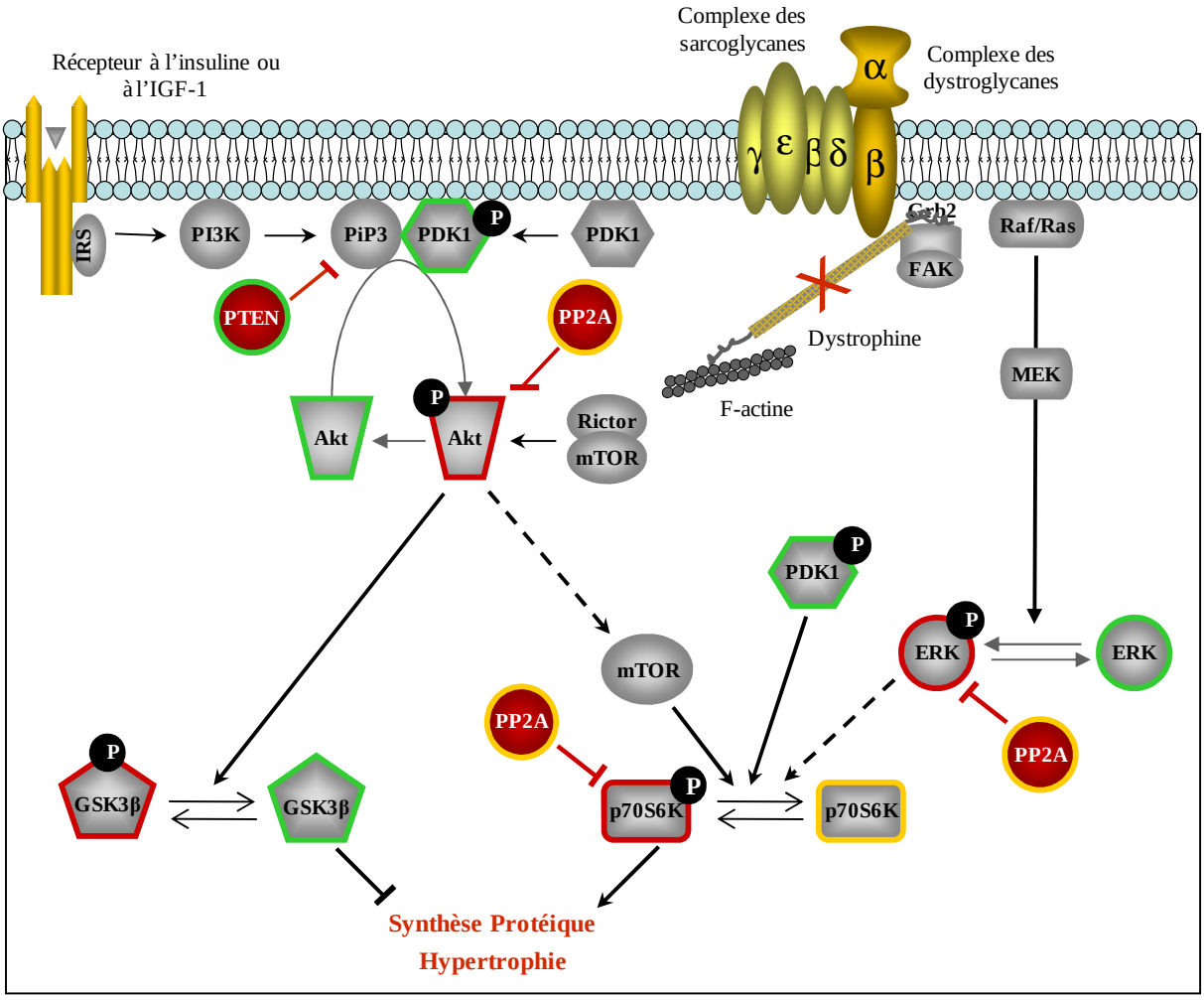
La DMD représente la forme la plus fréquente et la plus sévère des dystrophies musculaires. Malheureusement, plus de vingt ans après la découverte du gène (Monaco *et al.*, 1986, Hoffman *et al.*, 1987, Koenig *et al.*, 1987), les mécanismes globaux liant l'absence de dystrophine à la dégénérescence des fibres musculaires ne sont toujours pas entièrement élucidés, et les patients bénéficient uniquement de traitements palliatifs. Même si nous pouvons espérer que les recherches menées sur la thérapie génique ou cellulaire finissent par aboutir à la mise en place d'un protocole permettant la réintroduction de la dystrophine dans les muscles dystrophiques, les approches pharmacologiques permettent, en attendant, d'améliorer la durée et la qualité de vie des patients. Dans ce contexte, une meilleure compréhension des mécanismes définissant la pathogénie apparaît fondamentale, puisqu'elle pourrait permettre d'améliorer le cocktail de médicaments proposé aux patients. La caractérisation des dérèglements des voies de signalisation cellulaire touchant les muscles dystrophiques et surtout, la compréhension de l'implication de ces dérèglements dans le phénotype du muscle, pourraient plus particulièrement aboutir à la mise en place d'un traitement visant à restaurer une signalisation normale, voire bénéfique pour le muscle.

Depuis quelques années, les travaux relatant des dérèglements des voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle dystrophique se succèdent, mais plusieurs points limitent leurs retombées (Kolodziejczyk *et al.*, 2001, Kumar&Boriek, 2003, Lang *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2004, St-Pierre *et al.*, 2004, Nakamura *et al.*, 2005, Dogra *et al.*, 2006, Peter&Crosbie, 2006, Dogra *et al.*, 2008). Tout d'abord, ces travaux ont très souvent porté sur l'étude de quelques kinases isolées, sans considérer les voies dans leur ensemble, et les mécanismes moléculaires à l'origine des dérégulations décrites n'ont pas été élucidés. De plus, la plupart des études ont été menées chez la souris *mdx*, compliquant l'extrapolation des résultats obtenus à l'homme. Aucune étude n'a encore été publiée dans un modèle animal cliniquement relevant, tel que le chien GRMD, et le seul travail réalisé sur des biopsies humaines n'a porté que sur l'étude en immunohistochimie du niveau de phosphorylation d'Akt. En alliant la technologie des puces à anticorps à des approches plus ciblées, telles que le Western Blot, l'immunohistochimie et des tests d'activité kinase et phosphatase, nous avons pu mettre en évidence une dérégulation profonde des voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle dystrophique. Nous avons également pu décrire de façon précise les modulations affectant la voie PI3K/Akt dans le muscle GRMD,

et nous avons enfin montré qu'une activation de la phosphatase PTEN était à l'origine des dérégulations rapportées.

2. Aspects techniques

L'étude globale que nous avions envisagée chez la souris *mdx* à l'aide de notre puce à anticorps dédiée s'est vite révélée limitée par la faiblesse des signaux observés. De plus, les études en Western Blot, bien que confirmant l'atteinte des voies ERK/MAPK et PI3K/Akt dans les muscles *mdx*, ne nous ont pas toujours permis de valider des résultats pourtant déjà publiés, l'explication la plus probable semblant liée à l'importante variabilité inter-souris observée (Kumar&Boriek, 2003, Lang *et al.*, 2004, Kumar *et al.*, 2004, Dogra *et al.*, 2006, Peter&Crosbie, 2006). Enfin, le caractère fortement distinct des phénotypes développés par l'homme et par la souris nous a finalement poussés à remettre en question la pertinence du modèle murin dans notre tentative de caractérisation des modulations des voies de signalisation pouvant intervenir dans la pathogénie de la DMD. Grâce à une collaboration avec Karl Rouger (INRA UMR703), les travaux ont dans un second temps été poursuivis dans le modèle du chien GRMD. L'étude réalisée à l'aide de la puce à anticorps MAGY array a abouti, après amélioration de la préparation des échantillons et travail sur la fraction nucléaire, à des résultats assez encourageants. Elle nous a permis d'observer l'atteinte, dans le muscle GRMD, de protéines impliquées dans le cycle cellulaire et de protéines du cytosquelette. Cependant, l'extrême complexité du tissu musculaire rend difficile, nous l'avons déjà souligné, son étude à l'aide de méthodes à haut débit (puce à anticorps, mais également électrophorèse bi-dimensionnelle couplée à de la spectrométrie de masse). Nous n'avons pas été en mesure de détecter, à l'aide de ces puces, de variations importantes dans le niveau des protéines impliquées dans les voies de signalisation cellulaire. Les puces à anticorps développées par la société ProtNeteomix sont adaptées à l'étude de modèles biologiques plus simples, tels que les biopsies ou les lignées de cellules dérivées du cancer du sein (Sakanyan, 2005, Yeretssian *et al.*, 2005), mais elles ne permettent donc pas, en l'état actuel des choses, le profiling de biopsies musculaires. Le niveau de détection des protéines étant satisfaisant, et le bruit de fond relativement faible, le problème majeur apparaît lié à la réactivité croisée des anticorps. Il est probable que, dans le muscle, les anticorps présents sur la puce reconnaissent, en plus de la protéine d'intérêt, d'autres protéines à l'origine d'un signal aspécifique (White, 2008). Il apparaît donc indispensable, avant de pouvoir utiliser ce type de puces dans le cadre de la DMD (ou d'autres pathologies neuro-musculaires) de sélectionner uniquement des anticorps générant, lors de l'analyse en Western Blot, une bande unique correspondant à la



diminué dans le muscle GRMD ; augmenté dans le muscle GRMD ; identique ; non déterminé

Schéma 1 Les voies de signalisation ERK/MAPK et PI3K/Akt, avec les dérégulations détectées dans le muscle GRMD. Les protéines entourées de rouge, vert et jaune ont un niveau d'expression et/ou d'activité respectivement diminué, augmenté ou inchangé dans le muscle GRMD. Puisque nous n'avons pas détecté de changement dans le niveau d'activité de PP2A, la phosphatase est entourée de jaune.

protéine d'intérêt. Parallèlement à cela, et tel que nous l'avons déjà évoqué, la phosphorylation est un phénomène dynamique et la forme phosphorylée des protéines (correspondant dans la majorité des cas à la forme active) est peu représentée dans les cellules à un instant *t* (White, 2008). L'étude du profil de phosphorylation des protéines sur puce à anticorps se heurte donc à un problème de sensibilité. Une façon intéressante de pallier à la fois aux problèmes de spécificité et de sensibilité, est l'utilisation d'un système de sandwich (Sakanyan, 2005). Dans cette étude, nous avons testé une puce à anticorps utilisant un tel système et dédiée à l'étude du niveau de phosphorylation des protéines des voies MAPK et PI3K/Akt (R&D Systems). Chaque kinase est liée, d'un côté, par l'anticorps immobilisé sur la puce (dirigé contre les protéines totales) et, de l'autre, par un anticorps phospho-spécifique. L'utilisation d'un cocktail d'anticorps phospho-spécifiques, permet en outre, comme nous l'avons déjà noté, de connaître pour chaque kinase, le site de phosphorylation détecté. La comparaison, à l'aide de cette puce, du profil de phosphorylation du muscle squelettique de chiens sains et GRMD âgés de 4 mois nous a permis de mettre en évidence une atteinte globale des voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle dystrophique. Nous avons pu montrer que les kinases ERK1, ERK2, p38δ, p38γ, Akt1, GSK3β et p70S6K, présentaient toutes un niveau de phosphorylation statistiquement réduit dans le muscle GRMD (Schéma 1).

3. Étude détaillée de la voie PI3K/Akt dans le muscle GRMD

3.1. La voie PI3K/Akt et le contrôle de la masse musculaire

La voie PI3K/Akt joue, nous l'avons déjà souligné à plusieurs reprises, un rôle crucial dans la régulation de la masse musculaire (Glass, 2005a, Favier *et al.*, 2008). Il est maintenant clairement établi que l'hypertrophie induite par l'IGF-1 fait intervenir les deux branches de la voie (mTOR dépendantes et indépendantes). Il a de plus été montré *in vivo* que la voie Akt/mTOR était activée (et que GSK3β était inactivée) durant l'hypertrophie compensatoire, l'inactivation de la voie empêchant ce phénomène. L'activation d'Akt ou de p70S6K (ou l'inactivation de GSK3β) s'est de plus révélée suffisante pour induire l'hypertrophie. La voie Akt/mTOR est au contraire apparue inhibée pendant l'atrophie, et il a été montré que son activation était capable d'empêcher ce phénomène *in vivo*. Elle ne serait par contre pas nécessaire au maintien de la masse musculaire dans les muscles matures, puisqu'un traitement à la rapamycine ne semble pas causer d'atrophie dans les muscles contrôles (Bodine *et al.*, 2001, Lai *et al.*, 2004, Rommel *et al.*, 2001, Vyas *et al.*, 2002). Les observations concernant une éventuelle implication, dans la régulation de l'hypertrophie musculaire, de la voie de la

calcineurine sont plus contradictoires. Les travaux de Rommel et Bodine suggèrent que l'hypertrophie induite par l'IGF-1 ne passerait pas par une activation de la calcineurine, mais les deux articles sont en contradiction quant à un possible effet inhibiteur de la phosphatase sur ce phénomène (Bodine *et al.*, 2001, Rommel *et al.*, 2001). Au contraire, Vyas rapporte que l'IGF-1 (mais de façon surprenante pas le LiCl, un inhibiteur non compétitif de GSK3β) induirait une augmentation de l'activité du NFAT, et que la co-transfection d'une forme constitutivement active de GSK3β inhiberait ce phénomène, suggérant que GSK3β serait impliquée dans la régulation du NFAT suite à un traitement à l'IGF-1 (Vyas *et al.*, 2002). Les études chez les souris transgéniques supportent quant à elles l'idée que la calcineurine aurait un rôle limité dans la régulation de l'hypertrophie musculaire (Favier *et al.*, 2008). Enfin, rappelons qu'Akt intervient aussi dans le contrôle de l'atrophie *via* une inhibition de la dégradation protéique médiée par la voie ubiquitine protéasome et par la voie de l'autophagie et des lysosomes (Glass, 2005a, Berthon *et al.*, 2007, Mammucari *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2007, Favier *et al.*, 2008).

3.2. Dérégulations dans le muscle GRMD et conséquences probables

L'atteinte de la voie PI3K/Akt dans le muscle GRMD semble particulièrement importante, puisque Akt1, GSK3β et p70S6K se sont toutes révélées présenter un niveau de phosphorylation statistiquement réduit. Les expériences de fractionnement subcellulaire et d'immunohistochimie ont révélé que la diminution du niveau de phosphorylation d'Akt était le résultat d'une réduction drastique de la quantité de phospho-Akt au niveau des membranes et du noyau. La kinase s'est de plus révélée être deux fois moins active dans le muscle GRMD et il est plus que probable que cette réduction d'activité soit à l'origine du défaut de phosphorylation de GSK3β et p70S6K également mis en évidence (Chung *et al.*, 1994, Cross *et al.*, 1995, Inoki *et al.*, 2002, Glass, 2005a). Nous avons aussi pu montrer que la phosphorylation réduite de GSK3β était associée à une augmentation de la synthèse et de l'activité enzymatique de la kinase. Nous n'avons par contre pas observé de surexpression des E3-ubiquitine ligases MAFbx et MuRF1 dans le muscle GRMD, les deux protéines semblant même au contraire moins présentes que dans le muscle sain. Nous pensons que les dérégulations d'Akt, GSK3β et p70S6K mises en évidence dans le muscle GRMD pourraient bloquer l'hypertrophie compensatoire que les muscles auraient éventuellement pu tenter de mettre en place pour limiter l'impact de l'absence de dystrophine, ce qui pourrait avoir des conséquences importantes sur le phénotype du muscle. Nos données semblent par ailleurs

indiquer que la dérégulation d'Akt dans le muscle GRMD n'entraîne pas d'activation de la voie ubiquitine protéasome, ce résultat étant en accord avec l'absence d'activation (quel que soit le stage de la pathologie) de la voie MAFbx précédemment rapportée dans les biopsies de patients DMD (Chen *et al.*, 2005). La régulation coordonnée par Akt des voies de la synthèse et de la dégradation protéiques ne semble par ailleurs pas systématique. Il a en effet été montré qu'une expression ectopique localisée de myostatine, bien que réduisant la masse musculaire, le calibre des fibres et le contenu protéique total, et bien qu'entraînant une inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR, n'était associée à aucune modulation de la voie ubiquitine protéasome (Durieux *et al.*, 2007, Amirouche *et al.*, 2008). Enfin, la fonte musculaire des muscles DMD est essentiellement due à des phénomènes de nécrose, qui s'expliquent entre autres par une activation des calpaïnes (Tidball&Spencer, 2000, Bartoli&Richard, 2005) et il est possible que la voie ubiquitine protéasome ne participe pas à la pathogénie. Il serait toutefois intéressant d'étudier la voie de l'autophagie dans le muscle GRMD, afin de voir si elle est ou non stimulée par l'activité réduite d'Akt (Mammucari *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2007). En résumé, nous pensons que l'inactivation d'Akt dans le muscle GRMD pourrait avoir pour conséquence un blocage de l'hypertrophie compensatoire, sans entraîner d'activation de la voie ubiquitine protéasome.

4. Étude des kinases ERK1/2 dans le muscle GRMD

4.1. Rôle de la voie ERK/MAPK dans le muscle squelettique

La voie ERK joue quant à elle un rôle important dans la myogénèse ; elle est impliquée dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires. La balance entre le niveau de phospho-ERK1 et phospho-ERK2 semble déterminer si les cellules doivent poursuivre en prolifération (activation préférentielle de ERK1) ou au contraire, entrer en différenciation (activation préférentielle de ERK2) (Sarbassov *et al.*, 1997). Il a d'ailleurs été montré plus récemment que ERK2 était indispensable à la différenciation terminale des myoblastes, alors que ERK1 ne semblait pas requise (Li&Johnson, 2006). La voie ERK semble en plus jouer un rôle direct dans la régulation de l'hypertrophie des muscles squelettiques. Elle a été impliquée dans l'hypertrophie des fibres musculaires de type rapide en réponse à des agonistes des récepteurs bêta-adrénergiques (Shi *et al.*, 2007). L'inhibition de ERK s'est de plus révélée capable d'empêcher l'hypertrophie induite par l'IGF-1, en entraînant une diminution de l'augmentation du niveau de phosphorylation de p70S6K1, suggérant en plus que ERK jouerait un rôle important (direct ou non) dans ce phénomène (Haddad&Adams, 2004).

4.2. Dérégulations dans le muscle GRMD et hypothèses

L'étude sur puce à anticorps des biopsies canines a révélé un défaut de phosphorylation extrêmement marqué de ERK1 et ERK2 dans le muscle GRMD. Nous avons confirmé ces résultats en Western Blot, et nous avons montré que cela était associé à une augmentation du niveau d'expression des kinases. Par ailleurs, l'étude de trois muscles différents nous a permis de montrer que le défaut de phosphorylation semblait toucher de façon préférentielle l'isoforme ERK2. Nous pensons que le défaut de phosphorylation de ERK (et en particulier de ERK2) révélé dans le muscle GRMD pourrait avoir des conséquences néfastes sur la régulation de la myogénèse, et plus particulièrement sur la différenciation terminale des myotubes, ce qui pourrait avoir des conséquences négatives sur la régénération musculaire et aggraver le phénotype du muscle. Par ailleurs, le défaut de phosphorylation mis en évidence pourrait aussi limiter l'hypertrophie compensatoire du muscle, peut-être en partie en contribuant à diminuer le niveau de phosphorylation de p70S6K.

5. Comparaison avec les observations faites dans les muscles *mdx* et DMD

L'atteinte simultanée des voies PI3K/Akt et ERK/MAPK dans le muscle GRMD pourrait donc, en limitant l'hypertrophie compensatoire, contribuer à expliquer le phénotype développé. Chez la souris *mdx*, chez laquelle une réponse hypertrophique est observée, une activation d'Akt a été rapportée dans les muscles squelettiques des membres aux stades pré-nécrotique, nécrotique et hypertrophique de la pathologie et dans le diaphragme aux stades pré-nécrotique et nécrotique (Dogra *et al.*, 2006, Peter&Crosbie, 2006). Une activation encore plus marquée a par ailleurs été décrite chez des souris déficientes en sarcoglycane et chez des souris déficientes en dystrophine et en utrophine, suggérant qu'elle serait liée à la sévérité du phénotype (Peter&Crosbie, 2006). Au contraire, nous avons observé que le niveau de phosphorylation d'Akt semblait augmenté dans le TA à 1 mois mais diminué dans le diaphragme à 1, et plus encore à 4 mois, suggérant que l'activation de la kinase serait lié au phénotype hypertrophié du muscle. Les résultats concernant le statut de ERK sont un peu similaires. Il a été décrit que ERK était activée quel que soit le muscle et quel que soit le stade de la pathologie (Lang *et al.*, 2004), alors que nous observons une activation dans le TA, mais un défaut de phosphorylation dans le diaphragme. Des résultats publiés extrêmement récemment semblent appuyer l'hypothèse selon laquelle l'activation d'Akt dans les muscles *mdx* correspondrait à un phénomène compensatoire permettant de limiter les conséquences de l'absence de dystrophine. Ils révèlent qu'une activation constitutive de la kinase, en entraînant

une stabilisation de l'utrophine et du complexe UGC (utrophin-glycoprotein complex), et en induisant l'hypertrophie, permettrait de stabiliser le sarcolemme et de retarder encore la mise en place de la pathologie (Peter *et al.*, 2008). Concernant les résultats obtenus chez l'homme, une activation d'Akt a été rapportée dans le muscle de deux patients (âgés de 8 mois et 3 ans), suggérant l'existence d'un mécanisme compensatoire (Peter&Crosbie, 2006). Cependant, l'activité d'Akt, de même que le statut des kinase situées en aval (GSK3β et p70S6K par exemple), et celui des régulateurs de la voie n'ont, à notre connaissance, pas encore été regardés. De plus, les deux patients étant très jeunes, et les signes cliniques de la pathologie n'apparaissant généralement pas avant l'âge de trois ans, il serait intéressant d'approfondir ces résultats, afin de déterminer si l'activation d'Akt détectée persiste lorsque la pathologie progresse.

6. PTEN semble à l'origine de la dérégulation d'Akt dans le muscle GRMD

Nous avons cherché à comprendre, en analysant trois enzymes impliquées dans sa régulation, ce qui pourrait expliquer la réduction du niveau de phosphorylation et de l'activité kinase d'Akt détectée dans le muscle GRMD. Nous avons détecté des changements dans le niveau de phosphorylation de PDK1 et dans le niveau d'expression de PP2A, mais qui ne pouvaient pas expliquer les perturbations observées. L'augmentation du niveau de la forme phosphorylée (et supposée active) de PDK1 détectée dans le muscle GRMD aurait en effet normalement dû mener à une augmentation du niveau de phosphorylation et de l'activité enzymatique d'Akt (Alessi *et al.*, 1997). Par ailleurs, même si l'expression de PP2A était légèrement augmentée, aucun changement n'a été détecté dans son activité (Schéma 1). En revanche, l'augmentation du niveau d'expression et de l'activité enzymatique de la phosphatase PTEN mis en évidence pouvaient contribuer à expliquer le défaut de phosphorylation d'Akt et nous avons décidé d'approfondir son étude.

PTEN est une phosphoinositide phosphatase qui appartient à la famille des protéines tyrosine phosphatases (résidu tyrosine conservé dans le site CX_5RT/S). Elle a une double spécificité protéines/lipides mais ses substrats préférentiels sont les phosphoinositides. Elle déphosphoryle le phosphate en position D3 de l'anneau inositol des PtdIns3P, le PtdIns(3,4)P_2 et le PtdIns(3,4,5)P_3, son substrat principal (Maehama&Dixon, 1998, Blero *et al.*, 2007). Nous avons pensé que l'augmentation du niveau d'expression et d'activité détectée dans le muscle GRMD pourrait, en diminuant la quantité de PtdInsP_3 au niveau de la membrane plasmique, limiter le recrutement et l'activation d'Akt, et par conséquent expliquer la dérégulation de la voie. Cette hypothèse s'est trouvée fortement supportée par les résultats

obtenus en immunohistochimie, lors du marquage de PTEN et GSK3β sur coupes sériées. En effet, nous avons observé que toutes les fibres GRMD présentant une accumulation cytosolique importante de la phosphatase étaient également GSK3β-positives, alors que les fibres montrant uniquement un marquage sous-sarcolemmal ne présentaient pas d'accumulation de la kinase. Des fibres PTEN/GSK3β-positives ont de plus été observées à différents stades de la pathologie, révélant une atteinte de la voie sur le long terme, dès un stade précoce et jusqu'à un stade très tardif. Les stades étudiés étant de plus très distincts, tant au niveau de l'intensité des lésions, que de la présence de cellules inflammatoires ou encore du potentiel régénératif du muscle, le caractère constant de la dérégulation de PTEN et GSK3β démontre qu'elle ne peut être associée exclusivement à de l'inflammation ou de la régénération. A 3 mois, une accumulation de PTEN et de GSK3β était déjà notée dans de nombreuses fibres, alors que peu de lésions histologiques étaient observées, suggérant une mise en place précoce des dérégulations, indépendamment de la progression de la pathologie. De plus, le fait que certaines des fibres PTEN/GSK3β-positives observées à ce stade ne correspondent pas à des fibres centronucléées démontre que la dérégulation de la voie ne peut pas être associée exclusivement à une marque de régénération. Ceci s'est trouvé encore confirmé par le fait qu'à 36 mois, alors que le potentiel régénératif est éteint et que les muscles sont caractérisés par une atrophie marquée, de la fibrose et une infiltration par des cellules inflammatoires, des fibres PTEN/GSK3β-positives étaient encore observées. La grande proportion de ces fibres, et le fait que beaucoup correspondent à des fibres nécrotiques, pourraient de plus indiquer que la dérégulation de la voie PI3K/Akt caractérise des fibres qui ont accumulé de nombreux dommages et qui sont destinées à dégénérer. Les rares fibres hypertrophiées qui étaient encore présentes à ce stade étaient d'ailleurs systématiquement PTEN et GSK3β-négatives. Il a été montré récemment que la quantité de PTEN présente au niveau de la membrane plasmique (indétectable avec des techniques classiques de microscopie confocale, et par conséquent non visualisée dans notre étude) était proportionnelle à la quantité présente dans le cytosol. Par ailleurs, la translocation de PTEN à la membrane plasmique semble nécessaire et suffisante à son activité (Vazquez&Devreotes, 2006, Vazquez *et al.*, 2006). Il apparaît donc tout à fait probable que les fibres GRMD exhibant une accumulation cytosolique marquée de PTEN contiennent également un niveau accru de la phosphatase au niveau de la membrane plasmique, conduisant à une diminution du $PtdInsP_3$ et à une réduction du niveau d'activation d'Akt. Nous pouvons d'ailleurs noter que nous avons détecté une augmentation du niveau d'expression d'Akt1 dans le muscle GRMD,

probablement liée à un mécanisme compensatoire, mais que cette sur-expression était visiblement insuffisante pour maintenir un niveau de phosphorylation normal. L'activation d'Akt fait intervenir successivement deux mécanismes différents (phosphorylation à la membrane plasmique du résidu Thr308 par PDK1 puis phosphorylation par le complexe Rictor/mTOR de la Ser473), et il aurait été intéressant, afin de confirmer notre hypothèse, d'avoir des informations sur le niveau de phosphorylation de la Thr308. Malheureusement, les anticorps disponibles sur le marché que nous avons testé ne reconnaissaient pas la protéine canine en Western Blot.

Le fait que PTEN puisse être à l'origine de la dérégulation de la voie PI3K/Akt dans le muscle GRMD, et que cela puisse avoir des conséquences négatives sur une éventuelle hypertrophie compensatoire est par ailleurs supporté par la littérature. Il a été montré *in vitro* que la sur-expression de SHIP-2 (Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol-5'-phosphatase 2), une phosphatase qui, comme PTEN, déphosphoryle le $PtdInsP_3$ (Blero *et al.*, 2007), induisait l'atrophie, alors que la sur-expression d'un mutant dominant négatif, conduisant à une augmentation du niveau de $PtdInsP_3$, induisait l'hypertrophie (Rommel *et al.*, 2001). La sur-expression de SHIP-2 dans le muscle de souris saines était sans effet sur la taille des fibres, mais la sur-expression de la phosphatase dans un modèle d'hypertrophie compensatoire empêchait complètement la réponse hypertrophique, suggérant très fortement qu'une réduction de la quantité de $PtdInsP_3$ à la membrane plasmique est suffisante pour bloquer ce phénomène (Bodine *et al.*, 2001).

7. Autres pathologies associées à PTEN ou à d'autres phosphatases

PTEN est le second gène le plus fréquemment délété dans le cancer humain (dans près de 30% des cas, après p53) (Pendaries *et al.*, 2003, Blero *et al.*, 2007, Yin&Shen, 2008). Des mutations ont par ailleurs été associées à un groupe de maladies autosomiques dominantes prédisposant au cancer et regroupées sous le terme de "PTEN-associated Hamartoma Tumor Syndromes" ; au diabète de type 2 et à des maladies neurologiques, telles que la maladie de Parkinson et l'autisme (Liaw *et al.*, 1997, Ishihara *et al.*, 2003, Blero *et al.*, 2007, Stiles, 2008). C'est la première fois qu'une dérégulation est rapportée dans le cas d'une maladie neuro-musculaire. Les phosphoinositides et les phosphatases sont l'objet de recherches croissantes et des dérégulations ont été associées au cancer, à la leucémie myéloïde aiguë, au diabète et au syndrome de Lowe (Payrastre et *al.*, 2001, Pendaries et *al.*, 2003). La myotubularine MTM1, une phosphoinositide 3-phosphatase, est par ailleurs apparue mutée dans la myopathie myotubulaire (MTM) ou myopathie centronucléaire (CNM) liée à l'X

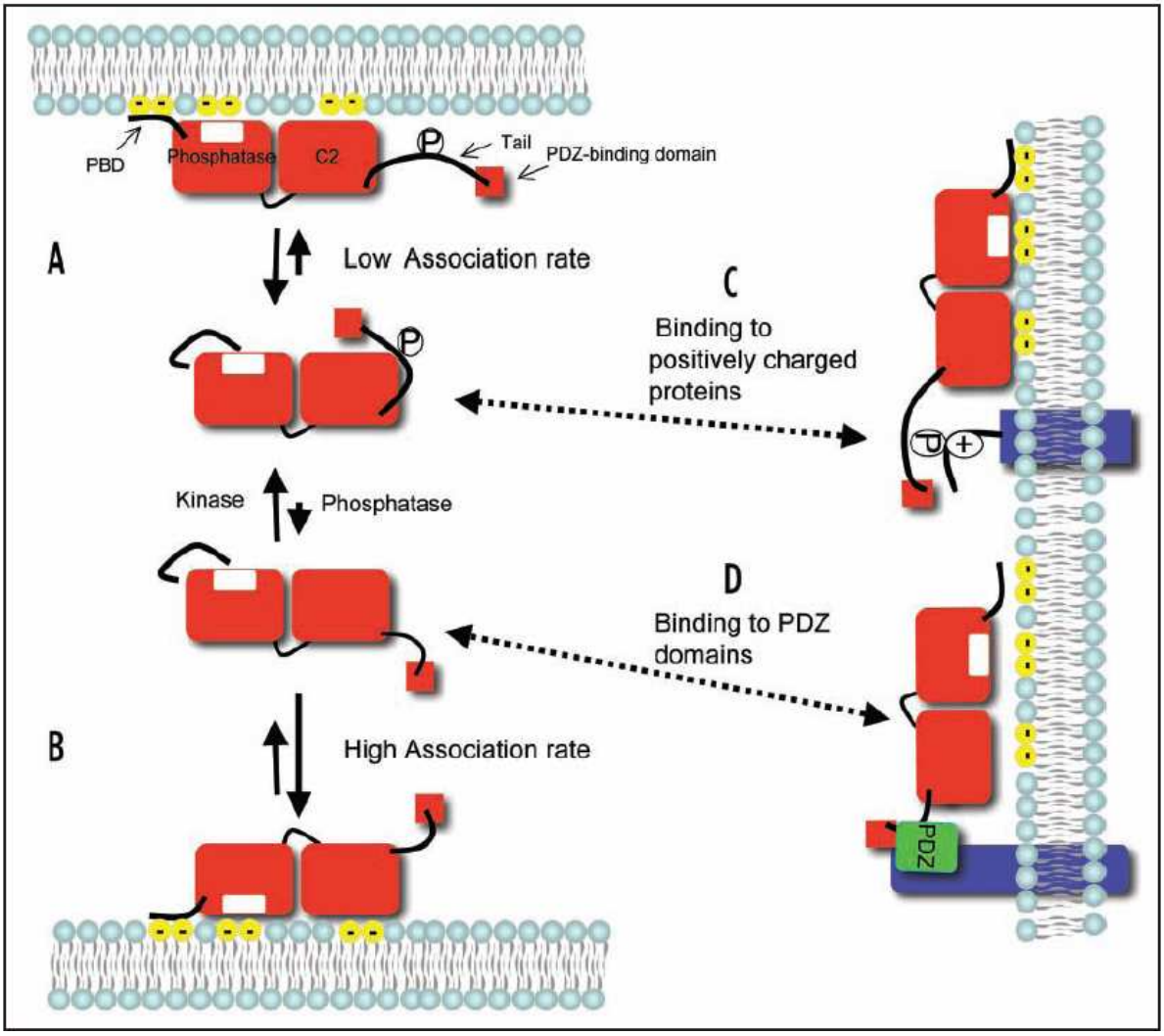


Figure 1 Représentation schématique des différents modes de liaison de PTEN à la membrane. **A**) La phosphorylation de la queue C-terminale masque les domaines de liaison à la membrane, entraînant un faible taux d'association. **B**) La déphosphorylation de la queue favorise l'association à la membrane, résultant en une augmentation de la part des molécules de PTEN qui sont liées à la membrane. Les molécules de PTEN phosphorylées et non phosphorylées se dissocient de la membrane avec le même taux. **C**) La liaison de PTEN à des protéines membranaires possédant des queues cytoplasmiques chargées positivement, comme NEP, résulte en un déplacement des interactions intramoléculaires de la queue et en une exposition des domaines de liaison à la membrane. **D**) la déphopshorylation de la queue expose le domaine PDZ. D'après (Vazquez&Devreotes, 2006).

(XLMTM, pour X-linked MTM) (Tronchere *et al.*, 2003) et hJUMPY, une autre phosphoinositide 3-phosphatase, s'est révélée être mutée dans des cas sporadiques de CNM (Tosch *et al.*, 2006).

8. Hypothèses sur l'origine de l'activation de PTEN dans le muscle GRMD

8.1. Taux d'association à la membrane plasmique

Étant donné les conséquences probables de la dérégulation de PTEN observée dans le muscle GRMD, il serait intéressant de tenter de comprendre son origine. Les mécanismes régulant la transcription de la phosphatase sont complexes et n'ont pas encore été entièrement élucidés. Ils font intervenir entre autres les agonistes de PPARγ (Teresi *et al.*, 2006) et la p53 (Wang *et al.*, 2005). Les mécanismes régulant la translocation à la membrane, et donc l'activité, sont en revanche aujourd'hui relativement bien compris. PTEN comprend un domaine PDB ($PtdInsP_2$-binding domain) N-terminal, un domaine phosphatase, un domaine C2 (Ca^{2+}-independent membrane-targeting module) de liaison aux lipides, une queue C-terminale d'une cinquantaine d'acides aminés et un domaine PDZ localisé à l'extrémité C-terminale (Leslie&Downes, 2002, Blero *et al.*, 2007). La queue C-terminale est nécessaire au maintien de la stabilité mais elle inhibe dans le même temps l'activité phosphatase. Les résidus Ser380, Thr382 et Thr383 sont phosphorylés à l'état basal, ce qui aboutit à une conformation "fermée", stable mais relativement inactive, le repliement de la queue phosphorylée masquant les domaines de liaison à la membrane. L'inaccessibilité du domaine PDZ en particulier empêcherait l'interaction de PTEN avec le PAC (PTEN-associated complex) et son recrutement à la membrane. Cette conformation permettrait tout de même le maintien du $PtdInsP_3$ à un niveau basal (expliquant que la perte de PTEN conduise à une augmentation du $PtdInsP_3$, comme dans le cancer), mais sans empêcher l'activation d'Akt suite à un stimulus. Suite à son activation (*via* entre autres la déphosphorylation de la queue), PTEN se retrouverait dans une conformation "ouverte" qui serait intégrée au PAC et donc recrutée à la membrane. PTEN serait donc phosphorylée de façon constitutive et une phosphatase serait responsable de l'activation, le taux d'association avec la membrane représentant l'étape clé de la régulation. PTEN interagirait alors directement avec les charges négatives du $PtdInsP_2$, via des résidus basiques du domaine C2, du domaine phosphatase et du domaine PDB. Les charges négatives des sites de la queue C-terminale encore phosphorylés permettrait par ailleurs une interaction avec des protéines membranaires possédant une queue cytoplasmique chargée positivement. Enfin, le domaine PDZ serait à l'origine d'une association avec des protéines membranaires possédant elles aussi de tels motifs (Figure 1).

L'interaction de PTEN avec la membrane plasmique est très dynamique, elle dure seulement quelques centaines de millisecondes et concerne donc uniquement une infime partie des molécules cytosoliques. Ce laps de temps très court semble néanmoins suffisant pour permettre l'enchaînement de plusieurs cycles catalytiques et la dégradation de plusieurs molécules de $PtdInsP_3$. L'activation de PTEN serait d'ailleurs accompagnée par une réduction de sa demi-vie, permettant d'éviter toute activation incontrôlée (Vazquez *et al.*, 2000, Vazquez *et al.*, 2001, Leslie&Downes, 2002, Vazquez&Devreotes, 2006, Vazquez *et al.*, 2006). Le rôle majeur de PTEN, et celui qui nous intéresse en regard de la voie PI3K/Akt, prend donc place au niveau de la membrane plasmique, et l'activité de la phosphatase semble principalement régulée par le taux d'association à cette dernière. L'absence de dystrophine est associée à un remodelage important de la membrane plasmique, ainsi qu'à de nombreux changements structuraux et conformationnels. Il apparaît par conséquent possible que l'activation de PTEN dans les muscles GRMD soit entre autres une conséquence de l'instabilité membranaire générée par l'absence de dystrophine. Le fait que l'activation de la phosphatase (et la dérégulation conséquente de la voie PI3K/Akt) ne soit pas retrouvée dans les MDC, et le fait qu'une activation d'Akt soit au contraire observée dans les muscles *mdx*, suggère par ailleurs que la dérégulation de PTEN ne correspondrait pas à une conséquence primaire de l'absence de dystrophine, mais plutôt à une conséquence indirecte.

8.2. Modifications post-traductionnelles (phosphorylation)

Il a par ailleurs été montré que GSK3β pouvait phosphoryler PTEN sur les résidus Ser362 et Thr366 (suite à la phosphorylation par CK2 de la Ser370) et que la phosphorylation de la Thr366 réduisait l'activité, suggérant l'existence d'un rétrocontrôle négatif (Al-Khouri *et al.*, 2005). A l'inverse, il a également été montré (dans des macrophages) que la PI3K régulait négativement PTEN, *via* une inhibition de la voie RhoA/ROCK, impliquée dans la phosphorylation et l'activation de PTEN (Papakonstanti *et al.*, 2007). Afin de voir si la phosphorylation de PTEN était modulée dans le muscle GRMD, deux anticorps phospho-spécifiques ont été testés. L'anticorps anti-PTEN (Ser370) ne croisait malheureusement pas chez le chien mais l'anticorps anti-PTEN (Ser380) a permis de mettre en évidence, dans le muscle GRMD, une augmentation du niveau de phosphorylation. Cette observation, bien que très partielle, pourrait indiquer que la sur-expression de PTEN dans le muscle GRMD s'accompagne d'une augmentation du niveau de phosphorylation de l'enzyme. Il serait intéressant d'essayer d'obtenir des informations sur les autres sites de phosphorylation, afin de voir si la sur-expression de PTEN dans le muscle GRMD s'accompagne d'une

augmentation de la phosphorylation (dans le cadre d'un rétro-contrôle visant à limiter l'activité de la phosphatase).

8.3. Régulation par les cavéoles

PTEN contient en plus un site de liaison à la cavéoline-1 et il a été montré dans une lignée cellulaire de carcinome épidermoïde, qu'environ 10% des molécules étaient localisées au niveau des fractions membranaires enrichies en cavéolines (CEM, caveolin-enriched membrane fraction) (Caselli *et al.*, 2002). Ce chiffre paraît disproportionné par rapport aux observations de Vazquez précédemment décrites, mais cette étude démontre clairement qu'une partie de PTEN peut être localisée au niveau des cavéoles. Dans les cellules musculaires, les cavéoles semblent de plus être impliquées directement dans la régulation d'Akt. Il a été montré qu'Akt interagissait avec la PKC atypique ζ (PKCζ) au niveau des cavéoles, l'insuline réduisant cette interaction et conduisant à l'activation d'Akt. Le céramide (un messager secondaire lipidique) s'oppose à cette activation. Il stabilise l'interaction PKCζ-Akt et active la PKCζ, qui phosphoryle alors Akt sur la Thr34, inhibant l'interaction de son domaine PH avec le $PtdInsP_3$. Le céramide semble de plus recruter aussi PTEN, créant ainsi un micro-environnement membranaire à partir duquel la signalisation dépendante d'Akt ne peut pas avoir lieu (Powell *et al.*, 2003, Fox *et al.*, 2007, Hajduch *et al.*, 2008). Une preuve directe du rôle joué par la cavéoline-3 dans la signalisation dépendante d'Akt dans les cellules musculaires a de plus été apportée récemment, puisqu'il a été montré qu'une sur- comme une sous-expression de la cavéoline 3 transformait le signal médié par la voie PI3K/Akt en cas de stress oxydatif d'un signal de survie en un signal de mort (Smythe&Rando, 2006). Enfin, les cavéoles ont été impliquées dans la signalisation de la voie ERK et il a été montré que les cavéolines 1 et 3 pouvaient inhiber directement l'activité de MEK1 et ERK2 *in vitro*, la sous-expression de la cavéoline 1 induisant au contraire une hyperactivation de la cascade (de Laurentiis *et al.*, 2007). La membrane plasmique des muscles DMD est caractérisée par une grande variabilité dans la taille et la forme des cavéoles, et par une augmentation du nombre de cavéoles et du niveau d'expression de la cavéoline-3 (Bonilla *et al.*, 1988, Repetto *et al.*, 1999, Galbiati *et al.*, 2001). Bien que ces observations aient été faites chez l'homme ou chez la souris, il est probable, étant donné les lésions présentes chez le chien, que les cavéoles soient également modulées, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la quantité de PTEN présente à la membrane plasmique, et donc sur son activité, et plus généralement sur la voie PI3K/Akt.

9. Perspectives

9.1. Étude comparée d'autres pathologies musculaires

Pour obtenir plus d'informations sur la possible origine de la dérégulation de PTEN dans le muscle GRMD, il pourrait être intéressant de voir si les observations que nous rapportons dans le cas de la DMD sont retrouvées dans d'autres pathologies musculaires, telles que la LGMD1C ou cavéolinopathie, une dystrophie musculaire des ceintures due à des mutations dans le gène de la cavéoline-3 (McNally *et al.*, 1998a, Minetti *et al.*, 1998, Hagiwara *et al.*, 2000), dans les sarcoglycanopathies, qui sont dues à des mutations dans les gènes codant les différentes isoformes de SG ou encore dans des modèles de dystrophies musculaires qui ne sont dues ni à des mutations dans les gènes codant des protéines du complexe ni à des mutations dans les gènes codant les cavéolines (Vainzof *et al.*, 2008).

9.2. Étude de la voie PI3K/Akt dans les biopsies humaines

L'ensemble de notre travail suggère fortement que l'activation de PTEN révélée chez le chien GRMD pourrait avoir des conséquences néfastes sur le phénotype du muscle dystrophique. Il faudrait à présent étudier le statut de la phosphatase dans des biopsies de patients sains et DMD, ainsi que celui des différentes enzymes de la voie PI3K/Akt. Comme nous l'avons déjà souligné, il pourrait également se révéler informatif d'étendre l'étude à la voie de l'autophagie.

9.3. Inhiber PTEN ou activer Akt

Si l'activation de PTEN est confirmée chez l'homme, une perspective à long terme de cette étude pourrait être la mise au point d'un traitement pharmacologique visant à restaurer une signalisation normale, voire à permettre la mise en place d'une signalisation favorisant l'hypertrophie. Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus à l'aide d'activateurs ou d'inhibiteurs des voies MAPK et PI3K/Akt dans le cadre de la DMD ou d'autres pathologies musculaires. Dans le modèle murin de la dystrophie musculaire autosomique dominante d'Emery-Dreifuss, un traitement avec le PD98059, un inhibiteur de MEK1, s'est révélé capable de retarder le développement de la dilatation du ventricule gauche (Muchir *et al.*, 2008). Il a en plus été montré en parallèle qu'une inhibition de la voie ERK, alliée à une activation de la voie PI3K/Akt, améliorait la différenciation des myoblastes murins exprimant une lamine A mutée (Favreau *et al.*, 2008). Il a par ailleurs été montré que le Magic-F1 (Met-Activating Genetically Improved Chimeric Factor-1), une protéine synthétique dérivée de l'HGF mais possédant une affinité moindre pour son récepteur Met, en activant la voie Akt,

permettait une amélioration du phénotype dystrophique des souris déficientes en α-SG (Cassano *et al.*, 2008). Concernant la DMD, un traitement avec de l'Imatinib mesilate (Gleevec®), un inhibiteur des tyrosine kinases et de l'activité profibrogénique du TGF-β, s'est révélé capable d'améliorer le phénotype de souris *mdx* entraînées (Cerri et al., 2007, communication au XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology). Une activation de ERK pourrait enfin avoir des effets bénéfiques dans la DMD (mis à part son rôle déjà évoqué dans l'hypertrophie compensatoire) en activant le gène de l'utrophine (Gyrd-Hansen *et al.*, 2002).

La recherche sur les inhibiteurs de PTEN se sont faites essentiellement dans le cadre du diabète de type 2, caractérisé par une résistance à l'insuline et où une inhibition de la phosphatase serait souhaitable. Une petite molécule inhibitrice spécifique, le VO-OHpic (3-hydroxypicolinate vanadium (IV) complex), a été développée récemment (Rosivatz, 2007). PTEN ne semblant pas activée dans les myotubes en culture, même à un stade très différencié, il faudrait envisager de tester les inhibiteurs sur fibres isolées. Cependant, dans le cas où une inhibition de PTEN serait par la suite envisagée chez les patients DMD, les effets tumorigènes indésirables d'un tel traitement seraient à craindre. Une étude récente a élaboré une hypothèse selon laquelle le ciblage de la sous-population de PTEN responsable de la signalisation dans la voie de l'insuline pourrait permettre d'envisager un traitement n'ayant pas d'effets tumorigènes. Cette étude portait sur l'inhibition de PTEN dans le cadre du diabète, mais la compréhension croissante de la régulation de PTEN laisse supposer que des traitements inhibiteurs pourraient un jour être utilisés en thérapie (Wang&Jiang, 2008).

10. Conclusion

En conclusion, suite à la mise en évidence d'une atteinte profonde des deux branches de la voie PI3K/Akt dans le muscle GRMD, nous avons pu démontrer qu'une activation de la phosphatase PTEN en était à l'origine. Il est fort probable que cette dérégulation empêche ou limite fortement l'hypertrophie compensatoire dans le muscle canin et aggrave fortement les conséquences de l'absence de dystrophine. Trois perspectives majeures se dégagent de cette étude : 1) l'étude du statut de PTEN et de la voie PI3K/Akt dans les biopsies DMD, 2) l'étude d'autres modèles de dystrophie musculaire, pour tenter d'élucider les mécanismes à l'origine de la dérégulation de PTEN et 3) si l'atteinte de PTEN se confirme dans les biopsies DMD, la recherche d'inhibiteurs permettant d'induire une signalisation activant l'hypertrophie.

Références bibliographiques

A

Acharyya, S., Butchbach, M. E., Sahenk, Z., Wang, H., Saji, M., Carathers, M., Ringel, M. D., Skipworth, R. J., Fearon, K. C., Hollingsworth, M. A., Muscarella, P., Burghes, A. H., Rafael-Fortney, J. A. and Guttridge, D. C. (2005) -Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell*, **8**, 5, 421-32.

Acharyya, S., Villalta, S. A., Bakkar, N., Bupha-Intr, T., Janssen, P. M., Carathers, M., Li, Z. W., Beg, A. A., Ghosh, S., Sahenk, Z., Weinstein, M., Gardner, K. L., Rafael-Fortney, J. A., Karin, M., Tidball, J. G., Baldwin, A. S. and Guttridge, D. C. (2007) -Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*, **117**, 4, 889-901.

Aguilar, V., Alliouachene, S., Sotiropoulos, A., Sobering, A., Athea, Y., Djouadi, F., Miraux, S., Thiaudiere, E., Foretz, M., Viollet, B., Diolez, P., Bastin, J., Benit, P., Rustin, P., Carling, D., Sandri, M., Ventura-Clapier, R. and Pende, M. (2007) -S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase. *Cell Metab*, **5**, 6, 476-87.

Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R. and White, M. F. (2000) -The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, **275**, 12, 9047-54.

Al-Khouri, A. M., Ma, Y., Togo, S. H., Williams, S. and Mustelin, T. (2005) -Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem*, **280**, 42, 35195-202.

Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R., Reese, C. B. and Cohen, P. (1997) -Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*, **7**, 4, 261-9.

Alessi, D. R., Kozlowski, M. T., Weng, Q. P., Morrice, N. and Avruch, J. (1998) -3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr Biol*, **8**, 2, 69-81.

Amirouche, A., Durieux, A. C., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Mouret, C., Bigard, X., Peinnequin, A. and Freyssenet, D. (2008) -Down-regulation of Akt/mTOR signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*,

Arthuis, M., Pinsard, N. and Ponsot, G. (1990) -Neurologie pédiatrique. *Med. Sci*, **1**, 445-448.

Auda-Boucher, G., Rouaud, T., Lafoux, A., Levitsky, D., Huchet-Cadiou, C., Feron, M., Guevel, L., Talon, S., Fontaine-Perus, J. and Gardahaut, M. F. (2007) -Fetal muscle-derived cells can repair dystrophic muscles in mdx mice. *Exp Cell Res*, **313**, 5, 997-1007.

B

Baghdiguian, S., Martin, M., Richard, I., Pons, F., Astier, C., Bourg, N., Hay, R. T., Chemaly, R., Halaby, G., Loiselet, J., Anderson, L. V., Lopez de Munain, A., Fardeau, M., Mangeat, P., Beckmann, J. S. and Lefranc, G. (1999) -Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med*, **5**, 5, 503-11.

Bakay, M., Zhao, P., Chen, J. and Hoffman, E. P. (2002) -A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul Disord*, **12 Suppl 1**, S125-41.
Barbujani, G., Russo, A., Danieli, G. A., Spiegler, A. W., Borkowska, J. and Petrusewicz, I. H. (1990) -Segregation analysis of 1885 DMD families: significant departure from the expected proportion of sporadic cases. *Hum Genet*, **84**, 6, 522-6.
Bartoli, M. and Richard, I. (2005) -Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 10, 2115-33.
Barton, E. R., Morris, L., Musaro, A., Rosenthal, N. and Sweeney, H. L. (2002) -Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol*, **157**, 1, 137-48.
Becker, P. E. and Kiener, F. (1955) -[A new x-chromosomal muscular dystrophy.]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr*, **193**, 4, 427-48.
Beggs, A. H., Koenig, M., Boyce, F. M. and Kunkel, L. M. (1990) -Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet*, **86**, 1, 45-8.
Benabdallah, B. F., Bouchentouf, M., Rousseau, J., Bigey, P., Michaud, A., Chapdelaine, P., Scherman, D. and Tremblay, J. P. (2008) -Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice. *Cell Transplant*, **17**, 3, 337-50.
Benayoun, B., Baghdiguian, S., Lajmanovich, A., Bartoli, M., Daniele, N., Gicquel, E., Bourg, N., Raynaud, F., Pasquier, M. A., Suel, L., Lochmuller, H., Lefranc, G. and Richard, I. (2008) -NF-kappaB-dependent expression of the antiapoptotic factor c-FLIP is regulated by calpain 3, the protein involved in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Faseb J*, **22**, 5, 1521-9.
Benchaouir, R., Meregalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., Battistelli, M., Bresolin, N., Bottinelli, R., Garcia, L. and Torrente, Y. (2007) -Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell*, **1**, 6, 646-57.
Berthon, P., Duguez, S., Favier, F. B., Amirouche, A., Feasson, L., Vico, L., Denis, C. and Freyssenet, D. (2007) -Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflugers Arch*, **454**, 4, 625-33.
Blero, D., Payrastre, B., Schurmans, S. and Erneux, C. (2007) -Phosphoinositide phosphatases in a network of signalling reactions. *Pflugers Arch*, **455**, 1, 31-44.
Bobet, J., Mooney, R. F. and Gordon, T. (1998) -Force and stiffness of old dystrophic (mdx) mouse skeletal muscles. *Muscle Nerve*, **21**, 4, 536-9.
Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J. and Yancopoulos, G. D. (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.
Bogdanovich, S., Krag, T. O., Barton, E. R., Morris, L. D., Whittemore, L. A., Ahima, R. S. and Khurana, T. S. (2002) -Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, **420**, 6914, 418-21.
Bonilla, E., Samitt, C. E., Miranda, A. F., Hays, A. P., Salviati, G., DiMauro, S., Kunkel, L. M., Hoffman, E. P. and Rowland, L. P. (1988) -Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell*, **54**, 4, 447-52.
Bowe, M. A., Deyst, K. A., Leszyk, J. D. and Fallon, J. R. (1994) -Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans. *Neuron*, **12**, 5, 1173-80.
Boyce, F. M., Beggs, A. H., Feener, C. and Kunkel, L. M. (1991) -Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4, 1276-80.

Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K. and Bredt, D. S. (1995) -Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, **82**, 5, 743-52.
Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C. and Bredt, D. S. (1996) -Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*, **84**, 5, 757-67.
Brown, R. H., Jr. and Hoffman, E. P. (1988) -Molecular biology of Duchenne muscular dystrophy. *Trends Neurosci*, **11**, 11, 480-4.
Brown, S. C., Fassati, A., Popplewell, L., Page, A. M., Henry, M. D., Campbell, K. P. and Dickson, G. (1999) -Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle alpha-dystroglycan-laminin interaction. *J Cell Sci*, **112 (Pt 2)**, 209-16.
Brunelli, S., Sciorati, C., D'Antona, G., Innocenzi, A., Covarello, D., Galvez, B. G., Perrotta, C., Monopoli, A., Sanvito, F., Bottinelli, R., Ongini, E., Cossu, G. and Clementi, E. (2007) -Nitric oxide release combined with nonsteroidal antiinflammatory activity prevents muscular dystrophy pathology and enhances stem cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 1, 264-9.
Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999) -Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, **96**, 6, 857-68.
Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. G. and Moore, K. J. (1984) -X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 1189-1192.
Bushby, K., Muntoni, F., Urtizberea, A., Hughes, R. and Griggs, R. (2004) -Report on the 124th ENMC International Workshop. Treatment of Duchenne muscular dystrophy; defining the gold standards of management in the use of corticosteroids. 2-4 April 2004, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord*, **14**, 8-9, 526-34.

C

Campanelli, J. T., Roberds, S. L., Campbell, K. P. and Scheller, R. H. (1994) -A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell*, **77**, 5, 663-74.
Campbell, K. P. and Kahl, S. D. (1989) -Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, **338**, 6212, 259-62.
Campbell, K. P. and Crosbie, R. H. (1996) -Muscular dystrophy. Utrophin to the rescue. *Nature*, **384**, 6607, 308-9.
Carlson, C. G., Samadi, A. and Siegel, A. (2005) -Chronic treatment with agents that stabilize cytosolic IkappaB-alpha enhances survival and improves resting membrane potential in MDX muscle fibers subjected to chronic passive stretch. *Neurobiol Dis*, **20**, 3, 719-30.
Carnwath, J. W. and Shotton, D. M. (1987) -Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci*, **80**, 1, 39-54.
Carpenter, S., Karpati, G., Zubrzycka-Gaarn, E., Bulman, D. E., Ray, P. N. and Worton, R. G. (1990) -Dystrophin is localized to the plasma membrane of human skeletal muscle fibers by electron-microscopic cytochemical study. *Muscle Nerve*, **13**, 5, 376-80.
Caselli, A., Mazzinghi, B., Camici, G., Manao, G. and Ramponi, G. (2002) -Some protein tyrosine phosphatases target in part to lipid rafts and interact with caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 3, 692-7.

Cassano, M., Biressi, S., Finan, A., Benedetti, L., Omes, C., Boratto, R., Martin, F., Allegretti, M., Broccoli, V., Cusella De Angelis, G., Comoglio, P. M., Basilico, C., Torrente, Y., Michieli, P., Cossu, G. and Sampaolesi, M. (2008) -Magic-factor 1, a partial agonist of Met, induces muscle hypertrophy by protecting myogenic progenitors from apoptosis. *PLoS ONE*, **3**, 9, e3223.

Cavaldesi, M., Macchia, G., Barca, S., Defilippi, P., Tarone, G. and Petrucci, T. C. (1999) -Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *J Neurochem*, **72**, 4, 1648-55.

Cerletti, M., Negri, T., Cozzi, F., Colpo, R., Andreetta, F., Croci, D., Davies, K. E., Cornelio, F., Pozza, O., Karpati, G., Gilbert, R. and Mora, M. (2003) -Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer. *Gene Ther*, **10**, 9, 750-7.

Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Ranier, J. E., Nguyen, P. N. and Caskey, C. T. (1988) -Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, **16**, 23, 11141-56.

Chang, W. J., Iannaccone, S. T., Lau, K. S., Masters, B. S., McCabe, T. J., McMillan, K., Padre, R. C., Spencer, M. J., Tidball, J. G. and Stull, J. T. (1996) -Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 17, 9142-7.

Chen, Y. W., Zhao, P., Borup, R. and Hoffman, E. P. (2000) -Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol*, **151**, 6, 1321-36.

Chen, Y. W., Nagaraju, K., Bakay, M., McIntyre, O., Rawat, R., Shi, R. and Hoffman, E. P. (2005) -Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, **65**, 6, 826-34.

Cheng, J. Q., Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tsichlis, P. N. and Testa, J. R. (1992) -AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 19, 9267-71.

Chiu, R. C., Zibaitis, A. and Kao, R. L. (1995) -Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg*, **60**, 1, 12-8.

Choi, K. M., McMahon, L. P. and Lawrence, J. C., Jr. (2003) -Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor. *J Biol Chem*, **278**, 22, 19667-73.

Chung, J., Grammer, T. C., Lemon, K. P., Kazlauskas, A. and Blenis, J. (1994) -PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*, **370**, 6484, 71-5.

Collins, C. A. and Morgan, J. E. (2003) -Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol*, **84**, 4, 165-72.

Cooper, B. J., Winand, N. J., Stedman, H., Valentine, B. A., Hoffman, E. P., Kunkel, L. M., Scott, M. O., Fischbeck, K. H., Kornegay, J. N., Avery, R. J. and et al. (1988) -The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature*, **334**, 6178, 154-6.

Cooper, B. J., Gallagher, E. A., Smith, C. A., Valentine, B. A. and Winand, N. J. (1990) -Mosaic expression of dystrophin in carriers of canine X-linked muscular dystrophy. *Lab Invest*, **62**, 2, 171-8.

Cossu, G. and Sampaolesi, M. (2007) -New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol Med*, **13**, 12, 520-6.

Coulton, G. R., Morgan, J. E., Partridge, T. A. and Sloper, J. C. (1988) -The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, **14**, 1, 53-70.
Crosbie, R. H., Heighway, J., Venzke, D. P., Lee, J. C. and Campbell, K. P. (1997) -Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem*, **272**, 50, 31221-4.
Crosbie, R. H., Straub, V., Yun, H. Y., Lee, J. C., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S., Dawson, V. L., Dawson, T. M. and Campbell, K. P. (1998a) -mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation. *Hum Mol Genet*, **7**, 5, 823-9.
Crosbie, R. H., Yamada, H., Venzke, D. P., Lisanti, M. P. and Campbell, K. P. (1998b) -Caveolin-3 is not an integral component of the dystrophin glycoprotein complex. *FEBS Lett*, **427**, 2, 279-82.
Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A. (1995) -Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 6559, 785-9.

D

Davies, K. E. and Grounds, M. D. (2006) -Treating muscular dystrophy with stem cells? *Cell*, **127**, 7, 1304-6.
Davies, K. E. and Nowak, K. J. (2006) -Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 10, 762-73.
Davis, R. J. (2000) -Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 2, 239-52.
Davison, M. D. and Critchley, D. R. (1988) -alpha-Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats. *Cell*, **52**, 2, 159-60.
De la Porte, S., Morin, S. and Koenig, J. (1999) -Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int Rev Cytol.*, **191**, 99-148.
de Laurentiis, A., Donovan, L. and Arcaro, A. (2007) -Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *Open Biochem J*, **1**, 12-32.
De Virgilio, C. and Loewith, R. (2006) -Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene*, **25**, 48, 6392-415.
Deconinck, N. and Dan, B. (2007) -Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*, **36**, 1, 1-7.
Den Dunnen, J. T., Grootscholten, P. M., Bakker, E., Blonden, L. A., Ginjaar, H. B., Wapenaar, M. C., van Paassen, H. M., van Broeckhoven, C., Pearson, P. L. and van Ommen, G. J. (1989) -Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet*, **45**, 6, 835-47.
DiMario, J. X., Uzman, A. and Strohman, R. C. (1991) -Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle. *Dev Biol*, **148**, 1, 314-21.
Disatnik, M. H., Dhawan, J., Yu, Y., Beal, M. F., Whirl, M. M., Franco, A. A. and Rando, T. A. (1998) -Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci*, **161**, 1, 77-84.
Dogra, C., Changotra, H., Wergedal, J. E. and Kumar, A. (2006) -Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in dystrophin-deficient skeletal muscle in response to mechanical stretch. *J Cell Physiol*, **208**, 3, 575-85.

Dogra, C., Srivastava, D. S. and Kumar, A. (2008) -Protein-DNA array-based identification of transcription factor activities differentially regulated in skeletal muscle of normal and dystrophin-deficient mdx mice. *Mol Cell Biochem*, **312**, 1-2, 17-24.
Doran, P., Martin, G., Dowling, P., Jockusch, H. and Ohlendieck, K. (2006) -Proteome analysis of the dystrophin-deficient MDX diaphragm reveals a drastic increase in the heat shock protein cvHSP. *Proteomics*, **6**, 16, 4610-21.
Dowling, P., Doran, P. and Ohlendieck, K. (2004) -Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427 (dystrophin of 427 kDa)-deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy. *Biochem J*, **379**, Pt 2, 479-88.
Duchenne, GBA. (1868) -Recherche sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myosclérosique. *Arch. Gen. Med*, **11**, 5-25, 179-209, 305-321, 421-423, 552-588.
Durieux, A. C., Amirouche, A., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Pasdeloup, M., Mouret, C., Bigard, X., Peinnequin, A. and Freyssenet, D. (2007) -Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology*, **148**, 7, 3140-7.

E

Einbond, A. and Sudol, M. (1996) -Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Lett*, **384**, 1, 1-8.
Emery, A. (1993) -Duchenne muscular dystrophy. 2nd ed. *Oxford Monographs on Medical Genetics*, **24**, Oxford : Oxford University Press.
Emery, A. (2001) -Duchenne muscular dystrophy or Meryon's disease. *Lancet*, **357**, 9267, 1529.
Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G. and Campbell, K. P. (1990) -Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, **345**, 6273, 315-9.
Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. (1991) -Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, **66**, 6, 1121-31.
Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. (1993) -A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*, **122**, 4, 809-23.
Ettinger, A. J., Feng, G. and Sanes, J. R. (1997) -epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem*, **272**, 51, 32534-8.

F

Favier, F. B., Benoit, H. and Freyssenet, D. (2008) -Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch*, **456**, 3, 587-600.
Favreau, C., Delbarre, E., Courvalin, J. C. and Buendia, B. (2008) -Differentiation of C2C12 myoblasts expressing lamin A mutated at a site responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy is improved by inhibition of the MEK-ERK pathway and stimulation of the PI3-kinase pathway. *Exp Cell Res*, **314**, 6, 1392-405.
Ferrer, A., Foster, H., Wells, K. E., Dickson, G. and Wells, D. J. (2004) -Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins. *Gene Ther*, **11**, 11, 884-93.
Fox, T. E., Houck, K. L., O'Neill, S. M., Nagarajan, M., Stover, T. C., Pomianowski, P. T., Unal, O., Yun, J. K., Naides, S. J. and Kester, M. (2007) -Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J Biol Chem*, **282**, 17, 12450-7.

Frost, R. A. and Lang, C. H. (2007) -Protein kinase B/Akt: a nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass. *J Appl Physiol*, **103**, 1, 378-87.

G

Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M. P. (2001) -Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol Med*, **7**, 10, 435-41.
Galvez, B. G., Sampaolesi, M., Brunelli, S., Covarello, D., Gavina, M., Rossi, B., Constantin, G., Torrente, Y. and Cossu, G. (2006) -Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*, **174**, 2, 231-43.
Ge, Y., Molloy, M. P., Chamberlain, J. S. and Andrews, P. C. (2003) -Proteomic analysis of mdx skeletal muscle: Great reduction of adenylate kinase 1 expression and enzymatic activity. *Proteomics*, **3**, 10, 1895-903.
Ge, Y., Molloy, M. P., Chamberlain, J. S. and Andrews, P. C. (2004) -Differential expression of the skeletal muscle proteome in mdx mice at different ages. *Electrophoresis*, **25**, 15, 2576-85.
Gee, S. H., Montanaro, F., Lindenbaum, M. H. and Carbonetto, S. (1994) -Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell*, **77**, 5, 675-86.
Glass, D. J. (2005a) -Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 10, 1974-84.
Glass, D. J. (2005b) -A signaling role for dystrophin: inhibiting skeletal muscle atrophy pathways. *Cancer Cell*, **8**, 5, 351-2.
Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J. C., Garcia, L. and Danos, O. (2004) -Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*, **306**, 5702, 1796-9.
Gramolini, A. O. and Jasmin, B. J. (1997) -Duchenne muscular dystrophy and the neuromuscular junction: the utrophin link. *Bioessays*, **19**, 9, 747-50.
Grefte, S., Kuijpers-Jagtman, A. M., Torensma, R. and Von den Hoff, J. W. (2007) -Skeletal muscle development and regeneration. *Stem Cells Dev*, **16**, 5, 857-68.
Gregorevic, P., Plant, D. R., Leeding, K. S., Bach, L. A. and Lynch, G. S. (2002) -Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. *Am J Pathol*, **161**, 6, 2263-72.
Gregorevic, P., Plant, D. R. and Lynch, G. S. (2004) -Administration of insulin-like growth factor-I improves fatigue resistance of skeletal muscles from dystrophic mdx mice. *Muscle Nerve*, **30**, 3, 295-304.
Grounds, M. D. and Davies, K. E. (2007) -The allure of stem cell therapy for muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, **17**, 3, 206-8.
Gyrd-Hansen, M., Krag, T. O., Rosmarin, A. G. and Khurana, T. S. (2002) -Sp1 and the ets-related transcription factor complex GABP alpha/beta functionally cooperate to activate the utrophin promoter. *J Neurol Sci*, **197**, 1-2, 27-35.

H

Hack, A. A., Groh, M. E. and McNally, E. M. (2000) -Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech*, **48**, 3-4, 167-80.
Haddad, F. and Adams, G. R. (2004) -Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-I-induced hypertrophy in rat muscles. *J Appl Physiol*, **96**, 1, 203-10.
Hagiwara, Y., Sasaoka, T., Araishi, K., Imamura, M., Yorifuji, H., Nonaka, I., Ozawa, E. and Kikuchi, T. (2000) -Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum Mol Genet*, **9**, 20, 3047-54.

Haidet, A. M., Rizo, L., Handy, C., Umapathi, P., Eagle, A., Shilling, C., Boue, D., Martin, P. T., Sahenk, Z., Mendell, J. R. and Kaspar, B. K. (2008) -Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 11, 4318-22.

Hajduch, E., Turban, S., Le Liepvre, X., Le Lay, S., Lipina, C., Dimopoulos, N., Dugail, I. and Hundal, H. S. (2008) -Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem J*, **410**, 2, 369-79.

Hantai, D., Labat-Robert, J., Grimaud, J. A. and Fardeau, M. (1985) -Fibronectin, laminin, type I, III and IV collagens in Duchenne's muscular dystrophy, congenital muscular dystrophies and congenital myopathies: an immunocytochemical study. *Connect Tissue Res*, **13**, 4, 273-81.

Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M. T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q. P., Kasuga, M., Nishimoto, I. and Avruch, J. (1997) -Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem*, **272**, 42, 26457-63.

Hartigan-O'Connor, D. and Chamberlain, J. S. (2000) -Developments in gene therapy for muscular dystrophy. *Microsc Res Tech*, **48**, 3-4, 223-38.

Haslett, J. N., Sanoudou, D., Kho, A. T., Bennett, R. R., Greenberg, S. A., Kohane, I. S., Beggs, A. H. and Kunkel, L. M. (2002) -Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 23, 15000-5.

Haslett, J. N., Sanoudou, D., Kho, A. T., Han, M., Bennett, R. R., Kohane, I. S., Beggs, A. H. and Kunkel, L. M. (2003) -Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. *Neurogenetics*, **4**, 4, 163-71.

Helliwell, T. R., Jackson, M. J., Phoenix, J., MacLennan, P., West-Jordan, J. and Edwards, R. H. (1994) -Immunohistochemical and biochemical indicators of muscle damage in vitro: the stability of control muscle and the effects of dinitrophenol and calcium ionophore. *Int J Exp Pathol*, **75**, 5, 329-43.

Hirawat, S., Welch, E. M., Elfring, G. L., Northcutt, V. J., Paushkin, S., Hwang, S., Leonard, E. M., Almstead, N. G., Ju, W., Peltz, S. W. and Miller, L. L. (2007) -Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol*, **47**, 4, 430-44.

Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr. and Kunkel, L. M. (1987) -Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, **51**, 6, 919-28.

Hoffman, E. P., Fischbeck, K. H., Brown, R. H., Johnson, M., Medori, R., Loike, J. D., Harris, J. B., Waterston, R., Brooke, M., Specht, L. and et al. (1988) -Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, **318**, 21, 1363-8.

Hoffman, E. P. and Kunkel, L. M. (1989) -Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron*, **2**, 1, 1019-29.

Howard, M. T., Anderson, C. B., Fass, U., Khatri, S., Gesteland, R. F., Atkins, J. F. and Flanigan, K. M. (2004) -Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann Neurol*, **55**, 3, 422-6.

Hresko, R. C. and Mueckler, M. (2005) -mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, **280**, 49, 40406-16.

Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M. and Eck, M. J. (2000) -Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol*, **7**, 8, 634-8.

I

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W. and Campbell, K. P. (1992) -Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, **355**, 6362, 696-702.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. and Guan, K. L. (2002) -TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, **4**, 9, 648-57.

Ishihara, H., Sasaoka, T., Kagawa, S., Murakami, S., Fukui, K., Kawagishi, Y., Yamazaki, K., Sato, A., Iwata, M., Urakaze, M., Ishiki, M., Wada, T., Yaguchi, S., Tsuneki, H., Kimura, I. and Kobayashi, M. (2003) -Association of the polymorphisms in the 5'-untranslated region of PTEN gene with type 2 diabetes in a Japanese population. *FEBS Lett*, **554**, 3, 450-4.

Izumiya, Y., Hopkins, T., Morris, C., Sato, K., Zeng, L., Viereck, J., Hamilton, J. A., Ouchi, N., LeBrasseur, N. K. and Walsh, K. (2008) -Fast/Glycolytic muscle fiber growth reduces fat mass and improves metabolic parameters in obese mice. *Cell Metab*, **7**, 2, 159-72.

J

Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. and Verfaillie, C. M. (2002) -Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, **418**, 6893, 41-9.

Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F. and Hemmings, B. A. (1991) -Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10, 4171-5.

Jouvion, G., Rouger, K., Fornasari, B., Bougras, G., Leroux, I., Segalen, J. and Cherel, Y. (2006) -Functional properties of muscle-derived cells related to morphological characteristics. *Histochem Cell Biol*, **126**, 5, 603-16.

K

Khurana, T. S., Watkins, S. C., Chafey, P., Chelly, J., Tome, F. M., Fardeau, M., Kaplan, J. C. and Kunkel, L. M. (1991) -Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*, **1**, 3, 185-94.

Khurana, T. S. and Davies, K. E. (2003) -Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 5, 379-90.

Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C. and Kunkel, L. M. (1987) -Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, **50**, 3, 509-17.

Koenig, M., Monaco, A. P. and Kunkel, L. M. (1988) -The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, **53**, 2, 219-28.

Koenig, M., Beggs, A. H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C. R., Lindlof, M., Kaariainen, H. and et al. (1989) -The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet*, **45**, 4, 498-506.

Koenig, M. and Kunkel, L. M. (1990) -Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*, **265**, 8, 4560-6.

Kolodziejczyk, S. M., Walsh, G. S., Balazsi, K., Seale, P., Sandoz, J., Hierlihy, A. M., Rudnicki, M. A., Chamberlain, J. S., Miller, F. D. and Megeney, L. A. (2001) -Activation of JNK1 contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Curr Biol*, **11**, 16, 1278-82.
Konishi, H., Kuroda, S., Tanaka, M., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kameyama, K., Haga, T. and Kikkawa, U. (1995) -Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 2, 526-34.
Kornegay, J. N., Tuler, S. M., Miller, D. M. and Levesque, D. C. (1988) -Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve*, **11**, 10, 1056-64.
Kramarcy, N. R., Vidal, A., Froehner, S. C. and Sealock, R. (1994) -Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *J Biol Chem*, **269**, 4, 2870-6.
Kumar, A. and Boriek, A. M. (2003) -Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *Faseb J*, **17**, 3, 386-96.
Kumar, A., Khandelwal, N., Malya, R., Reid, M. B. and Boriek, A. M. (2004) -Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. *Faseb J*, **18**, 1, 102-13.
Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Middlesworth, W., Ochs, H. D. and Latt, S. A. (1985) -Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 14, 4778-82.

L

Laemmli, U. K. (1970) -Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 5259, 680-5.
Lai, K. M., Gonzalez, M., Poueymirou, W. T., Kline, W. O., Na, E., Zlotchenko, E., Stitt, T. N., Economides, A. N., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J. (2004) -Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol*, **24**, 21, 9295-304.
Lalic, T., Vossen, R. H., Coffa, J., Schouten, J. P., Guc-Scekic, M., Radivojevic, D., Djurisic, M., Breuning, M. H., White, S. J. and den Dunnen, J. T. (2005) -Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet*, **13**, 11, 1231-4.
Lang, J. M., Esser, K. A. and Dupont-Versteegden, E. E. (2004) -Altered activity of signaling pathways in diaphragm and tibialis anterior muscle of dystrophic mice. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229**, 6, 503-11.
Langenbach, K. J. and Rando, T. A. (2002) -Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle Nerve*, **26**, 5, 644-53.
Lapidos, K. A., Kakkar, R. and McNally, E. M. (2004) -The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res*, **94**, 8, 1023-31.
Latres, E., Amini, A. R., Amini, A. A., Griffiths, J., Martin, F. J., Wei, Y., Lin, H. C., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J. (2005) -Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. *J Biol Chem*, **280**, 4, 2737-44.
Le Grand, F. and Rudnicki, M. A. (2007) -Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 6, 628-33.

Lee-Pullen, T. F., Bennett, A. L., Beilharz, M. W., Grounds, M. D. and Sammels, L. M. (2004) -Superior survival and proliferation after transplantation of myoblasts obtained from adult mice compared with neonatal mice. *Transplantation*, **78**, 8, 1172-6.
Lee, Y. H., Giraud, J., Davis, R. J. and White, M. F. (2003) -c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem*, **278**, 5, 2896-902.
Lefaucheur, J. P., Pastoret, C. and Sebille, A. (1995) -Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec*, **242**, 1, 70-6.
Lescaut, W., Butori, C., Soriani, M. H. and Desnuelles, C. (2004) -[Report of four women with Duchenne or Becker muscular dystrophy]. *Rev Med Interne*, **25**, 6, 464-7.
Leslie, N. R. and Downes, C. P. (2002) -PTEN: The down side of PI 3-kinase signalling. *Cell Signal*, **14**, 4, 285-95.
Li, J. and Johnson, S. E. (2006) -ERK2 is required for efficient terminal differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **345**, 4, 1425-33.
Liaw, D., Marsh, D. J., Li, J., Dahia, P. L., Wang, S. I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K. M., Tsou, H. C., Peacocke, M., Eng, C. and Parsons, R. (1997) -Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*, **16**, 1, 64-7.
Lloyd, A. C. (2006) -Distinct functions for ERKs? *J Biol*, **5**, 5, 13.
Lorain, S., Gross, D. A., Goyenvalle, A., Danos, O., Davoust, J. and Garcia, L. (2008) -Transient immunomodulation allows repeated injections of AAV1 and correction of muscular dystrophy in multiple muscles. *Mol Ther*, **16**, 3, 541-7.
Louboutin, J. P., Fichter-Gagnepain, V., Thaon, E. and Fardeau, M. (1993) -Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hindlimb muscles. *Neuromuscul Disord*, **3**, 5-6, 463-9.
Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, G., Spurr, N. K., Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H. and Davies, K. E. (1989) -An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature*, **339**, 6219, 55-8.
Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) -Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 1, 265-75.

M

Madhavan, R., Massom, L. R. and Jarrett, H. W. (1992) -Calmodulin specifically binds three proteins of the dystrophin-glycoprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun*, **185**, 2, 753-9.
Madhavan, R. and Jarrett, H. W. (1999) -Phosphorylation of dystrophin and alpha-syntrophin by Ca(2+)-calmodulin dependent protein kinase II. *Biochim Biophys Acta*, **1434**, 2, 260-74.
Maehama, T. and Dixon, J. E. (1998) -The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, **273**, 22, 13375-8.
Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S. J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., Goldberg, A. L., Schiaffino, S. and Sandri, M. (2007) -FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*, **6**, 6, 458-71.
Mann, C. J., Honeyman, K., Cheng, A. J., Ly, T., Lloyd, F., Fletcher, S., Morgan, J. E., Partridge, T. A. and Wilton, S. D. (2001) -Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1, 42-7.

Marelli, D., Desrosiers, C., el-Alfy, M., Kao, R. L. and Chiu, R. C. (1992) -Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant*, **1**, 6, 383-90.
Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E. and von der Mark, K. (1997) -Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet*, **17**, 3, 318-23.
McKay, M. M. and Morrison, D. K. (2007) -Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, **26**, 22, 3113-21.
McNally, E. M., de Sa Moreira, E., Duggan, D. J., Bonnemann, C. G., Lisanti, M. P., Lidov, H. G., Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., Hoffman, E. P., Zatz, M. and Kunkel, L. M. (1998a) -Caveolin-3 in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, **7**, 5, 871-7.
McNally, E. M., Ly, C. T. and Kunkel, L. M. (1998b) -Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett*, **422**, 1, 27-32.
Messina, S., Altavilla, D., Aguennouz, M., Seminara, P., Minutoli, L., Monici, M. C., Bitto, A., Mazzeo, A., Marini, H., Squadrito, F. and Vita, G. (2006a) -Lipid peroxidation inhibition blunts nuclear factor-kappaB activation, reduces skeletal muscle degeneration, and enhances muscle function in mdx mice. *Am J Pathol*, **168**, 3, 918-26.
Messina, S., Bitto, A., Aguennouz, M., Minutoli, L., Monici, M. C., Altavilla, D., Squadrito, F. and Vita, G. (2006b) -Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp Neurol*, **198**, 1, 234-41.
Michalak, M., Fu, S. Y., Milner, R. E., Busaan, J. L. and Hance, J. E. (1996) -Phosphorylation of the carboxyl-terminal region of dystrophin. *Biochem Cell Biol*, **74**, 4, 431-7.
Mieulet, V., Roceri, M., Espeillac, C., Sotiropoulos, A., Ohanna, M., Oorschot, V., Klumperman, J., Sandri, M. and Pende, M. (2007) -S6 kinase inactivation impairs growth and translational target phosphorylation in muscle cells maintaining proper regulation of protein turnover. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, 2, C712-22.
Millward, T. A., Zolnierowicz, S. and Hemmings, B. A. (1999) -Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci*, **24**, 5, 186-91.
Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A., Volonte, D., Galbiati, F., Cordone, G., Bricarelli, F. D., Lisanti, M. P. and Zara, F. (1998) -Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*, **18**, 4, 365-8.
Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Middlesworth, W., Colletti, C. A., Aldridge, J., Fischbeck, K. H., Bartlett, R., Pericak-Vance, M. A., Roses, A. D. and Kunkel, L. M. (1985) -Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature*, **316**, 6031, 842-5.
Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M. and Kunkel, L. M. (1986) -Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, **323**, 6089, 646-50.
Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Liechti-Gallati, S., Moser, H. and Kunkel, L. M. (1988) -An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, **2**, 1, 90-5.
Monici, M. C., Aguennouz, M., Mazzeo, A., Messina, C. and Vita, G. (2003) -Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, **60**, 6, 993-7.

Mouly, V., Aamiri, A., Perie, S., Mamchaoui, K., Barani, A., Bigot, A., Bouazza, B., Francois, V., Furling, D., Jacquemin, V., Negroni, E., Riederer, I., Vignaud, A., St Guily, J. L. and Butler-Browne, G. S. (2005) -Myoblast transfer therapy: is there any light at the end of the tunnel? *Acta Myol*, **24**, 2, 128-33.
Muchir, A., Pavlidis, P., Bonne, G., Hayashi, Y. K. and Worman, H. J. (2007a) -Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, **16**, 15, 1884-95.
Muchir, A., Pavlidis, P., Decostre, V., Herron, A. J., Arimura, T., Bonne, G. and Worman, H. J. (2007b) -Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest*, **117**, 5, 1282-93.
Muchir, A., Shan, J., Bonne, G., Lehnart, S. E. and Worman, H. J. (2008) -Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins. *Hum Mol Genet*,
Mukhopadhyay, N. K., Price, D. J., Kyriakis, J. M., Pelech, S., Sanghera, J. and Avruch, J. (1992) -An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J Biol Chem*, **267**, 5, 3325-35.
Muntoni, F., Torelli, S. and Brockington, M. (2008) -Muscular dystrophies due to glycosylation defects. *Neurotherapeutics*, **5**, 4, 627-32.

N

Nakamura, A., Yoshida, K., Ueda, H., Takeda, S. and Ikeda, S. (2005) -Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. *Biochim Biophys Acta*, **1740**, 3, 326-31.
Nakatani, M., Takehara, Y., Sugino, H., Matsumoto, M., Hashimoto, O., Hasegawa, Y., Murakami, T., Uezumi, A., Takeda, S., Noji, S., Sunada, Y. and Tsuchida, K. (2008) -Transgenic expression of a myostatin inhibitor derived from follistatin increases skeletal muscle mass and ameliorates dystrophic pathology in mdx mice. *Faseb J*, **22**, 2, 477-87.
Nonaka, I. (1998) -Animal models of muscular dystrophies. *Lab Anim Sci*, **48**, 1, 8-17.
Nowak, K. J. and Davies, K. E. (2004) -Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep*, **5**, 9, 872-6.

O

O'Hara, A. J., Howell, J. M., Taplin, R. H., Fletcher, S., Lloyd, F., Kakulas, B., Lochmuller, H. and Karpati, G. (2001) -The spread of transgene expression at the site of gene construct injection. *Muscle Nerve*, **24**, 4, 488-95.
Oak, S. A., Russo, K., Petrucci, T. C. and Jarrett, H. W. (2001) -Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochemistry*, **40**, 37, 11270-8.
Oak, S. A., Zhou, Y. W. and Jarrett, H. W. (2003) -Skeletal muscle signaling pathway through the dystrophin glycoprotein complex and Rac1. *J Biol Chem*, **278**, 41, 39287-95.
Ohanna, M., Sobering, A. K., Lapointe, T., Lorenzo, L., Praud, C., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Kelly, P. A., Sotiropoulos, A. and Pende, M. (2005) -Atrophy of S6K1(-/-) skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control. *Nat Cell Biol*, **7**, 3, 286-94.

Ohlendieck, K., Ervasti, J. M., Matsumura, K., Kahl, S. D., Leveille, C. J. and Campbell, K. P. (1991) -Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron*, **7**, 3, 499-508.
Ozawa, E., Yoshida, M., Suzuki, A., Mizuno, Y., Hagiwara, Y. and Noguchi, S. (1995) -Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, **4 Spec No**, 1711-6.
Ozawa, E., Noguchi, S., Mizuno, Y., Hagiwara, Y. and Yoshida, M. (1998) -From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, **21**, 4, 421-38.

P

Papakonstanti, E. A., Ridley, A. J. and Vanhaesebroeck, B. (2007) -The p110delta isoform of PI 3-kinase negatively controls RhoA and PTEN. *Embo J*, **26**, 13, 3050-61.
Partridge, T. (1991) -Animal models of muscular dystrophy--what can they teach us? *Neuropathol Appl Neurobiol*, **17**, 5, 353-63.
Partridge, T. A., Morgan, J. E., Coulton, G. R., Hoffman, E. P. and Kunkel, L. M. (1989) -Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*, **337**, 6203, 176-9.
Pastoret, C. and Sebille, A. (1993) -Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice. *Neuromuscul Disord*, **3**, 5-6, 471-5.
Pastoret, C. and Sebille, A. (1995) -mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. *J Neurol Sci*, **129**, 2, 97-105.
Pawson, T. (2002) -Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer*, **38 Suppl 5**, S3-10.
Payrastre, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M. and Gratacap, M. (2001) -Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cell Signal*, **13**, 6, 377-87.
Pearce, M., Blake, D. J., Tinsley, J. M., Byth, B. C., Campbell, L., Monaco, A. P. and Davies, K. E. (1993) -The utrophin and dystrophin genes share similarities in genomic structure. *Hum Mol Genet*, **2**, 11, 1765-72.
Peault, B., Rudnicki, M., Torrente, Y., Cossu, G., Tremblay, J. P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L. M. and Huard, J. (2007) -Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*, **15**, 5, 867-77.
Pendaries, C., Tronchere, H., Plantavid, M. and Payrastre, B. (2003) -Phosphoinositide signaling disorders in human diseases. *FEBS Lett*, **546**, 1, 25-31.
Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S. C. and Thomas, G. (2004) -S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol*, **24**, 8, 3112-24.
Pende, M. (2006) -mTOR, Akt, S6 kinases and the control of skeletal muscle growth. *Bull Cancer*, **93**, 5, E39-43.
Peng, H. B., Ali, A. A., Daggett, D. F., Rauvala, H., Hassell, J. R. and Smalheiser, N. R. (1998) -The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction. *Cell Adhes Commun*, **5**, 6, 475-89.
Pescatori, M., Broccolini, A., Minetti, C., Bertini, E., Bruno, C., D'Amico, A., Bernardini, C., Mirabella, M., Silvestri, G., Giglio, V., Modoni, A., Pedemonte, M., Tasca, G., Galluzzi, G., Mercuri, E., Tonali, P. A. and Ricci, E. (2007) -Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression. *Faseb J*, **21**, 4, 1210-26.

Peter, A. K. and Crosbie, R. H. (2006) -Hypertrophic response of Duchenne and limb-girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway. *Exp Cell Res*, **312**, 13, 2580-91.
Peter, A. K., Ko, C. Y., Kim, M. H., Hsu, N., Ouchi, N., Rhie, S., Izumiya, Y., Zeng, L., Walsh, K. and Crosbie, R. H. (2008) -Myogenic Akt Signaling Upregulates the Utrophin-Glycoprotein Complex and Promotes Sarcolemma Stability in Muscular Dystrophy. *Hum Mol Genet*,
Peters, M. F., Kramarcy, N. R., Sealock, R. and Froehner, S. C. (1994) -beta 2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *Neuroreport*, **5**, 13, 1577-80.
Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M. and Sweeney, H. L. (1993) -Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8, 3710-4.
Powell, D. J., Hajduch, E., Kular, G. and Hundal, H. S. (2003) -Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol*, **23**, 21, 7794-808.
Proud, C. G. (1996) -p70 S6 kinase: an enigma with variations. *Trends Biochem Sci*, **21**, 5, 181-5.
Pullen, N., Dennis, P. B., Andjelkovic, M., Dufner, A., Kozma, S. C., Hemmings, B. A. and Thomas, G. (1998) -Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science*, **279**, 5351, 707-10.

R

Radley, H. G., De Luca, A., Lynch, G. S. and Grounds, M. D. (2007) -Duchenne muscular dystrophy: focus on pharmaceutical and nutritional interventions. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 3, 469-77.
Rafael, J. A., Tinsley, J. M., Potter, A. C., Deconinck, A. E. and Davies, K. E. (1998) -Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet*, **19**, 1, 79-82.
Ragusa, R. J., Chow, C. K. and Porter, J. D. (1997) -Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, **7**, 6-7, 379-86.
Rampoldi, E., Meola, G., Conti, A. M., Velicogna, M. and Larizza, L. (1986) -A comparative analysis of collagen III, IV, laminin and fibronectin in Duchenne muscular dystrophy biopsies and cell cultures. *Eur J Cell Biol*, **42**, 1, 27-34.
Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A. C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G. L., Polakiewicz, R. D., Sonenberg, N. and Hershey, J. W. (2004) -Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *Embo J*, **23**, 8, 1761-9.
Repetto, S., Bado, M., Broda, P., Lucania, G., Masetti, E., Sotgia, F., Carbone, I., Pavan, A., Bonilla, E., Cordone, G., Lisanti, M. P. and Minetti, C. (1999) -Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun*, **261**, 3, 547-50.
Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannilkulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C. and et al. (1995) -Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, **81**, 1, 27-40.

Richard, I., Roudaut, C., Marchand, S., Baghdiguian, S., Herasse, M., Stockholm, D., Ono, Y., Suel, L., Bourg, N., Sorimachi, H., Lefranc, G., Fardeau, M., Sebille, A. and Beckmann, J. S. (2000) -Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated IkappaBalpha/nuclear factor kappaB pathway perturbation in mice. *J Cell Biol*, **151**, 7, 1583-90.
Roberts, R. G., Gardner, R. J. and Bobrow, M. (1994) -Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum Mutat*, **4**, 1, 1-11.
Roberts, R. G. (2001) -Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol*, **2**, 4, REVIEWS3006.
Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J. (2001) -Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*, **3**, 11, 1009-13.
Rosivatz, E. (2007) -Inhibiting PTEN. *Biochem Soc Trans*, **35**, Pt 2, 257-9.
Rouger, K., Le Cunff, M., Steenman, M., Potier, M. C., Gibelin, N., Dechesne, C. A. and Leger, J. J. (2002) -Global/temporal gene expression in diaphragm and hindlimb muscles of dystrophin-deficient (mdx) mice. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, 3, C773-84.
Rouger, K., Fornasari, B., Armengol, V., Jouvion, G., Leroux, I., Dubreil, L., Feron, M., Guevel, L. and Cherel, Y. (2007) -Progenitor cell isolation from muscle-derived cells based on adhesion properties. *J Histochem Cytochem*, **55**, 6, 607-18.
Rybakova, I. N., Patel, J. R. and Ervasti, J. M. (2000) -The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol*, **150**, 5, 1209-14.

S

Sakanyan, V. (2005) -High-throughput and multiplexed protein array technology: protein-DNA and protein-protein interactions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **815**, 1-2, 77-95.
Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J. L., Galvez, B. G., Barthelemy, I., Perani, L., Mantero, S., Guttinger, M., Pansarasa, O., Rinaldi, C., Cusella De Angelis, M. G., Torrente, Y., Bordignon, C., Bottinelli, R. and Cossu, G. (2006) -Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*, **444**, 7119, 574-9.
Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H. and Goldberg, A. L. (2004) -Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, **117**, 3, 399-412.
Sarbassov, D. D., Jones, L. G. and Peterson, C. A. (1997) -Extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 respond differently to mitogenic and differentiative signaling pathways in myoblasts. *Mol Endocrinol*, **11**, 13, 2038-47.
Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. and Sabatini, D. M. (2005) -Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, **307**, 5712, 1098-101.
Schertzer, J. D. and Lynch, G. S. (2006) -Comparative evaluation of IGF-I gene transfer and IGF-I protein administration for enhancing skeletal muscle regeneration after injury. *Gene Ther*, **13**, 23, 1657-64.
Schertzer, J. D., Ryall, J. G. and Lynch, G. S. (2006) -Systemic administration of IGF-I enhances oxidative status and reduces contraction-induced injury in skeletal muscles of mdx dystrophic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, 3, E499-505.
Schlessinger, J. (2000) -Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **103**, 2, 211-25.

Schwartz, M. and Duno, M. (2004) -Improved molecular diagnosis of dystrophin gene mutations using the multiplex ligation-dependent probe amplification method. *Genet Test*, **8**, 4, 361-7.

Sciandra, F., Bozzi, M., Bianchi, M., Pavoni, E., Giardina, B. and Brancaccio, A. (2003) -Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanita*, **39**, 2, 173-81.

Sharp, N. J., Kornegay, J. N., Van Camp, S. D., Herbstreith, M. H., Secore, S. L., Kettle, S., Hung, W. Y., Constantinou, C. D., Dykstra, M. J., Roses, A. D. and et al. (1992) -An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics*, **13**, 1, 115-21.

Shi, H., Zeng, C., Ricome, A., Hannon, K. M., Grant, A. L. and Gerrard, D. E. (2007) -Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in beta-agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**, 5, C1681-9.

Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G. and Barnard, P. J. (1989) -The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, **244**, 4912, 1578-80.

Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J. P., Roy, R., Dugre, F. J., Sylvain, M., Lachance, J. G., Deschenes, L., Senay, H. and Tremblay, J. P. (2006) -Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, **65**, 4, 371-86.

Smythe, G. M., Hodgetts, S. I. and Grounds, M. D. (2000) -Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy. *Mol Ther*, **1**, 4, 304-13.

Smythe, G. M. and Rando, T. A. (2006) -Altered caveolin-3 expression disrupts PI(3) kinase signaling leading to death of cultured muscle cells. *Exp Cell Res*, **312**, 15, 2816-25.

Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D. S. and Lisanti, M. P. (1996) -Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem*, **271**, 25, 15160-5.

Sotgia, F., Lee, J. K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T. C., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F. D., Minetti, C., Sudol, M. and Lisanti, M. P. (2000) -Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem*, **275**, 48, 38048-58.

Spencer, M. J., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K. and Tidball, J. G. (2001) -Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin Immunol*, **98**, 2, 235-43.

Spencer, M. J. and Tidball, J. G. (2001) -Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies? *Neuromuscul Disord*, **11**, 6-7, 556-64.

Squire, S., Raymackers, J. M., Vandebrouck, C., Potter, A., Tinsley, J., Fisher, R., Gillis, J. M. and Davies, K. E. (2002) -Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet*, **11**, 26, 3333-44.

St-Pierre, S. J., Chakkalakal, J. V., Kolodziejczyk, S. M., Knudson, J. C., Jasmin, B. J. and Megeney, L. A. (2004) -Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *Faseb J*, **18**, 15, 1937-9.

Stamler, J. S. and Meissner, G. (2001) -Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*, **81**, 1, 209-237.

Stedman, H. H., Sweeney, H. L., Shrager, J. B., Maguire, H. C., Panettieri, R. A., Petrof, B., Narusawa, M., Leferovich, J. M., Sladky, J. T. and Kelly, A. M. (1991) -The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, **352**, 6335, 536-9.

Stiles, B. L. (2008) -Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10: Extending its PTENtacles. *Int J Biochem Cell Biol*,
Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W. O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G. D. and Glass, D. J. (2004) -The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*, **14**, 3, 395-403.
Straub, V. and Campbell, K. P. (1997) -Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*, **10**, 2, 168-75.
Straub, V., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S. and Campbell, K. P. (1997) -Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol*, **139**, 2, 375-85.
Sudol, M. (1996a) -The WW module competes with the SH3 domain? *Trends Biochem Sci*, **21**, 5, 161-3.
Sudol, M. (1996b) -Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol*, **65**, 1-2, 113-32.
Sugiyama, J., Bowen, D. C. and Hall, Z. W. (1994) -Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. *Neuron*, **13**, 1, 103-15.

T

t Hoen, P. A., van der Wees, C. G., Aartsma-Rus, A., Turk, R., Goyenvalle, A., Danos, O., Garcia, L., van Ommen, G. J., den Dunnen, J. T. and van Deutekom, J. C. (2006) -Gene expression profiling to monitor therapeutic and adverse effects of antisense therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Pharmacogenomics*, **7**, 3, 281-97.
Teresi, R. E., Shaiu, C. W., Chen, C. S., Chatterjee, V. K., Waite, K. A. and Eng, C. (2006) -Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by Lovastatin and Rosiglitazone. *Int J Cancer*, **118**, 10, 2390-8.
Thomas, C. M. and Smart, E. J. (2008) -Caveolae structure and function. *J Cell Mol Med*, **12**, 3, 796-809.
Tidball, J. G. and Spencer, M. J. (2000) -Calpains and muscular dystrophies. *Int J Biochem Cell Biol*, **32**, 1, 1-5.
Tidball, J. G. and Wehling-Henricks, M. (2004) -Evolving therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: targeting downstream events. *Pediatr Res*, **56**, 6, 831-41.
Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J. M. and Davies, K. (1998) -Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med*, **4**, 12, 1441-4.
Tinsley, J. M., Blake, D. J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B. C., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G. K., Love, D. R. and et al. (1992) -Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature*, **360**, 6404, 591-3.
Tinsley, J. M., Potter, A. C., Phelps, S. R., Fisher, R., Trickett, J. I. and Davies, K. E. (1996) -Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature*, **384**, 6607, 349-53.
Torres, L. F. and Duchen, L. W. (1987) -The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*, **110 (Pt 2)**, 269-99.
Tortora, G. J. and Grabowski, S. R. (1994) - Principes d'anatomie et de physiologie. *Anjou, CEC Collégial et universitaire.*
Tosch, V., Rohde, H. M., Tronchere, H., Zanoteli, E., Monroy, N., Kretz, C., Dondaine, N., Payrastre, B., Mandel, J. L. and Laporte, J. (2006) -A novel PtdIns3P and PtdIns(3,5)P2 phosphatase with an inactivating variant in centronuclear myopathy. *Hum Mol Genet*, **15**, 21, 3098-106.

Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A. and Davis, R. J. (2000) -Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, **288**, 5467, 870-4.
Tournier, C., Dong, C., Turner, T. K., Jones, S. N., Flavell, R. A. and Davis, R. J. (2001) -MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes Dev*, **15**, 11, 1419-26.
Tronchere, H., Buj-Bello, A., Mandel, J. L. and Payrastre, B. (2003) -Implication of phosphoinositide phosphatases in genetic diseases: the case of myotubularin. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 10, 2084-99.
Turk, R., Sterrenburg, E., de Meijer, E. J., van Ommen, G. J., den Dunnen, J. T. and t Hoen, P. A. (2005) -Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics*, **6**, 98.
Turner, P. R., Schultz, R., Ganguly, B. and Steinhardt, R. A. (1993) -Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J Membr Biol*, **133**, 3, 243-51.

U

Um, S. H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P. R., Kozma, S. C., Auwerx, J. and Thomas, G. (2004) -Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, **431**, 7005, 200-5.

V

Vaghy, P. L., Fang, J., Wu, W. and Vaghy, L. P. (1998) -Increased caveolin-3 levels in mdx mouse muscles. *FEBS Lett*, **431**, 1, 125-7.
Vainzof, M., Ayub-Guerrieri, D., Onofre, P. C., Martins, P. C., Lopes, V. F., Zilberztajn, D., Maia, L. S., Sell, K. and Yamamoto, L. U. (2008) -Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J Mol Neurosci*, **34**, 3, 241-8.
Valentine, B. A., Cooper, B. J., Cummings, J. F. and deLahunta, A. (1986) -Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol*, **71**, 3-4, 301-10.
Valentine, B. A., Cooper, B. J., de Lahunta, A., O'Quinn, R. and Blue, J. T. (1988) -Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J Neurol Sci*, **88**, 1-3, 69-81.
Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N. and Sellers, W. R. (2000) -Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol*, **20**, 14, 5010-8.
Vazquez, F., Grossman, S. R., Takahashi, Y., Rokas, M. V., Nakamura, N. and Sellers, W. R. (2001) -Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem*, **276**, 52, 48627-30.
Vazquez, F. and Devreotes, P. (2006) -Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. *Cell Cycle*, **5**, 14, 1523-7.
Vazquez, F., Matsuoka, S., Sellers, W. R., Yanagida, T., Ueda, M. and Devreotes, P. N. (2006) -Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10, 3633-8.
Venema, V. J., Ju, H., Zou, R. and Venema, R. C. (1997) -Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem*, **272**, 45, 28187-90.

Vyas, D. R., Spangenburg, E. E., Abraha, T. W., Childs, T. E. and Booth, F. W. (2002) -GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **283**, 2, C545-51.

W

Wagner, K. R., McPherron, A. C., Winik, N. and Lee, S. J. (2002) -Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Ann Neurol*, **52**, 6, 832-6.

Wakefield, P. M., Tinsley, J. M., Wood, M. J., Gilbert, R., Karpati, G. and Davies, K. E. (2000) -Prevention of the dystrophic phenotype in dystrophin/utrophin-deficient muscle following adenovirus-mediated transfer of a utrophin minigene. *Gene Ther*, **7**, 3, 201-4.

Walker, K. S., Deak, M., Paterson, A., Hudson, K., Cohen, P. and Alessi, D. R. (1998) -Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem J*, **331 (Pt 1)**, 299-308.

Wang, J., Ouyang, W., Li, J., Wei, L., Ma, Q., Zhang, Z., Tong, Q., He, J. and Huang, C. (2005) -Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN expression and enhances signaling pathways leading to activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB induced by UV radiation. *Cancer Res*, **65**, 15, 6601-11.

Wang, X. and Jiang, X. (2008) -Post-translational regulation of PTEN. *Oncogene*, **27**, 41, 5454-63.

Wang, Z., Kuhr, C. S., Allen, J. M., Blankinship, M., Gregorevic, P., Chamberlain, J. S., Tapscott, S. J. and Storb, R. (2007) -Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther*, **15**, 6, 1160-6.

Wehling-Henricks, M., Lee, J. J. and Tidball, J. G. (2004) -Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord*, **14**, 8-9, 483-90.

Welch, E. M., Barton, E. R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W. J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C. R., Hwang, S., Wilde, R. G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y. C., Corson, D., Turpoff, A. A., Campbell, J. A., Conn, M. M., Khan, A., Almstead, N. G., Hedrick, J., Mollin, A., Risher, N., Weetall, M., Yeh, S., Branstrom, A. A., Colacino, J. M., Babiak, J., Ju, W. D., Hirawat, S., Northcutt, V. J., Miller, L. L., Spatrick, P., He, F., Kawana, M., Feng, H., Jacobson, A., Peltz, S. W. and Sweeney, H. L. (2007) -PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, **447**, 7140, 87-91.

Weston, C. R. and Davis, R. J. (2002) -The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev*, **12**, 1, 14-21.

Weston, C. R. and Davis, R. J. (2007) -The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*, **19**, 2, 142-9.

Wheeler, M. T., Zarnegar, S. and McNally, E. M. (2002) -Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, **11**, 18, 2147-54.

White, F. M. (2008) -Quantitative phosphoproteomic analysis of signaling network dynamics. *Curr Opin Biotechnol*, **19**, 4, 404-9.

Whitman, M., Downes, C. P., Keeler, M., Keller, T. and Cantley, L. (1988) -Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*, **332**, 6165, 644-6.

Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J. (2000) -Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 8-9, 1172-83.

Willig, TN. (1992) -Diagnostique et évolution des maladies neuro-musculaires. *Paris : Masson fasc*, **155**, 7-19.
Winder, S. J. (2001) -The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci*, **26**, 2, 118-24.
Worton, R. G. and Thompson, M. W. (1988) -Genetics of Duchenne muscular dystrophy. *Annu Rev Genet*, **22**, 601-29.
Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. (2006) -TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, **124**, 3, 471-84.

Y

Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J., Koretzky, G. and Campbell, K. P. (1995) -SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem*, **270**, 20, 11711-4.
Yeretssian, G., Lecocq, M., Lebon, G., Hurst, H. C. and Sakanyan, V. (2005) -Competition on nitrocellulose-immobilized antibody arrays: from bacterial protein binding assay to protein profiling in breast cancer cells. *Mol Cell Proteomics*, **4**, 5, 605-17.
Yin, Y. and Shen, W. H. (2008) -PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*, **27**, 41, 5443-53.
Yoon, S. and Seger, R. (2006) -The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*, **24**, 1, 21-44.

Z

Zarubin, T. and Han, J. (2005) -Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, **15**, 1, 11-8.
Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Karpati, G., Burghes, A. H., Belfall, B., Klamut, H. J., Talbot, J., Hodges, R. S., Ray, P. N. and Worton, R. G. (1988) -The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature*, 333, 6172, 466-9.
Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H. and Goldberg, A. L. (2007) -FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*, **6**, 6, 472-83.

Publications (revues scientifiques à comité de lecture)

1. **Feron M.**, Guevel L., Rouger K., Dubreil L., Arnaud M.-C., Ledevin M., Megeney L., Cherel Y. and Sakanyan V., 2008. *PTEN contributes to profound PI3K/Akt signaling pathway deregulation in dystrophin-deficient dog muscle*. Am J Pathol, 174(4).

2. Rouger K., Fornasari B., Armengol V., Jouvion G, Leroux I., Dubreil L., **Feron M.**, Guevel L. and Cherel Y., 2007. *Progenitor cell isolation from muscle-derived cells based on adhesion properties*. J Histochem Cytochem, 55(6):607-18.

3. Auda-Boucher G., Rouaud T., Lafoux A., Levitsky D., Huchet-Cadiou C., **Feron M.**, Guevel L., Talon S., Fontaine-Pérus J. and Gardahaut M.-F., 2007. *Fetal muscle-derived cells can repair dystrophic muscles in mdx mice*. Exp Cell Res, 313(5):997-1007.

Communications orales

1. AFM Final Workshop "Protein interactions in neuromuscular pathophysiology". 31 janvier 2008, Paris.
   Recent progress in studying Duchenne muscular dystrophy with antibody microarrays.

2. Colloque Myogénèse VII. 18-19 janvier 2007, Paris.
   Profil d'expression et phosphorylation des protéines des voies MAPK et PI3K/Akt dans la dystrophie musculaire de Duchenne.

3. SFBBM, 6ème colloque "Phosphorylation des protéines". 23-26 septembre 2006, Anglet.
   Profil d'expression et phosphorylation des protéines des voies MAPK et PI3K/Akt dans la dystrophie musculaire de Duchenne.

Posters présentés lors de congrès

1. Myology 2008, 3ème Congrès International de Myologie. 26-30 mai 2008, Marseille.
   PTEN phosphatase contributes to PI3K/Akt signaling pathway deregulation in the dystrophic dog.

2. Congrès annuel de la SFBBM et XXXII forum des jeunes chercheurs. 24-27 octobre 2005, Nantes.
   Profil d'expression et phosphorylation des protéines des voies MAP kinases dans la dystrophie musculaire de Duchenne : approche protéomique.

3. Myology 2005, 2ème Congrès International de Myologie. 9-13 mai 2005, Nantes.
   Studying MAP kinase phosphorylation in Duchenne muscular dystrophy by proteomic approaches.

PTEN contributes to profound PI3K/Akt signaling pathway deregulation in dystrophin-deficient dog muscle

Marie Feron[a], Laetitia Guevel[a,c], Karl Rouger[b], Laurence Dubreil[b], Marie-Claire Arnaud[a], Mireille Ledevin[b], Lynn A. Megeney[c], Yan Cherel[b] and Vehary Sakanyan[a,d]

[a]CNRS UMR6204, Faculté des Sciences et des Techniques, F-44322 Nantes Cedex 3, France

[b]INRA UMR703, Ecole Nationale Vétérinaire, F-44307 Nantes Cedex 3, France

[c]Ottawa Health Research Institute, Sprott Stem Cell center, Ottawa, ON Canada K1H8L6

[d]ProtNeteomix, 2, rue de la Houssinière, F-44322 Nantes Cedex 3, France

20 text pages and 7 figures

Running head: PTEN deregulates Akt in GRMD muscle

This work was supported by a grant from AFM (Association Française contre les Myopathies), N°11665.

Corresponding author: Laetitia Guevel, CNRS UMR6204, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, F-44322 Nantes Cedex 3, France.

Phone: +33-251125622; fax: +33-251125637; email: laetitia.guevel@univ-nantes.fr

Authors who should receive reprint requests are Laetitia Guevel and Marie Feron (marie.feron@etu.univ-nantes.fr).

Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is the most common and severe form of muscular dystrophy, and although the genetic basis of the disease is well defined, the overall mechanisms defining the pathogenesis remain obscure. Alterations in individual signaling pathways have been described but little information is available regarding their putative implication in DMD pathogenesis. Here, we studied the status of various major signaling pathways in the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog, that specifically reproduces the full spectrum of human pathology. Using antibody array, we found that Akt1, glycogen synthase kinase-3β (GSK3β), 70-kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K), extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), p38δ and p38γ kinases all exhibited decreased phosphorylation in 4-month-old GRMD muscle, revealing a deep alteration of the phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/Akt and MAPK pathways. Immunohistochemistry analysis revealed the presence of muscle fibers exhibiting a cytosolic accumulation of Akt1, GSK3β and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase (PTEN), an enzyme counteracting PI3K-mediated Akt activation. Enzymatic assays established that these alterations in phosphorylation and expression levels were associated with decreased Akt and increased GSK3β and PTEN activity. PTEN/GSK3β-positive fibers were also observed in 3- and 36-month-old GRMD muscle sections, indicating long-term PI3K/Akt pathway alteration. Collectively, our data suggest that PTEN increased expression and activity plays a central role in PI3K/Akt/GSK3β and p70S6K subpathways modulation, which could exacerbate the consequences of dystrophin deficiency.

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked neuromuscular disorder that affects 1 newborn boy in 3500. This recessive disease is caused by mutations in the dystrophin gene, resulting in total lack of the protein [1-3], and is characterized by severe degeneration of muscle fibers, progressive paralysis and death. Dystrophin is located under the sarcolemma of muscle fibers, and is associated with a complex comprising several integral, peripheral membrane and cytoplasmic proteins: the dystrophin-glycoprotein complex, or DGC [4-7]. By providing a strong physical link between the cytoskeleton network and the extracellular matrix, the DGC ensures the integrity of skeletal muscle fibers. In the absence of dystrophin, the complex is destabilized and this integrity is lost [5, 8]. However, the impaired structural role of the DGC alone may not be sufficient to account for the massive

degenerative process observed in DMD muscles. Numerous observations suggest that signaling pathway alterations may also participate to DMD pathogenesis.

Dystrophin and various DGC proteins have been demonstrated to interact with a number of signaling proteins, including growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) [9], neuronal nitric oxide synthase (nNOS) [10], calmodulin [11], focal adhesion kinase (FAK) [12] and caveolin-3 [13-15]. Moreover, studies of the X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse [16] revealed modulations in mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascades, as dystrophic animals exhibited increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) [17, 18] and c-jun N-terminal kinases 1 and 2 (JNK1/2) [19-21], and decreased phosphorylation of p38 [18]. Also, the phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway has been shown to be affected in the *mdx* mouse, with increased synthesis and phosphorylation of Akt [22, 23].

In addition to the limited information related to the origin of signal perturbations in dystrophic muscle, almost no information is available regarding signaling pathways in clinically relevant animal models or human tissue samples [23]. It is noteworthy that the *mdx* mouse model of DMD is characterized by successive degeneration/regeneration processes and does not exhibit the progressive muscle wasting and accumulation of connective tissue observed during the development of the human disease [24-26]. The Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog, characterized by rapidly progressive clinical dysfunction, severe muscle weakness, and abundant fiber necrosis, displays a disease progression that is far more similar to human DMD [27, 28].

In this study, we used antibody arrays to assess the global phosphorylation status of key proteins of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in skeletal muscles of 4-month-old healthy and GRMD dogs. Our data indicated that Akt1, GSK3β and p70S6K, as well as ERK1/2 and p38δ and γ kinases all displayed a decreased phosphorylation level in GRMD muscle. Western immunoblot, immunohistochemistry analysis and enzymatic assays allowed us to confirm these results and demonstrated that they were associated with a reduction in Akt activity and with enhanced GSK3β expression anc activity. Analysis of key enzymes involved in Akt regulation revealed that phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase (PTEN) was present at a much higher level and was more active in GRMD muscle. Moreover, immunohistochemistry analysis showed that all the GSK3β-positive fibers observed in GRMD muscle sections exhibited a strong cytosolic labeling of PTEN, suggesting that the accumulation of the phosphatase could play a central role in PI3K/Akt signaling pathway

deregulation. The observation of PTEN/GSK3β-positive fibers in muscle sections from 3- and 36-month-old GRMD dogs further demonstrated that both the early and late stages of the disease share dysregulation of the pathway. Collectively, our findings highly suggest that alterations in PTEN exist in GRMD muscle, which leads to long-term and deep modulation of the PI3K/Akt signaling pathway.

Materials and Methods

Antibodies

Mouse monoclonal antibodies anti-Akt1 (dilution used for western immunoblot analysis: 1:2,000) and anti-PTEN (1:500) were from BD PharMingen (San Diego, CA). Mouse monoclonal antibodies anti-caveolin-3 (1:25,000), anti-GSK3β (1:1,000), anti-p70S6K (1:1,000) and anti-PP2A catalytic α (1:5,000) were from BD Transduction Laboratories (Lexington, KY). Rabbit polyclonal antibodies anti-phospho-Akt (Ser473; 1:250), anti-phospho-GSK3β (Ser9; 1:50), anti-phospho-p70S6K (Thr421/Ser424; 1:100), anti-phospho-PDK1 (Ser241; 1:250) and anti-LDHA (1:750) were all from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Rabbit polyclonal antibody anti-histone H2AX (1:750) was from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX). A mouse mAb anti-GAPDH (1: 5,000) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) was used as an internal reference. The anti-Akt1, anti-GSK3β, a rabbit monoclonal anti-phospho-Akt (Ser473), a rabbit polyclonal anti-phospho-p70S6K (Thr389) and a rabbit monoclonal anti-PTEN antibodies from Cell Signaling Technology were also used for immunohistochemistry analysis at dilutions of 1:50; 1:50; 1:10; 1:10 and 1:10, respectively. Goat polyclonal anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies (IgG) conjugated to Alexa Fluor® 680 (1:10,000), as well as anti-rabbit and anti-mouse IgG conjugated to Alexa Fluor® 488 (1:300) were from Molecular Probes (Eugene, OR). Mouse monoclonal anti-Akt1 and anti-PP2A antibodies from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) were also used for immunoprecipitation tests.

Animals

The animals came from a GRMD dog-breeding colony established in France. Affected dogs were identified during the first days of life by polymerase chain reaction genotyping using appropriate oligonucleotide primers and immunohistochemical localization of dystrophin [29]. The dogs were housed and cared for at the Boisbonne Center for Gene Therapy of the National Veterinary School of Nantes. Protocols complied with the principles outlined

in the French National Institute for Agronomic Research (INRA) Guide for the care and use of laboratory animals in biological experimentation.

Muscles

GRMD dogs and healthy littermates were sacrificed by intravenous sodium pentobarbital administration, and the muscles were removed immediately after euthanasia. The *Vastus lateralis* and *Biceps brachii* muscles were removed from two healthy and two GRMD dogs aged of 4 months. Each muscle biopsy was equally divided, with one sample used for protein extraction (samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing), and the other one for immunohistochemical observation. The *Vastus lateralis* muscle was also removed from 3- and 36-month-old GRMD dogs and used for immunohistochemistry analysis.

For protein analysis, the frozen muscles were thawed in lysis buffer containing phosphatase inhibitor cocktails 1 and 2, and protease inhibitor cocktail (purchased from Sigma) at 1:100 and 1:200, respectively. Lysis buffer 6 (R&D Systems, Minneapolis, MN) and Nonidet-P40 lysis buffer (1% Nonidet-P40, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 10% glycerol, and 2 mM EDTA) were used for the antibody microarray assays and the western immunoblot analysis, respectively. Fibrotic and calcified portions of the biopsies were carefully removed manually, under a binocular microscope. The proteins were extracted from muscle samples using a Tissue-Lyser (Qiagen, Courtaboeuf, France) under the optimum conditions established during preliminary experiments. Typically, 200 mg of muscle samples were suspended in 1 mL lysis buffer, and treated using the Tissue-Lyser at 30 Hz, with a 3 mm stainless steel bead, for 15 minutes at 4°C.

For the immunohistochemistry and histopathological analysis, the sectioned blocks were embedded in Tissue-Tek 0.C.T. compound (Sakura Finetek, Torrance, CA), and frozen in isopentane cooled with liquid nitrogen. Transverse *Vastus lateralis* muscle cryosections (8 μm) were prepared using a Leica CM 3050S cryostat. For immunofluorescent labeling, muscle sections were permeabilized by incubating in PBS (pH 7.4) containing 0.2% Tween-20 (except for PTEN: 0.3% Triton X-100) at room temperature for 5 minutes, blocked with 10% goat serum in PBS containing 0.2% Tween-20 (except for PTEN: 0.1% Triton X-100) for 30 minutes and then incubated in blocking solution at 4°C overnight with primary antibodies anti-GSK3β, anti-Akt1, anti-phospho-Akt (Ser473), anti-phospho-p70S6K (Thr389) or anti-PTEN. After washing with PBS, the samples were incubated with goat anti-

rabbit or anti-mouse antibodies labeled with Alexa Fluor® 488 for 1 hour, at room temperature. After washing again with PBS, the sections were counterstained with a 1:1,000 dilution of iodide (642/661)-monomeric cyanine nucleic acid stains (TO-PRO-3) (Invitrogen Life Technologies, CA) to stain the nuclei, and cover-slipped with Mowiol medium (Calbiochem, CA). Secondary antibodies alone were used as negative controls in parallel assays. Hematoxylin & eosin (H&E) and alizarin red staining were performed as per standard histological protocols.

Laser confocal imaging

All immunolabeled sections were scanned serially with a blue 488 nm argon ion laser (to detect the Alexa Fluor® 488 signal from the labeled proteins) and with a red 633 nm helium neon laser (to detect TO-PRO-3-labeled nuclei), using the C1 inverted Nikon TE-2000 laser scanning confocal microscope (Nikon, Champigny, France). Each image was recorded in a separate channel (the green channel for proteins, and the blue channel for TO-PRO-3) and analyzed to determine the kinases and phosphatases subcellular location.

Subcellular fractionation of proteins

Proteins were fractionated with a ProteoExtract® subcellular proteome extraction kit purchased from EMD Biosciences (San Diego, CA). 50 mg of flash-frozen *Vastus lateralis* muscle from 4-month-old healthy and GRMD dogs were carefully minced with scissors, and the protein fractions were extracted according to the Supplier's protocol. Phosphatase inhibitor cocktails 1 and 2 (1:100) and protease inhibitor cocktail (1:200) were added to the buffers used to obtain subcellular cytosolic, membrane and nuclear protein fractions. The protein concentration was determined using a detergent-compatible colorimetric assay (DC protein Assay kit, Biorad, Hercules, CA). The purity of the fractions was verified using anti-LDHA (cytosolic marker), anti-caveolin-3 (plasma membrane marker) and anti-histone H2AX (nuclear marker) antibodies.

Western immunoblot analysis

Total proteins or subcellular fraction proteins extracted from healthy and GRMD muscles were separated by SDS-PAGE and transferred to a Protran BA83 nitrocellulose membrane (Whatman, Maidstone, UK) by electro-blotting with a Mini Trans-Blot cell (BioRad). A Ponceau-red staining was used to verify that the lanes were equally loaded (data

not shown). The membranes were blocked with PBS containing 0.1% Tween-20, 2.5% BSA at room temperature for 1 hour, and incubated with the corresponding antibody in PBS containing 0.1% Tween-20, 1% BSA for 2 hours. After 3 washes in PBS, the membranes were incubated with secondary goat anti-mouse or anti-rabbit IgG labeled with Alexa Fluor® 680 (1:10,000) in PBS containing 0.1% Tween-20, 1% BSA for 1 hour. The membranes were washed, and the fluorescence emitted by the protein bands was monitored using the Odyssey Infrared Imaging system (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE). The signal intensity (pixel.mm^{-2}) was quantified using the Odyssey Application Software Version 1.1 (LI-COR Biosciences). For total extracts, preliminary immunoblot analysis was performed on separate biopsies (4 samples dissected from distinct parts of the muscle). No difference was observed in the protein yield of the different biopsies and protein extracts were usually pooled, and analyzed in a single sample. The values were normalized with respect to the reference GAPDH and the average value was calculated from at least 3 experiments. Quantitative evaluation of the fluorescent intensity of the protein bands was performed using statEL software (Excel, Microsoft).

Kinase activity assays

Healthy and GRMD *Vastus lateralis* muscles were lysed in modified RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Nonidet-P40, 1% glycerol, 1mM EDTA) containing phosphatase and protease inhibitors. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid method and 500 µg of total proteins were precleared with 30 µL of Protein G Sepharose 4 Fast Flow beads (GE Healthcare, UK) for 2 hours at 4°C. Lysates were incubated with 5 µg of anti-Akt1 or 2.5 µg of anti-GSK3β antibody overnight at 4°C under gentle agitation and immune complexes were immunoprecipitated with 30 µL of Protein G Sepharose beads for 4 hours at 4°C. Immobilized complexes were washed twice with lysis buffer and twice with a specific buffer: ADB kinase assay buffer (100 mM MOPS pH 7.2, 125 mM β-glycerol phosphate, 25 mM EGTA, 5 mM sodium orthovanadate and 5 mM dithiothreitol) for the Akt assay and cold kinase assay buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 10 mM $MgCl_2$ and 1 mM DTT) for the GSK3β assay. Kinase reactions were performed for 30 minutes at 30°C in the presence of 10 uCi [γ-^{32}P]ATP. For the Akt kinase activity assay, 10 µL of ADB buffer, 10 µM of PKA inhibitor peptide, 100 µM of Akt/SGK peptide (RPRAATF) (immunoprecipitation phosphatase assay from Upstate Biotechnology), 150 µM of ATP and 20 mM of $MgCl_2$ were added, for a total volume of 40 µL. For the GSK3β assay,

10 μM of ATP and a GSK3β specific peptide substrate (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQpS; Upstate Biotechnology) were added, for a total volume of 30 μL. Tubes were centrifugated for 1 minute and the reaction supernatants were collected and spotted onto P81 phosphocellulose cation-exchange paper. Papers were finally washed 3 times in 0.75% phosphoric acid, for a total time of 45 minutes, rinsed 5 minutes in acetone, air-dried and counted in a liquid scintillation counter.

PTEN activity assay

Healthy and GRMD *Vastus lateralis* muscles were lysed in modified RIPA lysis buffer containing protease inhibitors. Total extracts were clarified by centrifugation at 100,000 g for 40 minutes and supernatants were dessalted on a PD-10 column. Phospholipid vesicles (PLV) were prepared using 100 μM of di(C8)-Pi(3,4,5)P3 (Echelon Biosciences, Inc., Salt Lake City, UT) and 0.5 mM of phosphatidyl-serine (Sigma) in 20 mM HEPES, pH 7.4 and 1 mM EGTA by a sonication of 1 hour at 4°C. The lipid phosphatase assay was performed by incubating 10 μL of supernatant with 10 μL of PLV and 10 μL of buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0 and 10 mM DTT) for 15 minutes at 37°C and stopped by the addition of 100 μL of Malachite Green Reagent (Echelon Biosciences). OD at 650 nm was read after 15 minutes of color development at room temperature.

PP2A activity assay

PP2A activity was evaluated in healthy and GRMD *Vastus lateralis* muscles by using an immunoprecipitation phosphatase assay from Upstate Biotechnology. In brief, immunoprecipitates of PP2A were obtained by incubating the muscle extracts with 4 μg of anti-PP2A C subunit antibody and the activity was assassed by the dephosphorylation of a preferred PP2A substrate phosphopeptide (KRpTIRR; Upstate Biotechnology).

Antibody arrays

A human phospho-MAPK array kit (R&D Systems) was used to evaluate the phosphorylation of 19 protein kinases involved in major signaling pathways in skeletal muscle from healthy and GRMD dogs. Protein sequence homology between human and dog was preliminary controlled by determining the identity score of the different kinases and the antibody cross-reactivity was validated by western immunoblot (data not shown). Capture antibodies directed against pan-epitopes of the corresponding proteins are immobilized on a

nitrocellulose membrane (2 spots of each antibody) and, after binding of both unphosphorylated and phosphorylated kinases, the latter are detected thanks to a cocktail of phospho-site specific antibodies (see at http://www.rndsystems.com/pdf/ARY002.pdf for a complete list of capture antibodies and recognized phosphorylation sites).

Binding assays were performed following the Supplier's instructions with minor modifications. The membranes were blocked for 1 hour at 20°C, and then incubated overnight at 4°C with 300 µg of total proteins. The membranes were washed three times for 10 minutes and then incubated with the detection antibody cocktail for 2 hours at 20°C. After washing, the membranes were incubated with streptavidin-horseradish peroxidase for 30 minutes and the chemiluminescent signal was recorded on Kodak Biomax MR film (Eastman Kodak, Rochester, NY). Films were scanned, and the spot images were analyzed using GenePix Pro 4.0 software (Axon Instruments, Union city, CA).

The assays were conducted in duplicate, using two biopsies removed from two different dogs, and similar results were obtained. A background value was determined for each array, using negative controls and empty spots positioned in clear areas. This average background signal was subtracted from each spot to normalize the values obtained. A ratio of signal intensity (GRMD/healthy) was calculated for each of the four replicates (two duplicates per assay), and transformed into a log value (base 2). A cut-off value was determined by ANOVA analysis at the 95% confidence level ($p<0.05$, $n=4$). Statistically significant variations in the fluorescence signals determined from the spots are shown on the corresponding histograms.

Results

Profiling protein kinase phosphorylation in dog skeletal muscle

In order to obtain a global overview of the modulations that could impact the PI3K/Akt and MAPK (ERK, JNK and p38) signaling pathways in GRMD muscle, standard antibody array technology was used. A phospho-MAPK antibody array was applied to compare the phosphorylation profile of 19 different protein kinases in skeletal muscle from 4-month-old healthy and GRMD dogs (Figure 1A). Among the 15 spots that could be analyzed, 7 corresponded to kinases exhibiting a phosphorylation level statistically reduced in GRMD muscle (Figure 1B). Akt1 and the direct and indirect Akt targets GSK3β and p70S6K all exhibited a reduced phosphorylation level in GRMD muscle, revealing that the PI3K/Akt pathway was severely affected. Also, two of the three MAPK pathways appeared to be modulated in GRMD muscle, as a reduced phosphorylation level was demonstrated for both

ERK1 and ERK2 (confirmed by western immunoblot experiment, data not shown), and p38δ and γ kinases. Collectively, these results showed that GRMD skeletal muscle displayed a deep remodeling of various major cell signaling pathways.

Decreased phosphorylation and perturbed localization of Akt in GRMD muscle

Antibody array analysis revealed an important deregulation of the PI3K/Akt signaling pathway in GRMD skeletal muscle, with notably a reduction in Akt1 phosphorylation level. Western immunoblot experiments showed a marked increase in total Akt1 proteins in GRMD muscle (Figure 2A). Immunofluoresence analysis revealed that the Akt1 labeling was slight in healthy skeletal muscle whereas GRMD muscle was characterized by the presence of many Akt1-expressing fibers exhibiting a cytosolic labeling and dispersed throughout the muscle tissue section. Some of these Akt1-positive fibers, regularly observed in cluster (Figure 2A, asterisk), were defined by a very intense labeling indicative of a massive accumulation of the kinase. In order to determine how Akt phosphorylation was altered at the subcellular level, compartment-specific fractions were prepared from healthy and GRMD skeletal muscles and analyzed by western immunoblot. In healthy dog muscle, phosphorylated Akt was not visible in the cytosolic fraction but was found to be concentrated in the membrane and nuclear compartments (Figure 2B). In GRMD muscle, phosphorylated Akt was neither detected in the cytosolic fraction and a dramatic reduction in the amount of the protein was showed within both the membrane and nuclear fractions. Immunofluorescence analysis revealed the presence of phosphorylated Akt in the nucleus and membrane of healthy muscle fibers (Figure 2C) whereas in GRMD muscle section, phosphorylated Akt-positive nuclei appeared less numerous and were characterized by a less intense labeling. Using a kinase activity assay, we also demonstrated that the reduced presence of phosphorylated Akt in GRMD skeletal muscle was associated with a large decrease in its activity, as the kinase was found to be almost twice less active than in healthy counterpart (Figure 2D). To explore whether the alteration of the phosphorylated form of Akt was maintained during muscular dystrophy progression, an immunolabeling was carried out on skeletal muscle sections from 3- and 36-month-old GRMD dogs. At these two ages, dystrophic muscle fibers were characterized by either an absence of labeling or by a slight signal, suggesting a persistant dysregulation of Akt in GRMD muscle (Supplemental Figure 1A-F at http://ajp.amjpathol.org/).

GSK3β and p70S6K phosphorylation is reduced in GRMD muscle

We next wanted to determine the consequences of the reduced Akt activity detected in GRMD muscle on the expression and phosphorylation pattern of GSK3β and p70S6K. First, western immunoblot experiments confirmed the previous antibody array results revealing that the phosphorylation of GSK3β was lower in GRMD muscle than in healthy counterpart (Figure 3A). Subsequently, we observed that GSK3β synthesis was enhanced in GRMD muscle, suggesting a greater elevation of the non-phosphorylated and active form of the kinase (Figure 3B). Subcellular fractionation experiments revealed that GSK3β was present in the healthy cytosolic, membrane and nuclear fractions (Figure 3C). In GRMD muscle, GSK3β was also observed in these three compartments but with an increased amount. To determine the muscle tissue location of GSK3β, immunolabeling directed against the kinase was carried out. It revealed that, while any healthy fibers were found to express GSK3β, numerous GRMD muscle fibers were GSK3β-positive and exhibited a cytosolic labeling (Figure 3D). Some of these fibers were characterized by a very intense labeling, suggesting a large cytosolic accumulation of the kinase. Using alizarin red staining to detect pathological levels of calcium characteristic of pre-necrotic or necrotic fibers, and visualized by an intense red staining (Figure 3E, asterisk), we found that GSK3β-positive GRMD fibers (Figure 3E, arrow and arrowhead) did not correspond to calcified fibers. Additionally, histological analysis based on H&E staining showed that some of the GSK3β-positive fibers displayed centrally located nuclei characteristic of regenerated fibers (Figure 3E, arrowhead). This indicates that GSK3β overexpression concerns mature fibers as well as young myotubes. Above all, the enhanced expression of GSK3β and its reduced phosphorylation in GRMD muscle were associated with a 2-fold increase in its kinase activity (Figure 3F).

Western immunoblot experiments also confirmed that p70S6K phosphorylation level was notably lower in the GRMD muscle extract than in the healthy one, yet the level of total proteins remained similar between the two conditions (Figure 4A). Confocal analysis of the phosphorylated p70S6K immunolabeling revealed that the protein was present in nearly all the nuclei of the healthy muscle fibers whereas its presence was limited to a few nuclei in the GRMD fibers (Figure 4B).

Collectively, these results demonstrated that both the PI3K/Akt/GSK3β and the PI3K/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR)/p70S6K pathways were significantly impacted by the reduced activity of Akt detected in GRMD muscle.

Increased PTEN expression and activity in GRMD muscle

In order to understand the mechanisms that affect Akt phosphorylation in GRMD muscle, three enzymes known to modulate Akt signaling were analyzed: PDK1, which phosphorylates Akt, and PP2A and PTEN, which dephosphorylates Akt and the lipid product PiP_3, respectively. Western immunoblot experiments revealed that the active phosphorylated form of PDK1 was elevated in GRMD muscle (Figure 5A), which could not account for the reduction detected in Akt phosphorylation level. The expression level of PP2A was also slightly increased but the enzyme assay did not reveal any difference in its activity (Figures 5A and 5B). Interestingly, the amount of the PTEN phosphatase was highly elevated in GRMD muscle, with a 4.5-fold increase when compared to healthy muscle (Figure 5C). Moreover, a notable increase in PTEN activity was observed in the GRMD muscle extract (Figure 5D). Immunolabeling directed against PTEN showed that healthy muscle fibers displayed a weak expression of the phosphatase whereas nearly all the GRMD muscle fibers were PTEN-positive (Figure 5E). These fibers exhibited either a strong labeling dispersed in whole cytosol, and evocating an important phosphatase accumulation (Figure 5E, arrow), or only an intense sub-sarcolemmal labeling (Figure 5E, arrowhead). In order to determine whether this PTEN altered expression was specific to the age of 4-months or if it could be observed during the GRMD disease progression, H&E staining and PTEN-immunolabeling were carried out on serial muscle tissue sections from 3-, 4- and 36-month-old GRMD dogs. An immunohistochemistry was also performed in parallel to the downstream-located kinase GSK3β. 3-month-old GRMD dog muscles, in which the morphological features of muscular dystrophy were yet very few, with only heterogeneity of fiber diameter, occasional fibers containing central nuclei and focal inflammatory cells (Figure 6A), already displayed a large number of PTEN-positive fibers randomly dispersed in the section (Figure 6B, arrowhead). Noteworthy, it appeared that these PTEN-positive fibers were all GSK3β-positive (Figure 6C, arrow), demonstrating that PTEN alteration contributes to deregulate the PI3K/Akt signaling pathway. Moreover, these observations highly suggest that the signaling pathway deregulation is present precociously in the dystrophic context, when the primitive histological muscle abnormalities are identified. In 4-month-old GRMD dog muscles, that were characterized by high fiber size variation, individual necrosis fibers, centrally nucleated fibers and fibrosis (Figure 6D), PTEN/GSK3β-positive fibers were also found (Figures 6E and 6F, arrow). They mainly had a small diameter (Figures 6D, 6E and 6F, empty arrowhead) or displayed central nuclei indicative of a stage of muscle regeneration (Figures 6D, 6E and 6F, thick arrow).

Also, some PTEN/GSK3β-positive fibers corresponded to fibers undergoing phagocytosis (Figure 6D, 6E and 6F, round). Finally, 36-month-old GRMD dog muscles, that displayed areas of extensive endomysial fibrosis typically associated with marked fiber atrophy and massive infiltration of inflammatory cells (Figure 6G), were characterized by a large proportion of fibers expressing both PTEN and GSK3β (Figure 6H and 6I, arrow). As this age point defined by exhausted myogenic regeneration potential, several PTEN/GSK3β-positive fibers were identified as necrotic fibers characterized by pale homogeneous cytoplasm and variable invading macrophages (Figures 6G, 6H and 6I, round), which could indicate that PTEN/GSK3β up-regulation defines muscle fibers that have accumulated damages and that are intended to degenerate. Of interest, the few hypertrophic fibers that were still present in the section were PTEN and GSK3β-negative (Figure 6H and 6I, square). The immunolabeling directed against the phosphorylated form of Akt performed in parallel on serial muscle sections co-labeled with PTEN and GSK3β at 3, 4 and 36 months revealed that PTEN/GSK3β-positive fibers were defined by a faint phospho-Akt signal, whatever the stage of the disease (see Supplemental Figure 1 at http://ajp.amjpathol.org/). All together, these results showed that an increased PTEN expression exists in muscle fibers during the progression of the GRMD disease and precised that PTEN/Akt/GSK3β alteration could not be attributed to a feature of regeneration or a consequence of inflammatory changes.

Discussion

Recent studies have indicated that DMD is associated with alterations in signal transduction pathways that may influence the muscle phenotype [17-19, 21-23]. Nevertheless, these studies have generally focused on one protein rather than assessing the global changes that may precipitate or exacerbate the pathology. Moreover, they have been mainly performed in the *mdx* mouse, a model that most likely will exhibit species specific changes that may not be reflected in the course of the human disease. Here, we applied antibody array technology to compare the phosphorylation profile of proteins from the PI3K/Akt and MAPK signaling pathways between skeletal muscles from healthy and GRMD dogs, that correspond to the only clinically relevant animal model for DMD. For the first time, we showed that Akt1, GSK3β and p70S6K, along with ERK1/2 and p38δ and γ kinases, exhibited reduced phosphorylation in GRMD muscle, revealing that cell signaling function is largely altered in the DMD context. Given the importance of the PI3K/Akt signaling pathway for regulating muscle mass [30-33], we chose to focus our analysis on the cascade and on the proteins involved

in its regulation. Subcellular fractionation and immunohistochemistry experiments revealed that the reduced phosphorylation level of Akt in GRMD muscle, as initially detected by the antibody array method, was the result of a dramatic decrease in the amount of the phosphorylated isoform in the membranes and nucleus. Using a kinase activity assay, we showed that this was associated with a severe decrease in its activity. Akt directly phosphorylates GSK3β at Ser9, thereby repressing its activity [34], and catalyses, *via* mTOR, p70S6K phosphorylation and activation [31, 35-38] (see Figure 7 for a schematic representation of the signaling pathway). The enhanced GSK3β activity and reduced p70S6K phosphorylation detected in GRMD muscle are thus coherent with the reduction in its activity. Three enzymes involved in its regulation were then analyzed. We detected changes in phosphorylated PDK1 and total PP2A levels but that could not account for the perturbations observed. Indeed, subsequently to the generation of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PiP_3) by the PI3K kinase [39], Akt is recruited to the plasma membrane and phosphorylated by PDK1 [40]. Thereby, the increased level of the phosphorylated (and presumably active) form of PDK1 detected in GRMD muscle should normally have led to enhanced Akt phosphorylation and activity. PP2A dephosphorylates Akt and p70S6K downstream in the cascade [41] but, even if its expression was slighty increased in GRMD muscle, no change was detected in its activity. In contrast, we revealed enhanced expression and activity of the PTEN phosphatase. PTEN opposes PI3K action by dephosphorylating PiP_3 [42] and the increased activity detected in GRMD muscle would presumably lead to a decreased level of the phosphoinositide, which should limit the recruitment and activation of Akt (see Figure 7). This hypothesis is strongly supported by the observation that the fibers that accumulated GSK3β in GRMD muscle were the same fibers that had greatly elevated PTEN level.

The PI3K/Akt/GSK3β and PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathways have been implicated in the regulation of skeletal muscle mass. Akt/mTOR signals were found to be upregulated during hypertrophy and downregulated during atrophy and the activation of Akt or p70S6K (or inactivation of GSK3β) appeared to be sufficient to induce hypertrophy. Moreover, in addition to acting as an inductive cue for hypertrophy, activation of the Akt/mTOR pathway could also prevent muscle atrophy *in vivo* [30, 32, 33, 43]. Furthermore, it has been shown *in vitro* that the overexpression of Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol-5'-phosphatase 2 (SHIP-2), which, like PTEN, decreases PiP_3 level, led to atrophy whereas the overexpression of a dominant negative mutant, which increases PiP_3 level, induced hypertrophy [32]. The overexpression of SHIP-2 in healthy mice muscle had no effect on fiber

size but the overexpression of the phosphatase in a model of compensatory hypertrophy completely blocked the hypertrophy response [30]. It is thereby likely that the overexpression and increased activity of PTEN detected in GRMD muscle (by decreasing Akt activity and p70S6K phosphorylation, and by activating GSK3β) could prevent compensatory muscle hypertrophy.

In dystrophin-deficient *mdx* mice, in which an hypertrophic response is seen, an activation of Akt has been reported in hindlimb skeletal muscles at both the pre-necrotic, peak necrotic and hypertrophic stages of the disease, even if this was surprisingly associated with a decrease in phosphorylated GSK3β level [23]. Intriguingly, Akt has also been shown to be activated in the diaphragm muscle at both the pre-necrotic and necrotic stages, in association with increased GSK3β and mTOR phosphorylation [22], suggesting that the activation of the kinase in *mdx* mice would not depend on the muscle phenotype (i.e., necrotic for the diaphragm muscle or hypertrophic for hindlimb skeletal muscles). The *mdx* mouse and the GRMD dog develop completely different answers to the absence of dystrophin and the discrepancies in the observations concerning Akt phosphorylation status underline the necessity of studying signaling pathway modulation in an animal model that closely mimics the human disease. An activation of Akt has been reported in the muscle of two patients (aged of 8 months and 3 years), suggesting that a compensatory mechanism could exist in young DMD boys [23]. However, as a single study exists, with only two biopsies studied, these results need further confirmation. Moreover, the activity of Akt as well as the status of the downstream GSK3β and p70S6K kinases have not already been assessed.

The question that raises next is what, at the structural level, could explain the enhanced expression and activity of PTEN detected in GRMD muscle. PTEN activity is largely restricted to the plasma membrane. Under normal conditions, the phosphatase is in a constrained conformation that would permit to maintain PiP_3 at a basal level but would not prevent stimulus-induced activation of the PI3K/Akt pathway [48, 49]. Moreover, a fraction of the molecules seems to be localized in caveolin-enriched membrane (CEM) fractions [47]. The absence of dystrophin is associated with multiple plasma membrane rehandling, along with structural and conformational changes, among which we can mention the large variability of caveolae size, shape or number [44-46]. It thereby appears possible that the alteration of PTEN detected in GRMD muscle could be a consequence of the membrane instability generated by the absence of dystrophin. Considering the impact this deregulation on the PI3K/Akt pathway, and the putative consequences on the compensatory hypertrophic response that muscles could

eventually develop, the question of its precise origin and the demonstration of its link with the lack of dystrophin appear of great interest. PTEN is the second most frequently deleted gene in human cancer [50] and mutations have been associated with Cowden disease (a cancer predisposition syndrome) [51]. Mutations of PTEN have also been associated with type 2 diabetes [52] but this is the first time that a deregulation is reported in a neuromuscular disease. The status of the phosphatase should now be carefully examined in *mdx* mice and DMD patients. It would also be interesting to see whether the observations made in the GRMD dog can be seen in other muscular dystrophies (due to mutations in genes coding for caveolins, like limb-girdle muscular dystrophy LGMD-1sC [53, 54] or in genes coding for some component of the DGC complex) or if they are restricted to DMD.

Taken together, our present results establish that increased PTEN activity is a signature of muscular dystrophy pathogenesis in the GRMD dog. This elevation leads to long-term and deep PI3K/Akt signaling pathway alteration, which could limit compensatory hypertrophy and exacerbate muscle degeneration.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Corinne Huchet-Cadiou and Dr. Gwenola Auda-Boucher for helpful discussions and the animal care technicians of the Boisbonne Center for Gene Therapy. This work was supported by a grant from AFM (Association Française contre les Myopathies), N°11665.

References

1. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM: Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 1986, 323:646-650
2. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. Cell 1987, 50:509-517
3. Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM: Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 1987, 51:919-928
4. Campbell KP, Kahl SD: Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. Nature 1989, 338:259-262
5. Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP: Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. Nature 1990, 345:315-319
6. Yoshida M, Ozawa E: Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. J Biochem (Tokyo) 1990, 108:748-752
7. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP: Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the

extracellular matrix. Nature 1992, 355:696-702
8. Ohlendieck K, Campbell KP: Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice. J Cell Biol 1991, 115:1685-1694
9. Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP: SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. J Biol Chem 1995, 270:11711-11714
10. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS: Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. Cell 1995, 82:743-752
11. Madhavan R, Massom LR, Jarrett HW: Calmodulin specifically binds three proteins of the dystrophin-glycoprotein complex. Biochem Biophys Res Commun 1992, 185:753-759
12. Cavaldesi M, Macchia G, Barca S, Defilippi P, Tarone G, Petrucci TC: Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. J Neurochem 1999, 72:1648-1655
13. Crosbie RH, Yamada H, Venzke DP, Lisanti MP, Campbell KP: Caveolin-3 is not an integral component of the dystrophin glycoprotein complex. FEBS Lett 1998, 427:279-282
14. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP: Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. J Biol Chem 1996, 271:15160-15165
15. Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, Sargiacomo M, Bricarelli FD, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP: Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. J Biol Chem 2000, 275:38048-38058
16. Bulfield G, Siller WG, Wight PAG, Moore KJ: X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 1984, 81:1189-1192
17. Kumar A, Khandelwal N, Malya R, Reid MB, Boriek AM: Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. Faseb J 2004, 18:102-113
18. Lang JM, Esser KA, Dupont-Versteegden EE: Altered activity of signaling pathways in diaphragm and tibialis anterior muscle of dystrophic mice. Exp Biol Med (Maywood) 2004, 229:503-511
19. Kolodziejczyk SM, Walsh GS, Balazsi K, Seale P, Sandoz J, Hierlihy AM, Rudnicki MA, Chamberlain JS, Miller FD, Megeney LA: Activation of JNK1 contributes to dystrophic muscle pathogenesis. Curr Biol 2001, 11:1278-1282
20. Nakamura A, Yoshida K, Ueda H, Takeda S, Ikeda S: Up-regulation of mitogen activated protein kinases in mdx skeletal muscle following chronic treadmill exercise. Biochim Biophys Acta 2005, 1740:326-331
21. St-Pierre SJ, Chakkalakal JV, Kolodziejczyk SM, Knudson JC, Jasmin BJ, Megeney LA: Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. Faseb J 2004, 18:1937-1939
22. Dogra C, Changotra H, Wergedal JE, Kumar A: Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in dystrophin-deficient skeletal muscle in response to mechanical stretch. J Cell Physiol 2006, 208:575-585
23. Peter AK, Crosbie RH: Hypertrophic response of Duchenne and limb-girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway. Exp Cell Res 2006, 312:2580-2591
24. Carnwath JW, Shotton DM: Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. J Neurol Sci 1987, 80:39-54
25. Coulton GR, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC: The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. Neuropathol Appl Neurobiol 1988, 14:53-70

26. Torres LF, Duchen LW: The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. Brain 1987, 110 (Pt 2):269-299
27. Cooper BJ, Winand NJ, Stedman H, Valentine BA, Hoffman EP, Kunkel LM, Scott MO, Fischbeck KH, Kornegay JN, Avery RJ, et al.: The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. Nature 1988, 334:154-156
28. Valentine BA, Cooper BJ, de Lahunta A, O'Quinn R, Blue JT: Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. J Neurol Sci 1988, 88:69-81
29. Sharp NJ, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD, et al.: An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. Genomics 1992, 13:115-121
30. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD: Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. Nat Cell Biol 2001, 3:1014-1019
31. Glass DJ: Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. Int J Biochem Cell Biol 2005, 37:1974-1984
32. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ: Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nat Cell Biol 2001, 3:1009-1013
33. Vyas DR, Spangenburg EE, Abraha TW, Childs TE, Booth FW: GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. Am J Physiol Cell Physiol 2002, 283:C545-551
34. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 1995, 378:785-789
35. Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J: Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. Cell 1992, 69:1227-1236
36. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL: TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. Nat Cell Biol 2002, 4:648-657
37. Inoki K, Ouyang H, Li Y, Guan KL: Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. Microbiol Mol Biol Rev 2005, 69:79-100
38. Price DJ, Grove JR, Calvo V, Avruch J, Bierer BE: Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. Science 1992, 257:973-977
39. Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L: Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. Nature 1988, 332:644-646
40. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P: Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. Curr Biol 1997, 7:261-269
41. Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA: Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. Trends Biochem Sci 1999, 24:186-191
42. Maehama T, Dixon JE: The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem 1998, 273:13375-13378
43. Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD, Glass DJ: Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. Mol Cell Biol 2004, 24:9295-9304
44. Bonilla E, Fischbeck K, Schotland DL: Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. Am J Pathol 1981, 104:167-173

45. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP: Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. Trends Mol Med 2001, 7:435-441
46. Repetto S, Bado M, Broda P, Lucania G, Masetti E, Sotgia F, Carbone I, Pavan A, Bonilla E, Cordone G, Lisanti MP, Minetti C: Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. Biochem Biophys Res Commun 1999, 261:547-550
47. Caselli A, Mazzinghi B, Camici G, Manao G, Ramponi G: Some protein tyrosine phosphatases target in part to lipid rafts and interact with caveolin-1. Biochem Biophys Res Commun 2002, 296:692-697
48. Vazquez F, Devreotes P: Regulation of PTEN function as a PIP3 gatekeeper through membrane interaction. Cell Cycle 2006, 5:1523-1527
49. Vazquez F, Matsuoka S, Sellers WR, Yanagida T, Ueda M, Devreotes PN: Tumor suppressor PTEN acts through dynamic interaction with the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 2006, 103:3633-3638
50. Yin Y, Shen WH: PTEN: a new guardian of the genome. Oncogene 2008, 27:5443-5453
51. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C, Parsons R: Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet 1997, 16:64-67
52. Ishihara H, Sasaoka T, Kagawa S, Murakami S, Fukui K, Kawagishi Y, Yamazaki K, Sato A, Iwata M, Urakaze M, Ishiki M, Wada T, Yaguchi S, Tsuneki H, Kimura I, Kobayashi M: Association of the polymorphisms in the 5'-untranslated region of PTEN gene with type 2 diabetes in a Japanese population. FEBS Lett 2003, 554:450-454
53. McNally EM, de Sa Moreira E, Duggan DJ, Bonnemann CG, Lisanti MP, Lidov HG, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Hoffman EP, Zatz M, Kunkel LM: Caveolin-3 in muscular dystrophy. Hum Mol Genet 1998, 7:871-877
54. Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, Bado M, Masetti E, Mazzocco M, Egeo A, Donati MA, Volonte D, Galbiati F, Cordone G, Bricarelli FD, Lisanti MP, Zara F: Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. Nat Genet 1998, 18:365-368

Figure 1

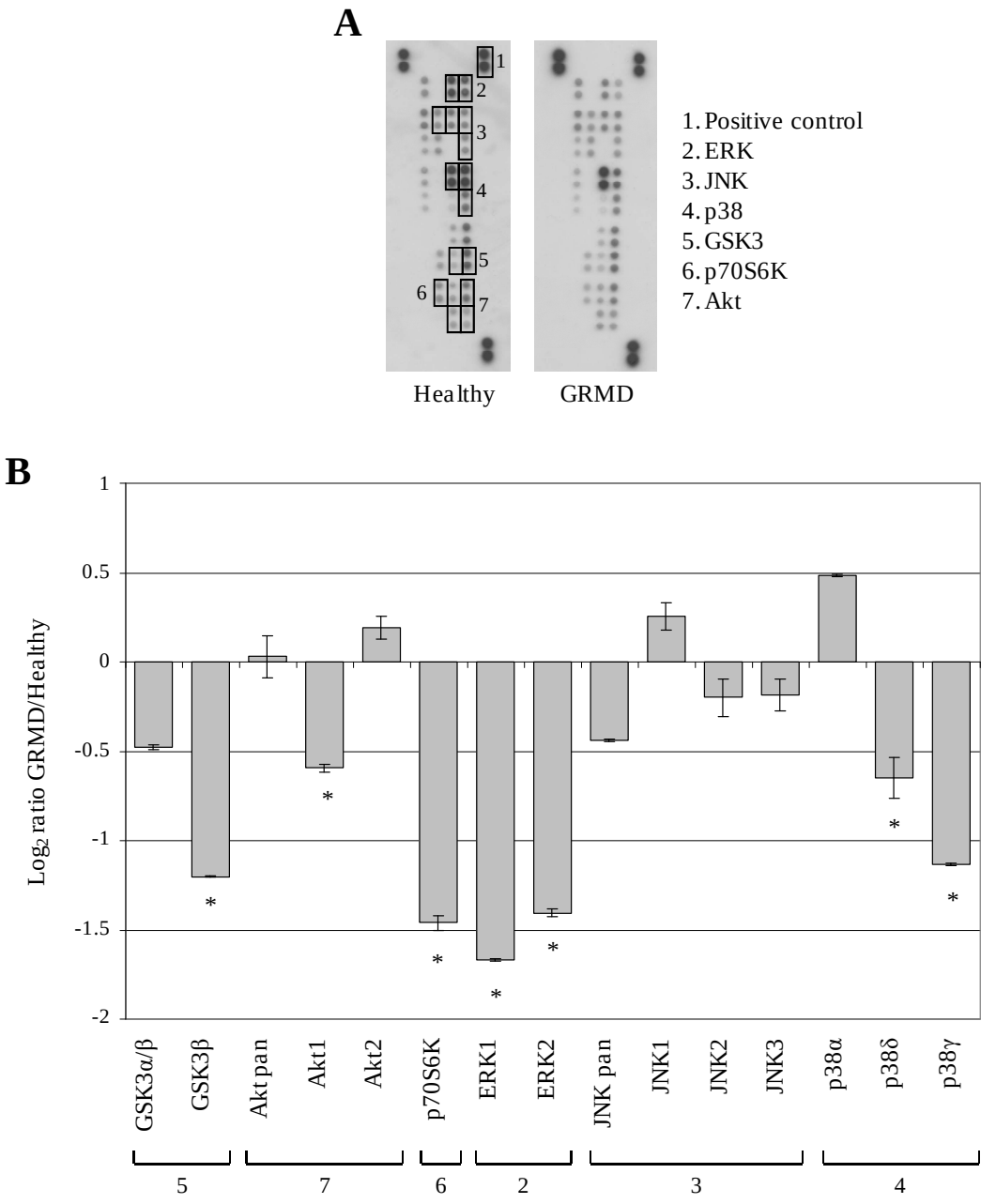

A
1
2
3
4
5
6
7
1. Positive control
2. ERK
3. JNK
4. p38
5. GSK3
6. p70S6K
7. Akt
Healthy
GRMD
B
Log2 ratio GRMD/Healthy
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
GSK3α/β
GSK3β
Akt pan
Akt1
Akt2
p70S6K
ERK1
ERK2
JNK pan
JNK1
JNK2
JNK3
p38α
p38δ
p38γ
5
7
6
2
3
4

Figure 2

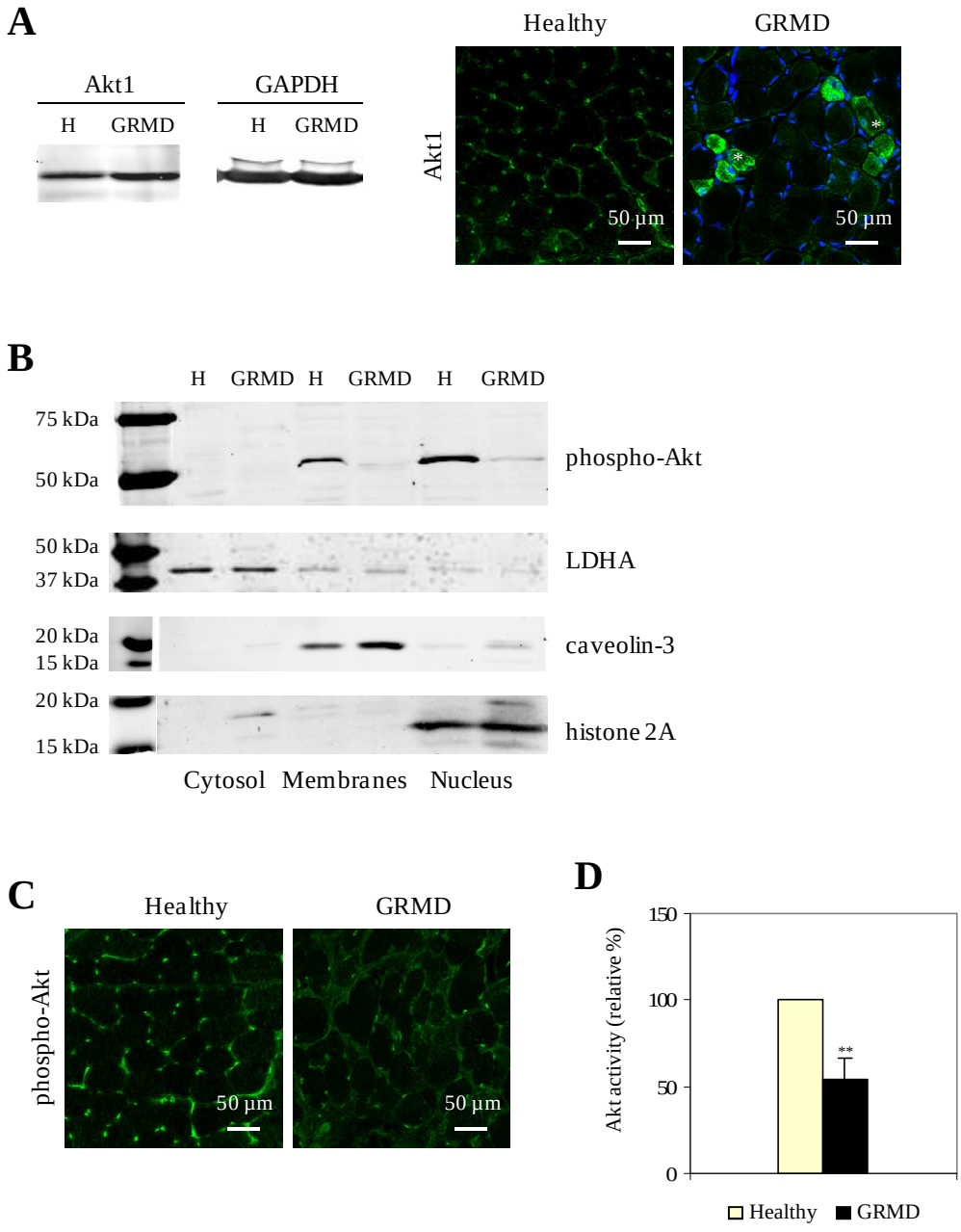

A
Akt1
GAPDH
H
GRMD
H
GRMD
Healthy
GRMD
Akt1
50 µm
50 µm
B
H
GRMD
H
GRMD
H
GRMD
75 kDa
50 kDa
phospho-Akt
50 kDa
37 kDa
LDHA
20 kDa
15 kDa
caveolin-3
20 kDa
15 kDa
histone 2A
Cytosol
Membranes
Nucleus
C
Healthy
GRMD
phospho-Akt
50 µm
50 µm
D
Akt activity (relative %)
150
100
50
0
**
Healthy
GRMD

Figure 3

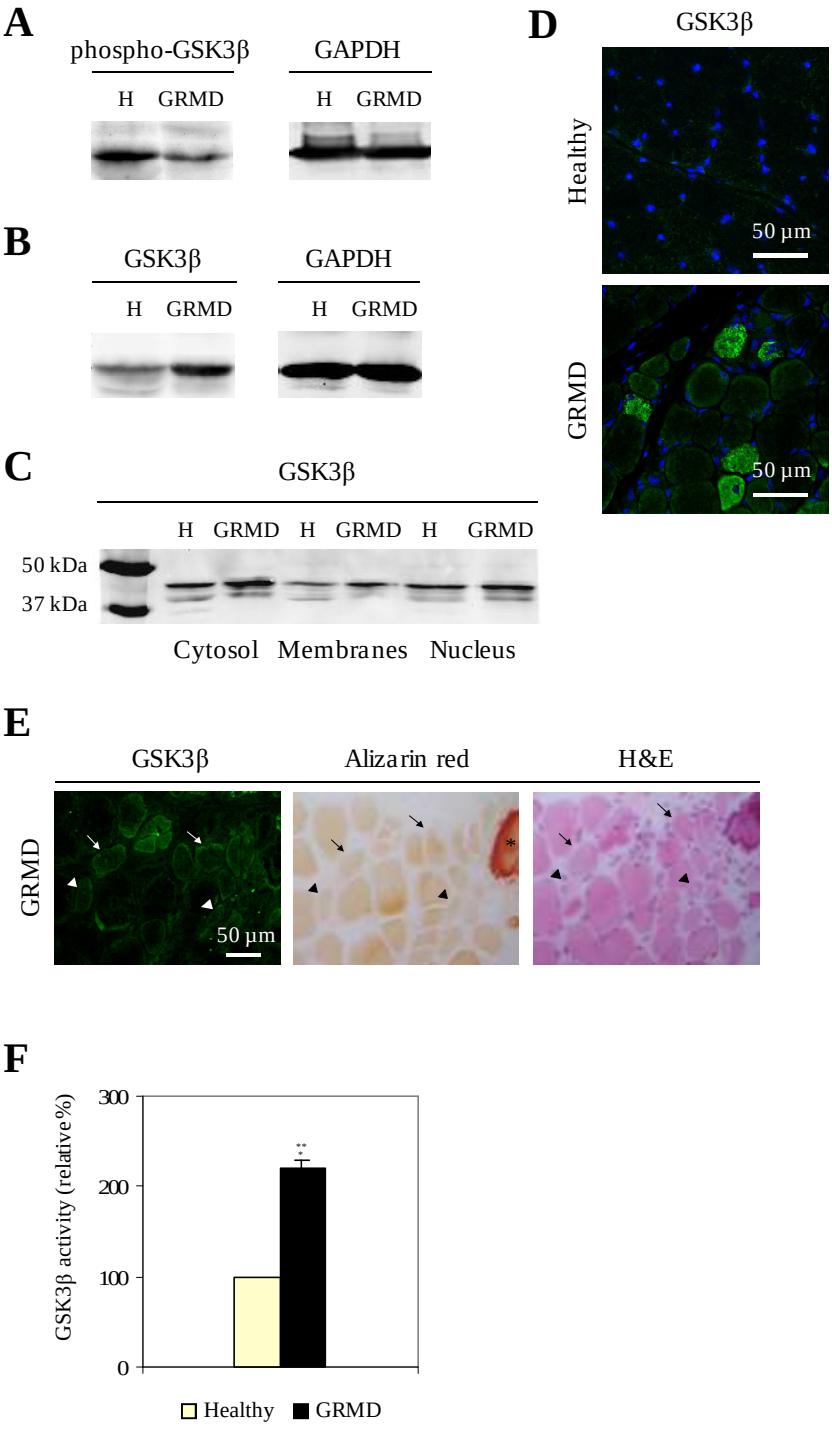

A
phospho-GSK3β
GAPDH
H GRMD
H GRMD
B
GSK3β
GAPDH
H GRMD
H GRMD
C
GSK3β
H GRMD H GRMD H GRMD
50 kDa
37 kDa
Cytosol Membranes Nucleus
D
GSK3β
Healthy
GRMD
50 µm
50 µm
E
GSK3β
Alizarin red
H&E
GRMD
50 µm
F
GSK3β activity (relative %)
300
200
100
0
Healthy
GRMD

Figure 4

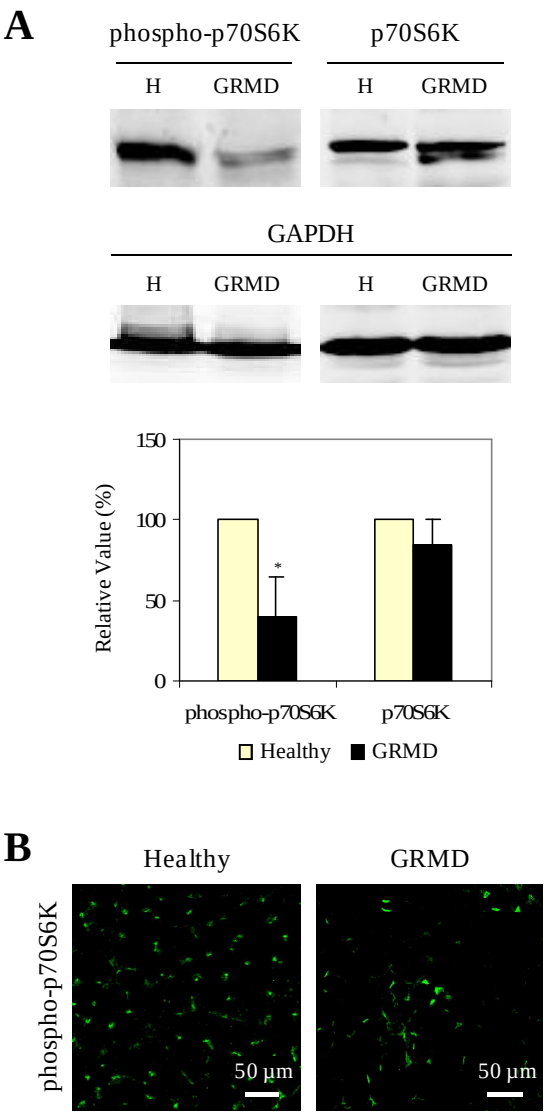

A
phospho-p70S6K
p70S6K
H
GRMD
H
GRMD
GAPDH
H
GRMD
H
GRMD
150
100
50
0
Relative Value (%)
*
phospho-p70S6K
p70S6K
Healthy
GRMD
B
Healthy
GRMD
phospho-p70S6K
50 µm
50 µm

Figure 5

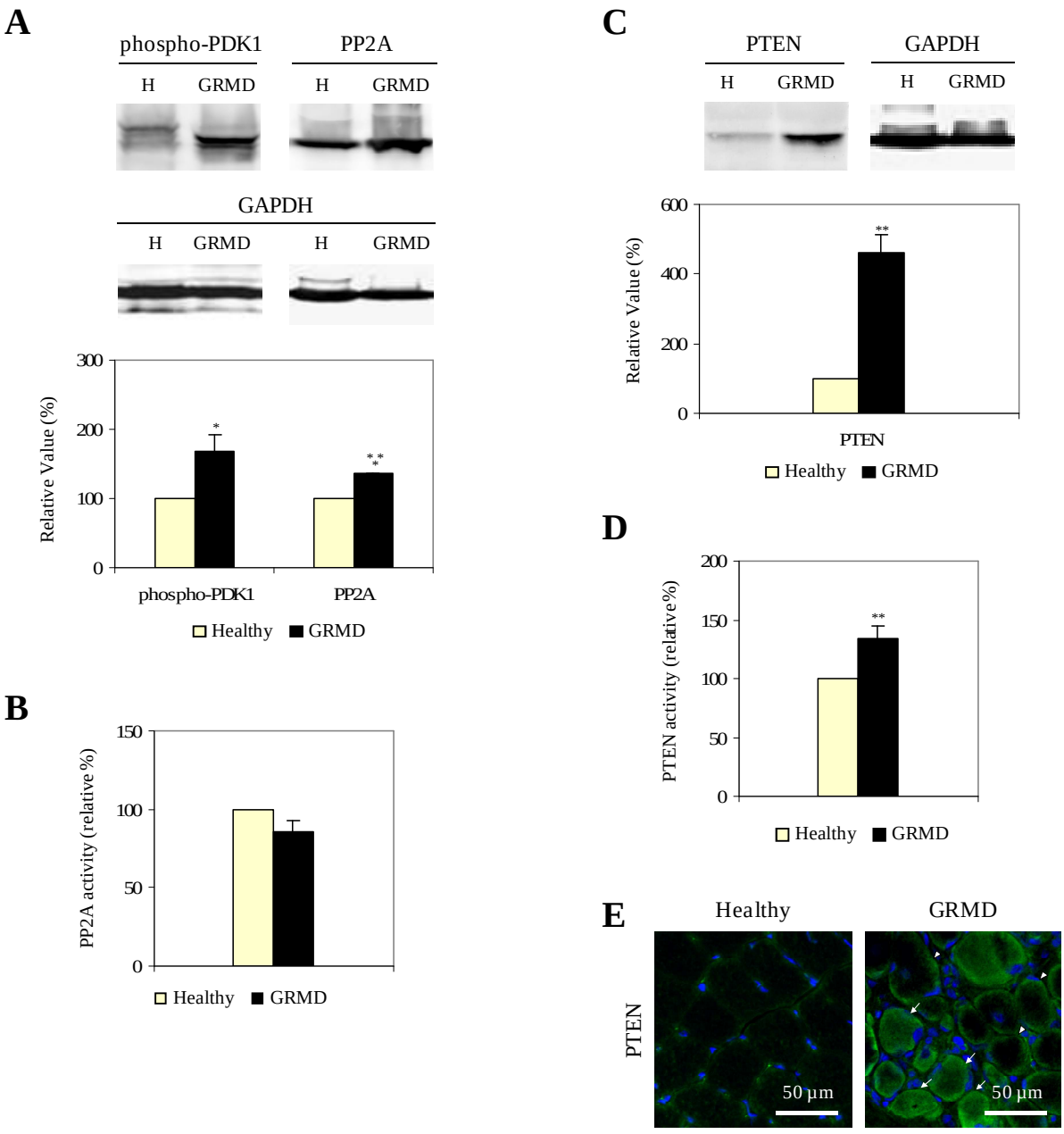

A
phospho-PDK1
PP2A
H
GRMD
H
GRMD
GAPDH
H
GRMD
H
GRMD
Relative Value (%)
300
200
100
0
*
**
*
phospho-PDK1
PP2A
Healthy
GRMD
B
PP2A activity (relative %)
150
100
50
0
Healthy
GRMD
C
PTEN
GAPDH
H
GRMD
H
GRMD
Relative Value (%)
600
400
200
0
**
PTEN
Healthy
GRMD
D
PTEN activity (relative %)
200
150
100
50
0
**
Healthy
GRMD
E
Healthy
GRMD
PTEN
50 µm
50 µm

Figure 6

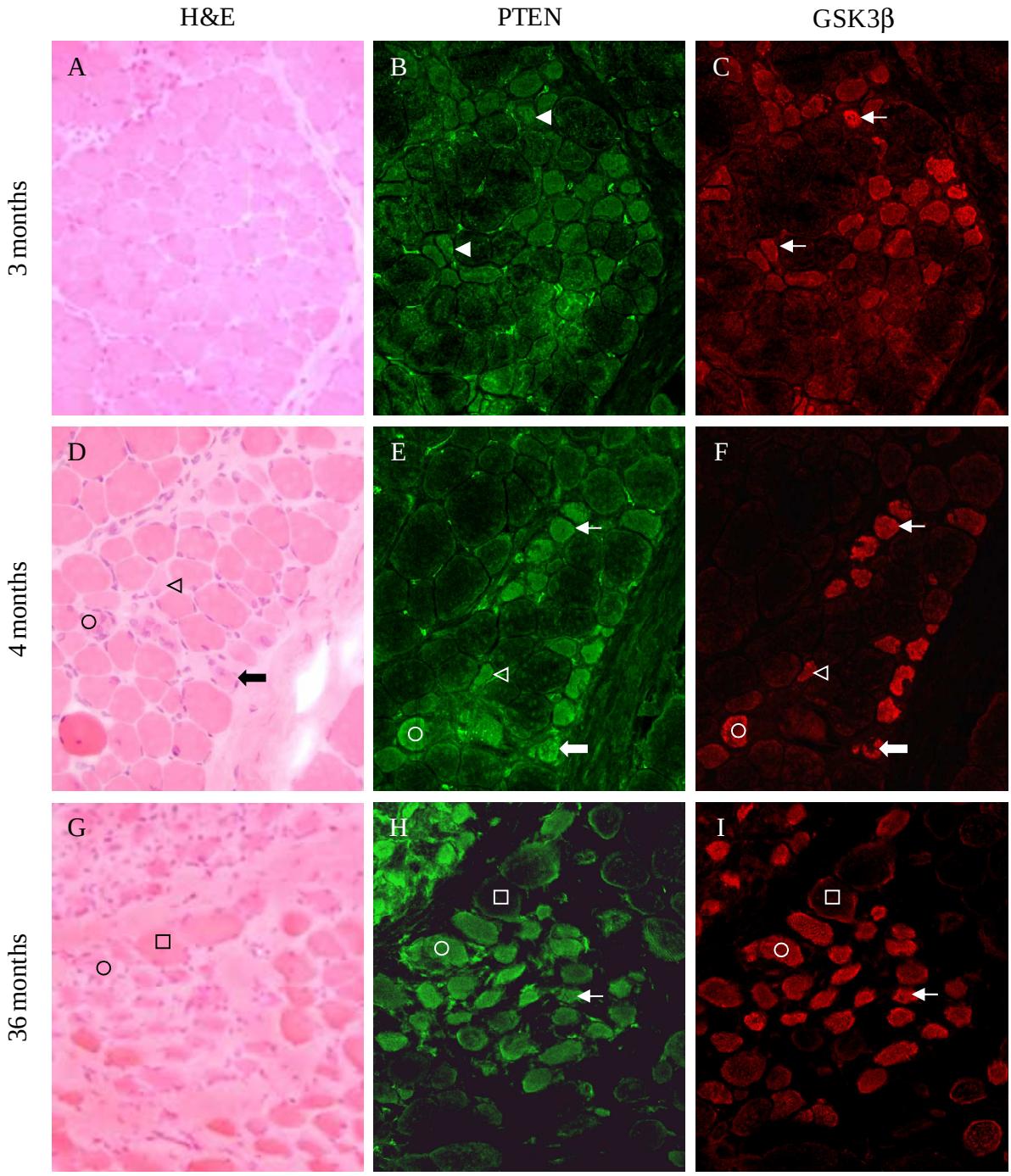
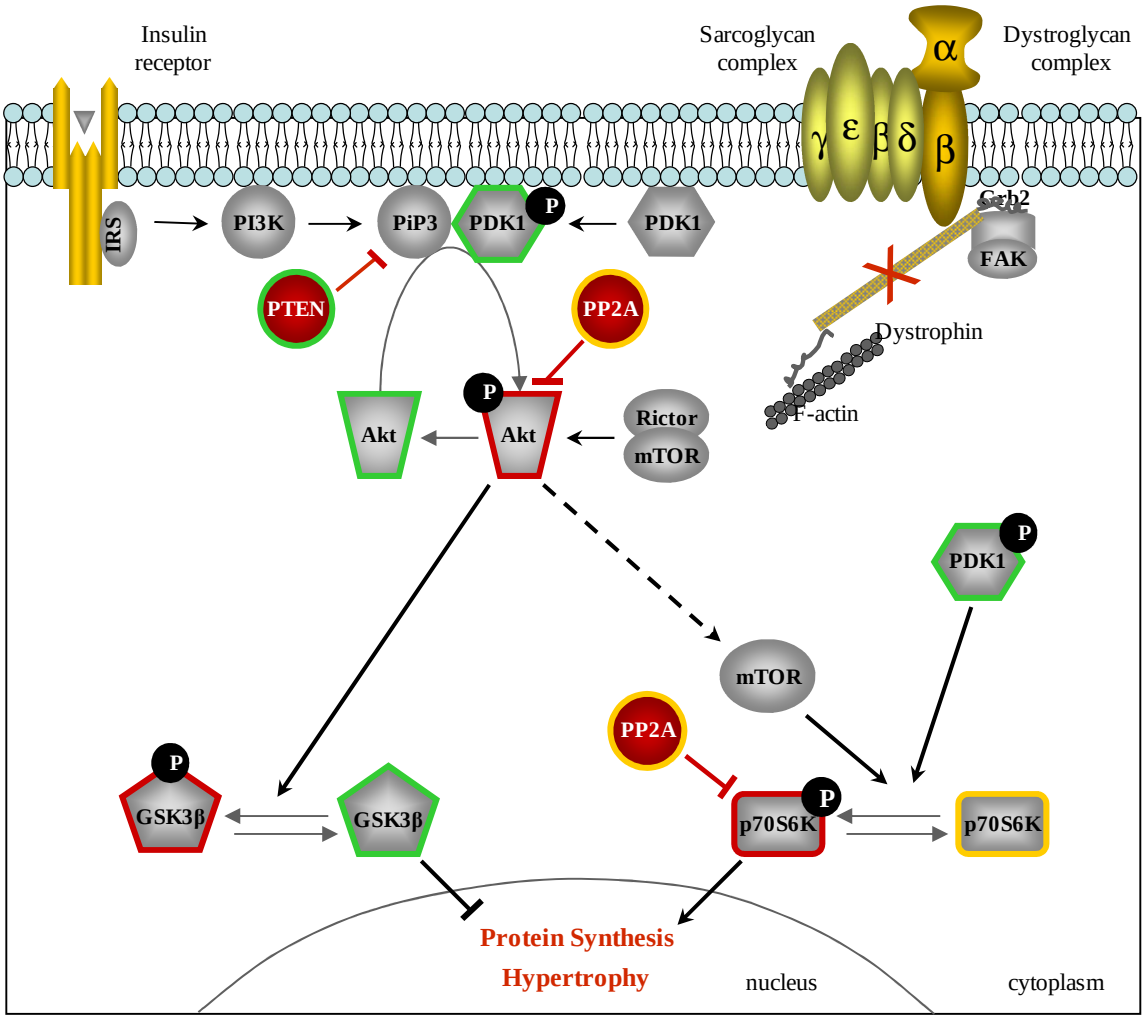


Figure 7



decreased in GRMD dog; increased in GRMD dog; identical; non determined

Supplemental Figure 1

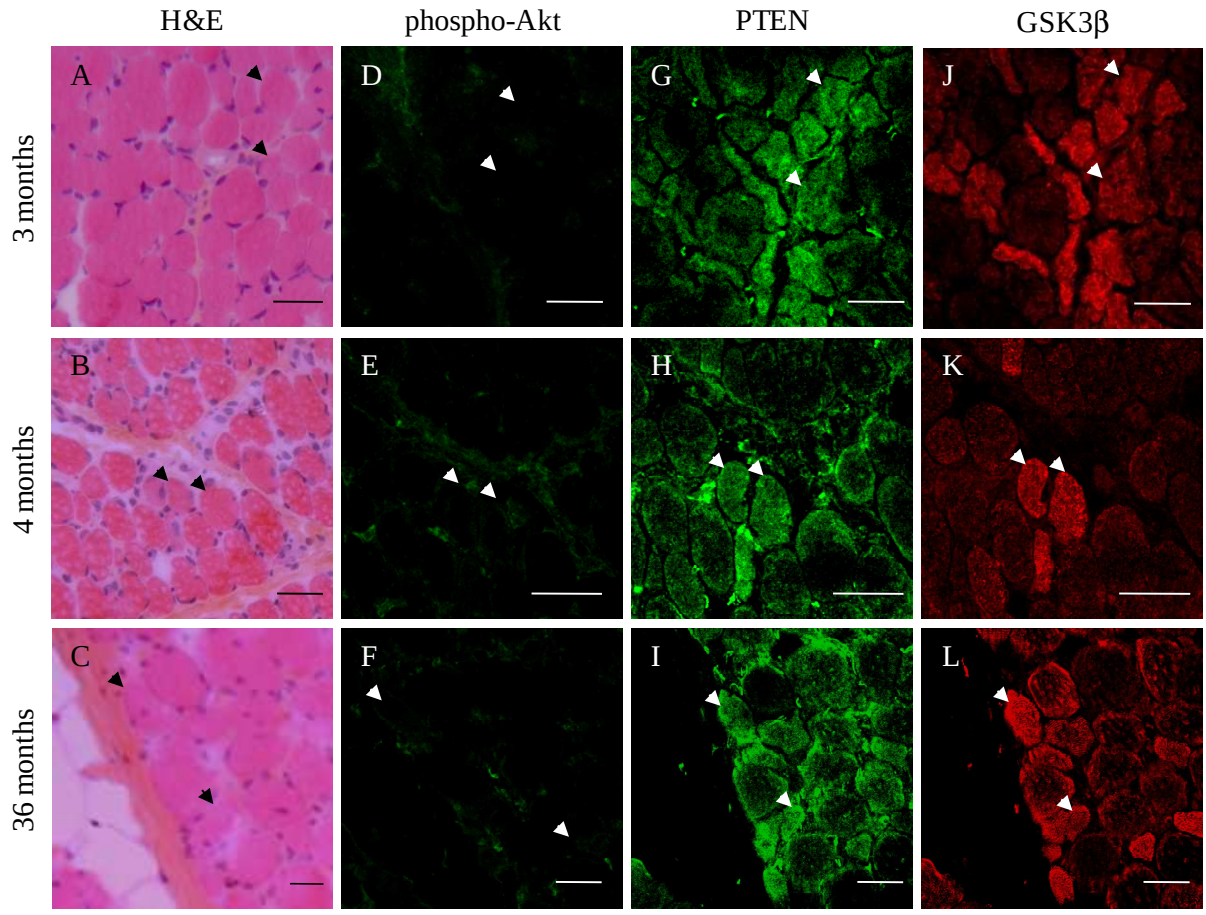


Figure legends

Figure 1. Antibody array analysis revealed PI3K/Akt and MAPK signaling pathway modulation in GRMD skeletal muscle.

A: Healthy and GRMD muscle extracts from 4-month-old dogs were incubated with two antibody arrays. Phosphorylated kinases were detected thanks to a cocktail of phospho-site specific biotinylated antibodies, via streptavidin-HRP and chemiluminescence. The position of the antibodies (double spots for each antibody) relative to the relevant protein kinases is shown. 1. Positive control; 2. ERK1 (right) and ERK2 (left); 3. JNK pan (bottom, right), JNK1 (top, right), JNK2 (top, middle) and JNK3 (top, left); 4. p38α (top, left), p38δ (bottom, right) and p38γ (top, right); 5. GSK3α/β (right) and GSK3β (left); 6. p70S6K and 7. Akt pan (bottom, left), Akt1 (top, right) and Akt2 (bottom, right). **B**: Quantification of the antibody array data. The spots chemiluminescence signal intensity was analyzed using Genepix Pro 4.0 software. The normalized spot intensity was determined by subtracting the averaged background signal from the spots corresponding to each kinase. A ratio of signal intensity (GRMD/healthy) was calculated, and log transformed (base2). The graph was constructed from two independent assays and error bars show the standard error of the mean. The numbers under the graph refer to Figure 1A. A cutoff value was determined by ANOVA analysis at 95% confidence level ($p<0.05$). * - significantly different from healthy muscle.

Figure 2. Akt exhibited increased expression, decreased phosphorylation, perturbed localization and reduced activity in GRMD skeletal muscle.

A: Western immunoblot analysis of Akt expression in skeletal muscle from 4-month-old healthy (H) and GRMD dogs. Total proteins (75 μg) were migrated with SDS-PAGE and the blotted proteins were incubated with anti-Akt1 antibody. The anti-GAPDH mAb was used to detect the corresponding control protein. Signals were analyzed by densitometry and quantified using the Odyssey Application Software Version 1.1. Immunohistochemical analysis for Akt1 was performed on transverse cryosections from 4-month-old healthy and GRMD dogs. Nuclear Akt1 immunolabeling was observed in healthy muscle fibers whereas strong Akt1 immunolabeling was observed in the cytosol of small GRMD muscle fibers (green fluorescent staining). Nuclear counterstaining is shown in blue. Scale bar – 50 μm.

B: Western immunoblot analysis of Akt phosphorylation level. Subcellular (cytosol, membranes and nucleus) protein fractions (10 μg) were migrated with SDS-PAGE and the blotted proteins were incubated with anti-phospho-Akt (Ser473), anti-LDHA (cytosolic

marker), anti-caveolin-3 (plasma membrane marker) and anti-histone H2AX (nucleus marker) antibodies. **C:** Immunohistochemical analysis for phosphorylated Akt (Ser473) showed strong fluorescent labeling of the nucleus and membrane in the healthy muscle, and a fall in the intensity of the phosphorylated Akt immunolabeling in the GRMD one (green fluorescent staining). Scale bar – 50 μm. **D:** Akt activity assay revealed that the kinase was almost twice less active in the GRMD muscle than in the healthy one. The histogram represents the relative level of Akt kinase activity in healthy and GRMD total extracts. The mean variation between the healthy and the GRMD muscle was calculated and the GRMD value was represented as a percentage of the healthy level taken as 100%. ** - significantly different from healthy muscle ($p<0.02$).

Figure 3. Decreased phosphorylation of GSK3β in GRMD skeletal muscle was associated with an increase in expression and enzymatic activity.

A and B: Total extracts (75 μg) obtained from healthy and GRMD skeletal muscles (4-month-old dogs) were migrated with SDS-PAGE. The blotted proteins were incubated with anti-phospho-GSK3β (Ser9) (**A**) or anti-GSK3β (**B**) antibody. The anti-GAPDH mAb was used as a loading control. **C:** Subcellular (cytosol, membranes and nucleus) protein fractions (10 μg) obtained from healthy and GRMD skeletal muscle were migrated with SDS-PAGE and the blotted proteins were incubated with anti-GSK3β antibody. **D:** Immunohistochemical analysis revealed weak cytosolic labeling of GSK3β in healthy muscle fibers, and strong cytosolic immunolabeling in GRMD muscle fibers (green fluorescent staining). Nuclear counterstaining is shown in blue. Scale bar – 50 μm. **E:** Calcium-sensitive dye alizarin red failed to stain any GSK3β-positive fibers (arrow and arrowhead). An alizarin red-positive fiber is shown (*). H&E staining revealed classical pathological changes of DMD including fiber size variation, fiber splitting and central nucleation in skeletal limb muscle. Some of the GSK3β-positive fibers were centro-nucleated (arrowhead). **F:** GSK3β activity assay revealed that the kinase was more than twice more active in GRMD muscle. For further details, see Fig. 2D. *** - significantly different from healthy muscle ($p<0.002$).

Figure 4. Decreased p70S6K phosphorylation in GRMD muscle was confirmed by western immunoblot and immunohistochemistry analysis.

A: Representative immunoblot of phosphorylated p70S6K (Thr421/Ser424) and total p70S6K in total extracts (75 μg) from healthy and GRMD skeletal muscles (4-month-old dogs). The

decreased phosphorylation of p70S6K detected by the antibody array analysis was confirmed. This was not accompanied by any change in the protein expression level. The histogram represents the relative level of phosphorylated and total p70S6K in healthy and GRMD extracts. The mean variation between the healthy and the GRMD muscle (normalized with GAPDH) was calculated and the GRMD value was represented as a percentage of the healthy level taken as 100%. * - significantly different from healthy muscle ($p<0.05$). **B:** Immunohistochemical analysis of phosphorylated p70S6K (Thr389). Whereas all nuclei were labeled within the healthy fibers, only a few GRMD nuclei exhibited a signal.

Figure 5. Increased PTEN expression and activity in GRMD skeletal muscle.
A: Total extracts (75 μg) from healthy and GRMD skeletal muscles (4-month-old dogs) were analyzed by immunoblotting and probed with antibodies to phospho-PDK1 (Ser241) and PP2A. The anti-GAPDH mAb was used as a loading control. Relative levels of phosphorylated PDK1 and total PP2A in healthy and GRMD muscles are shown on the graph. * - significantly different from healthy muscle *$p<0.05$, ***$p<0.002$. **B:** Phosphatase activity assay revealed no change in PP2A activity. For further details, see Fig. 2D. **C:** Representative immunoblot of PTEN in total extracts (75 μg) from healthy and GRMD skeletal muscle (4-month-old dogs). The anti-GAPDH mAb was used as a reference. Relative levels of total PTEN in healthy and GRMD muscles are shown on the graph. ** - significantly different from healthy muscle ($p<0.02$). **D:** Phosphatase activity assay revealed a significant increase in PTEN activity. ** - significantly different from healthy muscle ($p<0.02$). For further details, see Fig. 2D. **E:** Immunohistochemical analysis of PTEN confirmed the increase detected by western immunoblot. Most of the GRMD fibers exhibited a PTEN immunolabeling demonstrating sub-sarcolemmal accumulation (arrowhead) or dispersed localization in all the cytoplasm (arrow).

Figure 6. PTEN-positive fibers displaying GSK3β accumulation were observed at different stages of the disease.
H&E staining and double immunolabeling specific to PTEN and GSK3β were carried out on serial skeletal muscle sections from 3- (**A, B and C**), 4- (**D, E and F**) and 36-month-old (**G, H and I**) GRMD dogs. It revealed that GRMD muscle contained PTEN-positive fibers early, when the first characteristic histological lesions associated with the disease appeared, and that the presence of dispersed PTEN-positive fibers was maintained during the progression of the

disease. In 36-month-old dog muscle, that was characterized by the presence of extensive endomysial fibrosis and atrophic fibers, the proportion of PTEN-positive fibers seemed to be increased. Importantly, it appeared in the three age points examined that all the GSK3β-positive fibers also displayed elevated labeling for the upstream phosphatase PTEN.
Arrowhead: PTEN-positive fiber; arrow: PTEN/GSK3β-positive fiber; empty arrowhead: small PTEN/GSK3β-positive fiber; thick arrow: centrally nucleated fiber; round: necrotic fibers; square: hypertrophic PTEN/GSK3β-negative fiber.

Figure 7. Schematic diagram of signaling in the PI3K/Akt pathway and deregulations detected in GRMD skeletal muscle.
Proteins shown in red, green and yellow indicate decreased, increased and unchanged level of expression or activity of these enzymes in GRMD *vs*. healthy muscle, respectively. As PP2A phosphatase activity was not statistically modulated in GRMD muscle, the protein is shown in yellow. The deregulations detected in GRMD skeletal muscle could lead to decreased protein synthesis and block compensatory hypertrophy.

Supplemental Figure 1. The phosphorylated form of Akt was faintly detected in GRMD muscle whatever the stage of the disease.
H&E staining (**A, B and C**) and immunolabeling directed against phosphorylated Akt (**D, E and F**), PTEN (**G, H and I**) and GSK3β (**J, K and L**) were performed on serial skeletal muscle sections from 3-, 4- and 36-month-old GRMD dogs. They revealed that the phosphorylated form of Akt was barely detected whatever the stage studied. Scale bar, 50 µm.

Étude des voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt dans deux modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne : la souris *mdx* et le chien GRMD

Bien que l'origine de la dystrophie musculaire de Duchenne soit connue, des mutations dans le gène DMD aboutissant à l'absence de dystrophine, les mécanismes globaux définissant la pathogénie ne sont toujours pas élucidés. L'implication d'un dérèglement des voies de signalisation a été suggéré et nous souhaitions utiliser la technologie des puces à anticorps pour obtenir une vision globale des modulations affectant les voies MAPK et PI3K/Akt dans le muscle dystrophique. Après une première étude chez la souris mdx, les travaux ont été poursuivis sur le modèle du chien GRMD qui, de part sa physio-pathologie extrêmement proche de celle de l'homme, nous paraissait plus adapté. La comparaison du profil de phosphorylation de 19 kinases dans les muscles sain et GRMD révèle que Akt1, ses cibles directes et indirectes GSK3β et p70S6K, ainsi que les MAPK ERK1/2, p38δ et p38γ présentent toutes une phosphorylation réduite dans le muscle GRMD. Les tests d'activité enzymatique montrent que le défaut de phosphorylation des kinases de la voie PI3K/Akt détecté est associé à une activité réduite pour Akt et augmentée pour GSK3β (corrélé par une sur-expression de la kinase). Des expériences de western blot et des tests enzymatiques révèlent une augmentation de l'expression et de l'activité de la phosphatase PTEN, alors que les expériences de double marquage immunologique montrent la présence dans le muscle GRMD de fibres PTEN/GSK3β-positives et ce, à plusieurs stades. L'ensemble de ces travaux suggère que l'activation de PTEN dans le muscle dystrophique pourrait empêcher l'hypertrophie compensatoire régulée par la voie PI3K/Akt et aggraver les conséquences de l'absence de dystrophine.

Mots-clés : dystrophie musculaire de Duchenne, voies de signalisation, chien GRMD, souris *mdx*, puces à anticorps, Akt, PTEN, ERK

Study of the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways in two animal models of Duchenne muscular dystrophy : the *mdx* mouse and the GRMD dog

Although the origin of Duchenne muscular dystrophy is known, mutations in the DMD gene leading to the absence of dystrophin, the global mechanisms defining the pathogenesis are not yet understood. The implication of signaling pathway deregulation has been suggested and we wanted to take advantage of the antibody array technology to obtain a global overview of the modulations affecting the MAPK and PI3K/Akt pathways in dystrophic muscle. After a first study in the mdx mouse model, the work has been carried out in the GRMD dog that, thanks to its pathophysiology extremely close to that of human patients, appeared more pertinent to this study. The comparison of the phosphorylation profile of 19 different kinases between healthy and GRMD skeletal muscles reveale that Akt1, its direct and indirect targets GSK3β and p70S6K, along with the MAPK ERK1/2, p38δ and p38γ, all exhibit a reduced phosphorylation level in GRMD muscle. Enzymatic assays show that the phosphorylation defect of the PI3K/Akt pathway kinases detected in GRMD muscle is associated with decreased Akt and increased GSK3β activity (corroborated by an over-expression of the kinase). Western immunoblot experiments and enzymatic assays reveal increased expression and activity of the PTEN phosphatase, whereas immunohistochemcal double staining experiments show the presence in GRMD muscle sections of PTEN/GSK3β-positive fibers, and this at different stages of the disease. Taken together, these results suggest that PTEN activation in dystrophic muscle could prevent the compensatory hypertrophy response that is regulated by the PI3K/Akt pathway, and exacerbate the consequences of the absence of dystrophin.

Key words : Duchenne muscular dystrophy, signaling pathways, GRMD dog, *mdx* mouse, antibody array, Akt, PTEN, ERK