



**RÔLES DE RANK/RANKL/OPG DANS LE
MUSCLE SQUELETTIQUE**
**Intérêt thérapeutique potentiel pour la dystrophie
musculaire de Duchenne**

Thèse

SÉBASTIEN DUFRESNE

Doctorat en sciences cliniques et biomédicales
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Sébastien Dufresne, 2017

**RÔLES DE RANK/RANKL/OPG DANS LE
MUSCLE SQUELETTIQUE**
**Intérêt thérapeutique potentiel pour la dystrophie
musculaire de Duchenne**

Thèse

Sébastien Dufresne

Sous la direction de :

Dr. Jérôme Frenette, directeur de recherche

Résumé thèse

Une synchronicité existe entre l'apparition de l'atrophie musculaire et osseuse (ostéoporose) mais, très peu de groupes de recherche se sont intéressés à la possibilité qu'une voie de signalisation commune puisse contrôler simultanément ces tissus dans un contexte pathologique. Le but de cette thèse est de caractériser les rôles du sentier signalétique principal du remodelage osseux soit la voie RANK/RANKL/OPG, sur le muscle squelettique sain ou pathologique. Premièrement, nous avons démontré que RANK est exprimé dans le muscle squelettique et que son absence dans ce tissu induit un effet inotropique sur le muscle rapide *extensor digitorum longus* (EDL), limitant ainsi la perte de force maximale spécifique, tout en augmentant l'atrophie musculaire, la fatigabilité et la proportion de fibres rapides. Ensuite, nous avons montré qu'un blocage pharmacologique de la voie RANKL/RANK par l'OPG atténue la perte de la force musculaire de manière dose-dépendante et préserve l'intégrité musculaire, en particulier des muscles rapides EDL de souris dystrophiques. Cette étude nous a également permis de démontrer que l'OPG-Fc a un effet intéressant mais plus limité sur la préservation de la force du muscle lent soleus (Sol). Par contre, nous avons découvert que l'OPG-Fc potentialise les effets positifs d'une faible dose de formotérol, un membre de la famille des β_2 -agonistes, et leur combinaison restaure complètement la fonction du Sol des souris dystrophiques. Finalement, nous avons débuté une étude mécanistique sur l'effet protecteur de l'OPG-Fc sur le muscle squelettique dystrophique. Structurellement, l'OPG-Fc pleine longueur contient quatre domaines TNFR (RANKL), deux domaines de la mort cellulaire par apoptose (TRAIL) et un domaine lié à l'héparine. Nos résultats indiquent que les injections d'anti-RANKL, d'anti-TRAIL et d'OPG-Fc tronquée (possédant seulement les domaines TNFR) ou la suppression génétique de RANK dans le muscle sont nettement moins efficaces sur la préservation de la force des muscles dystrophiques que celles d'OPG-Fc pleine longueur. Étonnamment, l'absence de Ca^{2+} extracellulaire réduit considérablement les effets de l'OPG-Fc pleine longueur sur la force des muscles dystrophiques dans un modèle de contractilité in vitro. Nos analyses en microscopie confocale ont démontré que l'OPG-Fc pleine longueur pourrait se lier à un récepteur présentement non identifié localisé sur les myotubes et que cette liaison entraîne possiblement une activation d'une kinase liée aux intégrines (ILK) et la surexpression

d'une pompe calcique ATPase du réticulum sarcoplasmique appelée SERCA-2a, un déterminant clé de la performance musculaire. Les myotubes traités à l'héparinase, une enzyme connue pour cliver les domaines de l'héparine ou encore l'inhibition de l'ILK réduit significativement la surexpression de SERCA-2a induite par l'OPG-Fc. Cette thèse apporte globalement, une meilleure compréhension des fonctions de RANK/RANKL/OPG dans le muscle squelettique dénervé ou dystrophique et s'inscrit dans la liste des travaux pré-cliniques qui pourrait éventuellement contribuer à l'élaboration de nouveaux traitements pour les maladies musculaires et osseuses.

Abstract thesis

Although there is an obvious dynamic cross-talk between muscle and bone, a common signalling pathway that efficiently and synchronously controls these tissues has barely been investigated in all forms of muscle diseases. The aim of this thesis is to characterize the roles of RANK/RANKL/OPG, key regulators of bone remodeling, on skeletal muscle atrophy, phenotype and dysfunction. Firstly, we show that RANK is expressed in skeletal muscle and that muscle RANK deletion has inotropic effects in denervated fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) muscles, preventing on one side the loss of maximum specific force while promoting muscle atrophy and fatigability, and increasing the proportion of fast-twitch fibers. We next demonstrate that a pharmacological treatment of dystrophic *mdx* mice with recombinant full-length OPG-Fc mitigates the loss of muscle force in a dose-dependent manner and preserves muscle integrity, particularly in EDL muscles. We also found that the full-length OPG-Fc has limited effects on slow-twitch soleus (Sol) muscles. However OPG-Fc potentiates the positive effects of a low dose of formoterol, a member of β_2 -agonists, and completely restores the function of the Sol dystrophic muscles. Finally, we investigated the mechanism by which the full-length OPG-Fc protects the dystrophic muscles. Structurally, the OPG protein contains four TNFR domains (RANKL), two death domains (TRAIL) and a heparin-binding region. Our results indicate that anti-RANKL or anti-TRAIL or truncated OPG treatments (only TNFR domains) or RANK deletion are much less effective in preserving the strength of dystrophic muscles than full-length OPG-Fc. Surprisingly, the absence of extracellular Ca^{2+} significantly reduces the effects of full-length OPG-Fc on the force production of dystrophic muscles when incubated in a physiological bath in vitro. Confocal microscopy images showed that the full-length OPG-Fc binds directly to myotubes through a receptor that is currently unidentified activating possibly integrin-linked kinase (ILK) which upregulates sarco/endoplasmic calcium ATPase pump (SERCA-2a) expression in C2C12 myotubes. Heparinase, which cleaves heparin and heparin sulphate proteoglycan, or an inhibitor of ILK activity abrogates OPG-induced SERCA-2a expression, suggesting that OPG through ILK upregulates SERCA-2a expression, a key determinant of muscle performance. Overall, this thesis shed some light on RANK/RANKL/OPG functions in

skeletal muscle which will potentially contribute to the development of new treatments for several forms of muscle and bone diseases.

Table des matières

RÉSUMÉ THÈSE	III
ABSTRACT THESIS	V
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES	XIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
DÉDICACES	XVIII
AVANT-PROPOS	XX
REMERCIEMENTS	XXII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 PROBLÉMATIQUE.....	1
1.2 MUSCLE SQUELETTIQUE	3
1.2.1 <i>Structure et fonctions du muscle squelettique</i>	3
1.2.1.2 <i>Phénotype musculaire</i>	6
1.2.2 <i>Excitation - contraction - relaxation musculaire</i>	8
1.3 LE RÔLE DE LA VOIE RANK/RANKL/OPG DANS LA RÉGULATION DE LA DENSITÉ ET DU REMODELAGE OSSEUX	13
1.3.1 <i>Principales cellules osseuses</i>	13
1.3.2 <i>La triade RANKL/RANK/OPG</i>	16
1.4 RELATIONS ENTRE LE MUSCLE SQUELETTIQUE ET L'OS	21
1.4.1 <i>Influence mécanique</i>	21
1.4.2 <i>Influence cellulaire/chimique/moléculaire</i>	22
1.4.3 <i>Voies de signalisation communes aux muscles et os</i>	24
1.5 BUTS / OBJECTIFS / HYPOTHÈSES	34
CHAPITRE 2 : RANK EST UN RÉGULATEUR CLEF DU STOCKAGE DU CALCIUM, DE L'ACTIVITÉ DE SERCA ET DE LA FONCTION MUSCULAIRE CHEZ LES FIBRES RAPIDES DU MUSCLE SQUELETTIQUE	35
RÉSUMÉ	37
ABSTRACT	38
2.1 INTRODUCTION	39
2.2 MATERIAL & METHODS	41
2.2.1 <i>Ethical Approval</i>	41
2.2.2 <i>Animals</i>	41
2.2.3 <i>Denervation</i>	41
2.2.4 <i>Cell Culture</i>	42
2.2.5 <i>Genomic DNA for Genotyping</i>	42
2.2.6 <i>Isometric Contractile Properties</i>	42
2.2.7 <i>Immunohistochemistry</i>	43
2.2.8 <i>Western Blotting</i>	43
2.2.9 <i>Calcium Measurements</i>	44
2.2.10 <i>SERCA Parameters</i>	45
2.2.11 <i>Statistical Analyses</i>	45

2.3 RESULTS	47
2.3.1 <i>RANK is Expressed in Fully Differentiated C2C12 Myotubes and at the Sarcolemmal Membrane of Skeletal Muscle</i>	47
2.3.2 <i>RANK Deletion Affects Denervated Muscle Mass and Function</i>	47
2.3.3 <i>Total Calcium and SERCA Activity and Expression in RANK^{ff} and RANK^{mko} Muscles</i> ..	48
2.4 DISCUSSION.....	50
2.5 PERSPECTIVE AND CONCLUSION.....	52
2.6 DISCLOSURES SECTION.....	53
2.7 REFERENCES.....	54
2.8 FIGURES, TABLES AND LEGENDS	58
CHAPITRE 3 : L'OSTÉOPROTÉGÉRINE LIMITE LES SÉQUELLES DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE.....	70
RESUME	72
ABSTRACT	73
3.1 INTRODUCTION	74
3.2 MATERIALS AND METHODS.....	76
3.2.1 <i>Animals</i>	76
3.2.2 <i>Isometric Contractile Properties</i>	76
3.2.3 <i>Immunohistochemistry, Immunofluorescence and Staining</i>	77
3.2.4 <i>Cell Culture</i>	77
3.2.5 <i>ELISA</i>	78
3.2.6 <i>Statistical Analyses</i>	78
3.3 RESULTS	79
3.3.1 <i>Stimulated-C2C12 Myotubes Secrete Osteoprotegerin</i>	79
3.3.2 <i>OPG-Fc Treatment Greatly Increases Dystrophic Muscle Function</i>	79
3.3.3 <i>OPG-Fc Preserves Muscle Integrity and Reduces Leukocyte Accumulation in Dystrophic Muscles</i>	80
3.4 DISCUSSION.....	81
3.5 PERSPECTIVE AND CONCLUSION.....	83
3.6 DISCLOSURES SECTION.....	84
3.7 REFERENCES.....	85
3.8 FIGURES, TABLES, AND LEGENDS	90
CHAPITRE 4 : L'OSTÉOPROTÉGÉRINE ET LES β_2-AGONISTES ATTÉNUENT LES IMPACTS DE LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DES FIBRES RAPIDES ET LENTES CHEZ LE MUSCLE SQUELETTIQUE MURIN	98
RÉSUMÉ	100
ABSTRACT	101
4.1 INTRODUCTION	102
4.2 MATERIALS AND METHODS.....	104
4.2.1 <i>Animals</i>	104
4.2.2 <i>Isometric Contractile Properties</i>	104
4.2.3 <i>Immunohistochemical and Immunofluorescence analyses</i>	105
4.2.4 <i>Hematoxylin/eosin Ataining and Serum Creatine Kinase Assays</i>	105
4.2.4 <i>Western Blots</i>	106
4.2.5 <i>Statistical Analysis</i>	106
4.3 RESULTS	107
4.3.1 <i>Osteoprotegerin Rescues the Expression of the β_2-Adrenergic Receptor</i>	107
4.3.2 <i>Osteoprotegerin Acts Synergistically with Formoterol to Enhance Dystrophic Slow-twitch Muscle Function</i>	107

4.3.3 <i>Osteoprotegerin is as Effective as Formoterol in Reducing Muscle Damage and Inflammation</i>	108
4.4 DISCUSSION.....	109
4.5 PERSPECTIVE AND CONCLUSION	110
4.6 DISCLOSURES SECTION	111
4.7 REFERENCES.....	112
4.8 FIGURES AND LEGENDS.....	115
CHAPITRE 5 : L'OSTEOPROTEGERINE ATTENUÉ LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE PAR LE BIAIS D'UN MECANISME INDEPENDANT DE RANKL ET TRAIL	126
RESUME	128
ABSTRACT	130
5.1 BRIEF INTRODUCTION	131
5.2 MATERIALS AND METHODS.....	132
5.2.1 <i>Animals</i>	132
5.2.2 <i>Immunofluorescence and Staining</i>	132
5.2.3 <i>Cell Cultures</i>	133
5.2.4 <i>Western Blots and qPCR</i>	134
5.2.5 <i>Contractile Properties</i>	134
5.2.6 <i>Downhill Running Protocol</i>	135
5.2.7 <i>SERCA activity</i>	135
5.2.8 <i>Statistical Analyses</i>	136
5.3 RESULTS AND DISCUSSION.....	137
5.3.1 <i>RANK Expression in Human Primary Myotubes and Mice Skeletal Muscles</i>	137
5.3.2 <i>Full-Length OPG-Fc Mitigates Muscular Dystrophy in Fast-Twitch EDL Muscles</i>	137
5.3.3 <i>Extracellular Ca²⁺ Is Necessary for Enhancing Force Production in Full Length OPG-Fc treated Dystrophic Mice</i>	139
5.3.4 <i>Full-Length OPG-Fc Prevents Eccentric Contractions-induced Muscle Damage and Increases Functional Performance</i>	140
5.3.5 <i>Full-Length OPG-Fc Increases SERCA ATPase Parameters of Dystrophic EDL Muscles</i>	140
5.3.6 <i>Full-Length OPG-Fc Binds Directly to Skeletal Muscle and Acts Independently of RANKL/RANK</i>	141
5.4 PERSPECTIVE AND CONCLUSION.....	142
5.5 DISCLOSURES SECTION	142
5.6 REFERENCES.....	144
5.7 FIGURES AND LEGENDS	148
CONCLUSION & PERSPECTIVES	160
6.1 <i>RANK EST EXPRIMÉ DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE ET IMPLIQUÉ DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE CE TISSU POST-DÉNÉRVATION</i>	160
6.2 <i>LA FONCTION MUSCULAIRE DES SOURIS DYSTROPHIQUES TRAITÉES AVEC L'OPG-FC EST PRÉSERVÉE PAR UN MÉCANISME INDÉPENDANT DE RANK/RANKL</i>	163
6.3 <i>L'OPG-FC ET LE FORMOTÉROL ONT DES EFFETS PROTECTEURS ET SYNERGISTES SUR LA FONCTION DES MUSCLES LENTS DES SOURIS MDX</i>	166
6.5 <i>RETOUR SUR L'OBJECTIF PRINCIPAL</i>	169
ANNEXE 1 : RÔLES PHYSIOLOGIQUES DE RANK DANS LA DYSFONCTION ET ATROPHIE MUSCULAIRES POST-DÉNÉRVATION	170
RESUME	172
ABSTRACT	173
A1.1 INTRODUCTION	174

A1.2 MUSCLE PHENOTYPE AND RANK.....	175
A1.3 CALCIUM SIGNALLING, RANK, AND SKELETAL MUSCLE	176
A1.4 RANKL/RANK INTERACTIONS AND INTRACELLULAR SIGNALING NETWORKS IN BONE AND SKELETAL MUSCLE	179
A1.5 FUTURE DIRECTIONS AND PERSPECTIVES	180
A1.6 CONFLICTING INTERESTS.....	180
A1.7 AUTHORS' CONTRIBUTIONS.....	180
A1.8 REFERENCES.....	181
A1.9 FIGURE AND LEGENDS	184
ANNEXE 2 : INFLAMMATION ET RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE, UNE ARME À DOUBLE TRANCHANT.	186
RÉSUMÉ	188
ABSTRACT	189
A2.1 INTRODUCTION	190
A2.2 INITIATION DE L'INFLAMMATION ET RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE	191
A2.3 DÉVELOPPEMENT DE L'INFLAMMATION ET RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE.....	192
A2.4 RÉOLUTION DE L'INFLAMMATION ET RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE.....	194
A2.5 INFLAMMATION ET CONDITIONS PATHOLOGIQUES OU CHRONIQUES	196
A2.5.1 <i>Dystrophie musculaire</i>	196
A2.5.2 <i>Vieillesse</i>	197
A2.6 PERSPECTIVES.....	198
A2.7 LIENS D'INTÉRÊT	199
A2.9 RÉFÉRENCES.....	200
A2.10 FIGURES ET LÉGENDES.....	203
ANNEXE 3 : CARACTÉRISATION DES SOUCHES MYCOLACTONE-POSITIVE ET MYCOLACTONE-NÉGATIVE DU <i>M. ULGERANS</i> SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE : IGF-1 LIMITE LE CATABOLISME MUSCULAIRE INDUIT PAR LA MYCOLACTONE	206
RESUME	208
ABSTRACT	209
A3.1 INTRODUCTION	210
A3.2 MATERIALS AND METHODS.....	212
A3.2.1 <i>Animals</i>	212
A3.2.2 <i>Mycobacterium Ulcerans and Mycolactone</i>	212
A3.2.3 <i>Injection Procedures</i>	212
A3.2.4 <i>Isometric Contractile Properties and Tissue Freezing</i>	213
A3.2.5 <i>Immunohistochemical Analyses</i>	213
A3.2.6 <i>Myofiber Cross-Sectional Area</i>	214
A3.2.7 <i>Cell Viability Rate</i>	214
A3.2.8 <i>Ziehl-Neelsen Staining</i>	215
A3.2.9 <i>C2C12 Myoblast Proliferation</i>	215
A3.2.10 <i>C2C12 Myotube Diameter Analysis</i>	215
A3.2.11 <i>Western Blots</i>	216
A3.2.12 <i>Statistical Analysis</i>	217
A3.3 RESULTS	218
A3.3.1 <i>WT-MU and, to a Much Lesser Extent, M^{neg}-MU, are Found in the Periphery of Skeletal Muscle, and Induced Leukocyte Accumulation and Loss of Muscle Function</i>	218
A3.3.2 <i>WT-MU, but not M^{neg}-MU, Inhibits Myoblast Proliferation and Induces Myotube Atrophy</i>	219

<i>A3.3.3 The Addition of Exogenous IGF-1 Partially Rescues the Inhibitory Effects of WT-MU and Mycolactone on Myoblast Proliferation and Myotube Atrophy.....</i>	<i>220</i>
A3.4 DISCUSSION.....	221
A3.5 CONCLUSION AND PERSPECTIVES.....	223
A3.6 ACKNOWLEDGMENTS.....	224
A3.7 DISCLOSURES.....	224
A3.8 REFERENCES.....	225
A3.9 FIGURES AND LEGENDS.....	229
RÉFÉRENCES	240

Liste des tableaux

TABLEAU 2-1: BODY WEIGHTS AND MUSCLE MASS NORMALIZED TO BODY WEIGHT OF MICE.	58
TABLEAU 2-2: CONTRACTILE PROPERTIES OF SOL AND EDL MUSCLES.	59
TABLEAU 3-1: CONTRACTILE AND PHYSICAL PROPERTIES OF SOL, EDL AND DIA MUSCLES FROM C57BL/10J AND MDX MICE TREATED WITH PBS OR OPG-Fc.	90
TABLEAU 4-1: MORPHOLOGICAL AND CONTRACTILE PARAMETERS FROM WILD TYPE AND MDX MICE TREATED WITH PBS OR OPG-Fc AND/OR FORMOTEROL.	121
TABLEAU 4-2: MOYOFIBER SIZE AND PHENOTYPE OF SOL MUSCLES FROM WILD TYPE AND MDX MICE TREATED WITH PBS OR OPG-Fc AND/OR FORMOTEROL.	122
TABLEAU 4-3: MYOFIBER SIZE AND PHENOTYPE OF EDL MUSCLES FROM WILD TYPE AND MDX MICE TREATED WITH PBS OR OPG-Fc AND/OR FORMOTEROL	124

Liste des figures

FIGURE 1-1: ILLUSTRATION DU SARCOMÈRE DU MUSCLE SQUELETTIQUE TIRÉ DE [26]	3
FIGURE 1-2: RÔLES DU CALCIUM DANS LA CONTRACTION MUSCULAIRE TIRÉ DE [38]	9
FIGURE 1-3: LOCALISATION ET STRUCTURE DE ORAI/STIM1 TIRÉ DE [76]	12
FIGURE 1-4: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE RANK/RANKL DANS L'OS TIRÉ DE [233]	18
FIGURE 1-5: LES SEPT DOMAINES STRUCTURAUX ET LE RÉSIDU CYSTÉINE LIBRE DE L'OPG TIRÉ DE [115]	18
FIGURE 1-6: SITES DE LIAISONS ET SIGNALISATION DE L'OPG TIRÉ DE [115]	19
FIGURE 1-7: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU COMPLEXE DYSTROPHINE/GLYCOPROTÉINE TIRÉ DE [169]	26
FIGURE 1-8: CARTE CONCEPTUELLE DE LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA DMD TIRÉ DE [169].....	28
FIGURE 1-9: MÉCANISME D'ACTION DES β -AGONISTES SUR LE MUSCLE SQUELETTIQUE TIRÉ DE [199].....	30
FIGURE 1-10: INBITEURS EXPÉRIMENTAUX DE NF- κ B TESTÉS CHEZ LA SOURIS MDX TIRÉ DE [209].....	33
FIGURE 2-1: RANK EXPRESSION IN SKELETAL MUSCLES AND MYOTUBES.	61
FIGURE 2-2: IMPACT OF RANK DELETION ON MUSCLE CONTRACTILITY, FATIGUE, AND PHENOTYPE.	62
FIGURE 2-3: PERCENTAGE OF TYPE I AND II FIBERS IN SOL MUSCLES AND PROPORTION OF EACH FIBER TYPE EXPRESSING SERCA-1A AND SERCA-2A IN SOL AND EDL MUSCLES.	64
FIGURE 2-4: TOTAL CALCIUM CONTENT, SERCA ACTIVITY AND CALCIUM PROTEIN CONTENTS IN RANK ^{F/F} AND RANK ^{MKO} EDL MUSCLES.	67
FIGURE 2-5: SERCA Ca ²⁺ -DEPENDENT ATPASE PARAMETERS FROM SHAM AND DENERVATED RANK ^{F/F} AND RANK ^{MKO} IN SOL MUSCLES.	68
FIGURE 2-6: SCHEMATIC REPRESENTATION OF RANK/RANKL/OPG PATHWAY AS COMMON REGULATOR OF BONE AND MUSCLE CELLS.	69
FIGURE 3-1: LPS-STIMULATED MYOTUBES PRODUCE OPG.	91
FIGURE 3-2: OPG-Fc TREATMENT MITIGATES LOSS OF FORCE IN DYSTROPHIC MUSCLES.	92
FIGURE 3-3: INFLAMMATORY CELLS IN SOL MUSCLE FROM MDX OPG-TREATED MICE.	93
FIGURE 3-4: OPG-Fc TREATMENT GREATLY IMPROVES MUSCLE INTEGRITY AND REDUCES MUSCLE INFLAMMATION.	94
FIGURE 3-5: INFLAMMATORY CELLS IN DIA MUSCLE FROM MDX OPG-TREATED MICE.	95
FIGURE 3-6: MUSCLE DAMAGE IN SOL AND DIA MUSCLES FROM MDX OPG-TREATED MICE.	96
FIGURE 3-7: SCHEMATIC REPRESENTATION OF RANK/RANKL/OPG PATHWAY.....	97
FIGURE 4-1: OSTEOPROTEGERIN RESTORES THE β_2 -ADRENOCEPTOR CONTENT OF DYSTROPHIC SOL AND EDL MUSCLES.....	115
FIGURE 4-2: FORMOTEROL AND OSTEOPROTEGERIN ACT SYNERGISTICALLY IN SLOW-TWITCH SOL MUSCLES BUT NOT IN FAST-TWITCH EDL MUSCLES.	116
FIGURE 4-3: OSTEOPROTEGERIN AND FORMOTEROL SIGNIFICANTLY IMPROVE MUSCLE INTEGRITY AND REDUCE MUSCLE INFLAMMATION IN SLOW-TWITCH SOL MUSCLES OF MDX MICE.....	118
FIGURE 4-4: SCHEMATIC AND HYPOTHETICAL REPRESENTATION DEPICTING HOW OSTEOPROTEGERIN AND FORMOTEROL MAY INTERACT IN DYSTROPHIC MUSCLES.	119
FIGURE 5-1: RANK EXPRESSION IN HUMAN PRIMARY MYOTUBES AND MICE SKELETAL MUSCLES.	148
FIGURE 5-2: FULL-LENGTH OPG-Fc, AND TO A LESSER EXTENT RANK DELETION, MITIGATES MUSCULAR DYSTROPHY IN FAST-TWITCH SKELETAL MUSCLES.	150
FIGURE 5-3: EXTRACELLULAR Ca ²⁺ IS NECESSARY FOR ENHANCING FORCE PRODUCTION IN FULL-LENGTH OPG- TREATED DYSTROPHIC MICE.	152
FIGURE 5-4: FULL-LENGTH OPG-Fc PREVENTS ECCENTRIC CONTRACTIONS-INDUCED MUSCLE DAMAGE AND INCREASED FUNCTIONAL PERFORMANCE POST-ECCENTRIC DOWNHILL RUNNING.....	154
FIGURE 5-5: FULL-LENGTH OPG-Fc TREATMENT INCREASED SERCA ACTIVITY AND SERCA-2A PROTEIN CONTENT IN FAST-TWITCH DYSTROPHIC EDL MUSCLES.....	156
FIGURE 5-6: FULL-LENGTH OPG-Fc BINDS DIRECTLY TO SKELETAL MUSCLE AND ACTS INDEPENDENTLY OF RANKL/RANK.....	158
ANNEXE: 1-1: SCHEMATIC AND HYPOTHETICAL REPRESENTATION DEPICTING THE FUNCTION OF RANK IN SKELETAL MUSCLE.....	184

ANNEXE: 2-1: LEUCOCYTES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE SAIN	203
ANNEXE: 2-2: EFFETS DES DIFFÉRENTS LEUCOCYTES SUR LA RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE SUITE À UNE BLESSURE AIGUË ET STÉRILE.	204
ANNEXE: 2-3: LEUCOCYTES DANS UNE CONDITION MUSCULAIRE DÉGÉNÉRATIVE CHRONIQUE.	205
ANNEXE: 3-1: HISTOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL ANALYSES FROM MICE INFECTED WITH <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i>.....	229
ANNEXE: 3-2: ISOMETRIC CONTRACTILE PROPERTIES OF INFECTED BICEP MUSCLES.....	231
ANNEXE: 3-3: PHYSIOLOGICAL FIBER CROSS-SECTIONAL AREAS OF INFECTED BICEP MUSCLES.	233
ANNEXE: 3-4: DETECTION OF APOPTOSIS FEATURE BY ANNEXIN V- PROPIDIUM IODIDE (PI).	234
ANNEXE: 3-5: C2C12 MYOBLAST PROLIFERATION IN THE PRESENCE OF <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i>.	236
ANNEXE: 3-6: C2C12 MYOTUBE ATROPHY IN THE PRESENCE OF <i>MYCOBACTERIUM ULCERANS</i>.....	237
ANNEXE: 3-7: IGF-1 PARTIALLY REVERSES THE NEGATIVE EFFECT OF WT-MU AND MYCOLACTONE ON C2C12 MYOBLASTS	238
ANNEXE: 3-8: MYOSIN HEAVY CHAIN (MYHC), MUSCLE RING FINGER PROTEIN-1 (MURF-1), ATROGIN-1, AKT-1 AND P-AKT-1 LEVELS IN MYOTUBES EXPOSED TO VARIOUS CONDITIONS <i>IN VITRO</i>	239

Liste des abréviations

$[Ca^{2+}]_i$	Concentration intra-cytosolique en ions calcium
$[Ca^{2+}]_{rs}$	Concentration intra-reticulum sarcoplasmique en ions calcium
$[Ca^{2+}]_t$	Concentration totale en ions calcium
½ RT	<i>Half relaxation time</i>
4EBP1	<i>eIF4E-binding protein</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AMPC/cAMP	Adénosine monophosphate cyclique / <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
CamKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CPA	<i>Cyclopiazonic acid</i>
CSQ	Calséquestrine
CT	<i>Contraction time</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DHPR	<i>Dihydropyridines</i>
E : C	Excitation-contraction
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eIF2	Facteur d'initiation eukaryotique 2B
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FKBP12	<i>FK506 binding protein</i>
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GSK3B	<i>Glycogen synthase kinase-3b</i>
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
H/E	<i>Hematoxylin-eosin</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	<i>Horse serum</i>
IGF-1	<i>Insulin growth factor</i>
IGF-1R	<i>Insulin growth factor receptor</i>
IFN-γ	Interféron-γ
IKK	<i>IκB kinase</i>
ILK	<i>Integrin linked kinase</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
i.p.	Intrapéritonéal
IP ₃ R	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor</i>

Lf	Longueur des fibres
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCK	<i>Muscle creatine kinase</i>
MCT4	<i>Monocarboxylate transporter 4</i>
MCU	<i>Mitochondrial calcium uniporter</i>
mTor	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MU	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
MuRF-1	<i>Muscle ring-finger protein-1</i>
Myf-5	<i>Myogenic factor 5</i>
MyoD	<i>Myoblast determination protein</i>
NCX	<i>Sodium-calcium exchangers</i>
NFATc	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
OPG	Ostéoprotégérine
P70S6K	<i>P70-ribosomal S6 kinase</i>
Pax-7	<i>Paired box 7</i>
PGC-1	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
Pi	Phosphate inorganique
PIP2	<i>Phosphatidyl-inositol-diphosphate</i>
PKA	Protéine kinase A
PLB	<i>Phospholamban</i>
PMCA	<i>Plasma membrane Ca²⁺ ATP-ase</i>
PVDF	Polyvinyl difluoride
P0	Force maximale
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
ROC	<i>Receptor-operated channel</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
RYR	<i>Ryanodine receptor</i>
SAC	<i>Stretch-activated channels</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SERCA	<i>Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
Ser	Serine
SLN	<i>Sarcophilin</i>
SOC/SOCE	<i>Store-operated calcium entry channel</i>
Sol	<i>Soleus</i>
sP0	Force maximale spécifique
SR	<i>Sarcoplasmic reticulum</i>
STIM1	<i>Stromal interaction protein 1</i>
TGF-β	<i>Tumor growth factor-β</i>
Thr	Threonine
TPT	<i>Time to peak tension</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>

TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
UM	Unité motrice
UP	Ubiquitine-protéasome
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Dédicaces

Je dédie cette thèse à l'avancement et à l'excellence de la physiothérapie.

«Vous devez être le changement que vous voulez voir dans ce monde»
Gandhi (1869-1948)

Avant-propos

Le corps de cette thèse est composé de trois articles publiés (chapitres II, III et IV) et d'un article en préparation (chapitre V). Initialement, les résultats des chapitres II et III constituaient un seul article qui a été soumis à la revue *Nature*. Devant le refus du manuscrit proposé, nous l'avons scindé en deux articles distincts désormais publiés dans *American Journal of Pathology* (2015) et *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (2016). Pour ces deux articles, je suis co-premier auteur avec Nicolas Dumont, un ancien étudiant du laboratoire, et ce, en raison de l'envergure du projet de recherche. L'article publié dans *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* a obtenu une distinction de la part des éditeurs de ladite revue et la maison d'édition a reconnu l'article comme le meilleur du mois de mars 2016. Le chapitre IV, dont je suis le premier auteur a été accepté en novembre 2016 et sera publié sous peu dans *American Journal of Pathology*. Ensuite, les données principales de mon dernier projet de recherche, encore incomplètes sont présentées au chapitre V. Finalement, 3 articles présentés en annexe, dont je suis le premier auteur sont publiés respectivement dans *Receptor and Clinical Investigation* (2016), *Médecine/sciences* (2016) et *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (2013). Les articles sont inclus sous leur forme originale, à l'exception de corrections mineures du texte et de changements pour uniformiser la présentation de la thèse.

Pour ces travaux de recherche, mes responsabilités étaient de collaborer à la conception et à la mise au point du devis expérimental, à la réalisation des expériences, à l'analyse des résultats ainsi qu'à la rédaction des articles. Mon directeur de recherche, le Dr. Jérôme Frenette, a quant à lui supervisé et contribué à l'élaboration des objectifs spécifiques ainsi qu'à la rédaction des articles. Notre désir de comprendre la voie de signalisation RANK/RANKL/OPG dans le muscle squelettique a nécessité la présence de nombreux co-auteurs afin d'inclure un amalgame d'expertises diversifiées et complémentaires.. Le Dr. Russel A. Tupling et ses étudiants ont réalisé et analysé les expériences associées à

l'activité enzymatique de SERCA, une pompe Ca^{2+} /ATPasique. Le Dr. Paul Pape et son étudiante ont mesuré et interprété le niveau de calcium total. Finalement, le Dr. Josef Penninger nous a généreusement offert les souris génétiquement déficientes en RANK musculaire..

En complémentarité aux articles présentés dans cette thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à d'autres projets de recherche qui ont conduit à des publications comme co-auteur. Ainsi, j'ai réalisé et analysé les propriétés contractiles du vas deferens, un muscle lisse, en collaboration avec l'équipe du Dr. Jean Sévigny. Ces résultats sont publiés dans *The Journal of Biological Chemistry* (2014). Grâce à une autre collaboration avec le Dr. Luc A. Sabourin de l'University of Ottawa, un manuscrit est présentement en révision dans la revue *Skeletal Muscle sur les effets d'une délétion du gène STE-20 kinase sur les fonctions musculaires*. En dernier lieu, j'ai collaboré à une étude clinique en collectant et analysant les données de bilan musculaire quantifié provenant d'un appareil isocinétique chez la femme enceinte publiée dans *PLOS ONE* (2015).

Remerciements

Une thèse de doctorat est l'aboutissement d'un marathon intellectuel où son succès ne dépend pas uniquement du candidat. Au cours de mes études supérieures, j'ai beaucoup cherché, parfois élucidé, mais particulièrement appris. De nombreuses personnes ont significativement contribué à mon apprentissage, ainsi qu'à la réussite de ce présent projet de recherche. Les prochaines lignes leur seront entièrement consacrées.

Force est d'avouer qu'un directeur de recherche jouit d'une grande influence sur la qualité de la formation de ses étudiants. À cet égard, je quitte mon laboratoire d'accueil avec une dette envers son responsable le Dr. Jérôme Frenette. Parfois les mots ne rendent pas justice à notre idée ou notre sentiment, mais j'aimerais tout de même les utiliser, pour te remercier de m'avoir transmis ta rigueur, ta vision et ton désir d'être un acteur de changement dans la science biomédicale d'aujourd'hui. Merci de m'avoir fait confiance, et surtout de m'avoir appris à pêcher plutôt que de me donner un poisson (Confucius).

Durant mon parcours académique j'ai eu le bonheur de rencontrer des gens d'exception. Tout d'abord Dr. Claude H. Côté qui est pour moi une source d'inspiration professionnelle. En étudiant son pedigree, il devient simple d'observer que le succès d'un professeur peut être jumelé à une vie personnelle équilibrée et saine. Tu es calme et réfléchi, tes conseils sont avisés et expérimentés, ce qui fait de toi un mentor désiré. Merci de m'avoir tant appris. Au laboratoire, les rudiments de la recherche fondamentale m'ont été enseignés par le professionnel de recherche de l'époque M. Patrice Bouchard et un ancien candidat au Ph.D. le Dr. Nicolas A. Dumont. Votre aide m'a été précieuse, mais l'amitié que nous y avons développée l'est encore plus. Le temps passe et la composition de notre équipe de recherche a changé. Merci Antoine Boulanger-Piette d'avoir contribué à l'ambiance agréable de notre environnement de travail et surtout d'assumer la responsabilité de la poursuite de l'œuvre de cette thèse. Sabrina Bossé, dès ton arrivée, tu as su être un vent de fraîcheur pour le laboratoire. Merci pour ton sens de l'organisation, ton dévouement et ton sentiment d'appartenance à nos travaux. En dernier lieu, j'aimerais remercier tout spécialement, mon ancienne voisine de cubicule, Dre. Elise Duchesne,

désormais collègue, collaboratrice et colocataire pour ton intégrité, ta générosité et ton soutien toujours inébranlable. Tu possèdes ce petit «je ne sais quoi» qui prédestine un individu au succès. Petit clin d'œil à mon 2^e colocataire, Mike, pour te remercier d'être une source stable dans la recherche de l'équilibre de vie lors de ma dernière année à Shipshaw.

Poursuivre ses études au doctorat ne signifie pas l'absence d'échecs ou d'obstacles, mais seulement une capacité continuellement renouvelée de savoir se relever et faire face à l'adversité. Merci à mes parents de m'avoir inculqué à toujours repousser mes limites et à croire en mes capacités. Dans mes périodes de doute ou de fatigue, vous avez, encore une fois, été le pilier solide sur lequel je pouvais reprendre mon souffle pour mieux revenir à la charge. Vous avez fait de grands sacrifices pour vos enfants et j'espère pouvoir, un jour, bâtir ma famille de la même façon que vous avez construit la vôtre. Je ne peux passer sous silence la contribution indéniable de ma conjointe, Carolanne, à la réussite du présent processus. Pour le bien-être de ma carrière, tu as accepté sans critique, ni pression que mes activités de laboratoire ou mes responsabilités à l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC) passent avant toi. Malgré le fait que le temps soit relatif, je sais que mon absence de corps et/ou d'esprit a été un fardeau que tu as porté sans dire un mot. D'une part, j'aimerais te dire merci et de l'autre que ce sacrifice est un gage de la solidité de notre couple. Je suis heureux de débiter un nouveau chapitre de notre vie à tes côtés. Je t'aime.

Finalement, j'aimerais remercier l'UQAC de m'avoir fait confiance en m'offrant un poste de professeur-chercheur au sein de l'Unité d'enseignement en physiothérapie (UEP), alors que je n'avais pas encore terminé mes études. Je suis conscient que mes dégagements autorisés pour me permettre de concentrer mes efforts sur mes travaux de doctorat ont généré une surcharge de responsabilités à mes collègues de l'UEP, mais sachez que je vous en suis reconnaissant.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Problématique

Les troubles musculosquelettiques, dont la prévalence augmente avec l'âge, sont des affections pouvant provenir de plusieurs maladies ou conditions diverses touchant l'un ou l'autre des tissus du système musculosquelettique (SMS). Leurs conséquences sont susceptibles de conduire à la production d'un handicap ou à une comorbidité, en plus d'être un fardeau financier pour la société.

En 2012-2013, au Canada, les coûts des hospitalisations en soins de courte durée rattachés au SMS ont atteint 1,4 milliard de dollars et ont nécessité un investissement de 283,8 millions de dollars de la part des régimes publics d'assurance médicaments^{1,2}. Bien que l'objectif ultime des interventions et des dépenses du système de santé soit orienté vers la guérison ou la stabilisation de l'état du patient, la possibilité qu'un tissu blessé puisse communiquer et influencer un autre tissu n'est généralement pas considérée. Le muscle squelettique et l'os sont deux tissus du SMS qui possèdent une capacité d'adaptation intrinsèque leur permettant de modifier leur structure et métabolisme. Sans surprise, une étroite corrélation existe entre l'atrophie musculaire et la perte de la masse osseuse^{3,4}. Le remodelage osseux est principalement contrôlé par la triade récepteur activateur de NF- κ B (RANK), son ligand (RANKL), et l'ostéoprotégérine (OPG)^{5,6}. L'interaction de RANK / RANKL induit la maturation d'ostéoclastes multinucléés et ultimement la résorption osseuse. L'OPG exerce un effet inhibiteur sur ce processus de différenciation des pré-ostéoclastes en se liant à RANKL, empêchant ainsi la liaison avec RANK⁷. La triade RANK/RANKL/OPG est également exprimée par plusieurs autres tissus et est essentielle non seulement comme régulateur clé du remodelage osseux, mais joue un rôle important dans l'homéostasie immunitaire, vasculaire⁸⁻¹⁰ ou encore la croissance lobo-aléolaire au cours de l'allaitement¹¹.

En dépit d'une proximité anatomique et d'interactions biomécaniques évidentes entre l'os et le muscle squelettique, l'identification d'une voie de signalisation commune qui pourrait moduler en synchronie ces deux tissus n'a pas fait l'objet d'études intensives¹². L'identification d'un tel sentier augmenterait de manière significative les connaissances sur les biologies musculaires et osseuses et leur interdépendance. En outre, celui-ci pourrait être le carrefour d'une nouvelle ligne directrice de pensée en matière de design thérapeutique pour une grande variété de conditions où l'apparition des dysfonctions musculaires et osseuses est synchronisée, comme c'est le cas pour la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). La présente thèse contribue donc à l'amélioration des connaissances sur une voie possible de signalisation commune entre ces deux tissus et ses rôles dans la physiopathologie de la DMD. Ces travaux pionniers pourraient ouvrir la voie à de nouveaux traitements pour les maladies musculaires.

1.2 Muscle squelettique

1.2.1 Structure et fonctions du muscle squelettique

1.2.1.1 Ultrastructure

Le muscle squelettique représente environ 40% du poids corporel total et contient, à lui seul, 50 à 75% de l'ensemble des protéines du corps humain¹³. La fonction principale de ce tissu est de convertir l'énergie chimique en énergie mécanique afin de produire la force et la puissance nécessaires pour conserver une posture stable et dynamique ou encore générer les mouvements qui répondent aux besoins environnementaux de la participation sociale et de l'indépendance fonctionnelle. Sur le plan métabolique, il est la source principale de production de chaleur, et son habileté à emmagasiner des substrats importants tels que les acides aminés et les hydrates de carbone lui confère un rôle de premier ordre dans le maintien du métabolisme énergétique de base¹⁴.

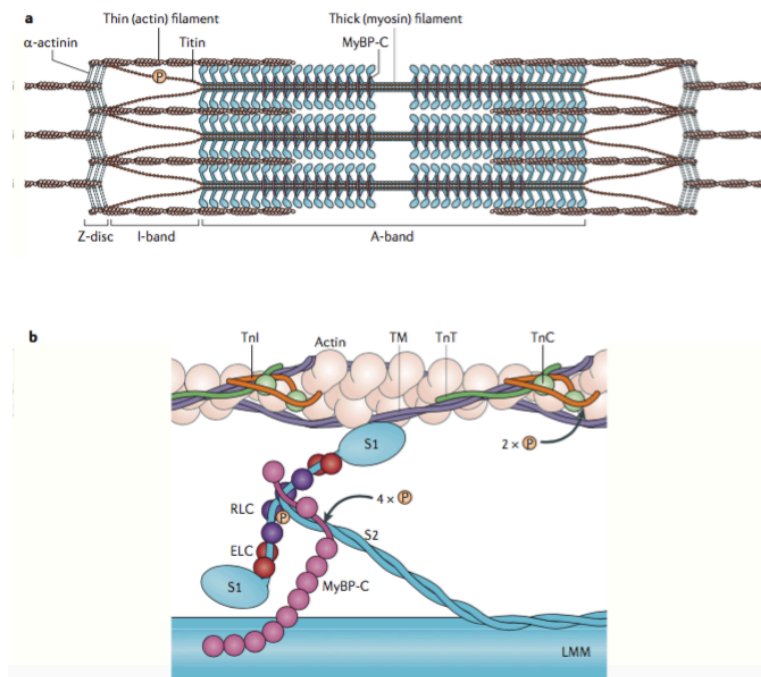


Figure 1-1: Illustration du sarcomère du muscle squelettique tiré de [26]

L'architecture du muscle squelettique se définit par un agencement précis de fibres musculaires et matrice extracellulaire (MEC)¹⁵. La taille d'un muscle sain est déterminée par le nombre et l'aire des fibres individuelles. L'organisation microscopique des composantes du muscle débute par la présence de faisceau musculaire recouvert d'un périmysium, une enveloppe constituée de collagène de type I et III¹⁶. Chacun d'eux possède un nombre déterminé de fibres musculaires multinucléées entourées d'un endomysium, une autre couche de tissu conjonctif. La fibre musculaire se divise en myofibrilles qui sont constituées de plusieurs protéines, dont les myofilaments. Les myofilaments, une fois assemblés, forment le sarcomère, qui est l'unité contractile de base du muscle squelettique. On retrouve également plusieurs réseaux protéiques associés au sarcolemme, la membrane cellulaire des fibres musculaires¹⁷. Les rôles biologiques de ces protéines sont diversifiés. Ainsi le complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine (DGC), fournit une stabilisation membranaire importante par sa liaison structurelle entre le sarcomère, le sarcolemme et la MEC¹⁸. La liaison de DGC à la MEC nécessite la présence de dystroglycane, une protéine transmembranaire qui se lie à la laminine, une composante de la MEC. Les protéines transmembranaires sarcoglycane solidifient la membrane musculaire et permettent au DGC d'être un carrefour signalétique pour la fibre¹⁹. Les intégrines représentent également un soutien physique significatif et relient le cytosquelette des myofilaments directement à la MEC²⁰. Les intégrines sont dimériques et formées d'une combinaison des divers isoformes de sous-unités α et β . L'absence ou le dysfonctionnement d'une de ces protéines peut entraîner des dommages et faiblesses importants au tissu²¹. Cependant, certains mécanismes compensatoires peuvent se manifester. Par exemple, l'utrophine est une protéine jouant un rôle similaire à la dystrophine et dans les conditions où le DGC est dysfonctionnel, telles la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), son expression et activité augmentent en réponse à un environnement instable²². Le sarcomère contient de nombreuses autres protéines qui contribuent à l'efficacité de la structure du cytosquelette et aux processus fonctionnels associés. Ainsi, les troponines C/I/T et la tropomyosine localisées sur le chapelet d'actine régulent la genèse de la force en formant un complexe dépendant du Ca^{2+} pouvant activer ou inhiber l'interaction actine-myosine, siège de la contraction musculaire^{23,24}. L'intégrité du sarcomère est renforcée par titine et

nébuline qui stabilisent les filaments minces et épais en les ancrant solidement aux disques
 $Z^{25,26}$.

1.2.1.2 Phénotype musculaire

Tel que discuté dans la section précédente, le muscle squelettique assure plusieurs rôles distincts. Les tissus musculaires sont composés de 4 types de fibres afin d'optimiser ses réponses aux demandes fonctionnelles²⁷. De cette manière, les différentes populations de fibres peuvent offrir une gamme complète de performances physiques, adaptées autant pour une tâche de courte durée et de puissance musculaire élevée que pour une activité de longue durée avec une production de force moindre²⁸. À cet égard, chaque muscle possède une proportion différente des types de fibres dont chacune d'entre elles ont des propriétés structurelles et fonctionnelles tout autant diversifiées. Globalement, les aspects les plus évidents de cette diversité résident dans une réponse contractile rapide ou lente et dans un métabolisme aérobie ou anaérobie. Sur la base de ces deux grands critères, les fibres I sont lentes et possèdent une faible puissance musculaire, mais jouissent d'un métabolisme oxydatif hautement efficace leur permettant ainsi d'être résistantes à la fatigue²⁹. À l'inverse, les fibres IIB et IIX sont rapides et puissantes, mais leur métabolisme glycolytique les rend vulnérables à la fatigue^{30,31}. Les fibres IIB ne sont pas exprimées chez l'homme, mais elles le sont chez plusieurs espèces animales ayant contribué à l'avancement des connaissances en physiologie musculaire. Les fibres rapides IIA sont intermédiaires puisqu'elles possèdent à la fois un métabolisme oxydatif et glycolytique et elles sont par conséquent puissantes et résistantes à la fatigue³². Ces quatre types de fibres sont aussi associés à quatre types d'unités motrices différentes ayant chacune des spécificités dans leur patron de stimulations³². L'hétérogénéité des fibres ne se limite pas seulement aux propriétés contractiles et activités métaboliques, mais inclut aussi une panoplie de différences structurelles du réticulum sarcoplasmique (RS), cytosquelette et de la jonction neuromusculaire (JNM). Un exemple typique est la largeur des disques Z qui est nettement plus épaisse chez les fibres lentes comparativement aux fibres rapides³³. Peut-être que la variation de tension à gérer entre celles-ci contribue à cette observation. Une analyse génomique, chez la souris, démontre qu'il y a environ 700 gènes différemment exprimés entre les populations de fibres, dont ceux codant pour la myosine³⁴. Il existe donc un isoforme différent pour chacune d'elles et semble être un élément majeur dans la

performance de la fibre³⁵. Bien que plusieurs fibres expriment un seul isoforme de myosine, un nombre non négligeable d'entre elles peuvent être hybrides en co-exprimant deux isoformes. Les muscles oculaires sont d'ailleurs reconnus pour être composés essentiellement de fibres hybrides³⁶. Certaines conditions, telles que l'entraînement en résistance, l'immobilisation et le vieillissement peuvent induire un changement du phénotype où une prévalence augmentée des hybrides sera fréquemment observée^{37,38}. Les ions de calcium (Ca^{2+}) ont une contribution importante dans l'induction des changements phénotypiques³⁹. La calcineurine (CaN) est une protéine hétérodimérique qui possède un domaine de liaison à la calmoduline et s'avère particulièrement sensible aux variations de la concentration du Ca^{2+} cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_c$)⁴⁰. Une augmentation prolongée et transitoire de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ entraîne la formation d'un complexe CaN-calmoduline- Ca^{2+} qui active les facteurs de transcription clés du remodelage phénotypique musculaire, soit NFATc1 et MEF2C^{41,42}. NFATc1 promeut les fibres de type I et réduit l'activité du promoteur des isoformes IIX/IIB de la myosine⁴³. Les souris MEF2C^{-/-} possèdent une proportion plus modeste de fibres lentes puisque MEF2C est connu pour augmenter l'expression du co-activateur transcriptionnel PGC-1, un puissant protagoniste des gènes mitochondriaux³². Pour être effectif, son inhibiteur naturel, soit l'histone désacétylase Iia (HDAC), doit être freiné par la kinase calmoduline II (CaMKII). Les muscles rapides ont donc une concentration d'HDAC supérieures à leurs homologues à phénotype lent⁴⁴. En plus d'influencer la programmation génétique de la myosine par le recrutement de NFAT et MEF2C, CaN régule le profil du métabolisme de la fibre. Ainsi, une surexpression transgénique de cette protéine conduit à une augmentation de la concentration de la myoglobine et des enzymes oxydatives des muscles rapides via le recrutement du facteur de transcription PPAR et de PGC-1⁴⁵. Le remodelage du phénotype musculaire, sous la régie de ces sentiers signalétiques, permet donc au muscle squelettique de s'adapter aux changements de son environnement afin de produire une réponse à un stimulus le plus efficacement possible.

1.2.2 Excitation - contraction - relaxation musculaire

La contraction musculaire est le résultat d'un enchaînement d'évènements précis et orchestrés dont l'objet est de convertir un signal électrique en un signal chimique à la jonction neuromusculaire (JNM)⁴⁶. La transmission synaptique à cet endroit, via la libération de l'acétylcholine emmagasinée dans les vésicules du motoneurone, représente le moyen de communication entre celui-ci et les fibres musculaires⁴⁷. Des décennies de recherche permettent de conclure que le sarcolemme, réelle barrière entre les environnements intra et extracellulaires de la fibre, assume un rôle essentiel dans la gestion du potentiel d'action par sa capacité à modifier sa perméabilité aux divers ions, aspect clé de l'excitabilité musculaire⁴⁸. La conductance de la membrane de la fibre musculaire au repos dépend à ~70% des ions chlorure et à ~30% des ions de potassium⁴⁹. Celle-ci est essentielle à la détermination du potentiel du repos et à la stabilisation membranaire. Une dysfonction des canaux chlorures conduit, tel que supporté par des observations cliniques, à un phénomène myotonique (hyperexcitabilité)⁵⁰. Les canaux de potassium, dont le gradient est sortant, semblent avoir un rôle nettement moins important que les canaux chlorures dans la repolarisation. Cependant, leur pertinence physiologique semble prendre leur envol en situation de fatigue où la réduction des niveaux d'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaires augmente le courant de potassium et conséquemment l'hyperpolarisation de la membrane⁵¹. À l'inverse, l'excitabilité membranaire est déterminée par les canaux sodiques dont deux d'entre eux, Nav 1.4 et Nav 1.5, sont voltage-dépendants⁵². Chez l'homme, ces canaux sont présents dans tous les types de fibre du muscle squelettique, mais leur expression est jusqu'à trois fois supérieure dans les fibres rapides⁵³. Leur répartition est inégale au sein de la membrane et amplifie le signal du potentiel d'action et/ou de réduction du seuil du potentiel évoqué. Ainsi, il peut avoir une concentration dix fois plus forte de canaux sodiques à la JNM par rapport aux endroits les plus distaux de ce point⁵⁴. Une densité élevée de canaux sodiques permet aux fibres de réagir à un taux élevé de décharge électrique en produisant une forte réponse contractile, mais de courte durée. L'arrivée du potentiel d'action provoque une entrée massive de sodium et une sortie de potassium par leurs canaux respectifs et active les pompes ATPasiques Na^+/K^- qui visent à contrôler ces changements de concentrations ioniques et rétablir l'état de repos. Cependant, puisque la variation du gradient sodique est très grande, elle peut dépasser la capacité réelle des

pompes ATPasique Na^+/K^- à rétablir l'équilibre et semble contribuer à la fatigabilité du muscle squelettique. Les fibres musculaires lentes qui possèdent moins de canaux sodiques pourraient être en quelque sorte protégées contre certains types de fatigue musculaire⁵⁴.

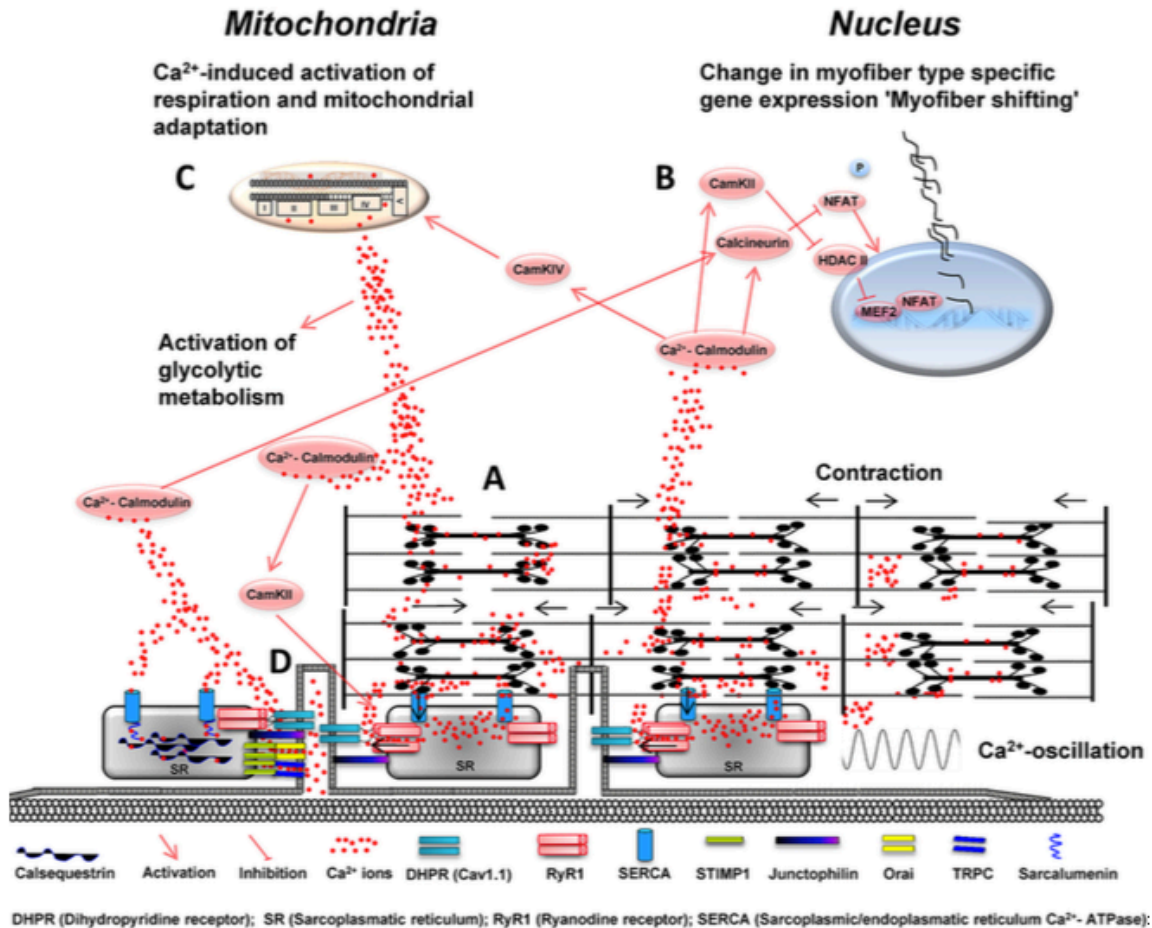


Figure 1-2: Rôles du calcium dans la contraction musculaire tiré de [38]

Le calcium est un messenger intracellulaire puissant et sa gestion doit être contrôlée avec précision lors d'une contraction musculaire. Chez la souris, la concentration de calcium cytosolique $[\text{Ca}^{2+}]_c$ libre, au repos, est de 10^{-7} M et augmente à 10^{-3} M après la réception d'un potentiel d'action^{39,55}. Le Ca^{2+} est principalement emmagasiné dans le RS et dans les mitochondries⁵⁵. Le RS est relié aux tubules-T qui sont des replis internes du sarcolemme en forme de tunnel. La dépolarisation du tubule-T par les ions sodiques provoque un changement conformationnel de leurs récepteurs dihydropyridines (DHPR) sensibles au

voltage, permettant ainsi un couplage direct avec les récepteurs ryanodines (RyR) localisés sur la membrane du RS⁵⁶. Cette liaison induit la libération du Ca²⁺ et est le mécanisme le plus efficace pour augmenter la [Ca²⁺]_c libre. La capacité à expulser le Ca²⁺ par RyR est influencée par certaines protéines, dont la calséquestrine (CSQ)⁵⁷. La CSQ est l'acteur le plus important pour la fixation du Ca²⁺ à l'intérieur RS et est principalement située dans les citernes à proximité de RyR. Dans le muscle squelettique, il existe deux isoformes de cette protéine, soit CSQ1 et CSQ2, qui peuvent être trouvées dans les fibres lentes (CSQ2), alors que CSQ1 est exprimée dans les fibres rapides⁵⁸. En plus de leur implication dans la libération du Ca²⁺ via son interaction avec RyR, CSQ est aussi un tampon calcique en raison de son nombre de résidus acides élevés pouvant lier 60-80 ions Ca²⁺ par molécule^{59,60}. D'autres protéines se lient directement à RyR afin de moduler la libération calcique, comme la calmoduline et la *FK506 binding protein 12* (FKBP-12)⁶¹. L'arrivée massive du Ca²⁺ libre dans le cytosol est transitoire : ceci est principalement dû aux pompes calciques et à la haute affinité de la troponine C, calmoduline et parvalbumine pour cet ion^{24,62,63}. Ces trois protéines cytosoliques ont des fonctions bien distinctes dans le processus de contraction musculaire. En fait, les troponines C, T et I forment un complexe avec la tropomyosine pour réguler le site actif de l'actine pour ses interactions avec la myosine²³. À l'état de repos, la troponine I et la tropomyosine bloquent ce site, empêchant le couplage actine-myosine. La liaison du Ca²⁺ à la troponine C provoque un changement conformationnel du complexe troponines-tropomyosine, permettant ainsi la formation des ponts croisés d'actine-myosine⁶⁴. Pour raccourcir le sarcomère et générer une tension plus forte, les têtes de myosine doivent glisser sur le chapelet d'actine suite à la dégradation de l'ATP en une molécule d'adénosine diphosphate (ADP) et d'un phosphate inorganique par la myosine ATPase⁶⁵. La contraction concentrique est alors débutée et l'intensité de la force produite est déterminée par le nombre de ponts croisés formés, l'amplitude ou la durée de l'oscillation calcique transitoire et l'affinité des myofilaments pour le Ca²⁺⁶⁶. La venue d'une nouvelle molécule d'ATP sur la myosine provoque un arrêt de liaison actine-myosine, suite à une réduction de leur affinité mutuelle et le cycle recommence.

La relaxation musculaire nécessite un retour du Ca²⁺ dans le RS pour que le complexe troponines-tropomyosine puisse à nouveau inhiber l'interaction actine-myosine. Pour cela,

la membrane du RS contient un transporteur actif, la pompe sarcoplasmique ATPasique (SERCA), qui assure le retour et le stockage du Ca^{2+} dans celui-ci⁶⁷. On retrouve 2 isoformes, soit SERCA-1a et SERCA-2a dans les fibres musculaires pleinement différenciées⁶⁸. SERCA-1a est exprimée dans les fibres rapides alors que SERCA-2a se retrouve, quant à elle, dans les fibres lentes et le muscle cardiaque⁶³. Ces isoformes ont une homologie structurelle de 84%, une affinité similaire pour le Ca^{2+} , mais SERCA-1a possède une capacité d'hydrolyse de l'ATP supérieure à SERCA-2a⁶⁹. SERCA est sous le contrôle de deux régulateurs, soit phospholamban (PLN) et sarcolipine (SLN). PLN phosphorylé et dans une moindre mesure SLN, réduisent l'affinité au Ca^{2+} de cette pompe et conduisent ultimement à une diminution de son activité⁷⁰. De plus, SLN peut également diminuer l'hydrolyse de l'ATP, élément essentiel du mécanisme de l'activité de SERCA⁷¹. Lorsque le Ca^{2+} est de retour à l'intérieur du RS, CSQ confère une contribution majeure dans l'efficacité d'emmagasinage, réduisant ainsi la concentration de Ca^{2+} libre et par conséquent le gradient contre lequel doit lutter SERCA. Bien que la relaxation musculaire soit majoritairement sous le contrôle de SERCA, d'autres protéines sont réputées pour contribuer à cet état. Par exemple, l'étude des muscles *ex vivo* des souris parvalbumine^{-/-} démontre une période prolongée du $[\text{Ca}^{2+}]_c$ transitoire et un temps de demi-relaxation plus long que les animaux sauvages⁷².

L'homéostasie du Ca^{2+} de la fibre musculaire est complexe et implique d'autres acteurs que les canaux voltage-dépendants. Bien que la majorité du Ca^{2+} entre dans les cellules par DHPR-RyR, d'autres voies d'entrée existent telles que le *store-operated calcium entry channel* (SOCE), *stretch-activated channels* (SAC) pour ne nommer que ces derniers^{73,74}. À titre d'exemple, l'épuisement des réserves de Ca^{2+} du RS provoque l'entrée du calcium extracellulaire via SOCE. La cinétique de SOCE est lente et son mécanisme réside principalement dans l'interaction de la protéine du RS *stromal interaction protein 1* (STIM1) avec une protéine transmembranaire Orai et des canaux ioniques à potentiel transitoire (TRPC)^{75,76}. Deux écoles de pensée s'affrontent en ce qui concerne la manière dont STIM1-Orai peut conduire à augmenter les réserves calciques du RS⁷⁷. L'une propose que cette interaction crée un canal permettant directement au Ca^{2+} extracellulaire de pénétrer dans le RS, alors que l'autre veut que le Ca^{2+} passe par le cytosol pour ensuite être

transporté activement par SERCA^{74,78}. Parallèlement, les mitochondries, en plus de leur fonction de producteur énergétique, jouent un rôle tampon important dans la gestion de cet ion et influencent la $[Ca^{2+}]_c$ libre^{39,79}. Ces organelles très nombreuses dans les fibres lentes sont situées près du RS, et une petite fraction des ions Ca^{2+} libérés par RyR est captée par les mitochondries via son transporteur le *mitochondrial calcium uniporter* (MCU)^{80,81}. Ainsi le Ca^{2+} joue un rôle central dans la fonction et l'adaptation du muscle squelettique par ses habiletés régulatrices de la contraction, du métabolisme et des voies signalétiques dépendantes du calcium. L'homéostasie de cet ion est donc primordiale et le non-respect de cet équilibre conduit à des dysfonctions de ce tissu contractile.

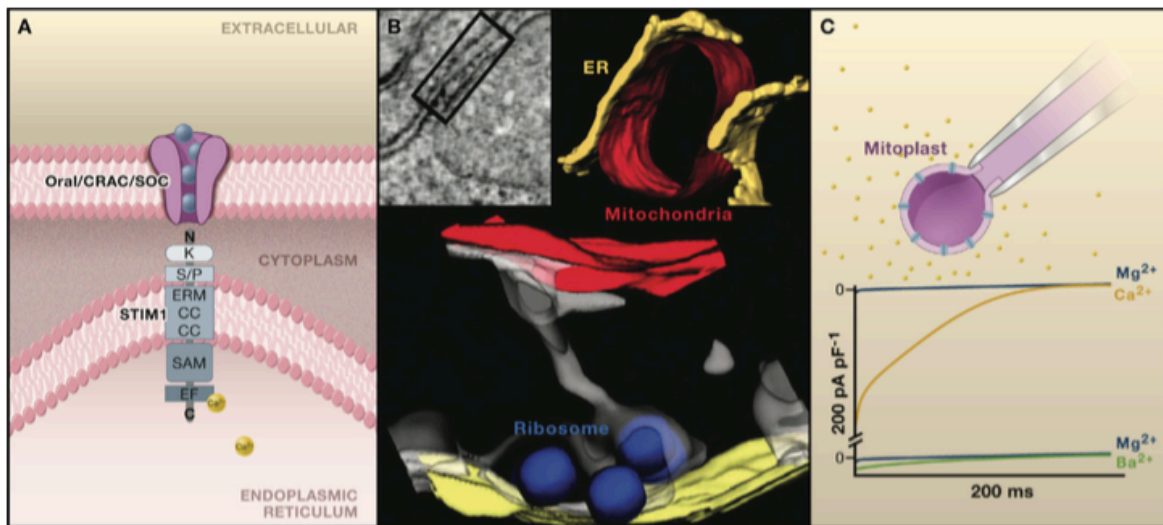


Figure 1-3: Localisation et structure de Orai/Stim1 tiré de [76]

1.3 Le rôle de la voie RANK/RANKL/OPG dans la régulation de la densité et du remodelage osseux

1.3.1 Principales cellules osseuses

1.3.1.1 Ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules cuboïdes représentant 4 à 6% des cellules osseuses totales résidentes et s'avèrent largement connus et étudiés pour leur capacité de synthèse osseuse⁸². Ils sont responsables de la production des composantes de la matrice osseuse, dont les protéines collagéniques et non collagéniques⁸³. Influencés par leur microenvironnement, ils peuvent sécréter divers facteurs de croissance, dont les protéines morphogénétiques osseuses, une panoplie de cytokines, les facteurs de croissance de type insuline (IGF) et le facteur de croissance transformant β (TGF- β)⁸⁴. En accord avec leur fonction, ils ont des caractéristiques morphologiques typiques des cellules ayant un rôle de synthèse protéique. Ils possèdent donc un nombre important de réticulum endoplasmique rugueux, d'appareil de Golgi et plusieurs vésicules de sécrétions⁸³. Bien que chaque cellule possède une capacité intrinsèque à assumer ses rôles, l'ostéoblaste n'est jamais actif seul, donc la présence d'un pool d'ostéoblastes est essentielle pour leur activation. Une fois réunis, la formation osseuse se produit en trois phases: (1) la production d'une matrice ostéoïde, (2) la maturation et (3) la minéralisation⁸⁵. Dans un premier temps, les ostéoblastes déposent le collagène, sans le minéraliser, produisant une matrice immature nommée ostéoïde. Ensuite, les ostéoblastes augmentent leur cadence de production de collagène, et la minéralisation du site débute⁸⁶. Plusieurs évidences suggèrent une forte corrélation positive entre la concentration de collagène et celle en minéraux durant cette phase du processus de synthèse osseuse. Pour initier la minéralisation, des concentrations ioniques locales élevées de Ca^{2+} et PO_4^{3-} doivent être atteintes afin d'induire leur précipitation en phosphate de calcium amorphe et ultérieurement conduire à la formation de cristaux d'hydroxyapatite⁸⁷. Ceci est réalisé grâce aux vésicules membranaires des ostéoblastes qui sont très riches en phosphatase alcaline et acides phospholipidiques, qui hydrolysent l'ATP et les inhibiteurs de la calcification de la matrice, permettant la précipitation des cristaux⁸⁸. Une fois ceux-ci

dans l'environnement de la matrice ostéoïde, ils fusionnent entre eux et calcifient progressivement la matrice, remplissant les espaces entre les fibres de collagène. Ensuite, lors de la dernière étape, la production de collagène diminue et la minéralisation se poursuit jusqu'à ce que la matrice ostéoïde soit entièrement minéralisée.

Les ostéoblastes matures ont une longévité limitée. Ils sont post-mitotiques et ne peuvent pas se diviser pour assurer leur renouvellement. Des cellules pré-ostéoblastiques et pluripotentes mésenchymateuses (MSC) activées permettent la différenciation et le renouvellement des ostéoblastes⁸⁹. Le pré-ostéoblaste actif se retrouve à la surface de l'os. Ce sont des cellules elliptiques, avec un noyau de forme allongée pouvant encore proliférer. À l'opposé des ostéoblastes matures, les pré-ostéoblastes ont une faible capacité de synthèse protéique⁹⁰. Le développement de l'ostéoblaste est progressif, avec une série d'évènements définie par l'expression de divers gènes, dont Runx2 et Osterix (Osx) et des activités cellulaires sous le contrôle d'une séquence précise de facteurs de transcription et de cytokines⁹¹. Les souris Runx2^{-/-} sont dépourvues d'ostéoblastes, alors qu'une surexpression transgénique de ce même gène augmente de manière significative et importante les autres gènes typiquement associés aux ostéoblastes⁹². L'ostéoblaste exprime divers types de récepteurs membranaires compatibles avec différents facteurs de croissance et hormones endocrines, et ceux-ci contrôlent de manière autocrine et paracrine l'activité des ostéoblastes. Leurs récepteurs endocriniens classiques incluent les hormones parathyroïdienne et thyroïdienne, l'hormone de croissance, l'insuline, la progestérone et la prolactine. Ils possèdent aussi des récepteurs d'hormones stéroïdiennes pour les oestrogènes, les androgènes, la vitamine D et les rétinoïdes⁹³. Les récepteurs principaux de leurs effecteurs paracrines et autocrines comprennent ceux pour le facteur de croissance épidermique (EGF), l'IGF, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le TGF, les interleukines, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et les récepteurs Wnt^{85,94}. De plus, les ostéoblastes ont également des récepteurs pour plusieurs intégrines impliquées dans l'adhérence des cellules à la surface osseuse⁹⁵. Les ostéoblastes sécrètent plusieurs cytokines, mais les plus importantes sont celles ayant comme fonction de réguler la différenciation des ostéoclastes, à savoir le facteur de stimulation des colonies de

macrophages (M-CSF), le ligand activateur de NF- κ B (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG)⁹⁶. Cet aspect sera exploité dans la section 1.3.2 de ce chapitre.

1.3.1.2 Ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées osseuses de grande taille, pouvant mesurer jusqu'à 100 μ m de diamètre. Ils proviennent de la différenciation des cellules naïves de la lignée des phagocytes mononucléaires suite à l'exposition de certains facteurs de transcription dont M-CSF et RANKL⁹⁷. La liaison de M-CSF à son récepteur situé sur les précurseurs ostéoclastiques, provoque leur prolifération, inhibe les mécanismes apoptotiques et induit l'expression du récepteur activateur de NF- κ B (RANK)⁹⁸. RANKL est un facteur crucial pour l'ostéoclastogenèse et sa liaison avec RANK promeut la fusion en cellule multinucléée, permettant ainsi la progression desdits précurseurs de différenciation cellulaire⁵. Un certain temps est requis pour que les ostéoclastes atteignent leur pleine maturité. Leur pleine capacité fonctionnelle n'est observée qu'à la suite de leur migration vers la surface osseuse. À ce moment, la morphologie des noyaux semble varier dans une même cellule. Certains sont ronds et euchromatiques, alors que d'autres sont de formes irrégulières et hétérochromatiques, reflétant peut-être la fusion asynchrone des précurseurs mononucléaires. L'ultrastructure de l'ostéoclaste est constituée par une abondance d'organelles dont l'appareil de Golgi, les vacuoles, les mitochondries et les vésicules de transport chargées d'enzymes lysosomales et métalloprotéases (MMP)⁹⁹. Leur caractéristique la plus spécifique et essentielle s'avère les replis profonds de la membrane cytoplasmique dans les régions faisant face à la matrice osseuse et au site de fixation de la cellule¹⁰⁰. Puisque leur fonction principale est la résorption osseuse, ils sont localisés directement sur la surface de l'os calcifié ou à l'intérieur d'une cavité creusée dans une lamelle osseuse, connue sous l'appellation lacune osseuse de *Howship*, qui est le fruit de leur activité fonctionnelle¹⁰¹. Il est possible de retrouver 4-5 ostéoclastes adhérents sur le même site résorbable, mais habituellement ils ne sont que 1-2 par endroit. L'adhésion de l'ostéoclaste à son site actif requiert plusieurs récepteurs transmembranaires des intégrines de surface, dont α 3 et α 5, ayant un pouvoir signalétique conduisant à une restructuration du

cytosquelette des ostéoclastes¹⁰². Bien que celles-ci assument un rôle majeur dans l'adhérence cellulaire, c'est la production d'un podosome, structure nettement plus dynamique et versatile, qui permet à une cellule mobile, telle que l'ostéoclaste, d'être adéquatement ancrée à son environnement¹⁰³. Grâce à ceux-ci, les ostéoclastes activés créent une zone d'étanchéité afin de délimiter le secteur à résorber. La fixation et la formation de cette zone étanche permettent l'étape subséquente d'acidification, arme protéolytique contre la matrice osseuse et des cristaux d'hydroxyapatite. Pour ce faire, les vésicules de transport des ostéoclastes libèrent leur contenu en MMPs et enzymes lysosomales dont l'action principale est de dégrader les liaisons collagéniques, libérant, en fin de digestion, les cristaux d'hydroxyapatite. La périphérie de la zone étanche est aussi le siège d'une sécrétion spécifique de protons, via des pompes ATPasiques, conduisant à une diminution du pH et à l'établissement d'un environnement suffisamment acide pour dissoudre les cristaux préalablement libérés par la dégradation du collagène. Cette déminéralisation rend la matrice osseuse exposée et vulnérable à l'ostéoclaste. Ensuite, les fibres de collagène résiduelles sont digérées par la cathepsine K, une enzyme lysosomale, et les déchets de cette action lytique sont internalisés ou transportés à travers la cellule¹⁰⁴. La régulation de la résorption osseuse est principalement médiée par l'action des hormones sur les cellules stromales, les ostéoblastes et les ostéocytes.

1.3.2 La triade RANKL/RANK/OPG

1.3.2.1 RANKL/RANK

La découverte de la triade RANKL/RANK/OPG fut l'une des percées les plus importantes pour propulser l'avancement de la compréhension des mécanismes responsables du remodelage osseux. RANKL appartient à la famille du *tumor necrosis factor* (TNF) et est une protéine transmembranaire présente chez plusieurs tissus, dont les ganglions lymphatiques, le thymus, la rate, le cerveau et la moelle osseuse^{6,8}. Dans l'os, RANKL est exprimé dans les cellules stromales, ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes. Afin d'espérer un avenir signalétique, RANKL doit être sécrété et expulsé de sa localisation membranaire via un clivage par des protéases extracellulaires tels que les MMPs¹⁰⁵. Une fois libéré dans l'espace interstitiel, deux destinations finales, ayant des fonctions opposées, sont possibles :

soit le récepteur membranaire RANK ou le récepteur leurre soluble OPG¹⁰⁶. La liaison de RANKL à RANK déclenche le signal clé de l'initiation de l'ostéoclastogenèse. Les souris quasi-totalement déficientes en RANKL présentent une nette augmentation de la densité osseuse se traduisant par une ostéopétrose, alors qu'une surexpression de celui-ci conduit à l'inverse une ostéoporose. RANK est dépourvu d'activité kinase intrinsèque. Il est donc nécessaire d'avoir des protéines adaptatrice en aval pour mettre la signalisation intracellulaire^{6,9}. RANKL provoque l'oligomérisation de RANK et le recrutement de certaines molécules d'adaptation à proximité dudit récepteur, dont le *tumor necrosis factor associated factor-6* (TRAF-6)¹⁰⁷. TRAF-6 est une protéine essentielle à la signalisation de RANK et sa délétion, tout comme RANKL, mène à une ostéopétrose sévère. TRAF-6 phosphoryle la kinase IKK β , permettant ainsi la survie de l'ostéoclaste et active plusieurs voies de signalisation, dont celles de NF- κ B et de *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). La famille des MAPK permet la translocation nucléaire de facteurs de transcription c-fos et c-Jun. C-fos et NFATc1 dictent le début de la transcription génétique requise pour permettre la maturation des ostéoclastes¹⁰⁸. Une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ est nécessaire pour que le NFATc1 soit actif. Cette libération calcique est le résultat de l'activation de la phospholipase γ (PLC γ) par RANKL. Le rôle de NFATc1 est de réguler négativement l'expression des inhibiteurs de la signalisation de RANK plutôt que d'induire l'expression de gènes ostéoclastogéniques¹⁰⁹. La perturbation du $[Ca^{2+}]_c$ est donc un aspect pivot de l'ostéoclastogenèse découlant de la liaison de RANKL à RANK.

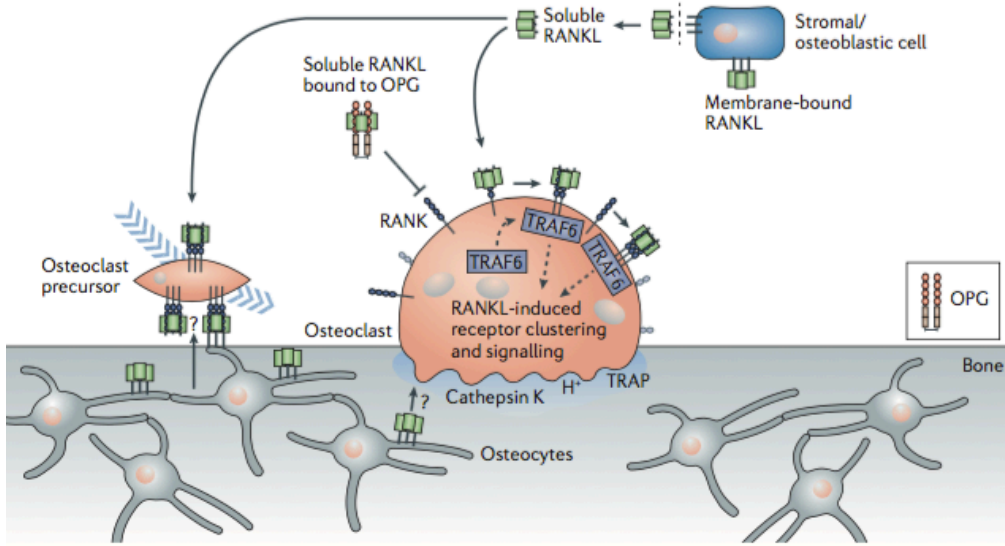


Figure 1-4: Représentation schématique de RANK/RANKL dans l'os tiré de [233]

1.3.2.2 OPG

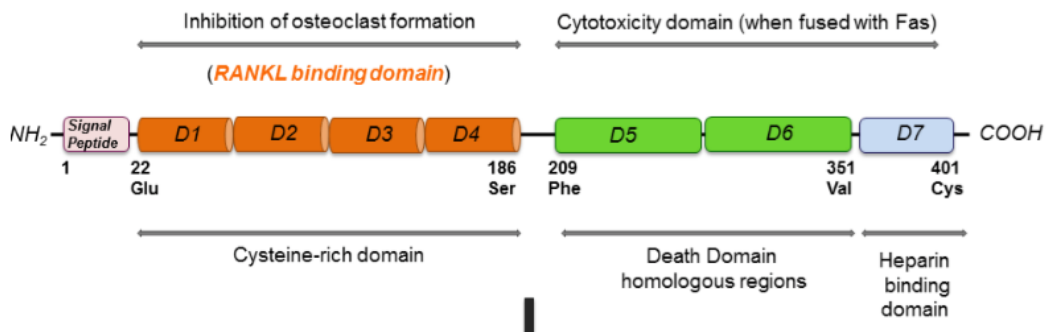


Figure 1-5: Les sept domaines structuraux et le résidu cystéine libre de l'OPG tiré de [115]

L'OPG est une glycoprotéine circulante appartenant à la famille du TNF et est principalement produite par les cellules mésenchymateuses et les cellules ostéoblastiques via la voie signalétique Wnt / β -caténine⁹⁴. À l'extérieur de l'os, l'OPG est exprimée dans de nombreux tissus, dont le cœur, les reins, le foie, la rate et les vaisseaux sanguins^{8,110}. Cette protéine est fréquemment nommée comme un récepteur leurre soluble, puisqu'elle ne possède pas d'activité signalétique intrinsèque, mais plutôt un potentiel inhibiteur par ses

interactions avec certains ligands. L'OPG possède sept domaines structuraux et un résidu cystéine libre. Parmi ceux-ci, on peut compter 4 domaines contenant une région de liaison à RANKL, 2 domaines possédant une région de liaison à TRAIL et 1 domaine incluant une région de liaison à l'héparine¹¹¹. Bien que RANKL et *tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) soient ceux les plus connus, le domaine héparine aurait des affinités pour le, syndécane-1, les glycosaminoglycanes (GAG), le facteur de von Willebrand et le facteur VIII-facteur von Willebrand¹¹². Le résidu cystéine libre est nécessaire pour la formation de liaisons disulfures permettant à la protéine d'interagir et de se combiner avec une autre molécule d'OPG pour former un ligand dimérique. Cette combinaison est un évènement clé qui augmente l'affinité de l'OPG pour ses ligands et ultimement sa capacité inhibitrice. Par conséquent, l'OPG circulante peut se trouver soit sous forme de monomère libre ou sous une forme d'homodimère (OPG-OPG) qui est biologiquement plus actif que la première forme. L'affinité de l'OPG pour RANKL est supérieure à celle entre RANKL et RANK, permettant ainsi plus facilement une inhibition de la différenciation des ostéoclastes et une protection contre la perte de la masse osseuse¹¹¹. Cette protection est confirmée par la délétion complète du gène OPG chez les souris OPG^{-/-}, lesquelles souffrent d'une ostéoporose sévère¹¹³.

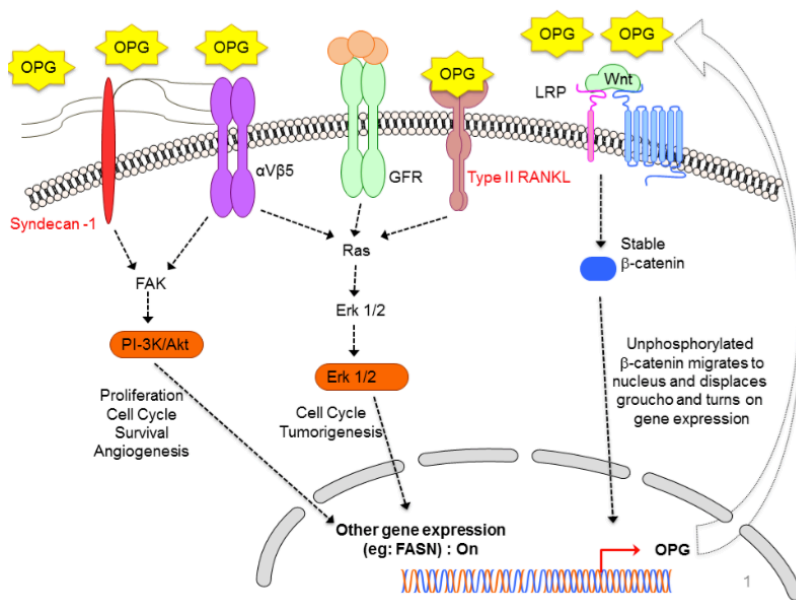


Figure 1-6: Sites de liaisons et signalisation de l'OPG tiré de [115]

TRAIL est un membre de la superfamille du TNF produit par les cellules immunitaires pouvant se lier à 5 récepteurs, dont DR4 et DR5 qui possèdent un domaine de mort et promeuvent l'apoptose cellulaire¹¹⁴. L'affinité de l'OPG à TRAIL est similaire à celle pour RANKL et le résultat biologique immédiat de l'interaction OPG-TRAIL est l'inhibition de l'apoptose induite par ce ligand¹¹¹. Les cellules cancéreuses d'une tumeur du côlon produisent et sécrètent, via la voie Wnt / β -caténine, de l'OPG et pourraient être l'un des mécanismes responsables de l'altération du processus apoptotique de celles-ci¹¹⁵. Le dernier domaine que possède l'OPG est un site de liaison à l'héparine comparable à celui de plusieurs cytokines et facteurs de croissance qui semble être au cœur de nombreuses fonctions essentielles. L'OPG se lie aux GAGs et protéoglycans de la matrice extracellulaire¹¹⁶ et l'héparine est celui ayant la plus forte affinité pour l'OPG¹¹⁷. L'interaction OPG-GAGs représente un régulateur important de la biodisponibilité de l'OPG et empêche son pouvoir inhibiteur sur la signalisation RANKL-RANK ou TRAIL-DR4/DR5¹¹¹. Lorsque le domaine héparine de l'OPG se lie aux PGs, particulièrement à syndécan-1, un phénomène d'internalisation et de dégradation du récepteur soluble s'installe et augmente ainsi la concentration locale de RANKL et l'activation de RANK¹¹⁸. De plus, les PGs sont impliqués dans la chimiotaxie des monocytes et stimulent leur migration cellulaire. Dans ce contexte, l'OPG peut assumer les fonctions d'un facteur chimiotactique pour les monocytes, qui peut être recruté dans un contexte inflammatoire ou pendant le processus ostéolytique. L'OPG semble également moduler l'adhésion cellulaire par une interaction avec certaines intégrines et l'activation subséquente de la signalisation Akt / PI3-Kinase¹¹⁹. Bien que le domaine héparine de l'OPG ne soit pas essentiel aux inhibitions de l'ostéoclastogenèse et de l'apoptose induite par TRAIL, tout laisse croire qu'il régularise la réponse biologique de l'OPG et sa biodisponibilité par le recrutement de partenaires importants tels que les GAGs et PGs. L'homéostasie osseuse est donc sous le contrôle de deux grandes voies de signalisation: RANK/RANKL/OPG et Wnt / β -caténine.

1.4 Relations entre le muscle squelettique et l'os

1.4.1 Influence mécanique

Le muscle squelettique et l'os sont des composantes essentielles de l'appareil locomoteur. L'association linéaire entre la masse maigre et la densité osseuse d'un individu suggère que ces tissus puissent jouir d'une relation interdépendante. Bogl et al. (2011) ont publié une étude clinique dans laquelle la masse musculaire était le meilleur indicateur prédictif de la masse osseuse¹²⁰. Lors de la puberté, tant chez les hommes que les femmes, l'augmentation de la force musculaire précède l'augmentation de la résistance osseuse aux impacts, mais qu'une fois adulte ces deux variables sont en équilibre¹²¹. L'influence mécanique dans la relation entre l'os et le muscle squelettique découle du fait indéniable que l'os soit un site d'insertion aux muscles et que la production de force musculaire induit une contrainte sur ses points de fixation. Afin d'être en adéquation avec leurs fonctions, ces tissus doivent s'adapter l'un à l'autre. D'un point de vue biomécanique, un évènement contractile induit une réponse, suivant une courbe de contrainte-déformation dans ces deux tissus. L'amplitude de la déformation élastique de cette réponse dicte, en quelque sorte, l'adaptation osseuse nécessaire afin de maintenir ou retrouver un état d'équilibre¹²². Ainsi, une forte contrainte appliquée sur l'os provoque une déformation élastique importante et déclenche une réplique ostéogénique en provenance des ostéocytes/ostéoblastes. À l'inverse, une faible contrainte, sur une longue période, favorise la dégradation osseuse afin de s'adapter aux nouvelles forces reçues¹²³. Un exemple typique de ce concept est la perte de masses osseuses corticale et trabéculaire du fémur observée par microtomographie à rayons X, suite à une paralysie transitoire du quadriceps par l'injection intramusculaire de la toxine botulique de type A¹²⁴. De plus, les rats ayant reçu cette même injection présentent un retard de guérison au niveau du site de la fracture tel que suggéré par un cal osseux incomplet, aminci et aux propriétés mécaniques inférieures¹²⁵. Bien que les plus grandes contraintes imposées à l'os soient issues des contractions musculaires, les forces d'impact gravitationnelles et les effets de bras de levier ont également une répercussion sur l'harmonie muscle-os¹²⁶. Ainsi, pour un travail musculaire équivalent, les forces de compression osseuse perçues à la hanche peuvent être jusqu'à environ 10 X supérieures au

poids corporel lors d'un jogging tandis qu'elles sont largement inférieures lors d'une épreuve de natation¹²⁷. Il n'est donc pas étonnant de constater que les athlètes nageurs semblent avoir une densité osseuse inférieure pour une même masse musculaire que les athlètes d'autres disciplines sportives.

1.4.2 Influence cellulaire/chimique/moléculaire

Bien que l'aspect mécanique de la communication entre le muscle squelettique et l'os semble être accepté, le postulat de possibles relations cellulaires, chimiques et moléculaires n'ont pas fait l'objet de recherches intensives. Plusieurs publications récentes supportent toutefois l'idée que le stress mécanique n'est pas l'unique moyen de communication entre ces deux tissus. À titre d'exemple, l'absence de la dystrophine dans les muscles des souris mdx provoque une diminution de la résistance et de la rigidité des os par rapport aux animaux sauvages. Plus précisément, Novotny et al. (2011) ont publié que les propriétés mécaniques des tibias de souris dystrophique était diminuées de 50% à 3 semaines de vie¹²⁸, alors qu'à cet âge les dommages musculaires sont encore non significatifs¹²⁹. L'explication des atteintes osseuses, à ce moment précis, ne peut pas provenir de sa relation mécanique avec le muscle squelettique, puisque celui-ci ne présenterait aucune dysfonction. De plus, la stimulation électrique isométrique *in situ* du muscle *tibialis anterior* (TA) durant 1 semaine réduit la sévérité de la dégradation osseuse du tibia chez une souris ayant la moëlle épinière complètement sectionnée. Malgré que la contraction isométrique puisse induire un stress mécanique, le temps de stimulation de 60 minutes par jour rend improbable que celui-ci soit suffisant pour induire à lui seul, une réponse osseuse, considérant l'aspect flasque du muscle en absence de stimulation. En fait, cette stimulation électrique permet aux TA de sécréter à nouveau des signaux endocrines et paracrines (ex. IGF-1, IL-6) pouvant activer la voie de signalisation β -caténine se traduisant par une protection des ostéocytes¹³⁰. Le muscle influencerait donc l'os et l'os influencerait le muscle. Cette réciprocité est renforcée par l'observation d'une faiblesse musculaire importante, en plus d'un changement phénotypique de l'EDL observé chez les souris ayant une délétion spécifique de la connexine 43 (Cx43) dans leurs ostéoblastes^{131,132}. Cette perte

de force pourrait être secondaire à une diminution de libération de l'ostéocalcine en absence de Cx43, connue pour stimuler la formation de fibres musculaires. L'ostéocalcine (OCN) est une hormone dérivée des ostéoblastes possédant un récepteur unique et est impliquée dans le remodelage osseux¹³³. L'injection chronique d'OCN augmente le nombre de mitochondries dans le muscle squelettique. Les souris OCN^{-/-} présentent une diminution significative de leur performance musculaire fonctionnelle¹³⁴. La myostatine, une protéine appartenant à la famille du TGF- β , conduit de façon synchrone à une atrophie musculaire et à une dégradation osseuse via l'activation de la voie NF- κ B¹³⁵. Cette association est supportée par la délétion spécifique de myostatine dans les muscles murins dont les conséquences sont une hypertrophie musculaire associée à une augmentation de la densité osseuse comparativement aux souris sauvages¹³⁶. La vitamine D est une autre molécule pouvant exercer un effet simultané sur ces deux tissus. Globalement, le métabolisme de cette vitamine est influencé par la parathormone (PTH). Une carence en vitamine D augmente la sécrétion de la PTH, dont les actions endocrines vont induire une libération importante de RANKL¹³⁷. La liaison RANKL/RANK active l'ostéoclaste et provoque ainsi la déminéralisation suite à la résorption osseuse. Le muscle exprime également le récepteur de la vitamine D (RVD) et son rôle dans ce tissu semble être lié à l'activité physique. Ainsi, des biopsies musculaires démontrent une certaine corrélation entre une faible concentration sérique de vitamine D et l'atrophie des fibres musculaires de type II^{138,139}. Les muscles des souris RVD^{-/-} ont une croissance musculaire lente secondaire à des niveaux bas d'expressions de certains facteurs myogéniques et à une réduction de l'activité de SERCA¹⁴⁰. De plus, ces changements affectent aussi les propriétés contractiles musculaires. Certaines études suggèrent que les BMPs soient également impliqués dans cette communication inter-tissulaire. L'intérêt particulier de cette famille protéique provient, en partie, d'une corrélation entre l'expression de BMP-1 dans les biopsies musculaires des patients victimes d'une contusion sévère et d'une incidence élevée d'ossification hétérotopique, c'est-à-dire le développement d'un tissu osseux à l'intérieur de la structure du muscle blessé¹⁴¹. Cependant, leurs rôles et mécanismes exacts, tant physiologiques que pathologiques, demeurent nébuleux et discutables¹⁴². Suite à l'exercice, il est démontré depuis longtemps que plusieurs interleukines (IL) pro et anti-inflammatoires sont cycliquement augmentées et qu'elles contribuent au remodelage en réponse à

l'entraînement¹⁴³. D'ailleurs, les fibres de types I expriment des niveaux élevés d'IL-6, dont la libération optimise l'absorption du glucose et contribue aux effets favorables de l'exercice sur le métabolisme énergétique¹⁴⁴. À faible dose, l'IL-6 promeut la différenciation des ostéoblastes, mais de fortes concentrations provoquent la situation inverse soit l'ostéoclastogénèse, telle qu'observée dans certaines conditions pathologiques chroniques telles que la dystrophie musculaire de Duchenne¹⁴⁵. De plus, le tissu musculaire sécrète l'IL-7, considérée comme une cytokine ostéoclastogénique et l'IL-15 dont une surexpression augmente la masse osseuse¹³⁵. Des études in vitro ont aussi démontré que les myotubes matures sécrètent des facteurs qui peuvent protéger les ostéocytes et ostéoblastes de l'apoptose induite par le dexaméthasone via l'activation de la voie β -caténine¹⁴⁶. Ensemble, ces observations semblent démontrer la possibilité d'une communication cellulaire/chimique/moléculaire entre le muscle et l'os, mais autant intéressante et probable qu'elle soit, d'autres études seront nécessaires pour solidifier cette relation entre ces deux tissus.

1.4.3 Voies de signalisation communes aux muscles et os

1.4.3.1 Synchronicité entre l'atrophie/dysfonction musculaire et l'ostéoporose

Tel que mentionné dans les sections précédentes, les muscles et les os possèdent d'excellentes capacités d'adaptation en réponse aux stimuli mécaniques, hormonaux, métaboliques et environnementaux. De plus en plus d'évidences démontrent que ces deux tissus répondent de façon cohérente et synchronisée^{3,134,147,148}. Un exemple illustrant bien ce concept provient d'une étude qui démontrait que le bras dominant des joueurs de tennis professionnels est plus développé autant sur le plan musculaire qu'osseux¹⁴⁹. Il existe donc une relation linéaire entre la taille du muscle et la densité minérale osseuse chez les adultes sains. À l'inverse, la réduction de la force musculaire produite est significativement corrélée avec des modifications osseuses tant quantitatives que qualitatives. Plusieurs autres conditions induisent une perturbation positive ou négative des masses musculaires et osseuses en tandem. Le vieillissement est possiblement l'une de ces conditions dans lesquelles cette association muscle-os est la plus évidente³. Le vieillissement est associé à

un déclin des fonctions musculaires et osseuses qui conduisent à la sarcopénie et l'ostéoporose. La sarcopénie est une perte de la masse et de fonction musculaire affectant préférentiellement les fibres de types II tandis que l'ostéoporose est une maladie systémique de l'os caractérisée par une faible densité osseuse et une détérioration de son ultrastructure¹⁵⁰. Plusieurs études suggèrent que ces deux conditions partagent des perturbations communes, telles qu'une baisse d'œstrogène sérique, d'androgènes et une augmentation de la concentration des cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, la diminution des niveaux hormonaux combinée à une réduction de l'activité physique régule négativement l'activation de la voie signalétique IGF-PI3K-AKT¹⁵¹. Cette voie de signalisation est le principal régulateur de la croissance musculaire postnatale, et une faible activité de celle-ci conduit à un changement métabolique et à une atrophie musculaire. L'IGF-1 exerce ses effets par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, l'IGF-1R, qui est l'un des agonistes naturels les plus puissants de PI3K-AKT¹⁵². Les médiateurs en aval d'AKT induisent la synthèse et retardent la dégradation des protéines en régulant l'expression de divers gènes. De plus, l'IGF-1 est capable de contrer les effets de la myostatine de la famille du TGF- β impliquée dans l'atrophie musculaire¹⁵³. Un autre aspect important de ce sentier est sa gestion du glucose. Ainsi, une altération de celui-ci affectera principalement les fibres de type II glycolytiques¹⁵⁴. Les fibres de type I, qui utilisent des ressources énergiques autres que le glucose, sont beaucoup moins affectées par le phénomène de sarcopénie. Parallèlement, l'ovariectomie des rates, un modèle de ménopause, démontre une altération des métabolismes osseux et musculaires¹⁵⁵. Plus précisément, la densité minérale osseuse et la qualité structurale de l'os sont diminuées tandis que les répercussions se font sentir sur la vitesse de synthèse protéique du tissu musculaire. Les astronautes subissent également une atrophie musculaire et osseuse en tandem lors d'un vol spatial¹⁵⁶. Parallèlement, un alitement prolongé provoque des changements physiologiques similaires aux modèles d'hypogravité sur le système musculo-squelettique. Ainsi, la taille des fibres et le nombre de capillaires présentent dans le muscle alité sont réduits, en plus de vivre un changement phénotypique, selon le mode transitoire suivant : I \rightarrow IIA \rightarrow IIX/IIB. Le retrait des contraintes de compression sur le squelette en hypogravité provoque également une perte de densité osseuse¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. La synchronicité des atteintes musculaires et osseuses est aussi observable pour certaines pathologies dont la DMD¹⁶⁰. Il est intéressant de constater

que la perte de la densité minérale osseuse, particulièrement au niveau des régions vertébrales, de la hanche et des membres inférieurs se produit après l'apparition des symptômes, suite à une dégénérescence musculaire significative, et régresse parallèlement avec l'avancement de la maladie. Les patients développent un état ostéoporotique et leurs os deviennent conséquemment vulnérables aux fractures¹⁶¹. Il est fréquemment mentionné que cette dysfonction osseuse pourrait être secondaire à une réduction du stress mécanique imposé à l'os et/ou aux effets indésirables d'une utilisation chronique des glucocorticoïdes prescrits aux enfants atteints de la DMD. Cependant, la nature exacte des stimuli mécaniques et des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent l'interaction du muscle et de l'os ne sont toutefois pas clairement identifiés.

1.4.3.2 Dystrophie musculaire de Duchenne

1.4.3.2.1 Complexe dystrophine/glycoprotéine

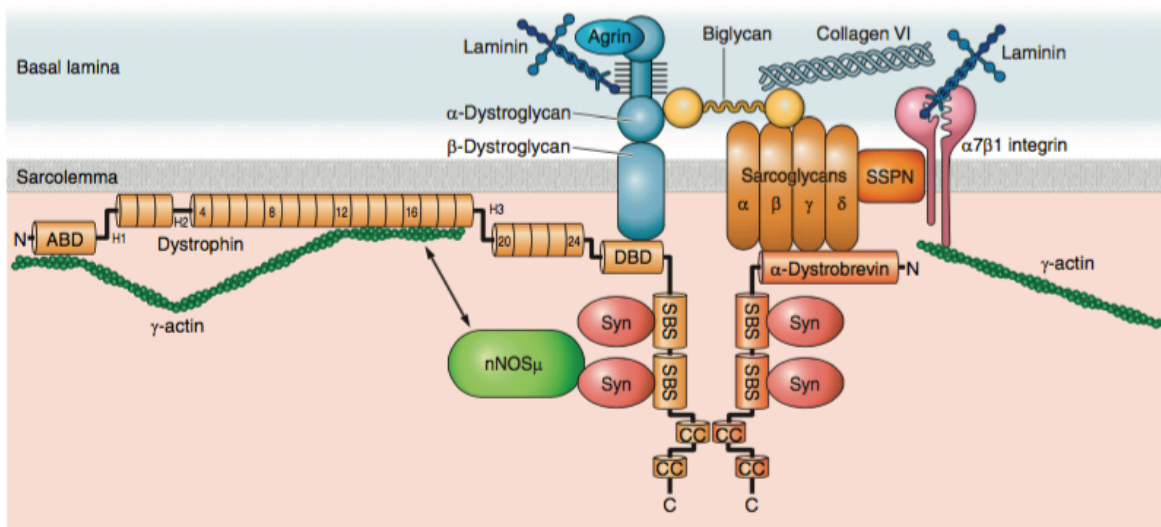


Figure 1-7: Représentation schématique du complexe dystrophine/glycoprotéine tiré de [169]

La DMD est une maladie génétique récessive associée aux gènes codant pour la dystrophine localisés sur le chromosome X¹⁶². Elle est la forme la plus sévère des

dystrophies et l'absence de ladite protéine déstabilise la structure et la signalisation du complexe DGC menant à des dysfonctions musculaires importantes limitant la qualité et la durée de vie du patient¹⁶³. Le rôle principal du DGC est d'être un renfort structural liant le cytosquelette aux composantes de la MEC afin de protéger l'ultrastructure contre les dommages potentiels pouvant survenir lors de cycles répétés de contraction¹⁶⁴. La dystrophine est une protéine centrale pour le DGC, constituée d'une triple hélice en forme spirale dont ses propriétés servent d'amortisseur de choc lors d'une contrainte de tension. Cette capacité à amortir les chocs découle, plus précisément, de la flexibilité de son armature et de son attache à γ -actine, lui permettant ainsi de transmettre une partie de la force latéralement et non uniquement de manière longitudinale¹⁶⁵. D'un point de vue biochimique, ses quatre domaines de liaison, ainsi que ses multiples répétitions de type spectrine lui confèrent un statut de protéine d'échafaudage pour la signalisation en aval¹⁶⁶. La dystrophine est solidement ancrée à son complexe grâce à sa liaison, via les motifs de son domaine C-terminal, à la protéine adaptatrice transmembranaire β -dystroglycane¹⁶⁷. En plus de son rôle dans l'adhérence de la dystrophine, lorsque la β -dystroglycane est en relation avec son partenaire α -dystroglycane, est impliquée dans la signalisation cellulaire¹⁶⁸. α -dystroglycane interagit directement avec des composantes de la MEC, et sa phosphorylation induit subséquentement celles des résidus tyrosines de la β -dystroglycane dont la conséquence est le recrutement d'une GTPase Rho régulant l'endocytose. α -dystroglycane communique aussi avec les sarcoglycane¹⁶⁹. Ces glycoprotéines transmembranaires forment un complexe tétramérique et interagissent avec plusieurs protéines de signalisation, dont sarcospane et biglycane^{170,171}. Malgré leurs rôles centraux dans la signalisation du DGC, tel que démontré par divers modèles *in vivo*, leur mécanisme d'action demeure largement inconnu. Le sarcospane, aidé par sa liaison directe avec l'intégrine $\alpha_7\beta_1$, peut servir de protéines chaperonnes pour l'assemblage et l'organisation du DGC¹⁷². Les souris dépourvues de sarcospane ont une faiblesse musculaire importante et des niveaux d'expression protéique réduits en dystrophine et utrophine¹⁷². Cette dernière protéine présente 80 % d'homologie avec la dystrophine localisée seulement aux JNM et principalement dans les muscles lents¹⁷³. La biglycane est une protéine de la MEC qui possède un pouvoir signalétique basé sur ses interactions avec des cytokines et facteurs de croissance dont le TGF et le TNF316. Au sein du DGC, son action principale repose sur la

fixation à la fibre musculaire de l'isoforme neuronale de l'enzyme oxyde nitrique synthase (nNOS), qui est un puissant antioxydant par sa production d'oxyde nitrique (NO)¹⁷⁰. Pour parvenir à cette tâche, la biglycane doit s'associer, entre autres, aux protéines adaptatrices syntrophines qui stabilisent le lien biglycane-nNOS¹⁷⁴. Les rôles structuraux et signalétiques du DGC dépendent donc de l'intégrité et de la capacité fonctionnelle de chacune des protéines lui étant associées.

1.4.3.2.2 Physiopathologie / implication du Ca^{2+}

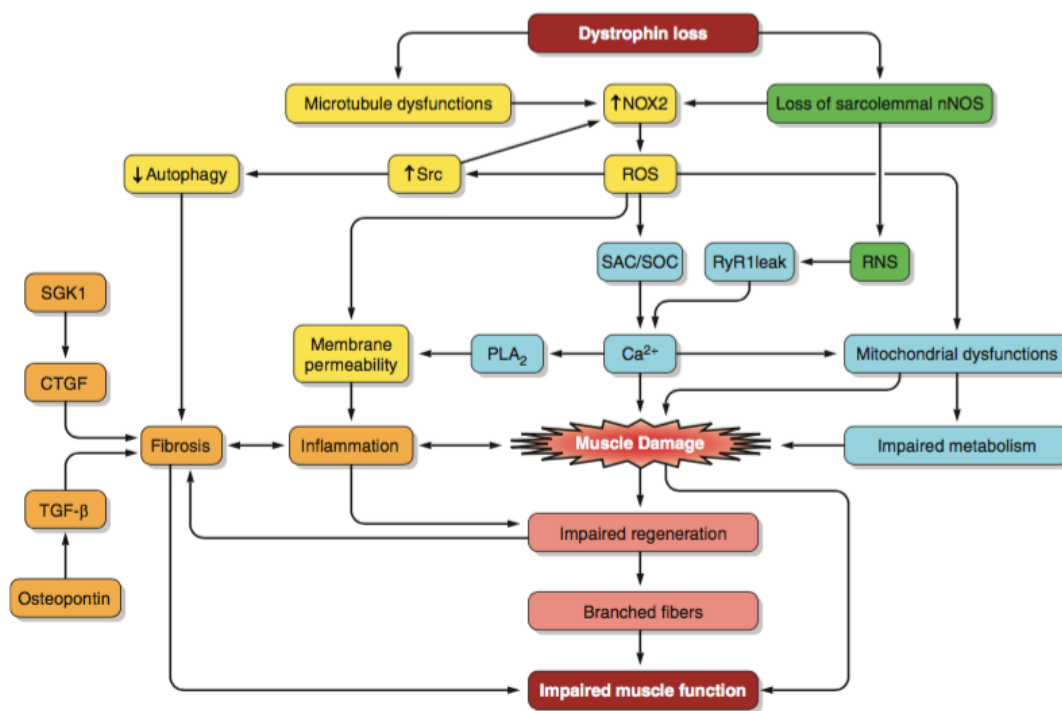


Figure 1-8: Carte conceptuelle de la physiopathologie de la DMD tiré de [169]

Les répercussions physiologiques de l'absence de la dystrophine dans le muscle squelettique sont multiples et l'origine de ceux-ci peut être sous un angle structural, signalétique ou homéostatique. Bien que ces trois lignes de pensées sont d'importance équivalente et peuvent expliquer la perte de force/fonction musculaire, ce chapitre portera exclusivement sur la physiopathologie induite par une perturbation de l'homéostasie du Ca^{2+} . Le couplage DHPR-RYR, qui conduit à une libération réduite de Ca^{2+} , serait l'une

des causes de cette perturbation calcique¹⁷⁵. La littérature propose deux explications possibles, soit que la $[Ca^{2+}]_c$ emmagasiné dans le RS est diminuée ou encore que l'ouverture du canal RYR serait de moindre diamètre chez la souris dystrophique¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. La première hypothèse est supportée par une réduction de l'expression de CSQ, une protéine tampon du Ca^{2+} emmagasiné dans le RS et un modulateur de RYR¹⁷⁹. De plus, les muscles des souris CSQ1^{-/-} présentent le même déficit de libération du Ca^{2+} par RYR que chez les souris mdx. L'une des explications pouvant justifier la perte de l'efficacité de RYR dans les muscles des souris CSQ1^{-/-} est que sa nitrosylation par NO, suite à une surexpression de iNOS, perturbe sa structure et augmente le $[Ca^{2+}]_c$ au repos¹⁸⁰⁻¹⁸². Ces augmentations du $[Ca^{2+}]_c$ réduisent le delta Ca^{2+} (c'est-à-dire la différence entre le Ca^{2+} libéré lors de la contraction - le $[Ca^{2+}]_c$ au repos) et par conséquent le potentiel contractile du muscle. Le mécanisme par lequel une réduction du delta Ca^{2+} inhibe partiellement la libération du Ca^{2+} du RS est incertain. Cependant, chez la souris mdx, celui-ci pourrait possiblement dépendre d'une altération de la junctophiline, un stabilisateur essentiel de la liaison membranaire du RS au tubule-t permettant ainsi à RYR d'être fonctionnellement efficace et dont la concentration est largement diminuée chez ces souris dystrophiques¹⁸³. Plus précisément, la $[Ca^{2+}]_c$ au repos anormalement élevée active les calpaïnes, des enzymes dépendantes du Ca^{2+} , dont parmi celles-ci, μ -calpaïne peut cliver junctophiline et réduire indirectement la capacité du tubule-t à activer efficacement RYR¹⁸⁴. RyR1 pourrait aussi perturber le $[Ca^{2+}]_c$ au repos suite à une modification post-traductionnelle menant à la perte de la protéine FKBP-12, dont le rôle est de stabiliser RYR, augmentant ainsi la prévalence des fuites calciques par ce récepteur^{181,182}. Le Ca^{2+} extracellulaire peut aussi conduire à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ au repos. SOCE est activé uniquement lorsque les réserves de Ca^{2+} dans le RS sont suffisamment basses pour permettre au senseur STIM1 d'interagir avec Orai1¹⁸⁵. Chez les souris mdx, SOCE est donc nettement plus actif suite à la surexpression de STIM1 et Orai1¹⁸⁶. Malgré les difficultés techniques permettant de mesurer de manière fiable et reproductible la $[Ca^{2+}]_c$ du RS, plusieurs auteurs affirment que le seuil d'activation de STIM1 dans le muscle dystrophique est largement supérieur à celui de 225 μ M observé dans les muscles sains¹⁸⁷. Le recrutement de ces canaux permettant au Ca^{2+} extracellulaire d'entrer dans la fibre musculaire mdx, nécessite donc une plus petite diminution des réserves de Ca^{2+} dans le RS que la fibre musculaire des animaux sauvages. La recapture du

Ca²⁺ est aussi perturbée, par une réduction de l'activité et de l'expression de SERCA des souris dystrophiques^{188,189}. Les muscles intrinsèques du larynx ont naturellement des concentrations de SERCA-1 et SERCA-2 supérieures aux autres muscles et semblent être protégés contre la nécrose musculaire induite par la dystrophie musculaire¹⁹⁰. La surexpression transgénique de la pompe à Ca²⁺ SERCA réduit la concentration sérique de la créatine kinase, la fibrose, les dommages musculaires et diminue la [Ca²⁺]_c et, par ricochet, l'activité des calpaïnes¹⁹¹. La justification expliquant cette réduction de SERCA dans cette condition est encore nébuleuse, mais pourrait être secondaire au stress cellulaire chronique des muscles impliqués¹⁹². Cette hypothèse est supportée par le fait que la surexpression de la *heat shock protein 72* (hsp72), une protéine chaperonne qui empêche la dégradation protéique, préserve le contenu et l'activité de SERCA dans les conditions de stress cellulaire d'une souris mdx¹⁸⁹. Cette protection de SERCA est suffisamment importante pour s'observer lors des propriétés contractiles musculaires *ex vivo*, par un demi-temps de relaxation plus court que celui des muscles contrôles. L'ensemble de ces éléments démontre clairement que la perte de l'homéostasie calcique joue un rôle clé dans la physiopathologie de la DMD.

1.4.3.2.3 Les β -agonistes comme traitement de la DMD

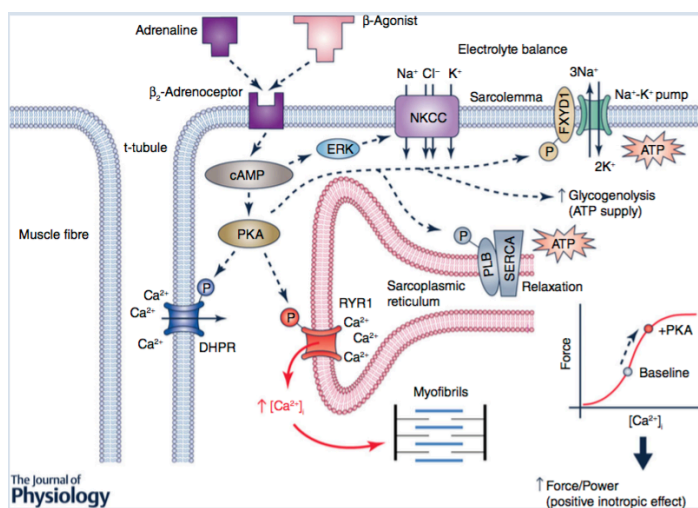


Figure 1-9: Mécanisme d'action des β -agonistes sur le muscle squelettique tiré de [199]

Les cellules du système nerveux sympathique synthétisent, entre autres, les catécholamines, des composés organiques aux fonctions essentielles. Les deux molécules les plus connues de cette famille sont l'adrénaline et la noradrénaline¹⁹³. L'adrénaline est produite et libérée par les glandes surrénales, alors que la noradrénaline est synthétisée et excrétée par les axones préalablement stimulés par l'acétylcholine afin de répondre de manière appropriée à un stress physiologique¹⁹⁴. L'adrénaline et la noradrénaline sont des ligands pour les récepteurs adrénergiques (AR) α_1 , α_2 , β_1 , β_2 et β_3 , provoquant ainsi des réponses stimulatrices et inhibitrices dans plusieurs tissus. Le muscle squelettique contient une proportion très importante de β_2 -AR et des populations plus modestes de β_1 -AR et α -AR¹⁹³. Les muscles à phénotype lent tels que le soléaire ont une plus grande densité de β_2 -AR que leurs homologues à contraction rapide¹⁹⁵. La signalisation des β_2 -AR est couplée à une protéine G dont la sous-unité α activée, l'adénylate cyclase, augmente l'expression du second messenger l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPC)^{196,197}. L'AMPC phosphoryle, la protéine kinase A (PKA), une fois activée, régule l'activité de plusieurs protéines, y compris celles de *cAMP response element binding protein* (CREB), un facteur de transcription nucléaire impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'adaptation et la survie^{198,199}. Les β -agonistes sont principalement utilisés pour induire une bronchodilatation des voies respiratoires dans la gestion thérapeutique de l'asthme et des maladies pulmonaires obstructives chroniques (MPOC)^{200,201}. Parallèlement, les β_2 -agonistes peuvent également induire une hypertrophie et un changement phénotypique du muscle squelettique^{202,203}. Par exemple, le clenbutérol augmente le contenu protéique, l'aire de surface et légèrement la force spécifique des muscles sains et dystrophiques chez l'animal. Cette drogue réduit également les dommages histologiques secondaires à divers modes de blessure induite par l'exercice¹⁹⁵. Cependant, un usage chronique de β -agonistes réduit la fonction cardiaque en diminuant l'expression et l'activité de SERCA et altère la formation osseuse en activant la voie RANK/RANKL^{204,205}. Il est bon de souligner que la nouvelle génération de β_2 -agonistes tels que le formotérol produit des effets anaboliques significatifs sur le muscle à des doses micromolaires, par rapport aux doses millimolaires pour l'ancienne génération comme le clenbutérol. Ainsi, une injection à une faible dose de 25 ug/kg/j de formotérol durant quatre semaines augmente la masse et les forces des muscles dystrophiques EDL et soléaire, sans affecter négativement la masse et la fonction

cardiaque de ces souris²⁰³. Bien que les bénéfices du formotérol soient observés autant chez les muscles rapides que lents, les résultats sont supérieurs dans les muscles à phénotype oxydatif comme le soléaire. Malgré le potentiel thérapeutique des β_2 -agonistes pour lutter contre les séquelles des muscles squelettiques dystrophiques, l'usage chronique de ceux-ci nécessaire à cette maladie progressive et incurable, demeure limitée par leurs effets secondaire délétères sur les tissus cardiaque et osseux.

1.4.3.2.4 Les effets d'un blocage des voies de signalisation en aval de RANK/RANKL sur l'évolution de la DMD

Des approches génétiques et/ou cellulaires ont été utilisées depuis plus de 30 ans pour corriger le gène de la dystrophine. Les thérapies expérimentales découlant de ces devis n'ont pas donné les fruits escomptés et posent de nombreux obstacles techniques et éthiques²⁰⁶. Bien que celles-ci demeurent une orientation de recherche justifiée et probablement essentielle, le développement de stratégies thérapeutiques alternatives qui se concentrent sur les mécanismes permettant de ralentir la progression de la maladie apporte un espoir concret et un potentiel de transférabilité du laboratoire à la clinique à court terme. Ainsi, la nature des changements histologiques a fait de NF- κ B et de sa signalisation des cibles pharmacologiques évidentes^{162,207}. L'inflammation chronique et la fibrose musculaire proviennent, entre autres, de l'activation classique de NF- κ B. De plus, NF- κ B est connu pour inhiber la réparation musculaire en limitant l'expression de MyoD, un facteur myogénique essentiel à ce phénomène²⁰⁸. Le statut inactif de NF- κ B est maintenu dans le cytoplasme grâce à la liaison inhibitrice de ses sous-unités p65 et p50 à la kinase I κ B^{209,210}. L'activation de NF- κ B nécessite donc la phosphorylation et l'ubiquitination de I κ B, suite à la réception d'un signal environnemental, via la formation d'un complexe formé de ses deux sous-unités à activité sérine/thréonine kinase IKK β et IKK α et sa sous-unité régulatrice N ϵ MO²¹¹. La dégradation de I κ B permet à p65 et p50 de migrer dans le noyau et ainsi de se fixer aux promoteurs des gènes qui lui sont associés pour induire leur transcription²¹². L'usage d'un peptide inhibiteur de IKK β empêche cette activation, réduit l'inflammation et la nécrose du tissu, en plus de favoriser la régénérescence musculaire²¹³.

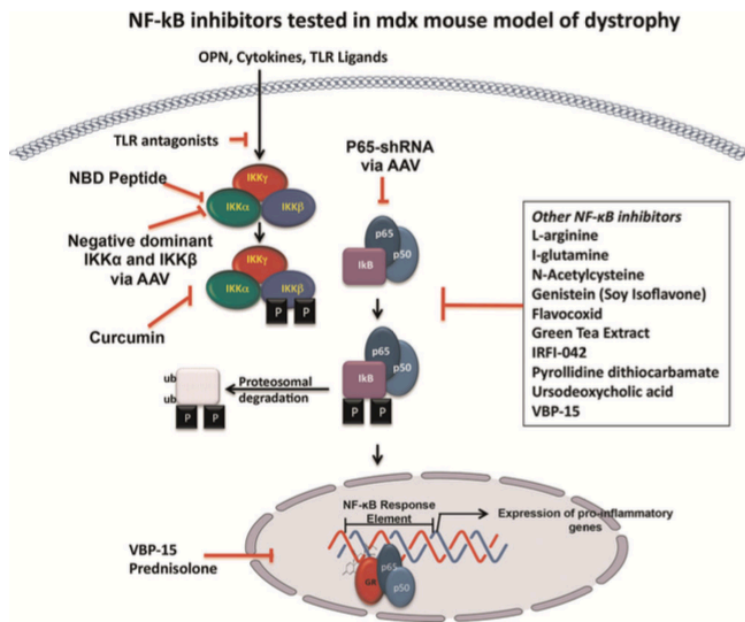


Figure 1-10: Inhibiteurs expérimentaux de NF-κB testés chez la souris mdx tiré de [209]

Des résultats similaires ont été observés avec le peptide expérimental NEMO Binding Domain (NBD), qui empêche la formation du complexe des sous-unités de IκB en inhibant le site de liaison de NEMO pour IKKβ et IKKα²¹⁴. Le stress cellulaire chronique imposé par les effets de NF-κB conduit, à long terme, à un état fibrotique et à une infiltration de gras intramusculaire. Une étude intéressante, dans laquelle les auteurs ont injecté intramusculairement un vecteur adénoviral recombinant pour une forme mutée et non fonctionnelle de IKKα, a démontré une diminution des niveaux NF-κB activés et le nombre de fibres endommagées chez la souris mdx âgée de 11 mois²¹⁵. Cliniquement, le traitement actuel des symptômes musculaires de la DMD est une prise chronique de glucocorticoïdes (prednisolone, deflazacort)^{216,217}. Malgré leurs effets secondaires importants, en l'occurrence une perte de masse osseuse, cette classe de médicament inhibe l'activité de NF-κB par l'induction d'une augmentation de l'expression de IκB, conduisant à une meilleure rétention cytoplasmique de p65 et p50²⁰⁷. De plus, ils répriment l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires, dont IL-6 influençant indirectement NF-κB en intervenant en amont de celui-ci²¹⁸. La contribution de NF-κB aux aspects progressifs et invalidants de cette maladie semble majeure et renforce la pertinence des études proposant des molécules qui limitent l'activation de cette voie pro-inflammatoire.

1.5 Buts / Objectifs / Hypothèses

En regard aux connaissances actuelles sur le muscle squelettique et à une communication biochimique potentielle avec le tissu osseux, nous avons décidé d'investiguer un champ de recherche complètement vierge soit le rôle de la voie de signalisation RANK/RANKL/OPG dans le muscle squelettique pathologique ou non pathologique. Pour y parvenir, il est proposé au chapitre II de caractériser le rôle de RANK/RANKL dans la physiopathologie du muscle dénervé. **L'hypothèse de cette étude est que RANK, par sa localisation en amont de TRAF-6 est un régulateur important dans la fonction du muscle dénervé.** Par la suite, l'intérêt est porté, au chapitre III, à évaluer, *in vitro*, la capacité des myotubes à sécréter de l'OPG et l'efficacité d'une série d'injection d'OPG-Fc, *in vivo*, dans la prévention de la perte fonctionnelle du muscle dystrophique des souris mdx. **Les hypothèses de cette section sont que les cellules musculaires sécrètent de l'OPG et que les injections quotidiennes d'OPG-Fc pendant 10 jours protègent contre la perte de force musculaire des muscles lents et rapides des souris mdx.** Nous avons démontré que l'OPG-Fc préserve complètement la force des muscles dystrophiques rapides EDL, mais de manière plus modeste celles des muscles lents Sol. Il est bien connu que les β_2 -agonistes sont particulièrement efficaces chez les muscles lents, nous avons donc vérifié, au chapitre IV, l'effet d'un traitement combiné d'OPG-Fc avec le formotérol sur la fonction des muscles dystrophiques EDL et Sol. **L'hypothèse associée à ce projet est que l'OPG-Fc agit en synergie avec le formotérol afin d'améliorer l'intégrité et la force musculaire.** Finalement, afin de rationaliser les principes physiologiques derrière l'ensemble de ces résultats, le chapitre V inclut l'objectif le plus important de cette thèse, soit l'identification du mécanisme d'action de l'OPG-Fc sur le muscle squelettique. **L'hypothèse qui en découle est que l'OPG-Fc ait la capacité structurale d'interagir directement sur la cellule musculaire, indépendamment de RANK/RANKL grâce à son domaine héparine.** Les sections qui suivent présentent donc les fruits du labeur qui découlent de ces objectifs spécifiques.

Chapitre 2 : RANK est un régulateur clef du stockage du calcium, de l'activité de SERCA et de la fonction musculaire chez les fibres rapides du muscle squelettique

Muscle RANK is a key regulator of calcium storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles

Sébastien S. Dufresne^{1*}, Nicolas A. Dumont^{1*}, Antoine Boulanger-Piette¹, Val A. Fajardo², Daniel Gamu², Sandrine-Aurélié Kake-Guena³, Rares Ovidiu David¹, Patrice Bouchard¹, Éliane Lavergne¹, Josef M. Penninger⁴, Paul C. Pape³, A. Russell Tupling² and Jérôme Frenette^{1,5}

Affiliations

¹ Centre Hospitalier Universitaire de Québec–Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUQ-CRCHUL), Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

² Department of Kinesiology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1

³ Département de physiologie et biophysique, Université de Sherbrooke Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

⁴ IMBA, Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, 1030 Vienna, Austria

⁵ Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

*These authors contributed equally to this work

Published in: Am J Physiol Cell Physiol. 2016 Apr 15;310(8):C663-72.

Résumé

Le récepteur-activateur du facteur nucléaire kB (RANK), son ligand (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG), un récepteur leurre soluble, sont les régulateurs clés de la différenciation des ostéoclastes et le remodelage osseux. Dans cet article, nous démontrons que RANK est également exprimé dans les myotubes et le muscle squelettique totalement différencié. La suppression spécifique de RANK musculaire (RANK^{mk0}) a des effets inotropes chez les muscles longs extenseurs des doigts (EDL) dénervés, mais pas chez les EDL placebos, et empêche la perte de la force musculaire spécifique maximale tout en favorisant l'atrophie musculaire, la fatigabilité et une proportion accrue de fibres à phénotype rapide. Dans les muscles EDL dénervés, RANK^{mk0} augmente nettement le contenu cellulaire du capteur de calcium la molécule d'interaction stromale 1 (STIM1), diminue l'activité de la pompe ATPasique à calcium du réticulum sarco(endo)plasmique (SERCA) et module le stockage du calcium. RANK^{mk0} n'a aucun effet significatif sur les muscles lents soléaires dénervés ou placebos. Ces données suggèrent que RANK a un nouveau rôle de régulateur clé du stockage du calcium et de l'activité de SERCA, affectant subséquemment la fonction du muscle squelettique dénervé.

Abstract

The receptor-activator of nuclear factor κ B (RANK), its ligand RANKL, and the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG) are the key regulators of osteoclast differentiation and bone remodeling. Here, we show that RANK is also expressed in fully differentiated myotubes and skeletal muscle. Muscle RANK deletion (*RANK^{mko}*) has inotropic effects in denervated, but not in sham, extensor digitorum longus (EDL) muscles, preventing the loss of maximum specific force while promoting muscle atrophy, fatigability, and increased proportion of fast-twitch fibers. In denervated EDL muscles, RANK deletion markedly increased stromal interaction molecule 1 (Stim1) content, a calcium sensor, and altered activity of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) modulating Ca^{2+} storage. Muscle RANK deletion had no significant effects on the sham or denervated slow-twitch soleus (Sol) muscles. These data identify a novel role for RANK as a key regulator of calcium storage and SERCA activity, ultimately affecting denervated skeletal muscle function.

2.1 Introduction

The receptor-activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), the membrane receptor RANK and the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG) are members of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily that regulate bone remodelling (26, 29). RANK/RANKL interaction activates Ca^{2+} -dependent and NF- κ B signalling pathways, which affect osteoclast differentiation, activation, and survival (29). The third protagonist, OPG, binds to RANKL and inhibits the RANK/RANKL interaction and subsequent osteoclastogenesis (46, 55). In addition to bone, RANK/RANKL has been detected in other tissues such as thymus, heart, kidney, liver, brain, blood vessels, and skeletal muscles (17, 32, 51). The RANK/RANKL pathway is known to be involved in a variety of physiological and pathological conditions, such as lymph-node organogenesis, formation of the lactating mammary gland, breast cancer, central thermoregulation, T-cell/dendritic cell communication, vascular calcification, and bone metastasis (18, 36, 38, 41, 45).

Muscle hypertrophy/atrophy and gain/loss of bone mineral density occur in parallel in many physiological or pathological conditions, and endocrine, mechanical factors, inflammatory and nutritional states simultaneously affect skeletal muscle and bone metabolism (3, 4, 16, 22, 39). These observations are consistent with the view that skeletal muscle and bone share common cell signalling pathways. For example, the Wnt/ β -catenin signalling pathway is a major regulator of bone mass and muscle development and growth (24). Conditional deletion of the *Ctnnb1* gene in osteocytes, which encodes for β -catenin, leads to impaired bone maturation and mineralization with an increased RANKL:OPG ratio (27). In bone, RANKL/RANK interactions activate tumour necrosis factor receptor-associated factors 6 (TRAF-6), which subsequently induces the activation of downstream signalling molecules and intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) oscillations (53). The ATP-dependent Ca^{2+} pump, sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), is essential for $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations and plays a critical role in osteoclastogenesis (54). Moreover, it has been shown that TRAF-6 is required for functional bone resorption, and muscle-specific TRAF-6 deletion preserves function and reduces atrophy in a model of

muscle wasting, indicating that TRAF-6 is an important regulator of both bone and muscle masses (19, 49, 50). Thus, common signalling pathways are emerging to explain the synchronicity between bone and skeletal muscle physiology and pathophysiology.

Muscle contraction involves the depolarization of the transverse-tubular (t) system, which activates dihydropyridine receptors (DHPRs), opening ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels (RYR1) in the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane. This results in the rapid influx of Ca^{2+} into the cytoplasm through RYR1 and the binding of Ca^{2+} ions to troponin C, causing the formation of actin-myosin cross-bridges and force development (34). Calcium reuptake in the SR is a tightly controlled mechanism mediated almost exclusively by SERCA-1a in fast-twitch fibers and SERCA-2a in slow-twitch fibers. The regulation of Ca^{2+} is also implicated in other physiological processes, such as the maintenance and the adaptation of muscle phenotypes (7, 40), while the chronic rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is associated with different pathological states, including muscle dystrophy (1) and the triggering of apoptotic processes (12, 42). Therefore, the appropriate regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is a requirement for proper cell function, phenotype, and survival.

We recently reported that OPG treatments protect against muscular dystrophy, suggesting a potential role for the RANK/RANKL/OPG pathway in muscle disease. In addition, muscle specific TRAF-6 deletion prevented muscle atrophy and decreased the expression of ubiquitin-proteasome components in models of denervation or starvation (28, 50). In the present study, we hypothesized that muscle RANK, a receptor upstream of TRAF-6, is an important regulator of denervated muscle function. We report that RANK/RANKL regulates Ca^{2+} storage, function, and phenotype, confirming a role for RANK in denervated skeletal muscles.

2.2 Material & Methods

2.2.1 Ethical Approval

All procedures were approved by the Université Laval, Research Center Animal Care and Use Committee, based on the Canadian Council on Animal Care guidelines.

2.2.2 Animals

Mice carrying the RANK^{floxed} or RANK^{del} alleles and muscle creatine kinase-Cre (mck-Cre) mice were backcrossed five times to a C57BL/10J background before generating a specific RANK skeletal muscle deletion, the mck-Cre RANK^{del/floxed}, hereafter named Rankmko mice (18). RANK^{mko} mice are viable, healthy and appeared indistinguishable from control RANK^{floxed/floxed} mice that do not carry the Cre recombinase, hereafter named RANK^{f/f} mice. Male wild-type (C57BL/10J) mice were purchased from the Jackson Laboratory and bred at our animal facility. Mice were screened for the desired genotype by PCR analysis. Food and water were provided ad libitum. At the end of the different experimental procedures, the mice were euthanized by cervical dislocation under anaesthesia.

2.2.3 Denervation

Sciatic denervation was performed under anaesthesia with isoflurane inhalation on adult mice aged 12-18 weeks. Briefly, the hindlimbs were shaved, and a small 0.5-cm incision was made proximal to the hip on the lateral side of the leg to expose and section a 3-5 mm piece of the sciatic nerve. The wounds were then closed with surgical sutures. The same surgery procedures were executed without sciatic denervation for sham mice. Mice were euthanized 14 days after sham or denervation procedures. Animals without surgical procedures were used as control mice.

2.2.4 Cell Culture

C2C12 myoblasts (ATCC) were cultured in high glucose DMEM (HyClone) supplemented with 10% FBS (HyClone) and 1% antibiotic-antimycotic (Life Technologies) in 5% CO₂ and at 37°C. When the myoblasts reached 90% confluence, the medium was replaced by high glucose DMEM containing 1% FBS for 5 days to allow the myoblasts to differentiate into myotubes (11).

2.2.5 Genomic DNA for Genotyping

Genomic DNA from mouse tail tissue samples was isolated and amplified by PCR. RANK, cre, and dystrophin was identified by isolating genomic DNA from tail tissue and screening for the mutation or presence of the transgene by PCR. To detect delta, flox, and wild-type alleles, the primers used were p87, p88, and p105. Conditions : 94 °C 2 min, 40 cycles of (94 °C 30 s, 60 °C 20 s, 72 °C 1 min) and 72 °C 4 min. To detect the presence of the mck-cre, the primers used were ALP 130 and ALP 131. Conditions : 94 °C 2 min, 40 cycles of (94 °C 30 s, 58 °C 10 s, 72 °C 1 min) and 72 °C 4 min. To detect the mdx allele, the primers used were p9427 and p259E. Conditions : 94 °C 3 min, 45 cycles of (94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 20 s) and 72 °C 10 min.

2.2.6 Isometric Contractile Properties

Mice were injected with buprenorphine (i.p. 0.1 mg/kg) and anesthetised with pentobarbital sodium (i.p. 50 mg/kg) 15 min later. Mice were weighed and the soleus (Sol) and extensor digitorum longus (EDL) muscles were carefully dissected, then attached to an electrode and a force sensor (305B-LR, Aurora Scientific, Inc.) to assess contractile properties as described previously (9, 44). Muscle fatigability was examined by stimulating muscle for 200 ms every second at 50 Hz until muscles lost 30% (Sol) or 50% (EDL) of their initial

force. Lastly, muscle length was measured, tendons were removed and muscles were weighed for calculation of muscle cross-sectional area and specific force (13). Functional measurements were analyzed with the Dynamic Muscle Data Analysis software (Aurora Scientific, Inc.).

2.2.7 Immunohistochemistry

Transversal Sol and EDL muscle sections (10 μm) were cut (Leica Microsystems CM1850, Nussloch, Germany) in duplicate from the proximal and distal portions of the muscles. Sections were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: anti-SERCA1a (Abcam), anti-SERCA2a (Abcam), anti-MyHC I (Novus Biological), anti-MyHC IIA (SC-71, DSHB), anti-MyHC IIB (BF-F3, DSHB), anti-MyHC IIX (6H1, DSHB), anti-dystrophin (NCL-Dys1, Vector Laboratories), and anti-RANK (R&D Systems). Pan-MyHC II was obtained by combining three antibodies: anti-MyHC IIA, anti-MyHC IIB, and anti-MyHC IIX (DSHB). Fiber-type differentiation by myosin immunohistochemical was performed as described by Schiaffino et al. (43). Biotinylated secondary antibodies for immunohistochemistry were purchased from Vector Laboratories and Alexa Fluor® secondary antibodies from Invitrogen. The localization of RANK and dystrophin in the sarcolemmal membrane of skeletal muscles was determined by confocal microscopy. Briefly, confocal series were acquired using a Quorum WaveFX spinning disc confocal system (Quorum Technologies, Guelph, Ontario) with 491 nm and 561 nm solid state laser lines for the excitation of green and red (Alexa-488 and Alexa-594), combined with appropriate BrightLine single-bandpass emission filters (536/40 nm and 624/40 nm, Semrock). For DAPI visualization, wide-field z-series were acquired at the same time with a DAPI fluorescence filter cube (Chroma Technology). The CCD camera used to capture the images was a Hamamatsu ImagEM C-9100.

2.2.8 Western Blotting

Myotubes or skeletal muscles were homogenized in a lysis buffer containing 10 μ l of protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Protein homogenates were electrophoretically separated on SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Bio-Rad), blocked in 5% skim milk and incubated overnight at 4°C. The following primary antibodies (all from Santa Cruz Biotechnology) were used: anti-SERCA-1a, anti-SERCA-2a, anti-Stim1, anti-calsequestrin, and anti-RANK anti-GAPDH. The membranes were washed and incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Protein bands were revealed using the ECL-Plus chemiluminescent detection system (Perkin-Elmer). Films (Denville scientific inc.) were used to detect a chemiluminescent signal, then scanned and analyzed using the Quantity One software (v4.6.6, Bio-Rad) (10).

2.2.9 Calcium Measurements

In another set of experiments, the concentration of total Ca^{2+} in Sol and EDL muscles was determined using the Ca^{2+} -dependent UV absorbance of 1,2-Bis (2-Aminophenoxy) ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA), which is a good estimate of [CaT] in the SR (30). Briefly, whole Sol and EDL muscles from 12-week-old mice were weighed and homogenized in a solution containing 0.3 mM BAPTA and sodium dodecyl sulphate (SDS) detergent to dissolve the surface and SR membranes. The mixture was then centrifuged, removing proteins and other insoluble muscle components to prevent unwanted absorbance or light scattering. To determine the amount of total Ca^{2+} , the supernatant was divided into four aliquots for separate absorbance measurements taken at 292 nm: 1) the supernatant alone; 2) The UV absorbance spectrum (240-390 nm) of the supernatant plus 1 mM EGTA added to give a zero Ca^{2+} BAPTA spectrum; 3) the supernatant with a known amount of Ca^{2+} standard added; and 4) the supernatant with excess Ca^{2+} added to complex essentially all of the binding sites on BAPTA with Ca^{2+} . From the absorbance data and the equations given by Lamboley et al. (30), values of total Ca^{2+} concentration were estimated and reported here in units of mmol/kg muscle weight. [CaT] measurements include the following components: extracellular ($[\text{CaT}]_{\text{EC}}$), intracellular outside of the SR ($[\text{CaT}]_{\text{NonSR}}$),

and intracellular inside the SR ($[CaT]_{SR}$). The Ca^{2+} chelator, BAPTA, should provide the best estimate of $[CaT]_{SR}$ under physiological conditions (30).

2.2.10 SERCA Parameters

Homogenates from the muscles of WT and KO mice were used to determine Ca^{2+} dependent Ca^{2+} -ATPase activity using a spectrophotometric assay (SPECTRAmax Plus; Molecular Devices) (47). Briefly, a reaction buffer (200 mM KCl, 20 mM HEPES (pH 7.0), 15 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 10 mM NaN_3 , 5 mM ATP, and 10 mM PEP) containing 18 U/mL of both LDH and PK, as well as the homogenate, were added to test tubes containing 15 different concentrations of Ca^{2+} , ranging between 7.6 and 4.7 pCa units in the presence and absence of ionophore A23187 (4.2 μ M). In the absence of the ionophore, Ca^{2+} accumulates inside the SR vesicle and causes back-inhibition of SERCA pumps, which is more relevant to the physiological system found in skeletal muscle. Aliquots (100 μ l) were then transferred in duplicate to a clear bottom 96-well plate (Costar, Corning Incorporated, NY), where 0.3 mM NADH was added to start the reaction. The plate was read at a wavelength of 340 nm for 30 min at 37°C. The different concentrations of Ca^{2+} in the wells were used to determine the maximal enzyme activity (V_{max}) and pCa50, which is defined as the $[Ca^{2+}]_f$ required to achieve 50% of V_{max} . Lastly, cyclopiazonic acid (CPA; 40 μ M), a highly specific SERCA inhibitor, was used to determine background activity which was subtracted from the total Ca^{2+} -ATPase activity measured in muscle homogenate. All data were then plotted against the negative logarithm of $[Ca^{2+}]_f$ (pCa) using basic statistical software (GraphPad Prism™ version 4) to determine V_{max} and pCa50. pCa50 was determined by non-linear regression curve fitting using the sigmoidal dose response.

2.2.11 Statistical Analyses

All values are expressed as means \pm SEM. The data were analyzed with Student's t-test, Chi-square test or one-way ANOVA followed by a Tukey's test (InStat). The levels of

significance were set at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for genotype (RANKf/f vs RANKmko) or # $p < 0.05$ for treatment (Sham vs Den).

2.3 Results

2.3.1 RANK is Expressed in Fully Differentiated C2C12 Myotubes and at the Sarcolemmal Membrane of Skeletal Muscle

To assess RANK expression in muscle cells, we first analysed its expression in C2C12 myoblasts and differentiated myotubes. RANK was found to be expressed in C2C12 myotubes, but not in proliferating C2C12 myoblasts (Fig. 2-1a). We next analysed RANK expression in skeletal muscle cells *in situ* using confocal microscopy. Confocal immunofluorescence confirmed the presence of RANK protein on the membrane of fast-twitch (EDL) (Fig. 2-1b) and slow-twitch (Sol; data not shown) skeletal muscle fibers. To confirm specific RANK expression in muscle, we crossed *RANK^{ff}* mice onto a muscle creatine kinase-Cre background to generate muscle-specific RANK knockout mice (*RANK^{mko}* mice). PCR results validated the deletion of the RANK allele, specifically in skeletal muscle tissue and partially in heart (Fig. 2-1c). Deletion efficiency was confirmed at the protein level in skeletal muscles, where RANK immunostaining was not detectable (Fig. 2-1b).

2.3.2 RANK Deletion Affects Denervated Muscle Mass and Function

To examine the role of RANK/RANKL in muscle pathophysiology, muscle mass, contractile properties, and fiber type proportions were examined in sham and denervated Sol and EDL muscles from *RANK^{ff}* and *RANK^{mko}* mice. Denervation and/or RANK deletion did not influence mice body weight. Treatment, but not genotype, reduced EDL and Sol muscle masses when normalized to body weights (Table 2-1). Intriguingly, denervated EDL muscles from *RANK^{mko}* mice exhibited inotropic effects, as determined by the decrease in muscle mass (Fig. 2-2a), combined with the partial preservation of maximum specific force (sP_0 ; N/cm²) and compared to denervated *RANK^{ff}* muscles (Fig. 2-2b). The absolute force production (P_0 ; g) was not different between *RANK^{ff}* and *RANK^{mko}* EDL muscle, but RANK deletion prevented the loss of twitch tension (P_t) in denervated

EDL muscles (Table 2-2). The contractile properties of control mice were similar between both genotypes (Table 2-2). Lastly, the P_i/P_0 ratio was increased in both, Sol and EDL muscles of denervated $RANK^{mko}$ mice (Fig. 2-2c), suggesting a change in myofilament Ca^{2+} sensitivity and/or SR Ca^{2+} release.

Denervation led to decreased fatigue resistance in both Sol and EDL muscles during a repetitive and glycolytic fatigue protocol (Fig. 2-2d-e). Both, sham and denervated $RANK^{mko}$ EDL muscles exhibited increased fatigability compared to sham and denervated $RANK^{ff}$ muscles (Fig. 2-2d-e). In accordance with the higher fatigability, immunohistochemical fiber typing showed that the slow-twitch fibers were nearly absent in sham $RANK^{mko}$ EDL muscles while the proportion of fast-twitch fibers (IIA+IIX+IIB) was significantly increased in denervated $RANK^{mko}$ EDL muscles compared to denervated $RANK^{ff}$ EDL muscles (Fig. 2-2f). The proportion of fiber type over 100% in denervated $RANK^{mko}$ EDL muscles indicated the presence of hybrid fibers expressing multiple isoforms of MyHC. No changes in muscle fiber type were observed in Sol muscles (Fig. 2-3a), indicating that the impact of muscle RANK deletion on muscle fatigue and phenotype is limited to fast-twitch EDL muscles. Noticeably, the proportion of fast-twitch fibers expressing SERCA-1a was reduced and the proportion of fast-twitch fibers expressing SERCA-2a was increased in $RANK^{mko}$ Sol and EDL muscles (Fig 2-3b).

2.3.3 Total Calcium and SERCA Activity and Expression in $RANK^{ff}$ and $RANK^{mko}$ Muscles

Our recent published data show an inverse relationship between [CaT] and muscle mass, where the highest values of [CaT] are seen with the lowest muscle weights (30). Since RANK deletion promotes muscle atrophy and prevents force deficits in denervated muscles, we next measured [CaT] in EDL muscles (Fig. 2-4a-c). Despite similar muscle masses, the average values of [CaT] were 42% lower in sham $RANK^{mko}$ relative to sham $RANK^{ff}$ EDL muscles (Fig. 2-4c), indicating that under non-pathological conditions, muscle RANK is important in Ca^{2+} storage of skeletal muscles. Consistent with the observed

inverted relationship between [CaT] and muscle weights, we found that muscle weights below <4.5 mg had much greater [CaT] than the bigger muscles, but data were non-linear due to a floor effect in the assay (Fig. 2-4b). Consistent with the reduced muscle mass in denervated *RANK^{mko}* EDL muscles (Fig. 2-4a), [CaT] increased by 93% in denervated *RANK^{mko}* EDL muscles, while it did not significantly increase in denervated *RANK^{ff}* EDL muscles (Fig. 2-4c).

Since SERCA is critical for Ca^{2+} cycling in the SR, we analyzed SERCA1a and SERCA2a expression and SERCA activity in Sol and EDL muscle extracts. Western blotting analyses showed that SERCA1a content is significantly reduced in denervated muscles, while SERCA2a content is significantly increased following denervation, independently of the genotype (Fig 2-4d). No difference in calsequestrin content, a calcium-binding protein located in SR, was observed between *RANK^{ff}* and *RANK^{mko}* muscles (Fig 2-4d). However, the content of the stromal interaction molecule 1 (Stim1), which functions as a calcium sensor in the SR, increased by 77% and 411% in denervated *RANK^{ff}* and *RANK^{mko}* EDL muscles, relative to their respective sham (Fig 2-4d). The concentration of Stim1 increased significantly by 184% in denervated *RANK^{mko}*, compared to denervated *RANK^{mko}* EDL muscles. Next, we assessed SERCA Ca^{2+} -dependent ATPase activity in muscle homogenates from sham and denervated *RANK^{ff}* and *RANK^{mko}* Sol and EDL muscles over Ca^{2+} concentrations ranging from *pCa* 7.0 to *pCa* 4.5. Interestingly, upon denervation, maximal SERCA activity was reduced in both the Sol and EDL muscles (Fig. 2-4e-g & Fig. 2-5). Moreover, maximal SERCA activity was significantly reduced in both the sham and denervated *RANK^{mko}* EDL compared to the sham and denervated *RANK^{ff}* EDL (Fig. 2-4c-f). This inhibitory effect of RANK deletion on SERCA activity was limited to EDL muscles and did not affect Sol muscles. Overall, these findings demonstrate a direct role for muscle RANK in the regulation of SERCA activity and Stim1 content in fast-twitch EDL muscles.

2.4 Discussion

We previously demonstrated that systemic injection of OPG, the decoy receptor of RANKL, restores muscle force and improves muscle histology in dystrophic *mdx* mice (9). However, whether the RANK/RANKL/OPG system directly or indirectly affects skeletal muscle was unknown. In this paper, using muscle specific RANK mutant mice, we demonstrate that RANK is expressed in skeletal muscle cells, where it directly regulates muscle function. Importantly, muscle-specific RANK deletion protects from denervation-induced loss of muscle force and modulates total Ca^{2+} storage and SERCA activity.

RANK is well characterized in osteoclasts, where it leads to the activation of different signalling pathways, especially NF- κ B and calcium-dependent pathways (5). In skeletal muscle, Ca^{2+} is a master regulator of multiple intracellular processes, such as myosin-actin cross-bridging, protein synthesis and degradation, mitochondrial adaptation, and fiber type shifting, through the control of Ca^{2+} sensitive proteases and transcriptional factors such as NFATc1 (2). Consistent with a role of RANK in the regulation of calcium handling, conditional deletion of *RANK* in skeletal muscle affected muscle contraction post-denervation, atrophy, and fiber type, all of which are regulated by Ca^{2+} (2). Intriguingly, muscle-specific *RANK* deletion prevents the loss of specific force production, but not the loss of muscle mass following denervation. Without significant changes in muscle mass, muscle strength can be altered by (1) the amplitude or duration of the Ca^{2+} transient or (2) the sensitivity of the myofilaments to Ca^{2+} . For instance, reduced force production in aged muscle is partially caused by the reduced Ca^{2+} content and myofilament sensitivity (31). Our findings show that *RANK*^{*mko*} denervated muscles have higher [CaT], which originates from the increase of intracellular calcium stocks (30, 33). Therefore, a higher Ca^{2+} content potentially results in greater rates of Ca^{2+} release, increased myoplasmic Ca^{2+} transients, and, ultimately, preserved muscle force production. These results are supported by the increased specific force and Pt/P₀ ratio in denervated *RANK*^{*mko*} EDL muscle, indicating that these muscles are able to generate a stronger contraction following submaximal stimulation.

The higher releasable of the Ca^{2+} content is not explained by greater SERCA activity, since we found that denervated *RANK^{mko}* muscles had a low SERCA activity rate compared to the denervated *RANK^{fl/fl}*. Moreover, we observed no change in CSQ content, making it unlikely to explain a greater releasable Ca^{2+} content; however, in the normal EDL muscles, it was shown that the resting SR Ca^{2+} content is only a relatively small proportion of its maximal content, and that Ca^{2+} bound to CSQ is only one-third of its saturated level (14, 35, 52). Thus, it is likely that the increase in [CaT] observed in the denervated *RANK^{mko}* EDL reflects an increased binding of Ca^{2+} in the SR, thereby increasing releasable SR Ca^{2+} and ultimately specific force production. In this respect, the relatively greater inhibition of SERCA activity may serve to prolong the Ca^{2+} transient and increase force production, while decreasing the fatigue resistance. Accordingly, we observed higher muscle strength following a single contraction (Pt) in denervated *RANK^{mko}* EDL muscle, combined with increased fatigability following repeated maximal contractions. The exact mechanisms lowering SERCA activity in response to RANK deletion are unknown and require further investigation – and analysis of sarcolipin and phospholamban, two well-known regulators of the SERCA pump (15), indicate increased expression of both proteins in response to denervation; however, no significant differences were found between genotypes (data not shown).

Enhanced Ca^{2+} entry could be responsible for any increase in SR Ca^{2+} content in muscle. In osteoclasts, RANKL-mediated Ca^{2+} entry could arise from intracellular or extracellular origin (6, 25). Members of the transient receptor potential vanilloid channels (TRPV) family, TRPV2 and TRPV5, were demonstrated to mediate RANKL-induced calcium entry (6, 23). Store-operated calcium entry (SOCE) channels, which sense declining Ca^{2+} ion concentration in the SR, were also associated with RANKL-induced calcium entry (23). For instance, the silencing of the SOCE channel *Orai1* with specific shRNA inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing NFATc1 induction (20). Mice lacking SOCE specifically in skeletal muscle exhibit reduced muscle mass and increased susceptibility to fatigue, whereas *Stim1^{-/-}* myotubes failed to refill their stores and altered the expression of key SR proteins (48). Furthermore, the use of the SERCA inhibitor suggests that under some conditions, the role of SERCA in replenishing Ca^{2+} stores is limited (37). Our current

findings that denervation treatment and RANK deletion markedly increased Stim1 content (184%) may explain, in part, the discrepancy between the rise in [CaT] and the depression of SERCA activity in denervated RANK^{mk0} EDL muscles. It is thus tempting to speculate that SOCE would compensate for the lack of SERCA activity in denervated RANK^{mk0} EDL muscles. The mechanisms by which RANKL/RANK controls Ca²⁺ storage in skeletal muscle cells require further experiments; nevertheless, our findings provide the first evidence that RANK is a novel regulator of Ca²⁺ storage in skeletal muscle cells.

With respect to EDL muscle fatigability, we found that both denervation and RANK deletion led to higher fatigability than their wild type and sham-operated counterparts. Consistent with this observation, we found that RANK^{mk0} muscles increased the number of fast-twitch type II fibers; however, the disproportionate increase of fatigability in RANK^{mk0} muscle compared to the relatively modest changes in fiber type, and that no changes in muscle contractility, fatigue, and phenotype were observed in Sol muscles, suggest that the muscle fiber type phenotype may not be the main reason to explain the fatigue in RANK^{mk0} muscle. Indeed, the decreased fatigue resistance observed following denervation was associated with an increased proportion of type I fibres in both RANK^{ff} and RANK^{mk0} Sol and EDL muscles. It could be speculated that the altered calcium signalling following muscle-specific RANK deletion impairs mitochondrial function, given the well-established role of the calcium-dependent effectors calcineurin and NFATc1 in enhancing muscle endurance and mitochondrial respiratory capacity (21). Nevertheless, our findings indicate that RANK deletion enhances force production, and promotes a fast-twitch phenotype and fatigability, while increasing stim1 content and decreasing SERCA activity.

2.5 Perspective and Conclusion

Osteoporosis and muscle wasting occur simultaneously in a variety of pathologies, although common signalling pathways between these two processes were not identified (Fig. 2-6). Here, we show that in addition to its role in bone homeostasis, RANK signalling also regulates Ca²⁺ storage, muscle mass, and muscle performance. Muscle-specific

deletion of RANK has an inotropic effect on denervated fast-twitch EDL muscles, largely composed of type IIA, IIX, and IIB fibers. Fast-twitch fibers are usually the first to be affected in several forms of muscular and neuromuscular diseases and aging conditions, leading to premature loss of function and important incapacities (8). Our findings show for the first time that fast-twitch fibers may be specifically targeted to enhance their force production. Although these results are preliminary and the long-term effects remain to be determined, this discovery opens a whole new field of research, as well as new therapeutic avenues for conditions affecting, in synchrony, bone and skeletal muscle, and potentially heart diseases.

2.6 Disclosures Section

J.F., S.S.D., N.A.D., and J.M.P. conceived the project and its design; S.S.D., N.A.D., P.B., A.B.P, V.A.F., D.G., S.A.K.G., O.D., R.T., P.C.P. and E.L. performed experiments and data analysis; J.F., S.S.D., and N.A.D. wrote the manuscript; and all authors checked for scientific content and approved the final manuscript. JF is supported by CIHR and NSERC and JMP by an advanced ERC grant and the Austrian Academy of Sciences. The authors declare no competing interests.

2.7 References

1. **Allen DG, Gervasio OL, Yeung EW, Whitehead NP.** Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can J Physiol Pharmacol* 88: 83–91, 2010.
2. **Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M.** Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80: 1215–1265, 2000.
3. **Bloomfield SA.** Changes in musculoskeletal structure and function with prolonged bed rest. *Med Sci Sports Exerc* 29: 197–206, 1997.
4. **Boss GR, Seegmiller JE.** Age-related physiological changes and their clinical significance. *West J Med* 135: 434–440, 1981.
5. **Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL.** Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337–342, 2003.
6. **Chamoux E, Bisson M, Payet MD, Roux S.** TRPV-5 mediates a receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand-induced increase in cytosolic Ca²⁺ in human osteoclasts and down-regulates bone resorption. *J Biol Chem* 285: 25354–25362, 2010.
7. **Chin ER.** Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 99: 414–423, 2005.
8. **Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S.** Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 2191–2199, 2013.
9. **Dufresne SS, Dumont NA, Bouchard P, Lavergne É, Penninger JM, Frenette J.** Osteoprotegerin Protects against Muscular Dystrophy. *Am J Pathol* 185: 920–926, 2015.
10. **Dufresne SS, Frenette J.** Investigation of wild-type and mycolactone-negative mutant *Mycobacterium ulcerans* on skeletal muscle: IGF-1 protects against mycolactone-induced muscle catabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R753–762, 2013.
11. **Dumont N, Frenette J.** Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: a mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am J Pathol* 176: 2228–2235, 2010.
12. **Francini F, Formigli L, Meacci E, Vassalli M, Nosi D, Quercioli F, Tiribilli B, Bencini C, Squecco R, Bruni P, Orlandini SZ.** Ca²⁺ homeostasis and cytoskeletal rearrangement operated by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblastic cells. *J Gravitational Physiol J Int Soc Gravitational Physiol* 9: P281–282, 2002.
13. **Frenette J, St-Pierre M, Côté CH, Mylona E, Pizza FX.** Muscle impairment occurs rapidly and precedes inflammatory cell accumulation after mechanical loading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R351–357, 2002.
14. **Fryer MW, Stephenson DG.** Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol* 493 (Pt 2): 357–370, 1996.
15. **Gamu D, Bombardier E, Smith IC, Fajardo VA, Tupling AR.** Sarcolipin provides a novel muscle-based mechanism for adaptive thermogenesis. *Exerc Sport Sci Rev* 42: 136–142, 2014.
16. **Goldspink DF.** The effects of denervation on protein turnover of the soleus and extensor digitorum longus muscles of adult mice. *Comp Biochem Physiol B* 61: 37–41, 1978.
17. **Hanada R, Hanada T, Sigl V, Schramek D, Penninger JM.** RANKL/RANK-beyond bones. *J Mol Med Berl Ger* 89: 647–656, 2011.

18. **Hanada R, Leibbrandt A, Hanada T, Kitaoka S, Furuyashiki T, Fujihara H, Trichereau J, Paolino M, Qadri F, Plehm R, Klaere S, Komnenovic V, Mimata H, Yoshimatsu H, Takahashi N, von Haeseler A, Bader M, Kilic SS, Ueta Y, Pifl C, Narumiya S, Penninger JM.** Central control of fever and female body temperature by RANKL/RANK. *Nature* 462: 505–509, 2009.
19. **Hindi SM, Sato S, Choi Y, Kumar A.** Distinct roles of TRAF6 at early and late stages of muscle pathology in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 23: 1492–1505, 2014.
20. **Hwang S-Y, Putney JW.** Orai1-mediated calcium entry plays a critical role in osteoclast differentiation and function by regulating activation of the transcription factor NFATc1. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 26: 1484–1492, 2012.
21. **Jiang LQ, Garcia-Roves PM, de Castro Barbosa T, Zierath JR.** Constitutively active calcineurin in skeletal muscle increases endurance performance and mitochondrial respiratory capacity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E8–E16, 2010.
22. **Jost PD.** Simulating human space physiology with bed rest. *Hippokratia* 12 Suppl 1: 37–40, 2008.
23. **Kajiya H, Okamoto F, Nemoto T, Kimachi K, Toh-Goto K, Nakayana S, Okabe K.** RANKL-induced TRPV2 expression regulates osteoclastogenesis via calcium oscillations. *Cell Calcium* 48: 260–269, 2010.
24. **Kohn AD, Moon RT.** Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38: 439–446, 2005.
25. **Komarova SV, Pilkington MF, Weidema AF, Dixon SJ, Sims SM.** RANK ligand-induced elevation of cytosolic Ca^{2+} accelerates nuclear translocation of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *J Biol Chem* 278: 8286–8293, 2003.
26. **Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM.** Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402: 304–309, 1999.
27. **Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M.** Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol* 30: 3071–3085, 2010.
28. **Kumar A, Bhatnagar S, Paul PK.** TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15: 233–239, 2012.
29. **Lacey D., Timms E, Tan H-L, Kelley M., Dunstan C., Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian Y-X, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle W.** Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 93: 165–176, 1998.
30. **Lamboley CRH, Kake Guena SA, Touré F, Hébert C, Yaddaden L, Nadeau S, Bouchard P, Wei-LaPierre L, Lainé J, Rousseau EC, Frenette J, Protasi F, Dirksen RT, Pape PC.** New method for determining total calcium content in tissue applied to skeletal muscle with and without calsequestrin. *J Gen Physiol* 145: 127–153, 2015.
31. **Lamboley CR, Wyckelsma VL, Dutka TL, McKenna MJ, Murphy RM, Lamb GD.** Contractile properties and sarcoplasmic reticulum calcium content in type I and type II skeletal muscle fibres in active aged humans. *J Physiol* 593: 2499–2514, 2015.
32. **Leibbrandt A, Penninger JM.** RANK/RANKL: regulators of immune responses

and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 1143: 123–150, 2008.

33. **Manno C, Ríos E.** A better method to measure total calcium in biological samples yields immediate payoffs. *J Gen Physiol* 145: 167–171, 2015.
34. **Melzer W, Herrmann-Frank A, Lüttgau HC.** The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim Biophys Acta* 1241: 59–116, 1995.
35. **Murphy RM, Larkins NT, Mollica JP, Beard NA, Lamb GD.** Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. *J Physiol* 587: 443–460, 2009.
36. **Nagy V, Penninger JM.** The RANKL-RANK Story. *Gerontology* (February 14, 2015). doi: 10.1159/000371845.
37. **Okubo Y, Suzuki J, Kanemaru K, Nakamura N, Shibata T, Iino M.** Visualization of Ca²⁺ Filling Mechanisms upon Synaptic Inputs in the Endoplasmic Reticulum of Cerebellar Purkinje Cells. *J Neurosci* 35: 15837–15846, 2015.
38. **Page G, Miossec P.** RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum* 52: 2307–2312, 2005.
39. **Pang MYC, Eng JJ, McKay HA, Dawson AS.** Reduced hip bone mineral density is related to physical fitness and leg lean mass in ambulatory individuals with chronic stroke. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 16: 1769–1779, 2005.
40. **Patterson MF.** Denervation produces different single fiber phenotypes in fast- and slow-twitch hindlimb muscles of the rat. *AJP Cell Physiol* 291: 518–528, 2006.
41. **Perlot T, Penninger JM.** Development and function of murine B cells lacking RANK. *J Immunol Baltim Md 1950* 188: 1201–1205, 2012.
42. **Sandri M.** Apoptotic signaling in skeletal muscle fibers during atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 249–253, 2002.
43. **Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, Vianello M, Gundersen K, Lomo T.** Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 10: 197–205, 1989.
44. **Segal SS, Faulkner JA.** Temperature-dependent physiological stability of rat skeletal muscle in vitro. *Am J Physiol* 248: C265–270, 1985.
45. **Sigl V, Penninger JM.** RANKL/RANK - from bone physiology to breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 25: 205–214, 2014.
46. **Simonet W., Lacey D., Dunstan C., Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen H., Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes T., Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle W.** Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell* 89: 309–319, 1997.
47. **Smith IC, Bombardier E, Vigna C, Tupling AR.** ATP consumption by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pumps accounts for 40-50% of resting metabolic rate in mouse fast and slow twitch skeletal muscle. *PloS One* 8: e68924, 2013.
48. **Stiber J, Hawkins A, Zhang Z-S, Wang S, Burch J, Graham V, Ward CC, Seth M, Finch E, Malouf N, Williams RS, Eu JP, Rosenberg P.** STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 10: 688–697, 2008.
49. **Sun H, Gong Y, Qiu J, Chen Y, Ding F, Zhao Q.** TRAF6 Inhibition Rescues

- Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy. *Int J Mol Sci* 15: 11126–11141, 2014.
50. **Sun H, Qiu J, Chen Y, Yu M, Ding F, Gu X.** Proteomic and bioinformatic analysis of differentially expressed proteins in denervated skeletal muscle. *Int. J. Mol. Med.* (April 8, 2014). doi: 10.3892/ijmm.2014.1737.
51. **Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM.** RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 20: 795–823, 2002.
52. **Trinh HH, Lamb GD.** Matching of sarcoplasmic reticulum and contractile properties in rat fast- and slow-twitch muscle fibres. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 591–600, 2006.
53. **Walsh MC, Choi Y.** Biology of the RANKL/RANK/OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 5, 2014.
54. **Yang Y-M, Kim MS, Son A, Hong JH, Kim K-H, Seo JT, Lee S-I, Shin DM.** Alteration of RANKL-Induced Osteoclastogenesis in Primary Cultured Osteoclasts From SERCA2^{+/-} Mice. *J Bone Miner Res* 24: 1763–1769, 2009.
55. **Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T.** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3597–3602, 1998.

2.8 Figures, Tables and Legends

	Mice			
	Sham ^{f/f}	Den ^{f/f}	Sham ^{mko}	Den ^{mko}
Body weight (g)	24.7 ± 0.8	24.3 ± 0.7	23.8 ± 1.4	24.5 ± 1.9
EDL muscle weight / Body weight	0,34 ± 0,05	0,28 # ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,25 # ± 0,04
Sol muscle weight / Body weight	0,29 ± 0,04	0,24 # ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,23 # ± 0,04

Tableau 2-1: Body weights and muscle mass normalized to body weight of mice.

Denervation and/or muscle RANK deletion did not influence body weight. Treatment, but not genotype, reduced EDL and Sol muscle mass normalized to body weight. Data are presented as mean +/- SEM, n=7. The level of significance was set at # p<0.05 for treatment (Sham vs Den).

	Sol						EDL					
	Ctrl ^{ff}	Sham ^{ff}	Den ^{ff}	Ctrl ^{mko}	Sham ^{mko}	Den ^{mko}	Ctrl ^{ff}	Sham ^{ff}	Den ^{ff}	Ctrl ^{mko}	Sham ^{mko}	Den ^{mko}
P₀	26.6	26.1	19.6#	26.9	25.6	18.1#	33.5	33.1	21.3#	32.7	33.5	22.1#
(g)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1.2	0.6	0.4	1.5	1.4	1.8	1.7	1.6	1.4	1.8	1.3	1.4
Pt	3.8	4.3	4.2	4.8	4.3	4.9	7.1	7.5	5.6#	5.3	5.8	6.2
(g)	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0.6	0.2	0.3	0.5	0.4	0.4	0.6	0.8	0.5	0.6	0.8	0.4

Tableau 2-2: Contractile properties of Sol and EDL muscles.

Ctrl, sham and denervated RANK^{f/f} and RANK^{mko} SOL and EDL muscles were incubated ex vivo and electrically stimulated to record maximal absolute force (P₀) and twitch tension Pt (g). P₀ (g) decreased independently of genotype following denervation. However, muscle RANK deletion prevented the loss of twitch force in denervated EDL muscles. No difference in P₀ and Pt were observed in muscle RANK deletion of control mice. Data are presented as mean +/- SEM, n=7. The level of significance was set at # p<0.05 for treatment (Sham vs Den).

Figure 1

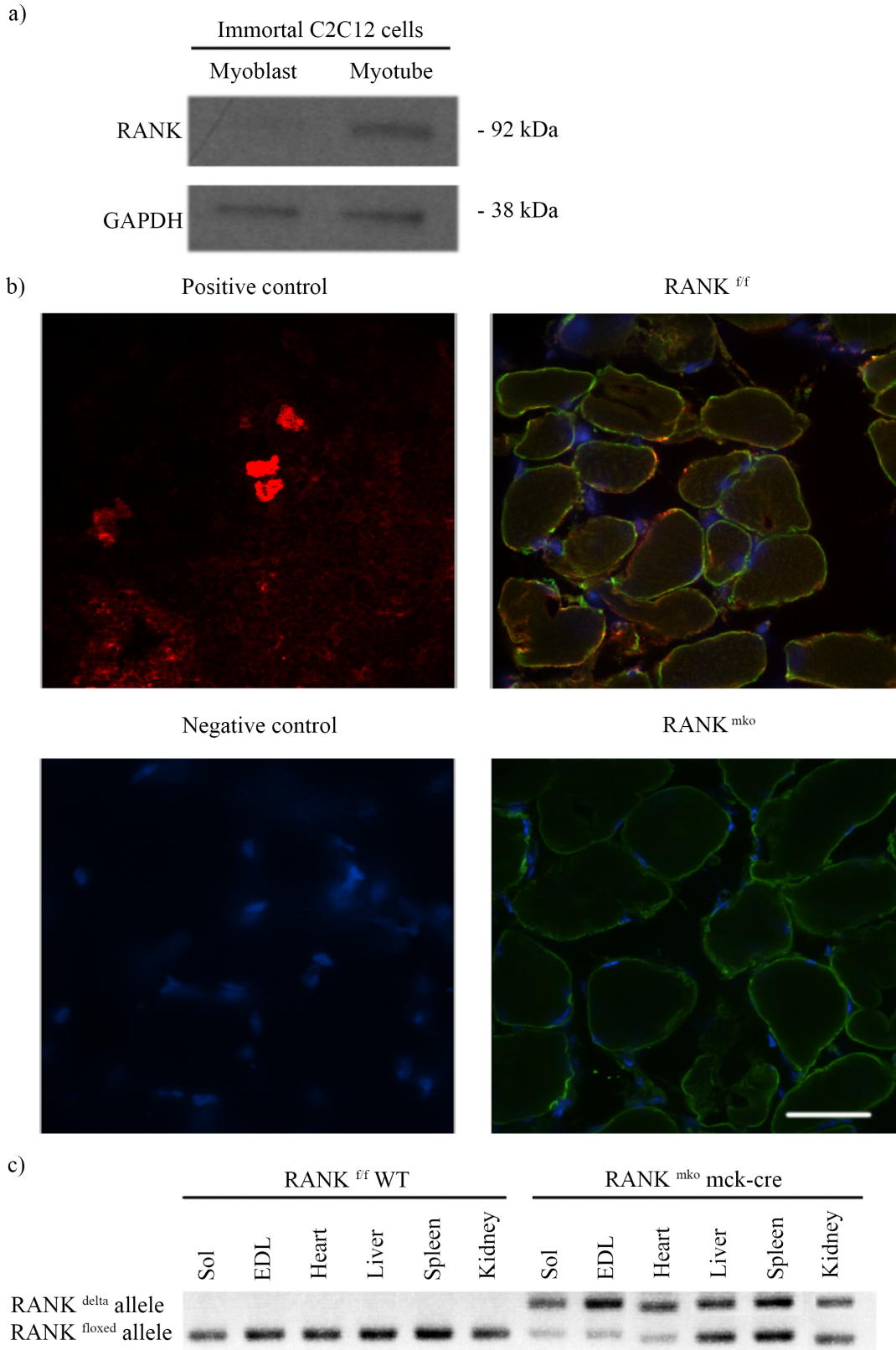


Figure 2-1: Rank expression in skeletal muscles and myotubes.

(a) Western blot showing that fully differentiated C2C12 myotubes, but not myoblasts, express RANK protein. GAPDH is shown as a loading control (b) Confocal images showing colocalization of intracellular face of cytoplasmic membrane/sarcolemma dystrophin (green) and RANK (red) in $RANK^{f/f}$ and the absence of RANK in $RANK^{mko}$ EDL muscles. Thymus sections were used as positive controls for RANK immunofluorescence. Omission of primary antibody was used as a negative control. Because non-muscle cells in skeletal muscles can also express RANK, confocal images, rather than Western blots, were required to confirm the absence of muscle RANK in $RANK^{mko}$ mice. Bar =100 um. (c) PCR analysis of genomic DNA isolated from Sol muscle, EDL muscle, heart, liver, spleen, and kidney showing efficient Cre-mediated recombination of loxP sites in skeletal muscles from $RANK^{mko}$ mice.

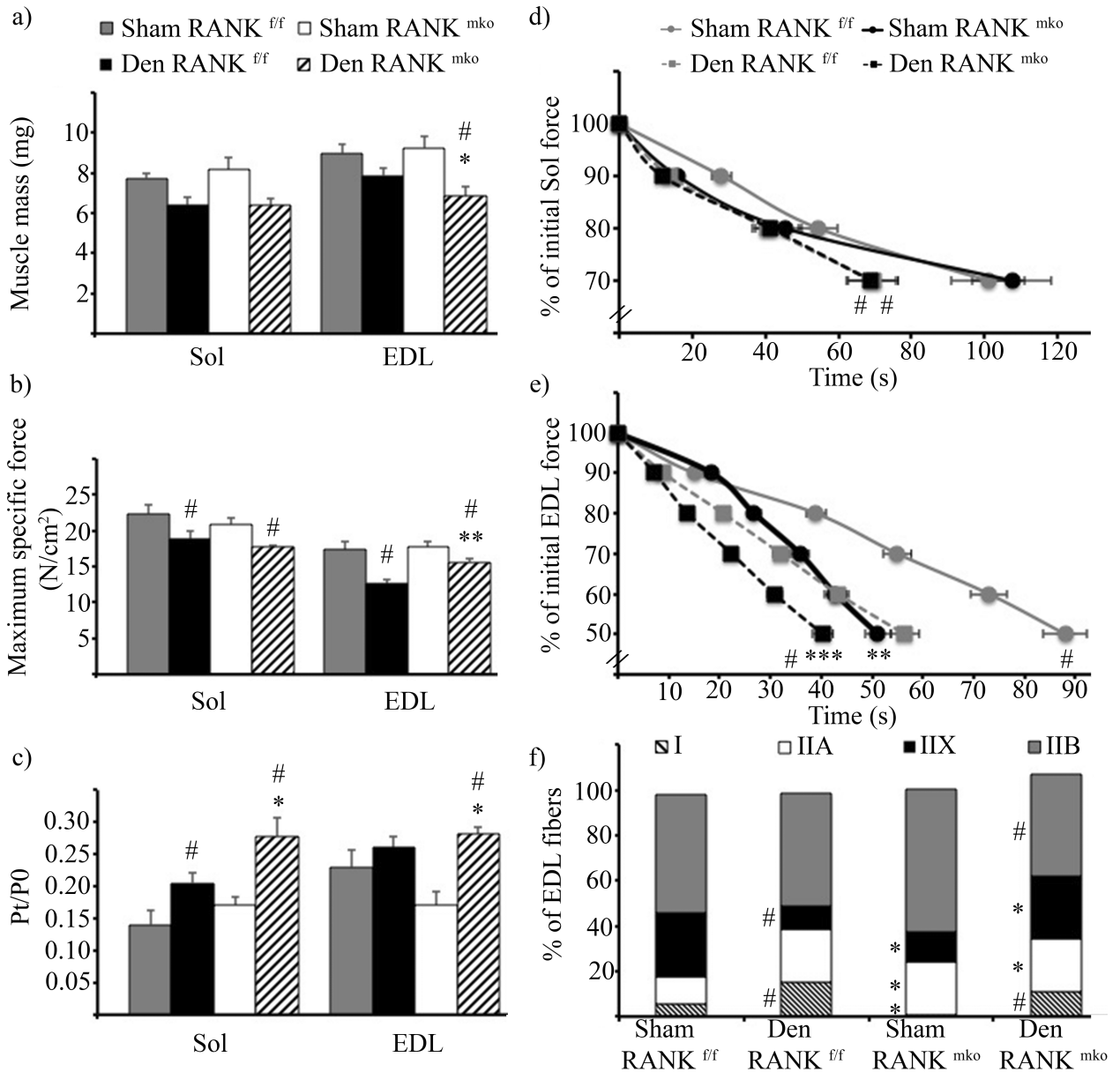


Figure 2-2: Impact of RANK deletion on muscle contractility, fatigue, and phenotype.

(a) Muscle atrophy was significantly more pronounced in denervated $RANK^{mko}$ relative to $RANK^{ff}$ EDL muscles. (b) However, ex vivo force measurements show that RANK ablation preserves the specific force tension of denervated (Den) EDL muscles, but not in slow-twitch Sol muscles. (c) RANK deletion increases Pt/P₀ ratio in Sol and EDL muscles following denervation. (d) Muscle glycolytic fatigue protocol was induced by a train of stimulations (200 ms on: 800 ms off, 50 Hz) until Sol muscles force reach 70% of their

initial force. Fatigue time is decreased in denervated muscles, but similar between $RANK^{ff}$ and $RANK^{mko}$ muscles. **(e)** Muscle glycolytic fatigue protocol was induced by a train of stimulations (200 ms on: 800 ms off, 50 Hz) until EDL muscles force reach 50% of their initial force. Sham and denervated $RANK^{mko}$ EDL muscles exhibit increased fatigability compared to sham and denervated $RANK^{ff}$ EDL muscles. **(f)** Fiber typing of EDL muscle analysis showed that the slow-twitch fibers were nearly absent in sham $RANK^{mko}$ EDL muscles, while the proportion of fast-twitch fibers (IIA+IIB+IIX) was significantly increased in denervated $RANK^{mko}$ EDL muscles compared to denervated $RANK^{ff}$ EDL muscles. The levels of significance were set at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for genotype ($RANK^{ff}$ vs $RANK^{mko}$) or # $p < 0.05$ for treatment (Sham vs Den). Data are presented as mean \pm SEM, $n = 3-7$.

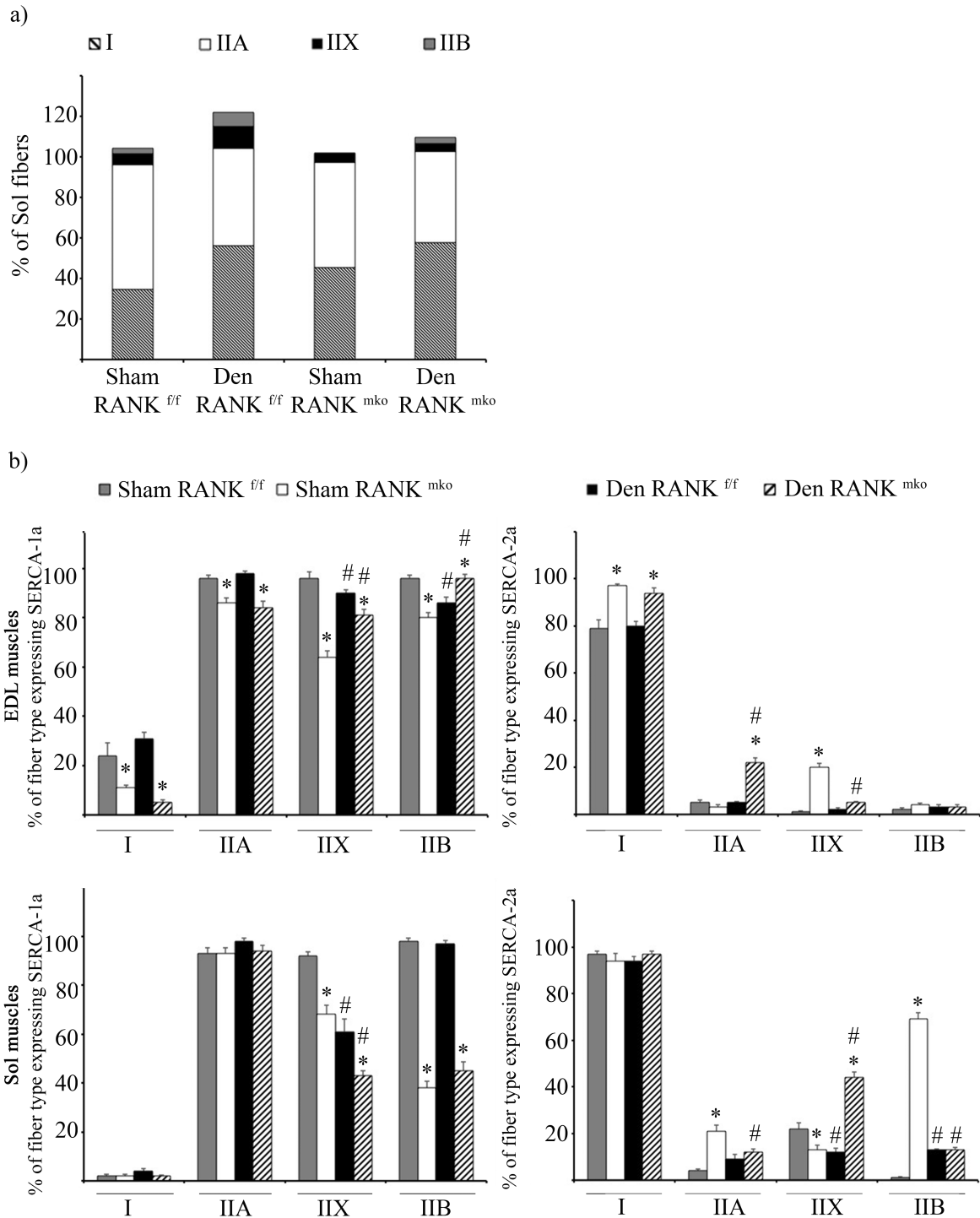


Figure 2-3: Percentage of type I and II fibers in Sol muscles and proportion of each fiber type expressing SERCA-1a and SERCA-2a in Sol and EDL muscles.

(a) As opposed to fast-twitch EDL muscles, no changes in phenotype were observed in sham or denervated RANK^{ff} and RANK^{mk0} in Sol muscles. **(b)** Sham and denervated RANK^{mk0} muscles exhibited a lower proportion of fast-twitch fibers expressing SERCA-1a and a higher proportion of fast-twitch fibers expressing SERCA-2a. The levels of significance were set at * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 for genotype (Rank^{ff} vs Rank^{mk0}) or # p<0.05 for treatment (Sham vs Den). Data are presented as mean +/- SEM, n = 6-8.

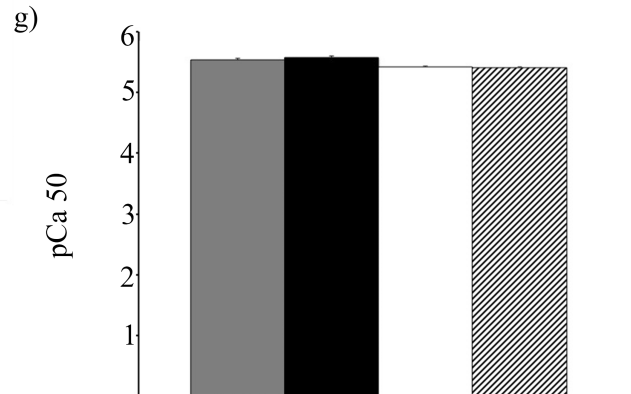
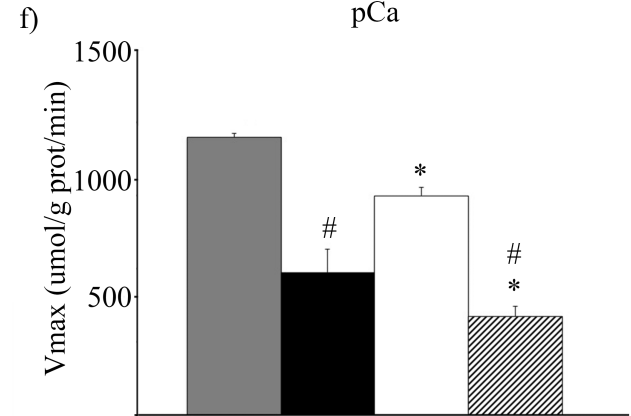
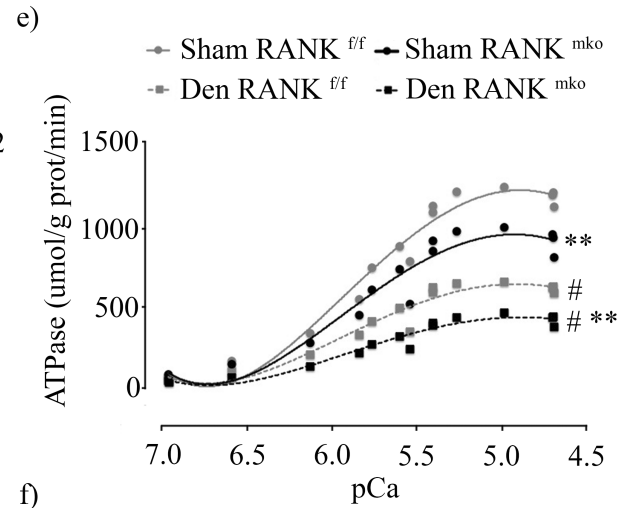
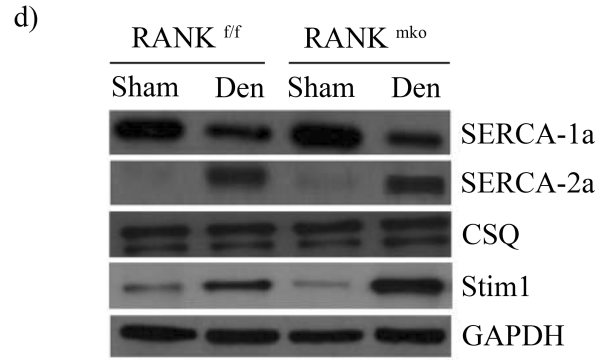
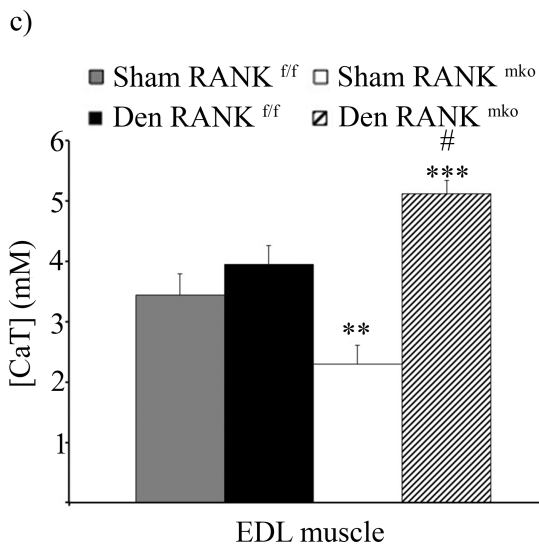
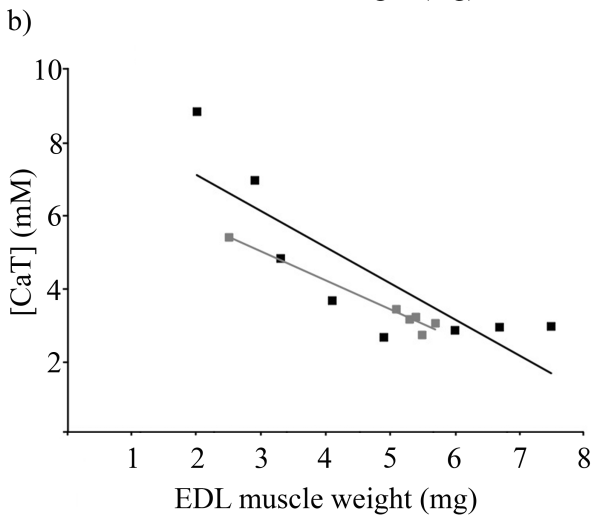
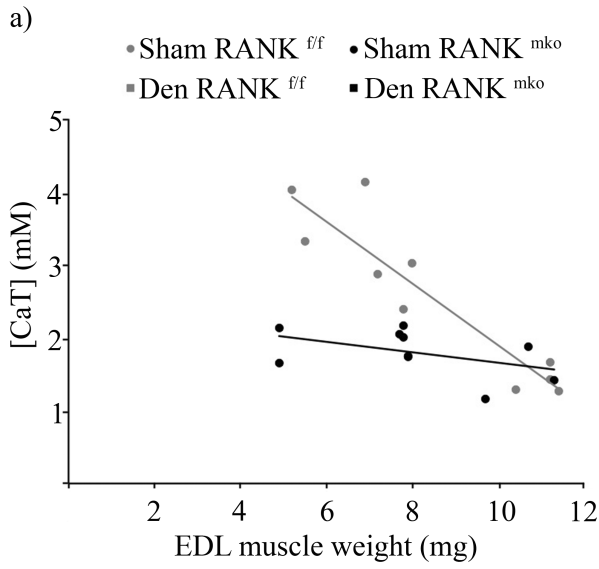


Figure 2-4: Total calcium content, SERCA activity and calcium protein contents in RANK^{f/f} and RANK^{mk0} EDL muscles.

(a-c) [CaT] was decreased in sham RANK^{mk0} EDL muscles relative to sham RANK^{f/f} EDL muscles, but increased sharply in denervated RANK^{mk0} EDL muscles. (d) Western blots show that SERCA-1a content is reduced, while SERCA-2a content is increased following denervation. No changes in calsequestrin content were observed, but Stim1 content increased markedly in denervated RANK^{mk0} EDL muscles. (e) SERCA Ca²⁺-dependent ATPase activity was assessed in muscle homogenates from sham and denervated RANK^{f/f} and RANK^{mk0} EDL muscles over Ca²⁺ concentrations ranging from pCa 7.4 to pCa5.0. (f) Maximal ATPase activity (Vmax) and (g) pCa value required to elicit 50% of maximal activity (pCa50). The levels of significance were set at * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 for genotype (Rank^{f/f} vs Rank^{mk0}) or # p<0.05 for treatment (Sham vs Den). Data are presented as mean +/- SEM, n = 3-7.

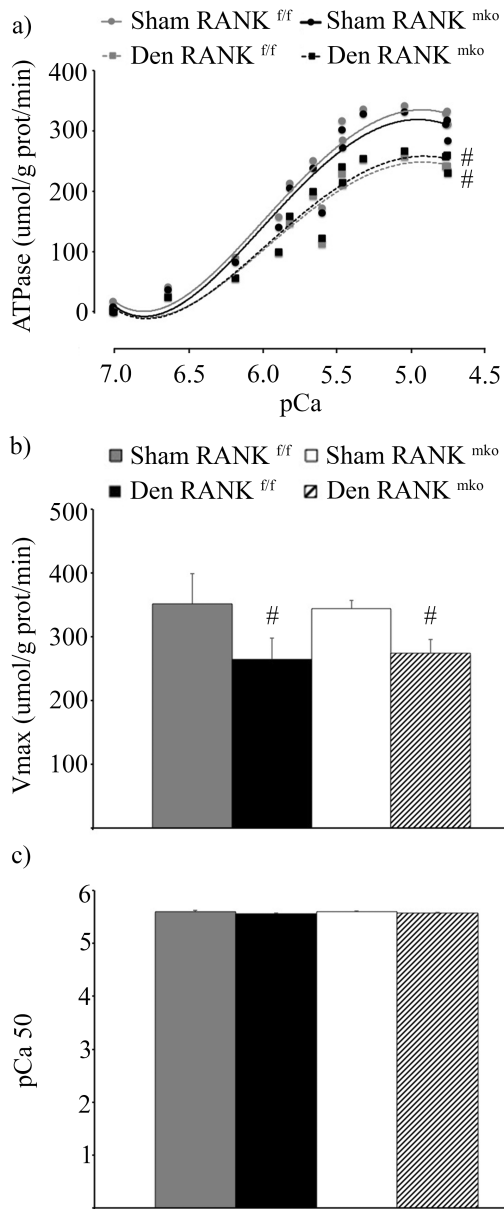


Figure 2-5: SERCA Ca²⁺-dependent ATPase parameters from sham and denervated RANK^{f/f} and RANK^{mko} in Sol muscles.

Denervation induced a significant reduction of (a) SERCA Ca²⁺ dependent ATPase activity and V_{max} (b) Mmaximal ATPase activity (V_{max}) (c) pCa value required to elicit 50% of maximal activity (pCa₅₀) were similar between control and experimental Sol muscles. The level of significance between genotype (Rank^{f/f}/Rank^{mko}) was set at * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 and set at # p<0.05 between treatment (Sham/Den). Data are presented as mean +/- SEM, n = 3-7.

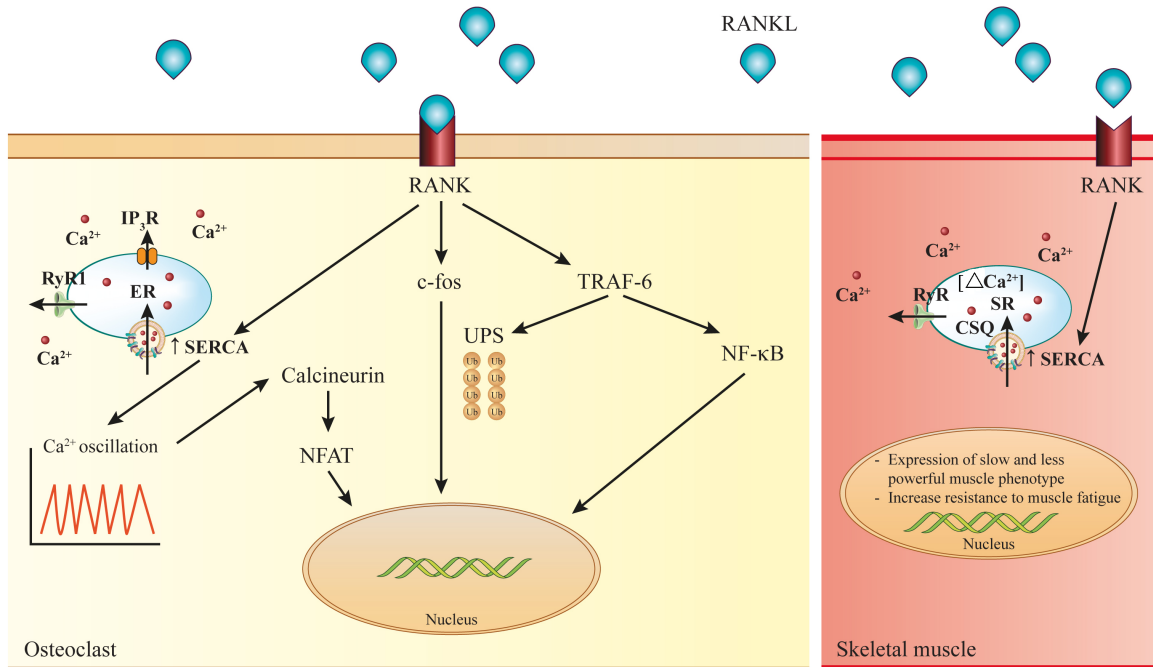


Figure 2-6: Schematic representation of RANK/RANKL/OPG pathway as common regulator of bone and muscle cells.

In osteoclast, RANK/RANKL interaction regulates osteoclastogenesis and/or cell apoptosis through the modulation of SERCA activity, Ca²⁺ oscillation, Ca²⁺-calcineurin-NFAT and NF-κB pathways. Muscle cells also express RANK, and RANK/RANKL interaction is an important regulator of SERCA activity and calcium storage in fast-twitch EDL muscles. These results highlight the importance of a common signalling pathway, opening up potentially new treatments for both skeletal muscle and bone.

Chapitre 3 : L'ostéoprotégérine limite les séquelles de la dystrophie musculaire

Osteoprotegerin protects against muscular dystrophy

Sébastien S. Dufresne^{1*}, Nicolas A. Dumont^{1*}, Patrice Bouchard¹, Éliane Lavergne¹,
Josef M. Penninger², and Jérôme Frenette^{1,3}

Affiliations

¹ Centre Hospitalier Universitaire de Québec–Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUQ-CRCHUL), Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

² IMBA, Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, 1030 Vienna, Austria.

³ Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V

* These authors contributed equally to this work

Published in : Am J Pathol 2015, 185: 920-926

Résumé

Le récepteur-activateur du facteur nucléaire κ B (RANK), son ligand (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG), un récepteur leurre soluble, sont les régulateurs clés de la différenciation des ostéoclastes et du remodelage osseux. Bien qu'il existe une forte corrélation entre l'ostéoporose et le dysfonctionnement du muscle squelettique, la pertinence fonctionnelle d'une voie de signalisation biologique particulière qui pourrait réguler de manière synchrone la physiopathologie de l'os et du muscle squelettique est encore insaisissable. Dans cet article, nous démontrons que les cellules musculaires peuvent produire et sécréter de l'OPG et que le traitement pharmacologique de la souris mdx dystrophiques avec de l'OPG-Fc recombinant atténue la perte de la force musculaire d'une manière dose-dépendante et préserve l'intégrité du muscle, en particulier dans le muscle à phénotype rapide EDL. Nos données identifient l'OPG-Fc comme un protecteur innovateur de l'intégrité musculaire et représentent potentiellement une nouvelle voie thérapeutique pour les maladies musculaires et l'ostéoporose.

Abstract

The receptor-activator of nuclear factor κ B (RANK), its ligand RANKL, and the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG) are the key regulators of osteoclast differentiation and bone remodeling. Although there is a strong association between osteoporosis and skeletal muscle atrophy/dysfunction, the functional relevance of a particular biological pathway that synchronously regulates bone and skeletal muscle physiopathology is still elusive. Here, we showed that muscle cells can produce and secrete OPG, and that pharmacological treatment of dystrophic *mdx* mice with recombinant OPG-Fc mitigates the loss of muscle force in a dose-dependent manner and preserves muscle integrity, particularly in fast-twitch EDL muscles. Our data identify OPG as a novel protector of muscle integrity, and potentially representing a new therapeutic avenue for both muscular diseases and osteoporosis.

3.1 Introduction

The discoveries of the receptor-activator of nuclear factor κ B (NF- κ B) ligand (RANKL), the receptor-activator of NF- κ B (RANK), and the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG) triad (RANK/RANKL/OPG) have been among the most important advances in the field of bone biology and disease. RANK, RANKL, and OPG are members of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily and form a key cytokine system for regulating osteoclast differentiation and function^{1,2}. RANKL is expressed by osteoblasts while RANK, its receptor, is expressed on pre-osteoclastic cells³. RANK/RANKL interaction induces the formation of multinucleated mature osteoclasts, ultimately causing bone resorption. OPG is a soluble decoy receptor for RANKL that inhibits RANKL/RANK interaction, osteoclastogenesis, and osteoporosis⁴. OPG is also a decoy receptor for the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), and increases cell survival by preventing the activation of pro-apoptotic TRAIL receptors (DR4) and (DR5)⁵. The overexpression of OPG in mice results in osteopetrosis, while OPG-null mice suffer from severe osteoporosis^{6,7}. Therefore, the OPG:RANKL ratio in the immediate vicinity of bone cells is a decisive factor in the regulation of bone turnover⁸.

Skeletal muscles represent up to 35-45% of total body mass and are responsible for many vital functions, such as movement, breathing, thermoregulation, and metabolism. Interestingly, osteoporosis and muscle atrophy/dysfunction occur simultaneously in a number of conditions, including spaceflight, extended bed rest, aging, and some muscular and neuromuscular diseases^{9,10,11}. For example, Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe genetic disease characterized by critical muscle degeneration combined with low bone density^{12,13}. These observations suggest the existence of cross-talks and mutual cooperative interactions between bone and skeletal muscle. However, a possible common signaling pathway simultaneously controlling these different tissues has not been identified so far. The first objective of the present study was to investigate the ability of skeletal muscle in culture to secrete OPG. The second objective was to characterize the effect of OPG-immunoglobulin fragment complex (OPG-Fc) treatment on the muscle function of dystrophic mice. In this paper, we demonstrate that muscle cells can produce and secrete

OPG. Importantly, we show for the first time that OPG-Fc treatment strikingly improves skeletal muscle integrity and function in the mdx model of muscular dystrophy. OPG-Fc completely restores the function of the dystrophic EDL muscle. The discovery of a common pathway linking bone and muscle wasting may provide powerful tools for developing more effective treatments for a wide variety of myopathies and muscle dystrophies.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Animals

Male wild-type (*C57BL/10ScSnJ*) and mdx dystrophic mice (*C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J*) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred at our animal facility. OPG-Fc [i.p. 0.3 and 1 mg/kg/d for 10 d] was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and injected daily from day 25 to 35 after birth. The fusion to the Fc region prolongs OPG half-life in circulation and OPG-Fc at [1mg/kg/d] is considered a low dose in rodent models of osteoporosis¹⁴. Control mice were injected daily with the same volume of PBS (vehicle). At the end of the different experimental procedures, mice were euthanized by cervical dislocation under anesthesia. All the procedures were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee based on the Canadian Council on Animal Care guidelines.

3.2.2 Isometric Contractile Properties

Mice were first injected with buprenorphine (i.p. 0.1 mg/kg) to palliate the poor analgesic effect of pentobarbital. Mice were then anaesthetized with pentobarbital sodium (i.p. 50 mg/kg) 15 min later. Soleus (SOL) and extensor digitorum longus (EDL) muscles were dissected and incubated in a buffered physiological salt solution (Krebs-Ringer), then attached to an electrode and a force sensor as previously described¹⁵. Diaphragm (DIA) muscle strips were carefully dissected to assess contractile properties as described by Lynch and collaborators¹⁶. Time-to-peak twitch tension (TPT; ms), half-relaxation time (1/2 RT, ms), twitch tension (Pt, g), maximum tetanic tension (P_0 , g), and maximum specific tetanic tension (sP_0 , N/cm²) values were obtained using a 305B-LR dual-mode lever arm system controlled by dynamic muscle control and data acquisition software (Aurora Scientific, Aurora, ON, Canada). The cross-sectional areas were estimated by dividing the wet weight by the optimal muscle length, multiplied by the muscle density (1.06 g/cm³), multiplied by

the fiber-to-muscle length ratio for SOL and EDL muscles¹⁷. Functional measurements were analyzed with the Dynamic Muscle Data Analysis software (Aurora Scientific, Inc.).

3.2.3 Immunohistochemistry, Immunofluorescence and Staining

Transverse sections of SOL, EDL and DIA muscles (10 µm) were cut (Leica Microsystems CM1850, Nussloch, Germany) in duplicate from the proximal and distal portions of the muscles. Sections were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: Rat anti-mouse F4/80 (1:100; Serotec, Oxford, UK) or Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) antibodies (1:300; BD Pharmingen) to identify macrophages and neutrophils, respectively. Biotinylated secondary antibodies for immunohistochemistry were purchased from Vector Laboratories (Burlington, ON, Canada), and Peroxidase conjugate and DAB chromogen were used to reveal neutrophils and macrophages (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Hematoxylin and eosin staining (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used to visualize muscle integrity and quantify the extent of muscle damage. Damaged area was defined as an area not occupied by normal or regenerating muscle fibers. Sections were examined with an inverted microscope (Nikon, Mississauga, Canada) and analyzed with ImageJ version 1.41 software (National Institutes of Health, USA).

3.2.4 Cell Culture

C2C12 myoblasts (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in high glucose DMEM (HyClone, Logan, UT, USA), and supplemented with 10% FBS (HyClone) and 1% antibiotic-antimycotic (Life Technologies) in a 5% CO₂ and 37 °C environment. When the myoblasts reached 90% confluence, the medium was replaced by high glucose DMEM containing 1% FBS for 5 days to allow the myoblasts to differentiate into myotubes. The myotubes were then treated with lipopolysaccharides (LPS) [1 µg/ml, Sigma-Aldrich].

3.2.5 ELISA

The concentrations of OPG and RANKL released by LPS-stimulated C2C12 myotubes [1 mg/ml] were assessed with the commercial mouse Osteoprotegerin/TNFRSF11B and the mouse TRANCE/RANKL/TNFSF11 Quantikine ELISA Kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

3.2.6 Statistical Analyses

All values are expressed as means \pm SEM. OPG secretion by C2C12 myotubes was analyzed by one-way ANOVA. All other data were analyzed by a 3-way ANOVA. All ANOVA analyses were followed by Tukey's test *a posteriori* (InStat). The level of significance was set at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3 Results

3.3.1 Stimulated-C2C12 Myotubes Secrete Osteoprotegerin

Skeletal muscle contains many cell types that could potentially produce OPG and/or RANKL; therefore, we used C2C12 myotubes to determine whether muscle cells could secrete OPG *per se*. Lipopolysaccharide (LPS) was used to stimulate C2C12 myotubes because LPS is known to increase RANK expression and promote osteoclastogenesis *in vitro*¹⁸. Soluble RANKL protein was undetectable in the culture media following LPS stimulation (data not shown). However, LPS-stimulated myotubes produced and secreted OPG in a time-dependent manner, and OPG concentration in the media was almost 3-fold higher compared to control 24h after LPS stimulation (Fig. 3-1).

3.3.2 OPG-Fc Treatment Greatly Increases Dystrophic Muscle Function

We next tested whether the pharmacological blockade of RANK/RANKL with its molecular decoy OPG improves structural integrity and function of dystrophic muscles. Daily injections of OPG-Fc [0.3 mg/kg/d] or [1 mg/kg/d] in *mdx* mice resulted in a dose-dependent gain of specific muscle force of 46% and 70% in SOL muscle, 114% and 233% in EDL muscle, and 27% and 59% in DIA muscle from *mdx* mice, compared to vehicle-injected *mdx* mice (Fig. 3-2). No significant differences with respect to time to peak tension (TPT), half-relaxation time ($\frac{1}{2}$ RT), or muscle and body weight were observed post OPG-Fc treatment (Table 3-1). Interestingly, OPG-Fc injection had no impact on muscle contractility in uninjured wild-type mice, suggesting that a pathological process must be in place for OPG-Fc to be effective. Of note, contractile properties of developing SOL and EDL control muscles (5 week-old) are roughly 14-15N/cm² at 25⁰C and 40-50% inferior to fully mature and adult muscles (12 week-old)^{19,20}. These data show that muscle cells can secrete OPG and that OPG-Fc can restore muscle force in dystrophic *mdx* mice.

3.3.3 OPG-Fc Preserves Muscle Integrity and Reduces Leukocyte Accumulation in Dystrophic Muscles

Because OPG-Fc drastically improves muscle force production, we next tested whether OPG-Fc preserves muscle integrity and reduces inflammation in dystrophic muscles. OPG-Fc treatment [1 mg/kg/d] for 10 days also resulted, respectively, in a 52% and 44% reduction of neutrophil and macrophage numbers in SOL muscle (Fig. 3-3A,B), in a 68% and 47% reduction in EDL muscle (Fig. 3-4A,C) and in a 30% and 18% decrease in DIA muscle (Fig. 3-5A,B) from dystrophic mice relative to vehicle-injected dystrophic mice. Hematoxylin and eosin staining also showed a marked reduction in the damaged muscle area in the SOL muscle (Fig. 3-6A), the EDL muscle (Fig. 3-4D,E), and the DIA muscle (Fig. 3-6B) in OPG-Fc-injected mdx mice relative to PBS-injected mdx mice. Thus, OPG-Fc treatment not only increases muscle force, but also alleviates the structural muscle damage and inflammation observed in mdx mice.

3.4 Discussion

An intimate functional relationship exists between muscle and bone, and cumulative evidence indicates that anabolism or catabolism of these tissues occurs in synchrony⁹. In support of this observation, mice deficient in myostatin have significantly more muscle mass and present, reciprocally, an increase in bone mineral density²¹, while focal muscle paralysis by Botox has dramatic effects on bone resorption²². Here, we show for the first time that C2C12 myotubes, deprived of osteogenic conditions, can directly secrete significant amounts of OPG protein²³, the bone anti-resorptive agent. More importantly, we show that 10 days of treatment with OPG-Fc during the first and most important phase of muscle degeneration in dystrophic mice led to a spectacular gain in muscle integrity and force, particularly in fast-twitch EDL muscles.

RANK, RANKL and OPG mRNA expression have been previously noted in heart and skeletal muscles, but their roles in muscle physiopathology had never been investigated^{24,25}. Our results showed that OPG-Fc does not enhance muscle force of healthy wild-type muscles, suggesting that a pathological condition is required for OPG-Fc to be effective. One could also speculate that OPG-Fc may have an effect on other cell types, such as inflammatory cells, which may potentially affect muscle integrity. However, recent studies indicate that OPG-Fc is a pro-inflammatory molecule in several different biological tissues^{26,27,28}, implying that the reduction of neutrophil and macrophage accumulations in OPG-Fc-treated mdx muscles is a consequence of improved muscle integrity and not the cause. Nevertheless, the molecular mechanisms driving OPG-Fc protective effects on muscle function in dystrophic muscles remain to be clarified, and may include one or several of the following pathways that are well-characterized during osteoclastogenesis (Fig. 3-7).

Since OPG-Fc reduces muscle weakness by controlling pathways that are dysregulated in dystrophic muscles, it is possible that OPG-Fc mediates its effects by regulating Ca²⁺ handling. Interestingly, elevated Ca²⁺ levels and impaired Ca²⁺ flux are observed in

dystrophic muscles even before the first signs of muscle degeneration^{29,30}. Overexpression of the transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) Ca²⁺ channel is sufficient to increase [Ca²⁺]_i and induce a muscle degeneration similar to the one observed in muscular dystrophy³¹. By contrast, decreased Ca²⁺ influx by transgenic overexpression of a dominant negative mutant of TRPC6 in mdx or sarcoglycan-deficient (*Sgcd*^{-/-}) models of muscular dystrophy alleviates muscle degeneration³². Similarly, overexpression of the Ca²⁺ ATPase pump SERCA, which is responsible for Ca²⁺ reuptake into the sarcoplasmic reticulum, mitigates muscular dystrophy in dystrophin (*mdx*) and sarcoglycan (*Sgcd*) null mice³³. The presence of elevated Ca²⁺ in dystrophic muscles is also associated with the activation of calpains (calcium-dependent cysteine proteases) and mitochondrial swelling³⁴. The overexpression of calpastatin, a specific endogenous inhibitor of calpains, reduces muscle necrosis in dystrophic mice³⁵. Overall, cumulative evidence indicates that dysregulation of [Ca²⁺]_i is intimately related to several forms of muscular dystrophy; however, a role for OPG-Fc in the regulation of calcium homeostasis has yet to be proven in skeletal muscles.

In bone, RANKL/RANK interaction activates cell signaling pathways via the recruitment of intracellular tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) signal transducer proteins. The cytoplasmic domain of RANK can bind to TRAF-2, -5 and -6, inducing the activation of NF-κB, JNK and mitogen-activated protein kinase pathways³⁶. In particular, TRAF-6 has been identified as a key adaptor molecule downstream of RANK activation, absolutely required for functional bone resorption³⁷. Muscle specific TRAF-6 deletion reduces muscle atrophy and decreases the expression of ubiquitin-proteasome components in models of denervation or starvation^{38,39,40}. Interestingly, the level and activity of TRAF-6 is increased in dystrophic mdx mice, and its inhibition improves muscle structure, function and mass⁴¹. Furthermore, the NF-κB pathway is constantly active in DMD patients⁴², and the pharmacological inhibition of NF-κB in mdx mice reduces the inflammatory reaction and muscle necrosis associated with muscular dystrophy, ultimately resulting in increased muscle strength⁴³. These results are very similar to our observations that OPG-Fc decreases muscle damage and inflammation, and increases muscle function. It is highly plausible that OPG-Fc would reduce NF-κB signaling in skeletal muscle in addition to regulating calcium handling. Indeed, NF-κB and calcium signaling are tightly interrelated in dystrophic

myofibers, e.g. the downregulation of one pathway leads to the downregulation of the other⁴⁴.

Cumulative evidence supports the notion that myofiber death primarily occurs through necrosis in DMD patients and mdx mice, and that the contribution of apoptosis in muscle wasting is reportedly negligible. However, caspase-3, -9, -12 and BAX were shown to be activated in mdx mice, suggesting endoplasmic reticulum and mitochondrial stresses at the early stage of muscular dystrophy⁴⁵. More recently, muscle biopsies showed an important increase of caspase-12 concentration in DMD patients, and the genetic deletion of caspase-12 preserved muscle integrity and function of mdx mice following eccentric contraction-induced muscle damage⁴⁶. TRAIL, mostly known for its anti-cancer properties, is potentially another cell signaling pathway through which OPG-Fc may interfere to preserve muscle function in mdx dystrophic mice. Indeed, TRAIL interacts with death receptors DR4 (TRAIL-RI) and DR5 (TRAIL-RII), inducing caspase cascade activation⁴⁷. Although muscle cells express receptors DR4 and DR5⁴⁸, a specific role for TRAIL-induced apoptosis has not been demonstrated in DMD or Becker muscular dystrophy⁴⁹. One cannot rule out the possibility that OPG-Fc, through its action as a decoy receptor for TRAIL, could partially reduce muscle degeneration in mdx mice.

3.5 Perspective and Conclusion

In conclusion, we uncover a complete novel and critical role of OPG in controlling muscle function and integrity in a model of muscular dystrophy. Our data demonstrating that OPG-Fc treatment protects SOL and DIA and, to a greater extent, EDL muscles, are of paramount importance, since defective fast-twitch fibers are recognized as one hallmark of several muscular and neuromuscular diseases⁵⁰. Although further studies are certainly required to decipher exactly how OPG, a known regulator of bone mass, improves muscle function, our discovery underscores the importance of cross-talks between muscle skeletal and bone and opens new avenues of treatment for several forms of neuromuscular and muscular diseases in which osteoporosis often occurs synchronistically.

3.6 Disclosures Section

Author contributions J.F., S.S.D., N.A.D., and J.M.P. conceived the project and its design. S.S.D., N.A.D., P.B., E.L. performed experiments and data analysis. J.F., S.S.D., and N.A.D. wrote the manuscript. All authors checked for scientific content and contributed to the final drafting of the manuscript. N.A.D. is supported by the Canadian Institutes of Health Research. This work was supported by grants to J.F. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC-227114), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; JNM-123675) and Muscular Dystrophy Canada (MDC). J.M.P. is supported by the Austrian Academy of Sciences and an Advanced ERC grant.

3.7 References

- 1 Kong YY1, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM: OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999, 397: 315-323
- 2 Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998, 93: 165-176
- 3 Papadopouli AE, Klonaris CN, Theocharis SE. Role of OPG/RANKL/RANK axis on the vasculature. *Histol Histopathol* 2008, 23: 497-506
- 4 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ: Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997, 89: 309-319
- 5 Bosman MC, Reis CR, Schuringa JJ, Vellenga E, Quax WJ: Decreased affinity of recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhTRAIL) D269H/E195R to osteoprotegerin (OPG) overcomes TRAIL resistance mediated by the bone microenvironment. *J Biol Chem* 2014, 289: 1071-1078
- 6 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998, 12: 1260-1268
- 7 Bargman R, Posham R, Boskey A, Carter E, DiCarlo E, Verdelis K, Raggio C, Pleshko N: High- and low-dose OPG-Fc cause osteopetrosis-like changes in infant mice. *Pediatr Res* 2012, 72: 495-501
- 8 Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D: Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol* 2003, 163: 2021-2031
- 9 Bonewald LF, Kiel DP, Clemens TL, Esser K, Orwoll ES, O'Keefe RJ, Fielding RA: Forum on bone and skeletal muscle interactions: summary of the proceedings of an ASBMR workshop. *J Bone Miner Res* 2013, 28: 1857-1865

- 10 DiGirolamo DJ, Kiel DP, Esser KA: Bone and skeletal muscle: neighbors with close ties. *Journal of bone and mineral research : J Bone Miner Res* 2013, 28: 1509-1518
- 11 Sharir A, Stern T, Rot C, Shahar R, Zelzer E: Muscle force regulates bone shaping for optimal load-bearing capacity during embryogenesis. *Development* 2011, 138: 3247-3259
- 12 Larson CM, Henderson RC: Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop* 2000, 20: 71-74
- 13 Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE: Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1997, 90: 717-727
- 14 Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, Kostenuik PJ, Dougall WC, Sullivan JK, Martin JS, Dansey R: Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 2012, 11: 401-419
- 15 Frenette J, St-Pierre M, Côté CH, Mylona E, Pizza FX: Muscle impairment occurs rapidly and precedes inflammatory cell accumulation after mechanical loading. *Am J Physiol* 2002, 282: R351-R357
- 16 Lynch GS, Rafael JA, Hinkle RT, Cole NM, Chamberlain JS, Faulkner JA: Contractile properties of diaphragm muscle segments from old mdx and old transgenic mdx mice. *Am J Physiol* 1997, 272: C2063-C2068
- 17 Brooks SV, Faulkner JA: Contractile properties of skeletal muscles from young, adult and aged mice. *J Physiol* 1988, 404: 71-82
- 18 Hou GQ, Guo C, Song GH, Fang N, Fan WJ, Chen XD, Yuan L, Wang ZQ: Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 2013, 32: 503-510
- 19 Dumont N, Bouchard P, Frenette J: Neutrophil-induced skeletal muscle damage: a calculated and controlled response following hindlimb unloading and reloading. *Am J Physiol* 2008, 295: R1831-R1838
- 20 Dumont N, Frenette J: Macrophages Protect against Muscle Atrophy and Promote Muscle Recovery in Vivo and in Vitro A Mechanism Partly Dependent on the Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling Molecule. *Am J Pathol* 2010, 176: 2228-2235
- 21 Bodnar D, Geyer N, Ruzsnavszky O, Olah T, Hegyi B, Sztretye M, Fodor J, Dienes B, Balogh A, Papp Z, Szabo L, Muller G, Csernoch L, Szentesi P: Hypermuscular

- mice with mutation in the myostatin gene display altered calcium signalling. *J Physiol* 2014, 592: 1353-1365
- 22 Warner SE, Sanford DA, Becker BA, Bain SD, Srinivasan S, Gross TS: Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone* 2006, 38: 257-264
 - 23 Philippou A, Bogdanis G, Maridaki M, Halapas A, Sourla A, Koutsilieris M: Systemic cytokine response following exercise-induced muscle damage in humans. *Clin Chem Lab Med* 2009, 47: 777-782
 - 24 Bernardi S, Fabris B, Thomas M, Toffoli B, Tikellis C, Candido R, Catena C, Mulatero P, Barbone F, Radillo O, Zauli G, Secchiero P: Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Mol Cell Endocrinol* 2014, 394: 13-20
 - 25 Tisato V, Secchiero P, Rimondi E, Giancesini S, Menegatti E, Casciano F, Zamboni P, Zauli G: GM-CSF exhibits anti-inflammatory activity on endothelial cells derived from chronic venous disease patients. *Mediators Inflamm.* 2013, Article ID 561689
 - 26 Shimamura M, Nakagami H, Osako MK, Kurinami H, Koriyama H, Zhengda P, Tomioka H, Tenma A, Wakayama K, Morishita R: OPG/RANKL/RANK axis is a critical inflammatory signaling system in ischemic brain in mice. *PNAS* 2014, 111: 8191-8196
 - 27 Zauli G, Melloni E, Capitani S, Secchiero P: Role of full-length osteoprotegerin in tumor cell biology. *Cell Mol Life Sci* 2009, 66: 841-851
 - 28 Nahidi L, Leach ST, Lemberg DA, Day AS: Osteoprotegerin exerts its pro-inflammatory effects through nuclear factor- κ B activation. *Dig Dis Sci* 2013, 58: 3144-3155
 - 29 Burr AR, Millay DP, Goonasekera SA, Park KH, Sargent MA, Collins J, Altamirano F, Philipson KD, Allen PD, Ma J, Lopez JR, Molkentin JD: Na⁺ dysregulation coupled with Ca²⁺ entry through NCX1 promotes muscular dystrophy in mice. *Mol Cell Biol* 2014, 34: 1991-2002
 - 30 DiFranco M, Woods CE, Capote J, Vergara JL: Dystrophic skeletal muscle fibers display alterations at the level of calcium microdomains. *PNAS* 2008, 105: 14698-14703
 - 31 Millay DP, Goonasekera SA, Sargent MA, Maillet M, Aronow BJ, Molkentin JD: Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *PNAS* 2009, 106: 19023-19028
 - 32 Millay DP, Maillet M, Roche JA, Sargent MA, McNally EM, Bloch RJ, Molkentin JD: Genetic manipulation of dysferlin expression in skeletal muscle: novel insights into muscular dystrophy. *Am J Pathol* 2009, 175: 1817-1823

- 33 Goonasekera SA, Lam CK, Millay DP, Sargent MA, Hajjar RJ, Kranias EG, Molkentin JD: Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J. Clin invest* 2011, 121: 1044-1052
- 34 Kuznetsov AV, Winkler K, Wiedemann FR, von Bossanyi P, Dietzmann K, Kunz WS: Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Mol Cell Biochem* 1998, 183: 87-96
- 35 Spencer MJ, Mellgren RL: Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet* 2002, 11: 2645-2655
- 36 Lee SW, Han SI, Kim HH, Lee ZH: TAK1-dependent activation of AP-1 and c-Jun N-terminal kinase by receptor activator of NF-kappaB. *J Biochem Mol Biol.* 2002, 35: 371-376.
- 37 Armstrong AP, Tometsko ME, Glaccum M, Sutherland CL, Cosman D, Dougall WC: A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem* 2002, 277: 44347-44356
- 38 Paul PK, Gupta SK, Bhatnagar S, Panguluri SK, Darnay BG, Choi Y, Kumar A: Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J Cell Biol* 2010, 191: 1395-1411
- 39 Paul PK, Bhatnagar S, Mishra V, Srivastava S, Darnay BG, Choi Y, Kumar A: The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol Cell Biol* 2012, 32: 1248-1259
- 40 Paul PK, Kumar A: TRAF6 coordinates the activation of autophagy and ubiquitin-proteasome systems in atrophying skeletal muscle. *Autophagy* 2011, 7: 555-556
- 41 Hindi SM, Sato S, Choi Y, Kumar A: Distinct roles of TRAF6 at early and late stages of muscle pathology in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1492-1505
- 42 Monici MC, Aguenouz M, Mazzeo A, Messina C, Vita G: Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 2003, 60: 993-997
- 43 Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PM, Carathers M, Li ZW, Beg AA, Ghosh S, Sahenk Z, Weinstein M, Gardner KL, Rafael-Fortney JA, Karin M, Tidball JG, Baldwin AS, Guttridge DC: Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest* 2007, 117: 889-901
- 44 Altamirano F, Lopez JR, Henríquez C, Molinski T, Allen PD, Jaimovich E: Increased resting intracellular calcium modulates NF-κB-dependent inducible nitric-

- oxide synthase gene expression in dystrophic mdx skeletal myotubes. *J Biol Chem* 2012, 287: 20876-20887
- 45 Honda A, Abe S, Hiroki E, Honda H, Iwanuma O, Yanagisawa N, Ide Y: Activation of caspase 3, 9, 12, and Bax in masseter muscle of mdx mice during necrosis. *J Muscle Res Cell Motil* 2007, 28: 243-247
- 46 Moorwood C, Barton ER: Caspase-12 ablation preserves muscle function in the mdx mouse. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 5325-5341
- 47 Crowder RN, El-Deiry WS: Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Exp Oncol* 2012, 34:160-164
- 48 Freer-Prokopa M, O'Flaherty J, Rossa JA, Weymana CM: Non-canonical role for the TRAIL receptor DR5/FADD/caspase pathway in the regulation of MyoD expression and skeletal myoblast differentiation. *Differentiation* 2009, 78: 205–212
- 49 Tews DS: Tumour necrosis factor-mediated cell death pathways do not contribute to muscle fibre death in dystrophinopathies. *Acta Neuropathol* 2005, 109: 217-225
- 50 Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM: Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1988, 52: 503-513

3.8 Figures, Tables, and Legends

	SOL				EDL				DIA			
	C57BL/10J		MDX		C57BL/10J		MDX		C57BL/10J		MDX	
	PBS	OPG	PBS	OPG	PBS	OPG	PBS	OPG	PBS	OPG	PBS	OPG
TpT (ms)	47.5 ± 5.5	46.8 ± 4.5	46.5 ± 6.2	36.8 ± 2.6	25.5 ± 2.0	24.2 ± 2.1	18.5 ± 0.5	32.7 ± 5.1	42.9 ± 4.6	44.8 ± 5.3	43.4 ± 0.8	41.6 ± 2.6
½ RT (ms)	42.5 ± 2.6	42.2 ± 5.2	34.2 ± 5.1	37.8 ± 2.8	19.2 ± 1.6	17.7 ± 1.9	21.3 ± 1.3	19.8 ± 1.2	28.5 ± 3.1	35.4 ± 4.6	24.6 ± 4.1	21.2 ± 2.14
Pt (g)	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.2 ± 0.2	2.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.2 ± 0.5	2.2* ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.6 ± 0.5	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.4
P0 (g)	14.1 ± 1.5	12.3 ± 0.6	4.9 ± 1.2	7.6* ± 0.9	17.9 ± 0.9	18.8 ± 1.8	5.3 ± 1.3	9.9** ± 0.8	18.5 ± 1.4	18.9 ± 0.9	6.8 ± 1.7	10.3* ± 1.1
Muscle weight (mg)	4.9 ± 0.3	4.1 ± 0.3	3.9 ± 0.2	4.6 ± 0.9	5.2 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.4	4.9 ± 0.3	14.5 ± 2.01	13.8 ± 0.8	16.1 ± 2.1	13.6 ± 1.1
Body weight (g)	14.8 ± 1.9	13.4 ± 1.2	13.2 ± 2.1	12.9 ± 1.3	14.8 ± 1.9	13.4 ± 1.2	13.2 ± 2.1	12.9 ± 1.3	14.8 ± 1.9	13.4 ± 1.2	13.2 ± 2.1	12.9 ± 1.3
Muscle/body (%)	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.10	0.10	0.12	0.11

Tableau 3-1: Contractile and physical properties of Sol, EDL and DIA muscles from C57BL/10j and mdx mice treated with PBS or OPG-Fc.

SOL, EDL and DIA muscles were incubated ex vivo and electrically stimulated (10, 20, 50, 100, 120 Hz at 35V) to measure time to peak tension (TPT), half-relaxation time (1/2RT) maximal twitch tension (Pt) and absolute force (P0). Muscle weight (mg) and body weight (g) were determined thereafter. Data are presented as mean +/- sem, n=6. Significantly different from respective mdx PBS-injected muscle, * p<0.05, ** p<0.01 (ANOVA with post-hoc Tukey test).

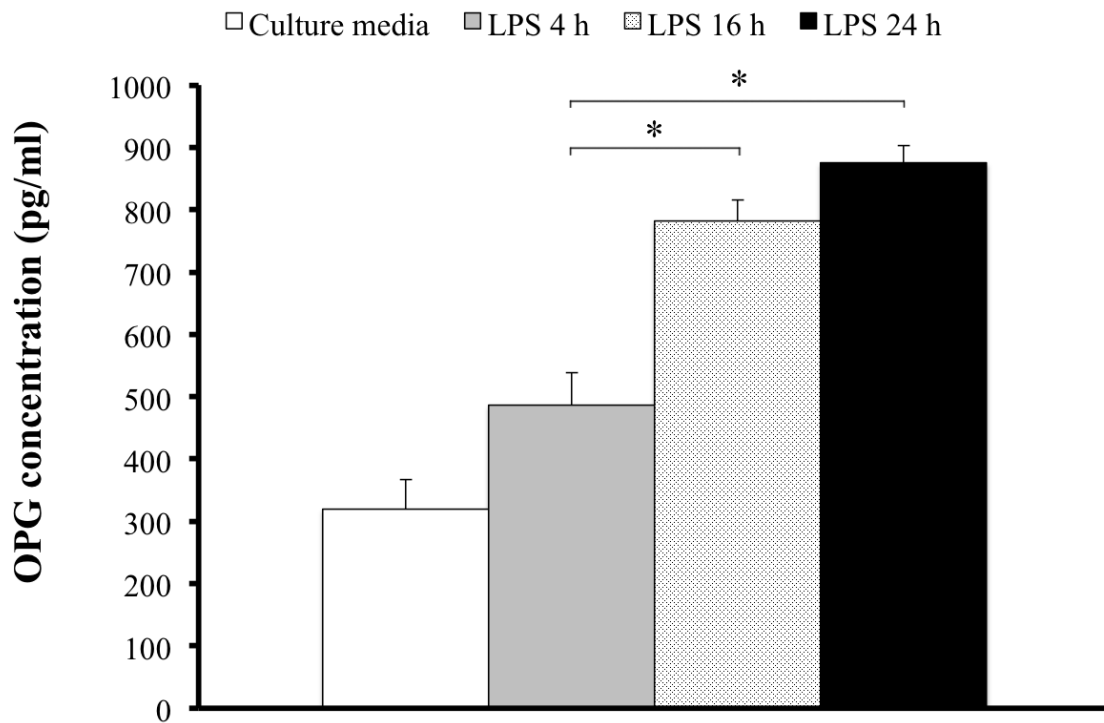


Figure 3-1: LPS-stimulated myotubes produce OPG.

The concentration of soluble OPG secreted by LPS-stimulated myotubes [1 mg/ml] was measured by ELISA. A 3-fold increase of OPG concentration in the supernatant is observed 24h after LPS stimulation. Data are shown as mean \pm s.e.m., one-way ANOVA and Tukey's post-hoc tests * $p < 0.05$.

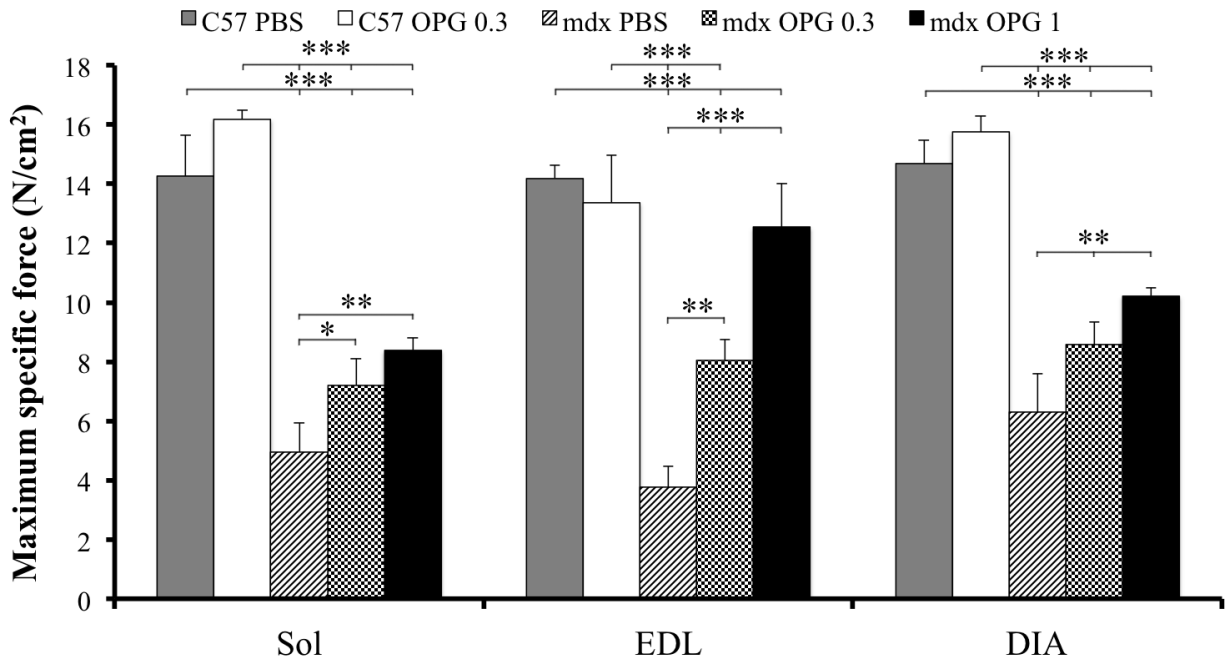


Figure 3-2: OPG-Fc treatment mitigates loss of force in dystrophic muscles.

Maximal specific force of SOL, EDL and DIA muscles from 5-week old *C57BL/10j* or *mdx* mice treated from day 25 to 35 with vehicle or OPG-Fc i.p. [0.3 or 1 mg/kg/d] (n=6 per group). OPG-Fc treatment rescues muscle force in a dose-dependent manner, especially in fast-twitch EDL muscle. Uninjured muscles from *C57BL6/10j* mice were used as controls. Data are presented as mean +/- sem, n=6 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (ANOVA with post-hoc Tukey test).

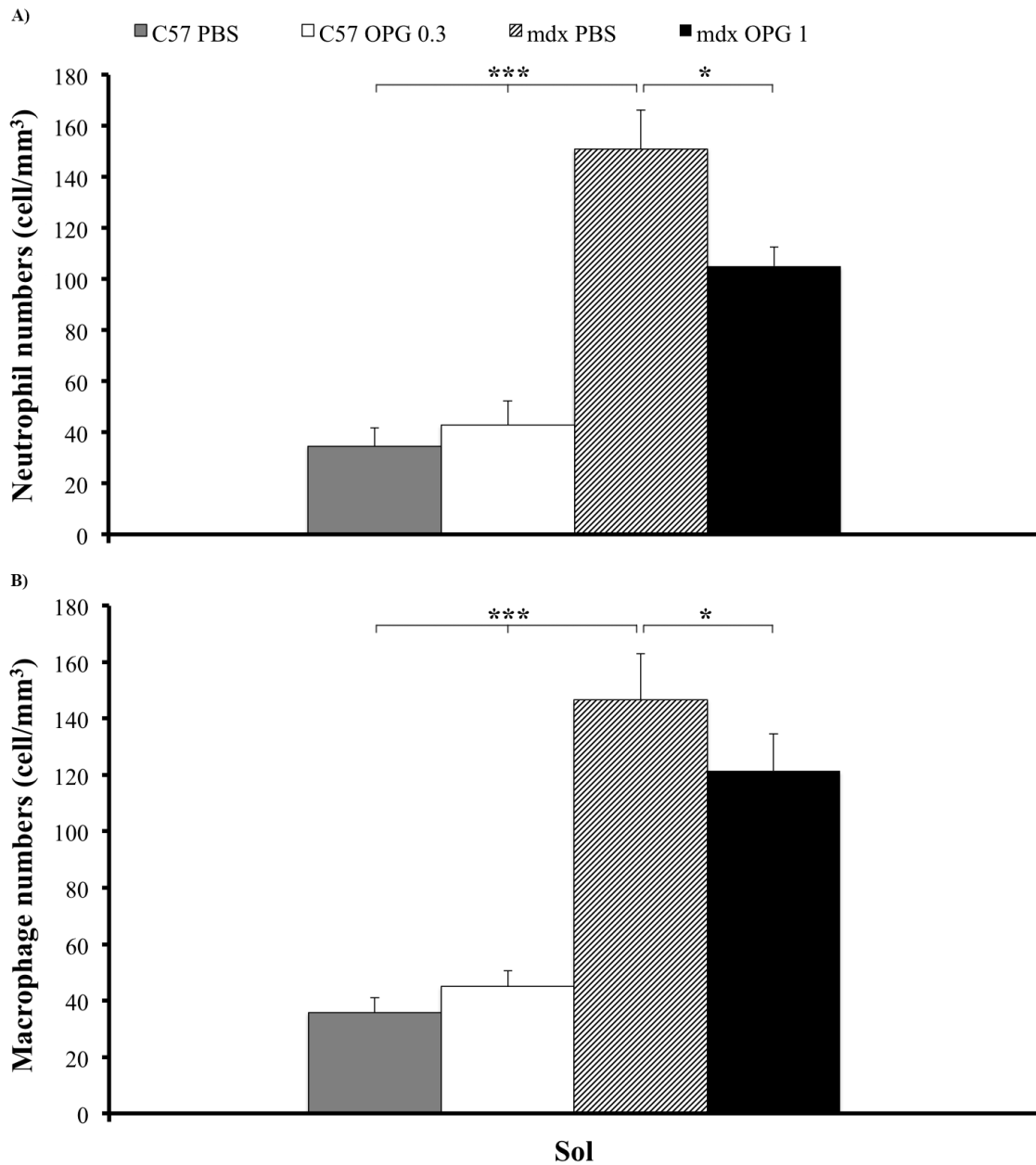


Figure 3-3: Inflammatory cells in SOL muscle from mdx OPG-treated mice.

Immunohistochemistry staining revealed that OPG-Fc [1 mg/kg/d] reduced the numbers of (A) neutrophils (anti-Ly6C/Ly6G) and (B) macrophages (anti-F4/80) in mdx SOL muscles. Healthy muscles from C57BL6/10j mice are shown as controls. Data are presented as mean \pm sem, n=6 *p<0.05 (ANOVA with post-hoc Tukey test).

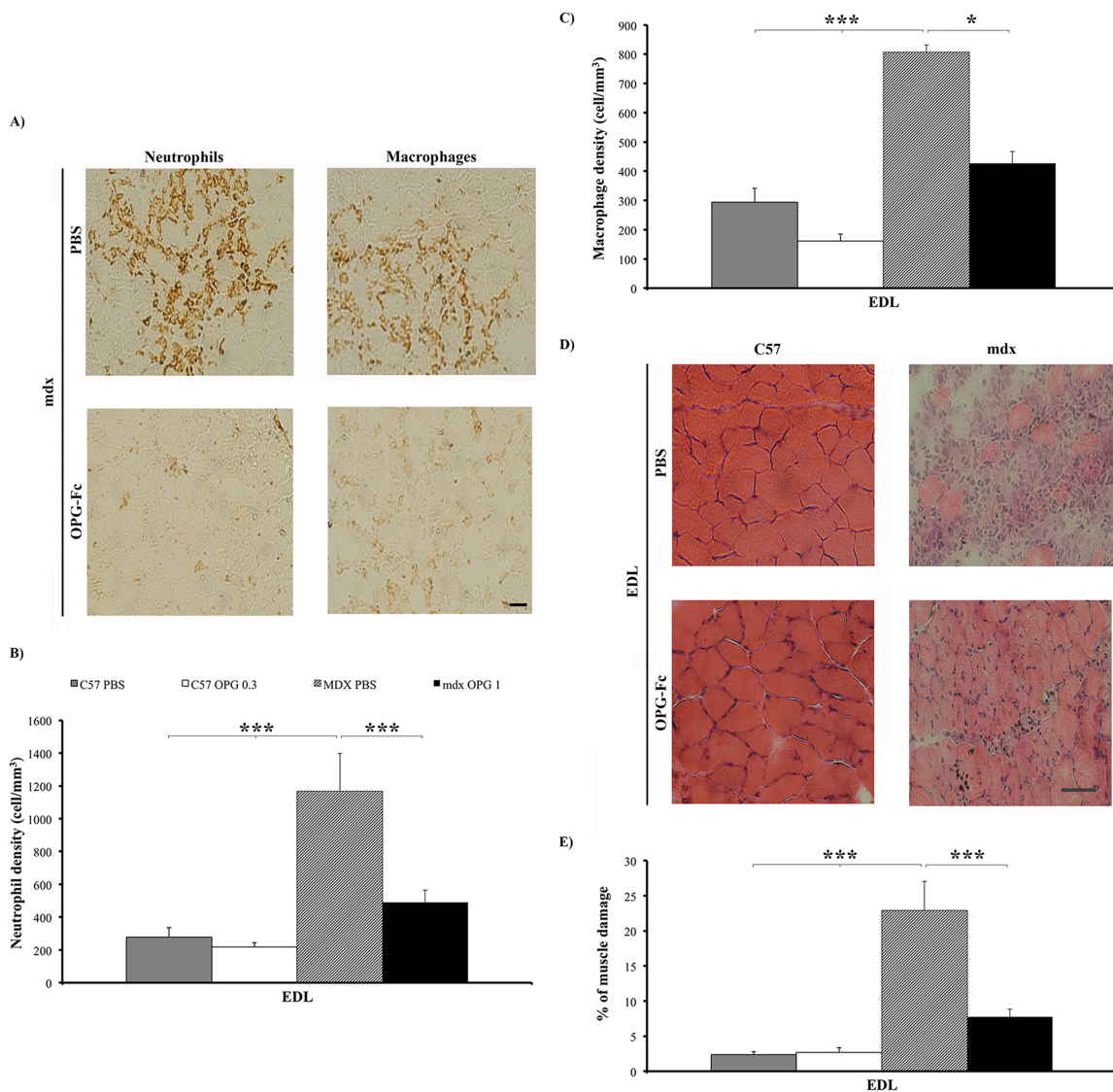


Figure 3-4: OPG-Fc treatment greatly improves muscle integrity and reduces muscle inflammation.

Immunohistochemistry analyses (a) showed that the numbers of neutrophils (anti-Ly6C/Ly6G) (b) and macrophages (anti-F4/80) (c) are significantly reduced in EDL muscles. Representative H&E staining (d) and quantification of muscle damage by ImageJ (e) demonstrated that OPG-Fc [1 mg/kg/d] greatly reduced cell infiltration and muscle damage. Healthy muscles from *C57BL6/10j* mice are shown as controls. Data are presented as mean +/- sem, n=6 *p<0.05, ***p<0.001 (ANOVA with post-hoc Tukey test).

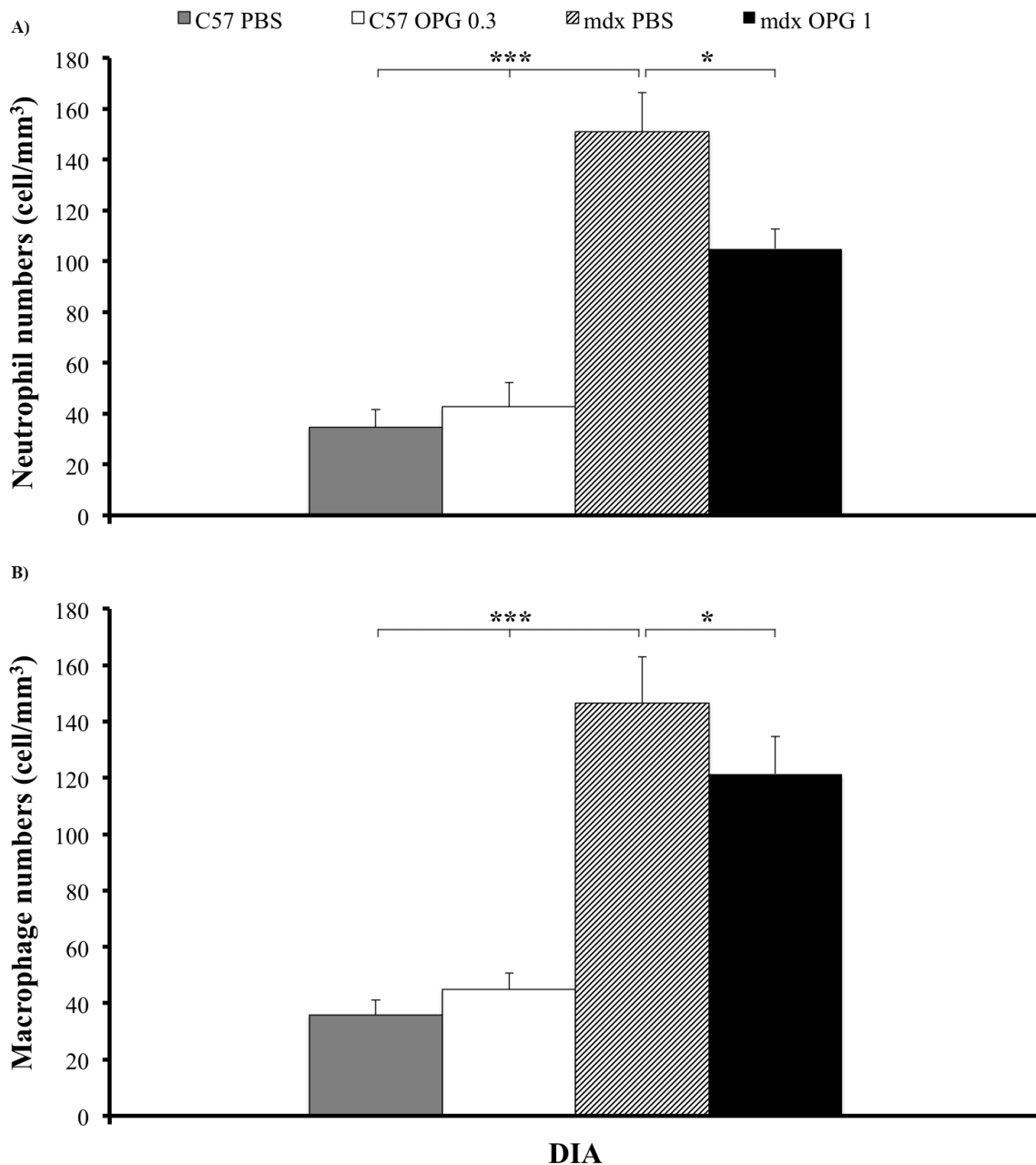


Figure 3-5: Inflammatory cells in DIA muscle from mdx OPG-treated mice.

Immunohistochemistry staining revealed that OPG-Fc [1 mg/kg/d] decreased the numbers of (A) neutrophils (anti-Ly6C/Ly6G) and (B) macrophages (anti-F4/80) in mdx DIA muscles. Healthy muscles from C57BL6/10j mice are shown as controls. Data are presented as mean +/- sem, n=6 *p<0.05 (ANOVA with post-hoc Tukey test).

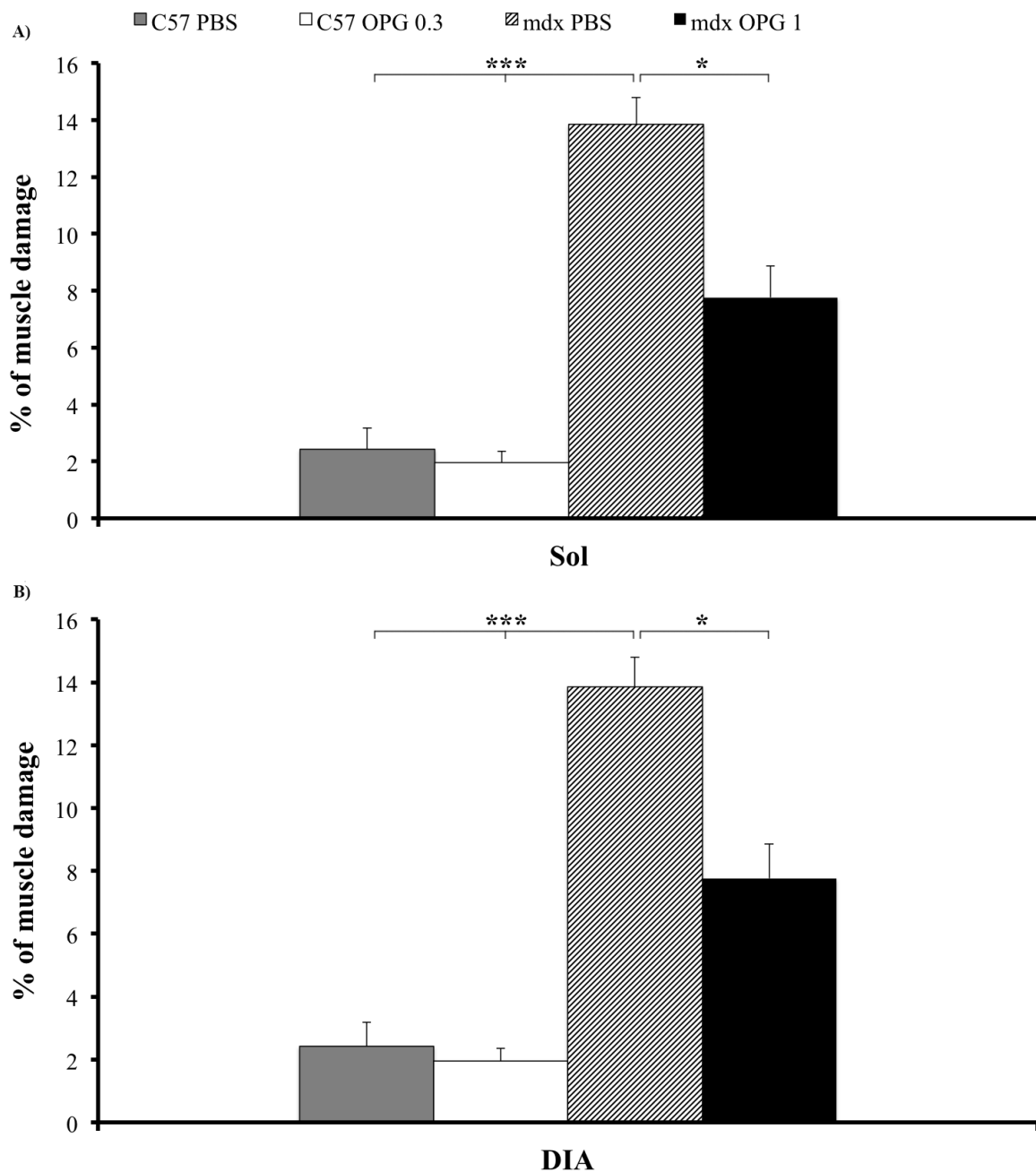


Figure 3-6: Muscle damage in SOL and DIA muscles from mdx OPG-treated mice.

H&E staining quantification showed that OPG-Fc [1 mg/kg/d] protects mdx mice SOL (A) and DIA (B) muscles against damage. Healthy muscles from C57BL6/10j mice are shown as controls. Data are presented as mean +/- sem, n=6 *p<0.05 (ANOVA with post-hoc Tukey test).

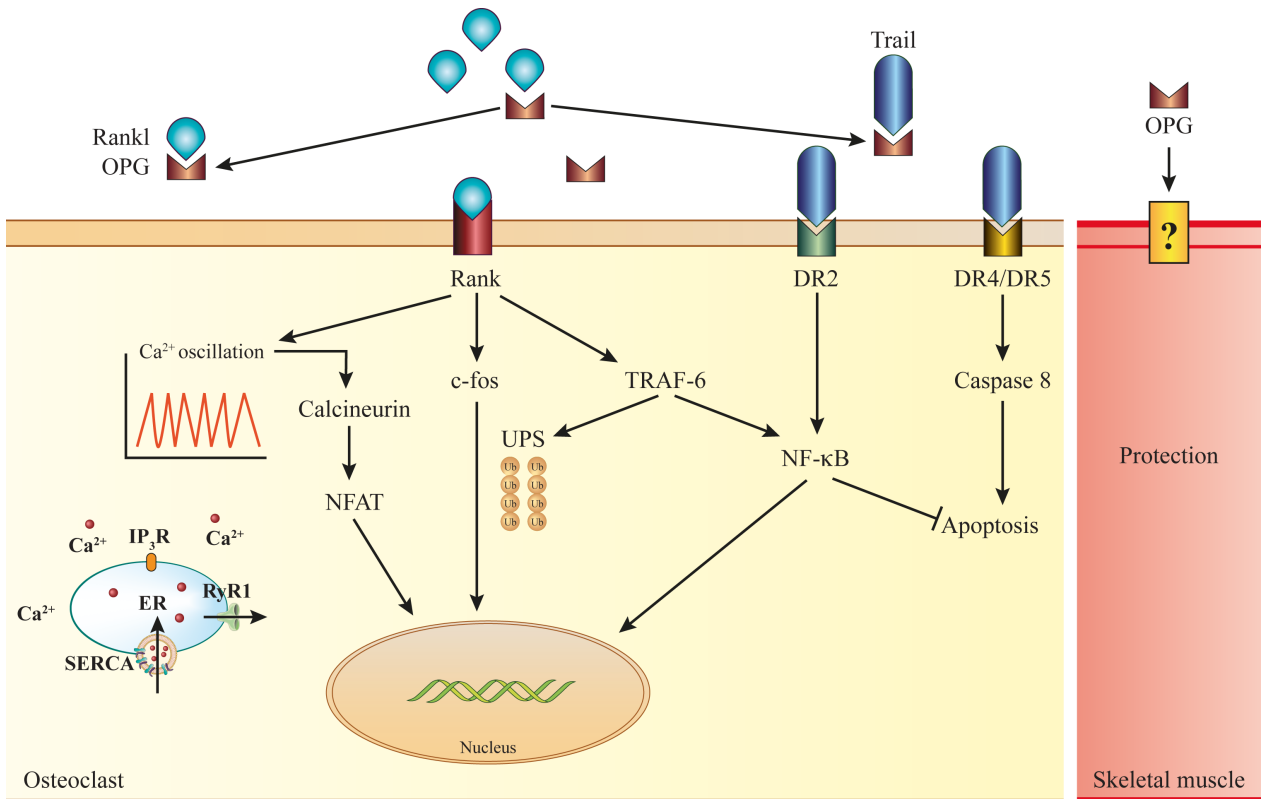


Figure 3-7: Schematic representation of RANK/RANKL/OPG pathway.

In osteoclasts, RANK/RANKL interaction can activate different intracellular pathways, including TRAF6/NF-κB and Ca²⁺-calcineurin pathways. OPG is a soluble decoy receptor for RANKL and TRAIL, preventing osteoclastogenesis and/or cell apoptosis. Muscle cells can secrete OPG, and OPG-Fc treatment greatly improves muscle function and highlights the importance of cross-talk between muscle skeletal and bone and opens new avenues of treatment for several forms of neuromuscular and muscular diseases.

Chapitre 4 : L'ostéoprotégérine et les β_2 -agonistes atténuent les impacts de la dystrophie musculaire des fibres rapides et lentes chez le muscle squelettique murin

Osteoprotegerin and β_2 -agonists mitigate muscular dystrophy in slow- and fast-twitch skeletal muscles

Sébastien S. Dufresne¹, Antoine Boulanger-Piette¹, and Jérôme Frenette^{1,2}

Affiliations

¹ Centre Hospitalier Universitaire de Québec–Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUQ-CRCHUL), Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

² Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

Published in : Am J Pathol 2016,

Résumé

Nos travaux ultérieurs ont démontré que des injections quotidiennes d'ostéoprotégérine (OPG) restaurent complètement la fonction du muscle rapide *extensor digitorum longus* (EDL) chez la souris dystrophique mdx, un modèle de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Cependant, en dépit des améliorations marquées, l'OPG n'a pas été aussi efficace pour prévenir la perte de la fonction des muscles lents soléaire et diaphragme. Puisque que les β_2 -agonistes sont connus pour augmenter la force des muscles lents et rapides, mais que leur utilisation est limitée par leurs effets néfastes sur les tissus osseux et cardiaque, nous avons testé l'hypothèse que l'OPG, un protecteur de l'os et du muscle squelettique, puisse agir en synergie avec les β_2 -agonistes et potentialiser leurs effets positifs sur les muscles dystrophiques. Nous avons observé que l'expression des récepteurs β_2 -adrénergiques, qui sont principalement exprimés dans le muscle squelettique, est significativement réduite dans les muscles mdx mais restaurée par l'injection de l'OPG. Plus important encore, l'OPG associée à une faible dose de formotérol, une nouvelle génération de β_2 -agonistes, protège histologiquement et fonctionnellement à la fois les muscles dystrophiques rapides et lents. Cette combinaison de médicaments, qui sont déjà individuellement approuvés pour l'usage humaine, ouvre de nouveaux espoirs thérapeutiques contre la DMD et éventuellement d'autres maladies neuromusculaires.

Abstract

Our recent work showed that daily injections of osteoprotegerin (OPG) completely restore the function of fast-twitch extensor digitorum longus muscles in dystrophic mdx mice, a mouse model of Duchenne muscular dystrophy (DMD). However, despite marked improvements, OPG was not as effective in preventing the loss of function of slow-twitch soleus and diaphragm muscles. Since β_2 -agonists enhance the function of slow- and fast-twitch dystrophic muscles and since their use is limited by their adverse effects on bone and heart tissues, we hypothesised that OPG, a bone and skeletal muscle protector, acts synergistically with β_2 -agonists and potentiates their positive effects on skeletal muscles. We observed that the content of β_2 -adrenergic receptors, which are mainly expressed in skeletal muscle, is significantly reduced in dystrophic muscles but is rescued by the injection of OPG. Most importantly, OPG combined with a low dose of formoterol, a new generation of β_2 -agonists, histologically and functionally rescued slow-twitch dystrophic muscles. This combination of therapeutic drugs, which have already tested and approved for human use, may open up new therapeutic avenues for DMD and possibly other neuromuscular diseases.

4.1 Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal severe genetic muscle disease caused by a mutation in the gene encoding dystrophin resulting in a complete absence of this protein¹. Dystrophin is a cytoplasmic protein that connects the cytoskeleton of a muscle fiber to the surrounding extracellular matrix through the cell membrane. Many muscle proteins such as dystroglycan, sarcoglycan, vinculin, and talin colocalize with dystrophin at the costamere and myotendinous junction^{2,3}. The absence of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy (DMD) weakens the dystroglycan complex, increasing the susceptibility of muscle fibers to contraction-induced injuries⁴.

The sympathetic nervous system is a major regulator of muscle mass mediated by β -adrenoceptors (ARs)⁵. β_2 -ARs are predominantly expressed in airways and skeletal muscle. Chronic injections of β_2 -selective agonist induce skeletal muscle hypertrophy through cyclic AMP (cAMP) and PI3K/AKT/mTOR pathway⁶. New generation of β_2 -agonists such as formoterol have a significant anabolic effect at micromolar doses⁷ and protect against contraction-induced muscle damage in mdx dystrophic mice⁸. However, chronic treatments for months with β_2 -agonists is associated with some undesirable side-effects, including increased heart rate and heart hypertrophy⁹. Moreover, β_2 -agonists can also activate the receptor-activator of nuclear factor κ B (RANK), the receptor-activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), a key promoter of osteoclastogenesis and bone remodelling¹⁰. The third protagonist, OPG, binds to RANKL exerting an inhibitory effect on the pre-osteoclastic differentiation process¹¹. Thus, the potential side-effects on heart and bone limit the use of β_2 -agonists for the treatment of DMD¹².

Our laboratory have previously demonstrated that OPG treatment mitigates and restores function of fast-twitch muscular dystrophy in young mdx mice¹³. Because β_2 -agonists, as opposed to OPG, are very effective to enhance or prevent the loss of function of slow-twitch muscles, we tested whether a combined treatment of OPG with very low dose of formoterol [10 μ g/kg/d i.p.] would be superior to OPG and β_2 -agonist alone. We show that

OPG and very low dose of formoterol act synergistically on slow-twitch soleus (Sol), but not on fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) of mdx mice. We also showed that the β_2 -AR content of dystrophic Sol and EDL muscles was significantly lower than that of control muscles and that OPG-Fc rescued the β_2 -AR content of dystrophic Sol and EDL muscles. The combination of these two drugs provides a new and potentially effective treatment for rescuing the functions of slow- and fast-twitch dystrophic muscles and may counteract the negative effects of β_2 -agonists on bone.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Animals

Male wild-type (WT) (C57BL/10ScSnJ) and mdx dystrophic (C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J) mice bred in our animal facility weighing 14–15 g were used for this protocol. Food and water were provided ad libitum. Mice were injected i.p. with OPG [1 mg/kg/d] (R&D Systems, Minneapolis, MN) or formoterol [10 or 100 µg/kg/d, β_2 -agonist] (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) alone or in combination for 10 days starting at 25 days of age. Changes in body weight and fluid consumption were adjusted to maintain the effective dose. Mice injected with equal volumes of phosphate-buffered saline (PBS) were used as control. At the end of the different experimental procedures, mice were euthanized by cervical dislocation under anesthesia. All of the procedures were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee based on the Canadian Council on Animal Care guidelines.

4.2.2 Isometric Contractile Properties

Mice received buprenorphine as an analgesic (0.1 mg/kg) at least 15 min before being anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg). The right Sol and EDL were dissected and incubated in a buffered physiological salt solution (Krebs-Ringer) as previously described by Dufresne et al (2016)¹⁴. The maximum tetanic tension (P_0 , g) values were obtained using a 305B-LR dual-mode lever arm system controlled by dynamic muscle control and data acquisition software (Aurora Scientific, Aurora, ON, Canada) and the maximum specific tetanic tension (sP_0 , N/cm²) were obtained by dividing the wet weight by the optimal muscle length multiplied by the muscle density (1.06 g/cm³) multiplied by the fiber-to-muscle length ratio. At the end of the contractile property measurements, the tendons were removed, and the muscles were weighed, embedded in tissue freezing medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC), frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until used for the immunohistochemical and immunofluorescence assays.

4.2.3 Immunohistochemical and Immunofluorescence analyses

Transversal sections (10 µm thick) of Sol and EDL were immunolabelled for 2 h at room temperature with anti-pan-macrophage F4/80 (1:100; Serotec, UK) or anti-neutrophil Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) antibodies (1:300; BD Pharmingen, USA) to identify macrophages and neutrophils, respectively. Positive cells were counted at 400 magnification, and the total areas of the sections were determined and multiplied by the thicknesses to express the number of each cell type per cubic millimeter. The concentrations of inflammatory cells were measured in duplicate in two different sections of muscles. Fiber typing and areas occupied by type I, IIA, IIX, IIB fibers were determined as described by Schiaffino et al¹⁵. Briefly, muscle sections were incubated with the following antibodies: anti-MyHC I (Novus Biological), anti-MyHC IIA (SC-71, Developmental studies hybridoma bank (DSHB)), anti-MyHC IIX (6H1, DSHB) anti-MyHC IIB (BF-F3, DSHB) and Alexa Fluor® secondary antibodies (Invitrogen). The myofiber cross-sectional area (CSA) of each fiber type were analyzed with ImageJ version 1.41 software (National Institutes of Health, USA).

4.2.4 Hematoxylin/eosin Staining and Serum Creatine Kinase Assays

Hematoxylin and eosin staining (Sigma-Aldrich, USA) was used to visualize the number of centrally nucleated fibers, muscle integrity and quantify the extent of muscle damage on approximately 100 myofibers per muscle. Damaged area was defined as an area not occupied by normal or regenerating muscle fibers. Sections were examined with an inverted microscope (Nikon, Canada) and analyzed with ImageJ version 1.41 software (National Institutes of Health, USA).

Blood collection was carried out by cardiac puncture and samples centrifuged at 10000g at 4°C for 10 min. The serum creatine kinase (CK) activity was determined according to the manufacturer's instructions (Biovision, CA, USA). The activity was expressed as U/l and used to detect indirectly muscle damage due to muscle disorders.

4.2.4 Western Blots

For Western blotting, Sol and EDL muscles from mice treated for 10 days with OPG [1 mg/kg/d] or formoterol [10 or 100 µg/kg/d] alone or in combination were homogenized in lysis buffer, separated on 9% SDS-polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The protein bands were immunoblotted with an anti-β₂-AR primary antibody overnight at 4°C (1:500; Santa Cruz Biotechnology, USA) followed by an HRP-conjugated secondary antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Bands were revealed using the ECL-Plus chemiluminescent detection system (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Images of the membranes were acquired, scanned, and analyzed using Quantity One software (v4.6.6, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). GAPDH (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used as a loading control. Images of the membranes were acquired, scanned, and analysed using Quantity One software (v4.6.6, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

4.2.5 Statistical Analysis

The data were analyzed by two-way ANOVA to determine whether the variations among the experimental groups were significant (InStat software, version 3). When a significant *F* ratio was obtained, a posteriori test was performed (Tukey's protected least-significant differences test). The level of significance was set at $P < 0.05$.

4.3 Results

4.3.1 Osteoprotegerin Rescues the Expression of the β_2 -Adrenergic Receptor

The β_2 -AR content was significantly reduced respectively by 17% and 28% in dystrophic Sol and EDL muscles compared with WT muscles. OPG treatment completely rescued β_2 -AR expression in both dystrophic muscles while the low and high doses of formoterol treatment had no significant impact on β_2 -adrenergic receptor content in dystrophic muscles (Fig 4-1).

4.3.2 Osteoprotegerin Acts Synergistically with Formoterol to Enhance Dystrophic Slow-twitch Muscle Function

We next investigated the effect of OPG-Fc and/or low or high doses of formoterol on the contractile properties of dystrophic Sol and EDL muscles (Fig. 4-2). A high dose of formoterol [100 $\mu\text{g}/\text{kg}$] increased the maximum specific force of dystrophic Sol and EDL muscles by 100% and 65%, respectively, while a low dose [10 $\mu\text{g}/\text{kg}$] had no significant effect. OPG-Fc [1 mg/kg] was significantly superior to any dose of formoterol, increasing the maximum specific force of dystrophic EDL muscles by 120%. However, the effect of OPG-Fc alone on the function of dystrophic Sol muscles was similar to that of the high dose of formoterol [100 $\mu\text{g}/\text{kg}$] (81% gain in force). More importantly, the combination of a very low dose of formoterol [10 $\mu\text{g}/\text{kg}$] + OPG-Fc [1 mg/kg] had a synergistic effect that was significantly superior to OPG-Fc alone in restoring the function of dystrophic Sol muscles (Fig. 4-2). Interestingly, the effect of a high dose of formoterol + OPG-Fc was similar to that of a low dose of formoterol + OPG-Fc on force production by dystrophic Sol muscles. On the other hand, the effect of OPG-Fc alone on dystrophic EDL muscles was significantly superior to any dose of formoterol while the combination of the two drugs did not provide any additional benefit for dystrophic EDL muscles. Like specific force, the maximum absolute isometric tetanic force (P_0) showed similar differences between groups for Sol and EDL muscles (Supplemental Table 4-1). However, OPG-Fc and/or low or high

doses of formoterol had no significant impact on time-to-peak twitch tension, half-relaxation time, muscle mass and body weight (Supplemental Table 4-1).

4.3.3 Osteoprotegerin is as Effective as Formoterol in Reducing Muscle Damage and Inflammation

The dystrophic features (centrally nucleated myofibers, necrotic myofibers and serum CK) were considerably reduced in dystrophic mice treated with OPG [1 mg/kg] or high dose of formoterol or OPG and low dose of formoterol (Fig. 4-3A-B-C-D-E). However, treatments had no impact on myofiber size and phenotype in Sol and EDL muscles (Supplementary Tables 4-2 & 4-3). Since chronic inflammation is a major problem in muscular dystrophy and contributes significantly to disease progression in DMD, we next compared the efficacy of OPG, formoterol and both combined in reducing neutrophil and macrophage infiltration. Consistent with the extent of muscle damage and CK activity, the number of neutrophils and macrophages were significantly reduced in dystrophic muscles from mice treated with OPG or high dose of formoterol or OPG combined with low dose of formoterol compared with PBS treated mdx mice (Fig. 4-3F-G). The low dose of formoterol had no significant impact on the extent of muscle damage area and the number of invaded inflammatory cell. (Fig. 4-3B). In terms of muscle damage and inflammation, the combined treatment of OPG with low dose of formoterol was not superior to OPG or high dose of formoterol treatment alone.

4.4 Discussion

The RANK/RANKL/OPG pathway and the β -adrenergic system communicate and synchronously regulate bone homeostasis¹⁰. RANKL/RANK interactions and adrenergic stimulation also control Ca^{2+} content and mobilization as well as SERCA [sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, an ATP-dependent Ca^{2+} pump] activity in skeletal muscles^{16,17}. The loss of Ca^{2+} homeostasis leads to muscle degeneration, inflammation, and fibrosis, a signature of muscular dystrophy¹⁸. The present study provides compelling evidence that the combination of a low dose of formoterol + OPG-Fc is sufficient to rescue the function of slow- and fast-twitch dystrophic skeletal muscles during the first peak of muscle degeneration at 3-5 weeks of age in mdx mice.

Previous studies have shown that 1000 mg/kg/d of clenbuterol¹⁹ or 25-100 mg/kg/d of formoterol²⁰, given for 4 weeks, is required to induce muscle hypertrophy and protect against muscular dystrophy. Mechanistically, β_2 -agonists activate, amongst others, protein kinase A (PKA) which phosphorylates phospholamban (PLN) on serine 16 and activates SERCA (β_2 -agonists-PKA-SERCA pathway). Interestingly, our findings showed that very low doses of OPG-Fc potentiate the positive effects of formoterol on slow-twitch Sol muscles in young mdx mice. The synergistic effects of formoterol and OPG-Fc were particularly significant in Sol muscles in which OPG-Fc or formoterol alone had limited effects. However, the possible crosstalk between OPG-Fc and formoterol in skeletal muscles is poorly understood. Given that OPG-Fc increased the density of β_2 -AR and thus the number of potential binding sites for formoterol, it is possible that OPG may strengthen the downstream effect of β_2 -agonists on PI3K/AKT/mTOR signalling and/or the cAMP dependent pathway by promoting protein synthesis and SERCA activity (Fig. 4-4). However, that fact that OPG-Fc alone was largely superior to any dose of formoterol in rescuing fast-twitch dystrophic EDL muscles suggests that the inhibition of RANKL/RANK interactions by OPG is very important in preventing subsequent NF- κ B activation and the progression of muscular dystrophy²¹ (Fig. 4-4). OPG-Fc reduced the number of neutrophils and macrophages in dystrophic muscles but had no effect on muscle

force production by healthy mice, suggesting that a pathological state is required for OPG to be effective. While the mechanism by which OPG and formoterol work in synchrony requires further investigation, our findings provide the first evidence that much less formoterol is required to obtain the same beneficial effect in skeletal muscles, with potentially no or fewer adverse effects on heart and bone functions.

4.5 Perspective and conclusion

The present study convincingly shows that a very low dose of formoterol combined with OPG-Fc acts synergistically and mitigates muscular dystrophy. The effects of prolonged OPG-Fc and β_2 -agonist treatments should be investigated in a more severe mouse model of muscular dystrophy. Since osteoporosis and muscle atrophy/degeneration worsen in tandem during neuromuscular diseases and since OPG has a positive beneficial effect on skeletal muscle and bone functions, we have high hopes that this combined treatment may open the way for new treatments for DMD patients.

4.6 Disclosures section

SSD and JF conceived the project and its design; SSD performed experiments and data analysis; SSD, ABP and JF wrote the manuscript; and all authors checked for scientific content and approved the final manuscript. JF was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

4.7 References

1. Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, Hoffman EP, Villalta SA, Rao VA, Wakefield LM, Woodcock J: Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 2015, 7:299rv4.
2. Kukkurainen S, Määttä JA, Saeger J, Valjakka J, Vogel V, Hytönen VP: The talin-integrin interface under mechanical stress. *Mol Biosyst* 2014, 10:3217–3228.
3. Law DJ, Allen DL, Tidball JG: Talin, vinculin and DRP (utrophin) concentrations are increased at mdx myotendinous junctions following onset of necrosis. *J Cell Sci* 1994, 107 (Pt 6):1477–1483.
4. Call JA, Warren GL, Verma M, Lowe DA: Acute failure of action potential conduction in mdx muscle reveals new mechanism of contraction-induced force loss. *J Physiol* 2013, 591:3765–3776.
5. Michel MC, Seifert R: Selectivity of pharmacological tools: implications for use in cell physiology. A review in the theme: Cell signaling: proteins, pathways and mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2015, 308:C505–C520.
6. Berdeaux R, Stewart R: cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *AJP Endocrinol Metab* 2012, 303:E1–E17.
7. Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS: Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue. *Neuromuscul Disord* 2007, 17:47–55.
8. Gehrig SM, Koopman R, Naim T, Tjoakarfa C, Lynch GS: Making fast-twitch dystrophic muscles bigger protects them from contraction injury and attenuates the dystrophic pathology. *Am J Pathol* 2010, 176:29–33.

9. Cates CJ, Jaeschke R, Schmidt S, Ferrer M: Regular treatment with formoterol and inhaled steroids for chronic asthma: serious adverse events. *Cochrane Database Syst Rev* 2013, 6:CD006924.
10. Huang HH, Brennan TC, Muir MM, Mason RS: Functional α 1- and β 2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *J Cell Physiol* 2009, 220:267–275.
11. Bonnet N, Pierroz DD, Ferrari SL: Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008, 8:94–104.
12. Pierroz DD, Bonnet N, Bianchi EN, Bouxsein ML, Baldock PA, Rizzoli R, Ferrari SL: Deletion of β -adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2012, 27:1252–1262.
13. Dufresne SS, Dumont NA, Bouchard P, Lavergne É, Penninger JM, Frenette J: Osteoprotegerin Protects against Muscular Dystrophy. *Am J Pathol* 2015, 185:920–926.
14. Dufresne SS, Dumont NA, Boulanger-Piette A, Fajardo VA, Gamu D, Kake-Guena SA, David RO, Bouchard P, Lavergne É, Penninger JM, Pape PC, Tupling AR, Frenette J: Muscle RANK is a key regulator of calcium storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016, :ajpcell.00285.2015.
15. Yang Y-M, Kim MS, Son A, Hong JH, Kim K-H, Seo JT, Lee S-I, Shin DM: Alteration of RANKL-Induced Osteoclastogenesis in Primary Cultured Osteoclasts From SERCA2^{+/-} Mice. *J Bone Miner Res* 2009, 24:1763–1769.
16. Briston SJ, Dibb KM, Solaro RJ, Eisner DA, Trafford AW: Balanced changes in Ca buffering by SERCA and troponin contribute to Ca handling during β -adrenergic stimulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2014, 104:347–354.

17. Gehrig SM, van der Poel C, Sayer TA, Schertzer JD, Henstridge DC, Church JE, Lamou S, Russell AP, Davies KE, Febbraio MA, Lynch GS: Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* 2012, 484:394–398.
18. Lynch GS, Hinkle RT, Faulkner JA: Power output of fast and slow skeletal muscles of mdx (dystrophic) and control mice after clenbuterol treatment. *Exp Physiol* 2000, 85:295–299.
19. Ryall JG, Schertzer JD, Murphy KT, Allen AM, Lynch GS: Chronic 2-adrenoceptor stimulation impairs cardiac relaxation via reduced SR Ca²⁺-ATPase protein and activity. *AJP Heart Circ Physiol* 2008, 294:H2587–H2595.
20. Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PML, Carathers M, Li Z-W, Beg AA, Ghosh S, Sahenk Z, Weinstein M, Gardner KL, Rafael-Fortney JA, Karin M, Tidball JG, Baldwin AS, Guttridge DC: Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest* 2007, 117:889–901.

4.8 Figures and legends

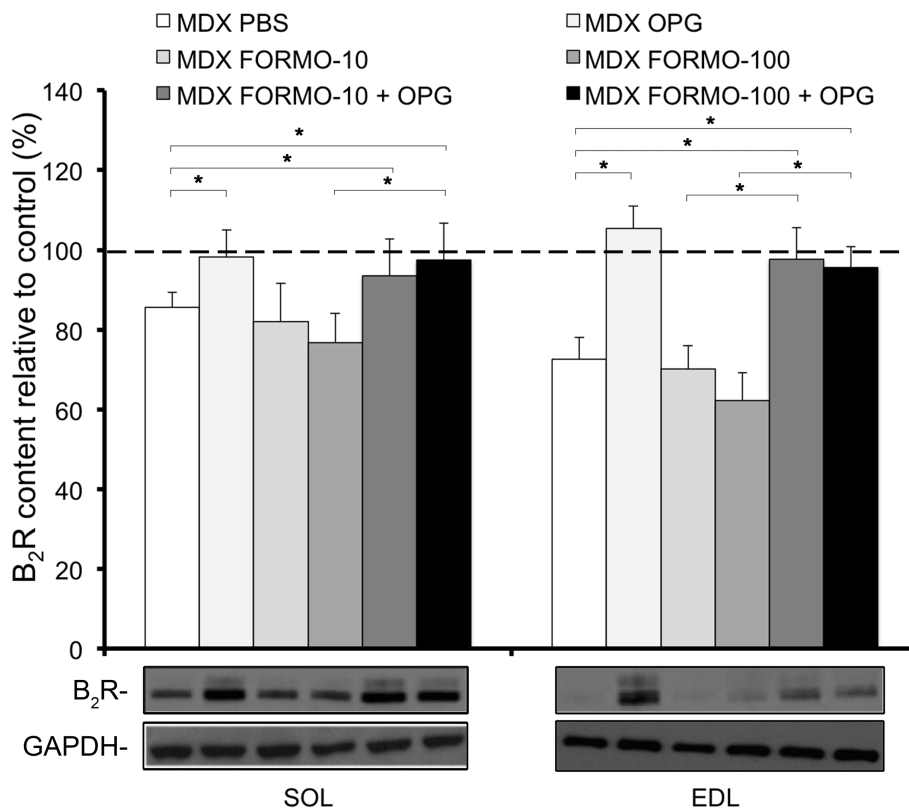


Figure 4-1: Osteoprotegerin restores the β_2 -adrenoceptor content of dystrophic Sol and EDL muscles.

Wild-type control or mdx mice were injected with PBS or OPG and/or formoterol for 10 days and included the following six groups: (1) mdx PBS-injected mice (mdx PBS), (2-3) mdx formoterol-injected mice at two different concentrations [10 or 100 ug/kg] (mdx FORMO-10; mdx FORMO-100), (4) mdx OPG-injected mice at concentration of [1 mg/kg], or (5-6) mdx injected with a combination of OPG and two different doses of formoterol (mdx FORMO-10 + OPG; mdx FORMO-100 + OPG). Data are expressed as percentage-increase or decrease relative to wild-type PBS-injected mice. Dystrophic muscles have a 17-28% reduction of the β_2 -adrenoceptor content, while OPG, but not formoterol, rescues completely its expression. All data are expressed as means \pm SE; n = 10 independent experiments per group. The dotted line is the visual representation of wild-type data; * p<0.05.

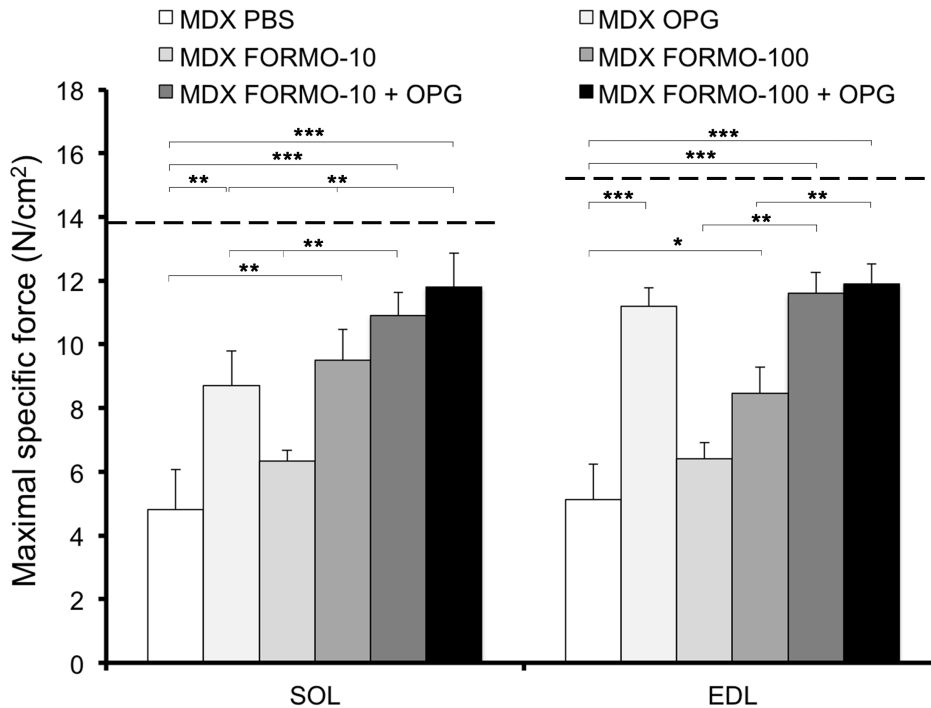


Figure 4-2: Formoterol and osteoprotegerin act synergistically in slow-twitch Sol muscles but not in fast-twitch EDL muscles.

Mdx mice were injected with PBS or OPG and/or formoterol for 10 days and included the same six groups defined in figure 1: (1) mdx PBS-injected mice (mdx PBS), (2-3) mdx formoterol-injected mice at two different concentrations [10 or 100 ug/kg] (mdx FORMO-10; mdx FORMO-100), (4) mdx OPG-injected mice at concentration of [1 mg/kg], or (5-6) mdx injected with a combination of OPG and two different doses of formoterol (mdx FORMO-10 + OPG; mdx FORMO-100 + OPG). Maximum specific force decreased in dystrophic Sol muscles and formoterol [100 ug/kg] or OPG [1mg/kg] significant increased the force production of dystrophic Sol muscles. The combination of formoterol and OPG act synergistically and the force production of dystrophic Sol muscle was superior to formoterol or OPG alone. The lower or higher doses of formoterol combined with OPG were not different. Maximum specific force also decreased in dystrophic EDL muscles but formoterol [100 ug/kg] or OPG [1mg/kg] treatments significantly increased the force production of dystrophic EDL muscles. The combination of any doses of formoterol and OPG treatment was not superior to OPG alone for fast-twitch EDL muscles. All data are expressed as means \pm SE; n = 8 independent experiments per group. The dotted line is the visual representation of wild-type data; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

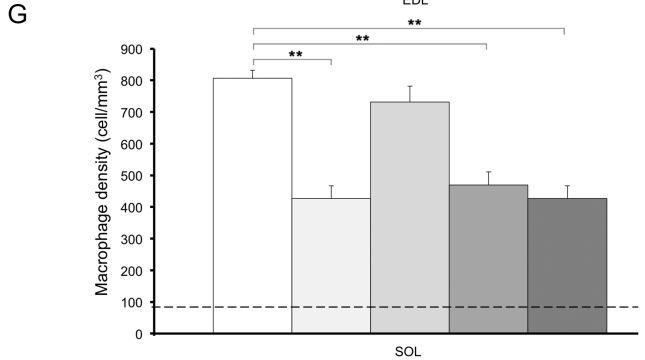
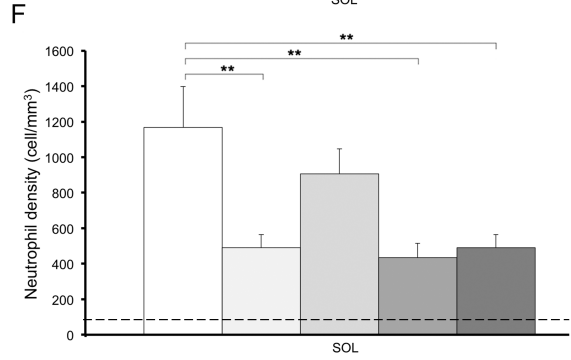
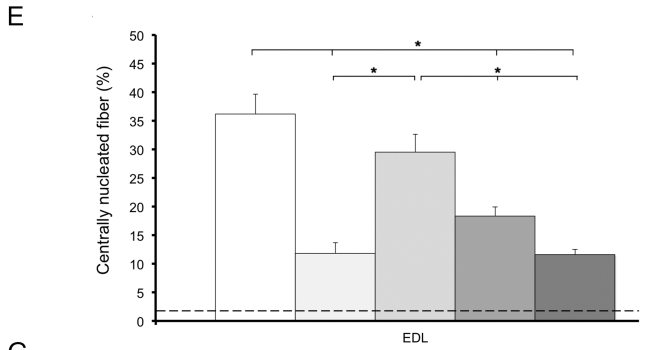
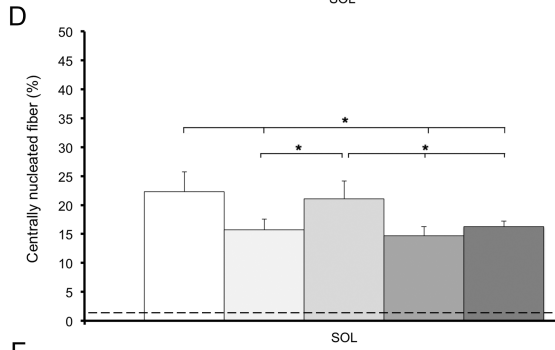
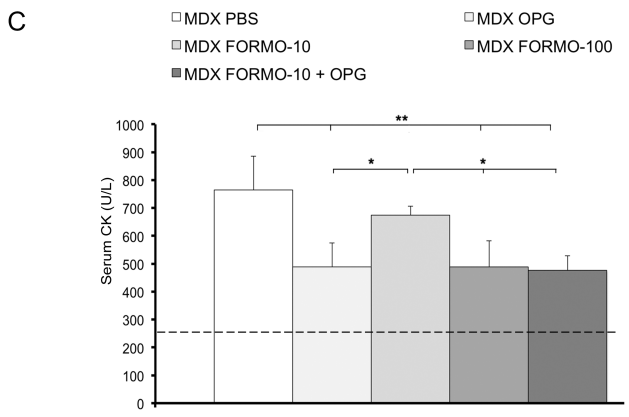
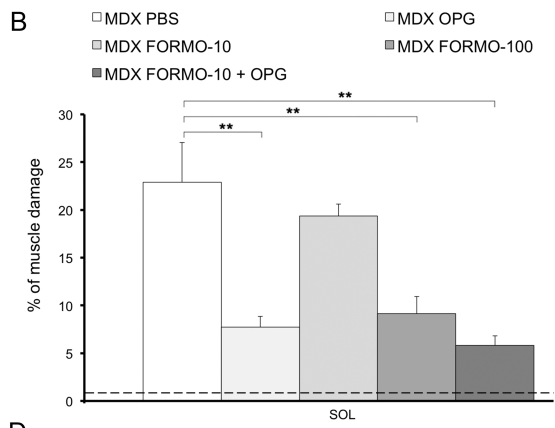
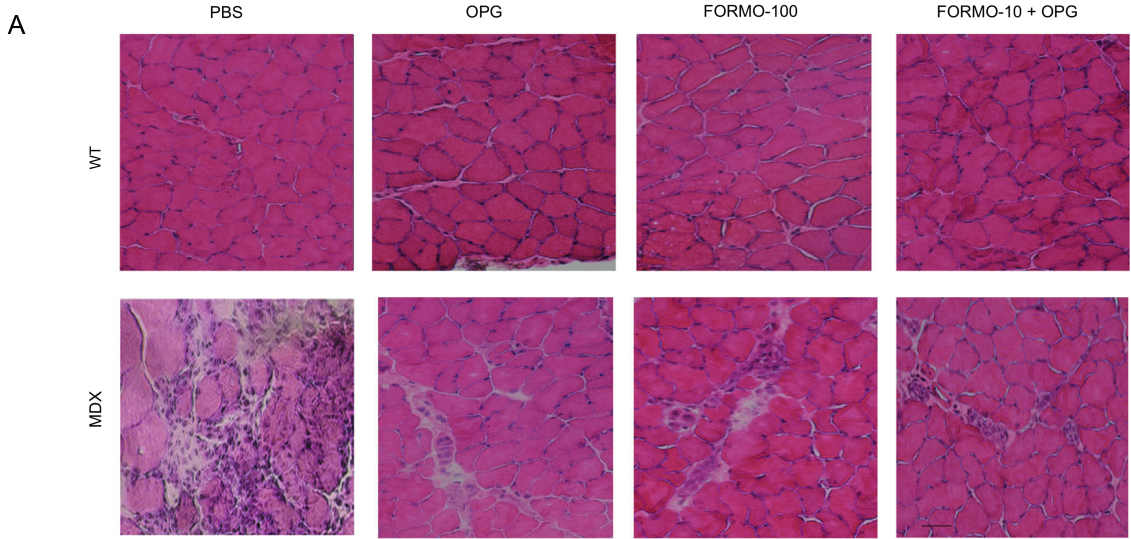


Figure 4-3: Osteoprotegerin and formoterol significantly improve muscle integrity and reduce muscle inflammation in slow-twitch Sol muscles of mdx mice.

Mdx mice were injected with PBS or OPG and/or formoterol for 10 days and included five groups: (1) mdx PBS-injected mice (mdx PBS), (2-3) mdx formoterol-injected mice at two different concentrations [10 or 100 ug/kg] (mdx FORMO-10; mdx FORMO-100), (4) mdx OPG-injected mice at concentration of [1 mg/kg], or (5) mdx injected with a combination of OPG and low dose of formoterol (mdx FORMO-10 + OPG). Representative hematoxylin and eosin staining (**A**), quantification of muscle damage (**B**), serum CK activity (**C**), percentage of centrally nucleated fibers of Sol (**D**) and EDL (**E**) showed that OPG [1mg/kg/d] or the high dose of formoterol [100 ug/kg/d] or OPG + low dose of formoterol [10 ug/kg/d] reduce cell infiltration and damage in dystrophic Sol muscles. Immunohistochemistry analyses demonstrated that the numbers of neutrophils (anti-Ly6C/Ly6G) (**F**) and pan-macrophages (anti-F4/80); (**G**) are reduced significantly following OPG and/or formoterol treatments. Healthy muscles from wild-type mice are shown as controls. All data are expressed as means \pm SE; n = 6-8 independent experiments per group. The dotted line is the visual representation of wild-type data; * p<0.05, ** p<0.01. Scale bar = 100 μ m.

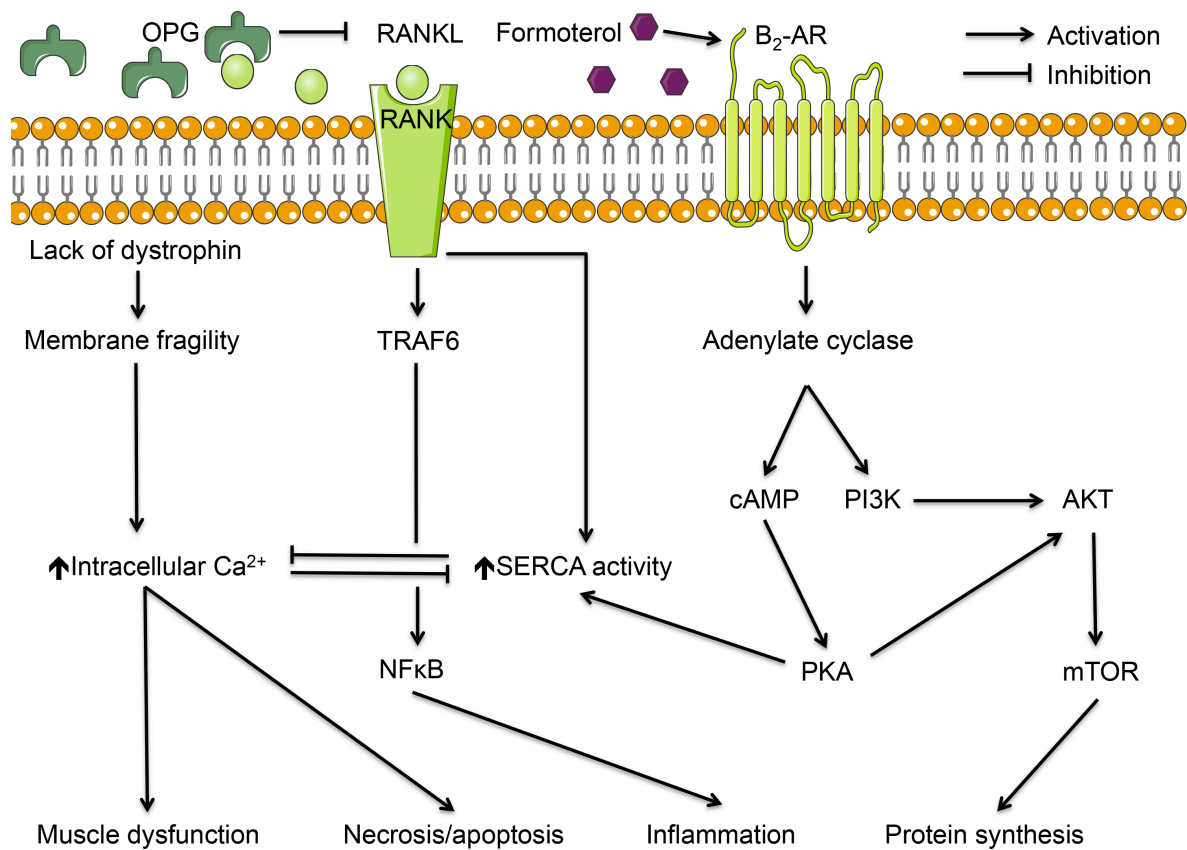


Figure 4-4: Schematic and hypothetical representation depicting how osteoprotegerin and formoterol may interact in dystrophic muscles.

β₂-agonists bind to adrenergic receptors, a class of G protein-coupled receptors that stimulate intracellular adenylyl cyclase, which catalyses the conversion of ATP to cAMP, triggering skeletal muscle anabolism and SERCA activity. OPG binds to RANKL preventing RANKL/RANK interactions and activation of NF-κB pathway.

		WT	MDX					
	PBS	+	+	-	-	-	-	-
	OPG	-	-	+	-	-	+	+
	FORMO- 10	-	-	-	+	-	+	-
	FORMO- 100	-	-	-	-	+	-	+
Morphological parameters								
Weights	Body (g)	14,7 +/- 1,8	15,3 +/- 2,1	14,5 +/- 1,3	14,4 +/- 1,6	14,8 +/- 1,1	14,4 +/- 1,4	14,5 +/- 1,7
	Sol (mg)	6,1 +/- 0,3	6,1 +/- 0,2	6,4 +/- 0,2	6,1 +/- 0,3	6,2 +/-0,3	6,1 +/- 0,4	6,2 +/- 0,2
	EDL (mg)	5,6 +/- 0,3	5,4 +/- 0,2	5,7 +/- 0,3	5,7 +/- 0,1	5,5 +/- 0,2	5,5 +/- 0,2	5,6 +/- 0,2
Contractile parameters								
Sol	TPT (ms)	46,4 +/- 4,3	44,3 +/- 5,1	42,3 +/- 3,4	46,1 +/- 4,1	45,6 +/- 4,7	44,2 +/- 4,1	45,2 +/- 4,7
	½ RT (ms)	41,6 +/- 3,4*	33,4 +/- 4,6	35,1 +/- 4,3	33,8 +/- 3,3	31,7 +/- 3,6	35,5 +/- 4,6	35,7 +/- 4,2
	Pt (g)	1,9 +/- 0,4*	0,7 +/- 0,3	1,3 +/- 0,4*	0,9 +/- 0,3	1,5 +/- 0,3*	1,5 +/- 0,4*	1,8 +/- 0,5*
	PO (g)	14,1 +/- 1,8*	5,1 +/- 1,3	7,9 +/- 1,1*	6,5 +/- 0,8	8,8 +/- 0,7*	9,1 +/- 1,1*	9,9 +/- 0,6**
EDL	TPT (ms)	25,1 +/- 1,6*	18,1 +/- 0,7	17,4 +/- 0,8	18,5 +/- 1,2	19,2 +/- 0,9	19,3 +/- 1,8	18,8 +/- 0,7
	½ RT (ms)	18,6	22,4	20,8	24,1	20,5	22,1	23,5

		+/- 1,4*	+/- 1,6	+/- 1,4	+/- 1,3	+/- 1,1	+/- 0,8	+/- 0,7
	Pt (g)	2,3	1,2	2,4	1,4	1,7	2,3	2,2
		+/- 0,4*	+/- 0,3	+/- 0,3*	+/- 0,3	+/- 0,4*	+/- 0,6	+/- 0,5
	P0 (g)	17,4	5,4	10,1	6,3	8,5	9,9	9,6
		+/- 1,2*	+/- 0,7	+/- 1,2**	+/- 0,8	+/- 0,7*	+/- 0,8**	+/- 1,1**

Tableau 4-1: Morphological and contractile parameters from wild type and mdx mice treated with PBS or OPG-Fc and/or formoterol.

Wild-type and mdx mice were injected with PBS or OPG and/or formoterol for 10 days and included the following seven experimental groups: (1) wild-type PBS-injected mice (WT PBS), (2) mdx PBS-injected mice (mdx PBS), (3-4) mdx formoterol-injected mice at two different concentrations [10 or 100 ug/kg] (mdx FORMO-10; mdx FORMO-100), (5) mdx OPG-injected mice at concentration of [1 mg/kg], or (6-7) mdx injected with a combination of OPG and two different doses of formoterol (mdx FORMO-10 + OPG; mdx FORMO-100 + OPG). Sol and EDL muscles were electrically stimulated and time to peak tension (TPT), half relaxation time (1/2RT) maximal twitch tension (Pt) and absolute force (P0) recorded. Muscle weight (mg) and body weight (g) were determined thereafter. All data are expressed as means \pm SE; n = 8 independent experiments per group; Significantly different from PBS-treated mdx mouse; * p<0.05, ** p<0.01.

		WT	MDX					
	PBS	+	+	-	-	-	-	-
	OPG	-	-	+	-	-	+	+
	Formo-10	-	-	-	+	-	+	-
	Formo-100	-	-	-	-	+	-	+
Myofiber size and phenotype								
Sol	MHC I (%)	36,2 +/- 2,0*	43,2 +/- 2,0	42,9 +/- 2,8	44,1 +/- 0,8	42,3 +/- 2,1	43,5 +/- 4,0	44,5 +/- 2,5
	MHC I CSA (μm^2)	1050,4 +/- 46,9	1197,0 +/- 54,9	1150,4 +/- 56,6	1152,2 +/- 57,1	1158,6 +/- 58,5	1180,8 +/- 109,8	1149,6 +/- 53,1
	MHC IIA (%)	46,3 +/- 1,4	47,1 +/- 3,3	47,0 +/- 1,6	47,6 +/- 1,9	48,6 +/- 1,3	47,6 +/- 3,7	48,1 +/- 1,2
	MHC IIA CSA (μm^2)	920,0 +/- 15,0*	1296,2 +/- 58,1	1298,2 +/- 13,9	1282,4 +/- 59,9	1297,2 +/- 19,0	1239,4 +/- 7,2	1286,2 +/- 33,0
	MHC IIX (%)	8,5 +/- 0,5*	11,1 +/- 0,5	10,7 +/- 0,6	11,2 +/- 1,2	11,1 +/- 0,4	11,6 +/- 2,4	11,6 +/- 0,8
	MHC IIX CSA (μm^2)	694,0 +/- 27,7*	519,0 +/- 59,0	521,4 +/- 30,8	489,4 +/- 14,8	532,2 +/- 28,6	528,8 +/- 49,6	512,2 +/- 53,1
	MHC IIB (%)	6,5 +/- 0,8*	2,3 +/- 1,5	2,3 +/- 0,8	2,8 +/- 0,5	2,6 +/- 0,4	2,9 +/- 0,2	3,4 +/- 0,3
	MHC IIB CSA (μm^2)	693,8 +/- 19,5*	422,1 +/- 39,3	446 +/- 32,3	479,4 +/- 30,0	446,6 +/- 39,9	450,6 +/- 64,1	438,2 +/- 22,4

Tableau 4-2: Moyofiber size and phenotype of Sol muscles from wild type and mdx mice treated with PBS or OPG-Fc and/or formoterol.

Wild-type and mdx mice were injected with PBS or OPG and/or formoterol for 10 days and included the following seven experimental groups: (1) wild-type PBS-injected mice (WT PBS), (2) mdx PBS-injected mice (mdx PBS), (3-4) mdx formoterol-injected mice at two different concentrations [10 or 100 ug/kg] (mdx FORMO-10; mdx FORMO-100), (5) mdx OPG-injected mice at concentration of [1 mg/kg], or (6-7) mdx injected with a combination of OPG and two different dose of formoterol (mdx FORMO-10 + OPG; mdx FORMO-100 + OPG). Fiber typing and specific cross-sectional area (CSA) of Sol muscles were performed using immunofluorescence of the four myosin heavy chain (MHC) isoforms: type I (MHC I), type IIA (MHC IIA), type IIX (MHC IIX) and type IIB (MHC IIB). Treatments had no significant impacts on fiber typing and CSA of Sol muscles. All data are expressed as means \pm SE; n = 6-8 independent experiments per group; Significantly different from PBS-treated mdx mouse; * p<0.05.

		WT	MDX					
PBS		+	+	-	-	-	-	-
OPG		-	-	+	-	-	+	+
Formo-10		-	-	-	+	-	+	-
Formo-100		-	-	-	-	+	-	+
Myofiber size and phenotype								
EDL	MHC I (%)	5,0 +/- 0,9	4,9 +/- 0,4	4,4 +/- 0,2	4,7 +/- 0,5	4,9 +/- 0,4	4,6 +/- 0,3	4,8 +/- 0,4
	MHC I CSA (μm^2)	345,2 +/- 42,9	341,0 +/- 37,8	327,0 +/- 17,5	337,6 +/- 8,2	358,2 +/- 22,2	316,0 +/- 21,6	321,0 +/- 16,6
	MHC IIA (%)	27,4 +/- 2,0**	12,3 +/- 1,8	12,0 +/- 0,9	12,6 +/- 1,7	12,9 +/- 2,2	12,1 +/- 0,6	12,0 +/- 0,5
	MHC IIA CSA (μm^2)	867,0 +/- 50,1*	461,2 +/- 27,5	462,8 +/- 18,8	460,0 +/- 28,1	457,4 +/- 26,4	451,4 +/- 40,2	440,6 +/- 16,6
	MHC IIX (%)	36,5 +/- 2,7*	11,2 +/- 0,8	10,7 +/- 1,2	11,8 +/- 0,6	12,6 +/- 0,7	11,7 +/- 1,2	12,3 +/- 1,2
	MHC IIX CSA (μm^2)	918 +/- 68,6	898,2 +/- 63,0	899,8 +/- 21,8	895,8 +/- 28,3	916,6 +/- 24,0	890,4 +/- 48,7	910,8 +/- 45,2
	MHC IIB (%)	52,6 +/- 1,6*	78,2 +/- 2,7	77,1 +/- 2,1	77,3 +/- 1,0	79,1 +/- 1,0	76,9 +/- 0,6	76,7 +/- 2,3
	MHC IIB CSA (μm^2)	900,4 +/- 116,9	1068,0 +/- 54,0	1075,0 +/- 43,3	1073,4 +/- 53,4	1110,0 +/- 73,7	1101,4 +/- 15,4	1108,8 +/- 64,0

Tableau 4-3: Myofiber size and phenotype of EDL muscles from wild type and mdx mice treated with PBS or OPG-Fc and/or formoterol

Wild-type and mdx mice were injected with PBS or OPG and/or formoterol for 10 days and included the following seven experimental groups: (1) wild-type PBS-injected mice (WT PBS), (2) mdx PBS-injected mice (mdx PBS), (3-4) mdx formoterol-injected mice at two different concentrations [10 or 100 ug/kg] (mdx FORMO-10; mdx FORMO-100), (5) mdx OPG-injected mice at concentration of [1 mg/kg], or (6-7) mdx injected with a combination of OPG and two different doses of formoterol (mdx FORMO-10 + OPG; mdx FORMO-100 + OPG). Fiber typing and cross-sectional area (CSA) of EDL muscles were performed using immunofluorescence of the four myosin heavy chain (MHC) isoforms: type I (MHC I), type IIA (MHC IIA), type IIX (MHC IIX) and type IIB (MHC IIB). Treatments had no significant impact on fiber typing and CSA of EDL muscles. All data are expressed as means \pm SE; n = 6-8 independent experiments per group; Significantly different from PBS-treated mdx mouse; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Chapitre 5 : L'ostéoprotégérine atténue la dystrophie musculaire par le biais d'un mécanisme indépendant de RANKL et TRAIL

Osteoprotegerin mitigates muscular dystrophy through a mechanism that is independent of RANKL and TRAIL

Sébastien S. Dufresne¹, Antoine Boulanger-Piette¹, Sabrina Bossé¹, Val A. Fajardo², Daniel Gamu², Hideo Yagita³, Josef M. Penninger⁴, A. Russell Tupling² and Jérôme Frenette^{1,5}

¹ Centre Hospitalier Universitaire de Québec–Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUQ-CRCHUL), Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

² Department of Kinesiology, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1

³ Department of Immunology, Juntendo University, School of Medicine, Tokyo, Japan

⁴ IMBA, Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences, 1030 Vienna, Austria

⁵ Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

Article in preparation: to be submitted to Nature Medicine 2017

Résumé

Des études cliniques ont démontré qu'il existe un lien entre l'ostéoporose et l'atrophie musculaire. La dégradation de ces conditions se produit parallèlement à la suite de l'immobilisation, les maladies neuromusculaires ou le vieillissement. Le récepteur-activateur du facteur nucléaire kB (RANK), son ligand RANKL et le récepteur soluble leurre ostéoprotégérine (OPG) sont les principaux régulateurs du remodelage osseux. Structuellement, la protéine OPG contient quatre domaines TNFR (RANKL), deux domaines d'apoptose cellulaire (*tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* [TRAIL]) et une région liaison avec l'héparine. L'hypothèse de notre recherche est que la dérégulation du microenvironnement de la voie RANK/RANKL/OPG est impliquée dans la physiopathologie la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). Les muscles squelettiques contiennent la protéine RANK sur leur sarcolemme et l'expression de l'ARNm de RANK est augmentée de 4 fois dans les muscles de souris dystrophiques. L'injection de l'OPG-Fc pleine longueur durant 10 jours entraîne un gain de 233% de la force musculaire *ex vivo* et protège contre les dommages/dysfonctions causés par les contractions excentriques répétées du muscle dystrophique *extensor digitorum longus* (EDL). Le traitement à l'OPG améliore les performances fonctionnelles *in vivo* des souris dystrophiques. La délétion spécifique de RANK musculaire via l'approche génétique d'inactivation conditionnelle Cre-lox (*mdxRANK^{mdx}*) sur des souris dystrophiques, est moins efficace que l'OPG-Fc pleine longueur, mais améliore la force musculaire des muscles EDL dystrophiques de 83%. L'inhibition pharmacologique de RANKL et TRAIL durant 10 jours a augmenté, respectivement, la force des muscles EDL dystrophiques de 45% et 17%. Une seule injection d'OPG-Fc a produit une hausse de la force musculaire de 136%, mais l'absence de Ca^{2+} extracellulaire dans la solution physiologique du bain à contractilité a réduit considérablement les effets de l'OPG-Fc sur la tension générée. L'analyse en microscopie confocale démontre que l'OPG-Fc pleine longueur, mais pas l'OPG-Fc tronquée (possédant seulement les 4 domaines RANKL) pourrait se lier à un récepteur membranaire non identifié sur les myotubes, et que cette liaison conduit à l'augmentation de l'expression de SERCA-2a. Cependant, les myotubes incubées avec l'héparinase, clivant les domaines de l'héparine, ainsi que l'inhibition de l'activité de la kinase liée aux intégrines β_1 et β_3 (ILK), qui interagit avec SERCA-2a, suppriment l'augmentation de l'expression de SERCA

induite par l'OPG-Fc pleine longueur. Ces résultats pourraient conduire à l'élaboration de futures avenues thérapeutiques et traiter de façon conjointe l'ostéoporose et la dégénérescence musculaire chez les patients atteints de la DMD.

Abstract

Clinical studies have clearly shown that there is an association between osteoporosis and muscle atrophy, and that the worsening of these conditions occurs in tandem following prolonged bed rest, immobilization, neuromuscular diseases, or aging. The receptor-activator of nuclear factor κ B (RANK), its ligand RANKL and the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG) are the key regulators of osteoclast differentiation and bone remodeling. Structurally, the OPG protein contains four TNFR domains (RANKL), two death domains (tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [TRAIL]) and a heparin-binding region. The hypothesis driving our research is that the dysregulation of the RANK/RANKL/OPG microenvironment is not limited to osteoporosis, but very important in muscle diseases such as Duchenne muscular dystrophy (DMD). Skeletal muscles express RANK on the sarcolemmal membrane, and that RANK mRNA expression increases by 4-fold in dystrophic extensor digitorum longus (EDL) muscles. Full length OPG-Fc injections completely restore force of fast-twitch dystrophic EDL muscles (+233%), protect against eccentric contraction-induced damage and most importantly improve functional performance and activity of dystrophic mice. Muscle specific deletion of RANK using the Cre-lox conditional inactivation approach (mdx RANK^{mk0}) is less effective than OPG-Fc treatment, but improves force of dystrophic EDL muscles (+83%). Pharmacologic inhibition of RANKL and TRAIL for 10 days increased the force of dystrophic EDL muscles by 45% and 17%, respectively, which are modest compared to dystrophic EDL muscles from OPG-treated mdx mice. Surprisingly, a single treatment with the full-length OPG-Fc significantly increased force production (+136%), but the absence of extracellular Ca²⁺ drastically reduced the effects of full-length OPG-Fc. Confocal microscopy observation showed that the full-length OPG-Fc, but not the truncated OPG-Fc (with only the RANKL domains), binds directly to myotubes through a receptor that is currently unidentified which increases SERCA-2a expression in C2C12 myotubes. However, myotubes treated with heparinase, or integrin linked kinase (ILK) inhibitor, abrogates OPG-induced SERCA-2a expression, suggesting that OPG through heparin and/or ILK upregulates SERCA-2a expression. The present findings propose novel therapeutic approaches in which full-length OPG-Fc, may treat simultaneously osteoporosis and muscle degeneration in DMD patients.

5.1 Brief Introduction

The receptor-activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), the membrane receptor RANK, and the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG) are members of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily that regulates bone remodeling^{1,2}. RANKL is expressed by osteoblasts, while RANK, its receptor, is expressed by pre-osteoclastic cells^{3,4}. The RANK/RANKL interaction induces the formation of multinucleated mature osteoclasts, ultimately causing bone resorption⁵. OPG, the third protagonist, is also produced by osteoblasts, binds to RANKL and exerts an inhibitory effect on the pre-osteoclastic differentiation process⁶. Structurally, the native OPG protein is highly conserved and contains four TNFR domains (RANKL), two death domains (tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand [TRAIL]), and a heparin-binding region⁷. OPG is thus a very efficient anti-resorptive agent, and also serves as a decoy receptor for the TRAIL and increases cell survival by blocking the pro-apoptotic effects of the RANK/RANKL interaction^{1,8}. Interestingly, osteoporosis and muscle atrophy/dysfunction occur simultaneously in a number of conditions, including spaceflight, extended bed rest, and several muscular and neuromuscular diseases, suggesting cross-talks and mutual cooperative interactions between these two tissues⁹⁻¹¹. However, little is currently known about potential cellular and molecular mechanisms that may tie together bones and skeletal muscles. Our recent publication showed that muscle RANK deletion or OPG-Fc treatment prevent the loss of function of fast-twitch EDL muscles associated with denervation or muscular dystrophy¹²⁻¹⁴. Here, we tested the hypothesis that the RANK/RANKL/OPG triad acts directly and plays an important role in the regulation of skeletal muscle integrity and function during muscular dystrophy.

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Animals

Mice carrying the RANK^{floxed} or RANK^{del} alleles and muscle creatine kinase-cre (mck-cre) mice were backcrossed five times to a C57BL/6 background before generating the mck-cre RANK^{del/floxed} (Rank^{mko}) mice as previously described^{12,15}. Male wild-type (C57BL/10ScSnJ) and mdx dystrophic mice (C57BL/10ScSn-Dmd^{mdx}/J) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and bred at our animal facility. RANK^{mko} mice were also crossed with mdx-background mice to generate double deficient mice (dystrophin and RANK). Mice were screened for the desired genotype by PCR analysis. Dystrophic mdx mice were injected daily with full-length OPG-Fc [i.p., 0.3 or 1 or 3 mg/kg/d R&D systems, MN, USA], PBS, anti-RANKL [1 mg/kg/ every 3d, H. Yagata, Japan], anti-TRAIL [1 mg/kg/every 3d, H. Yagata, Japan] or truncated OPG-Fc [1 mg/kg/d, Syd Labs, MA, USA] from days 25 to 35 after birth. In another set of experiments, mdx mice received one full-length OPG-Fc [i.p., 1 mg/kg/d] at 34-days old and were sacrificed after 24h. Five-six-month old mdx mice were daily injected for 10d with full-length OPG-Fc [i.p. 1 mg/kg/d] followed by a treadmill eccentric protocol. C57BL/10ScSnJ mice were used as a control and injected daily with the same volume of phosphate-buffered saline (vehicle). At the end of the different experimental procedures, mice were euthanized by cervical dislocation under anesthesia and serum, bone (femur), skeletal muscles (EDL, Sol, tibialis anterior, diaphragm) and cardiac muscle were removed and stored at -80 °C for future analysis. All of the procedures were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee, based on the Canadian Council on Animal Care guidelines.

5.2.2 Immunofluorescence and Staining

Transversal EDL muscle sections (10 µm) were cut (Leica Microsystems CM1850, Nussloch, Germany) in duplicate from the proximal and distal portions of the muscles. Tissue sections stained with hematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were examined with an inverted microscope (Nikon, Ontario, Canada) and damage,

regenerating and intact areas of skeletal muscles were quantified with ImageJ software version 1.41 (National Institutes of Health, USA). Image series of EDL and myotubes were taken at room temperature using a Confocal microscope (Axio Observer.Z1; Carl Zeiss, Germany) and acquired using a Quorum WaveFX spinning disc confocal system (Quorum Technologies, Ontario, Canada). Solid state laser lines 491 nm and 561 nm were used for excitation of green and red (Alexa-488 and Alexa-594), combined with appropriate BrightLine single-bandpass emission filters (536/40 nm and 624/40 nm, Semrock, NY, USA). For DAPI visualization, wide-field z-series were acquired at the same time with DAPI fluorescence filter cube (Chroma Technology, VT, USA). The CCD camera used to capture the images was a Hamamatsu Image EM C-9100. Images were acquired and analyzed using Volocity software, version 4.2.1. Iterative restoration (deconvolution) was applied for the DAPI channel, using the same software.

5.2.3 Cell Cultures

C2C12 myoblasts (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone, Logan, UT, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Logan, UT, USA) and 1% antibiotic-antimycotic (Life Technologies, Ontario, Canada) in a 5% CO₂ and 37°C environment. When the myoblasts reached 90% confluence, the medium was replaced by high glucose DMEM containing 1% FBS for 5 days to allow the myoblasts to differentiate into myotubes. Myotubes were then treated with OPG-Fc [100 ng/ml, R&D Systems, MN, USA] and/or QLT0267, an inhibitor of integrin-linked kinase [2.5 or 10 µM, QLT inc, Vancouver, Canada], or heparinase I or/and III [10 or 100 mU/ml, Sigma-Aldrich, Ontario, Canada]. Human myoblasts were obtained from a postmortem muscle biopsy from one infant with no DMD-related disease and two infants diagnosed for DMD. Myoblasts proliferated in MB-1 medium (Hyclone, Logan, UT, USA) supplemented with 15% FBS (Wisent, Québec, Canada), 1% penicillin-streptomycin (Wisent, Québec, Canada), 10 µg/l of bFGF (R&D systems, Ontario, Canada), 0.4 mg/l of dexamethasone (Sigma, Ontario, Canada), and 5 mg/l of insulin (Sigma, MO, USA). For differentiation, cells were expanded in DMEM and supplemented with 2% FBS and antibiotics for 5 days.

5.2.4 Western Blots and qPCR

Myotubes or skeletal muscles were homogenized in a lysis buffer containing 1 ml/ml, protease inhibitor cocktail (P8340; Sigma-Aldrich, Ontario, Canada), 20 mM Tris-base pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10% glycerol, 1% Igepal (Sigma-Aldrich, Ontario, Canada), 2 mM Na₃VO₄, 8.3 mM NaF and 0.2 mM PMSF. The protein content of the supernatant was measured using BCA protein assay kit (EMD chemical, Nussloch Germany). Protein homogenates were electrophoretically separated on SDS-polyacrylamide gels, transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Bio-Rad, CA, USA), blocked in 5% skim milk and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. The membranes were washed and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Bands were revealed using the ECL-Plus chemiluminescent detection system (Perkin-Elmer, MA, USA). Images of the membranes were acquired, scanned, and analyzed using Quantity One software (v4.6.6, Bio-Rad). For RT-PCR analysis, myotubes or skeletal muscles were rapidly put in RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, MD, USA). Total RNA was isolated using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, MD, USA) according to manufacturer's instructions. During isolation process, RNA samples were treated with RNase-Free DNase Set (Qiagen, MD, USA). RNA quality was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA) and quantified using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE, USA). The expression of the RANK gene in each sample was compared to the housekeeping GAPDH gene. Measurements were performed in duplicate for each standard and muscle sample.

5.2.5 Contractile Properties

Mice were injected with buprenorphine (i.p. 0.1 mg/kg) and were anaesthetized with pentobarbital sodium (i.p. 50 mg/kg) 15 min later. Sol, EDL, and diaphragm (DIA) muscles were carefully dissected, then attached to an electrode and a force sensor (305B-LR, Aurora Scientific Inc., Ontario, Canada) to assess contractile properties as described previously^{13,16}. For the eccentric contraction protocol, the muscles were stimulated at 150 Hz for 700 ms.

After 500 ms, the muscles were lengthened to 110% L0 at 0.5 L0/s for 200 ms. To mechanistically investigate whether extracellular Ca^{2+} enhances force production, dystrophic EDL muscles from PBS- and full-length OPG-Fc treated mice were isolated and placed in a physiological solution containing 2 mM Ca^{2+} to record contractile properties. Muscles were then incubated into a physiological solution containing 0 mM Ca^{2+} . They were electrically stimulated at 100 Hz for 700 ms every 5 min, and the decline in force production recorded until it reached a plateau. Thereafter, the 0 mM Ca^{2+} solution was replaced by a normal physiological solution containing 2 mM Ca^{2+} . The recovery of muscle force was recorded every 5 min until it reached a plateau¹⁷. Functional measurements were analyzed with the Dynamic Muscle Data Analysis software (Aurora Scientific Inc., Ontario, Canada).

5.2.6 Downhill Running Protocol

Six month-old mdx mice were treated for 10 days with PBS (n=12) or full length OPG-Fc [1mg/kg/d] (n=12). From days 7 to 9, mice were trained for acclimatization on an horizontal (0% grade) motorized treadmill at 6, 8 and then 10m/min for 5 min. Following the training protocol, mice ran on a downhill sloped (14-degree decline) at 10m/min for 45 min. Mice were continually observed during the running protocol. Exhausted mice showing physical signs of breathing and discomfort were rested for 2min. The running protocol was discontinued after 3 stops. Following the eccentric protocol, mouse activity was measured by video tracking software in an open field for 24h¹⁸.

5.2.7 SERCA activity

Frozen EDL muscles were homogenized with a ground-glass pestle in 5 volumes of 10 mM Tris/HCl (pH 8.3) supplemented with 0.3 M sucrose. SERCA activity was measured in A. R. Tupling's laboratory^{12,19} with a Beckman DU-650 spectrophotometer following the oxidation of NADH at 340 nm in assay buffer containing 1 mM EGTA (pH 7.5), 10 mM phosphoenolpyruvate, 18 U/mL pyruvate kinase and lactate dehydrogenase, 0.2 mM NADH, 20 mM HEPES, 200 mM KCl, 15 mM MgCl_2 , 10 mM NaN_3 , and 0.005% Triton X-100. The reaction started with the addition of 4 mM MgATP. SERCA activity was

determined as the difference in absorbance following the addition of low (50 mM) and high (2,000 mM) solutions of CaCl₂ and is expressed as ATP hydrolyzed per min per mg protein, or per g wet muscle using the extinction coefficient of NADH of $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.2.8 Statistical Analyses

All values are expressed as means \pm SEM. The data was analyzed by one-way ANOVA, followed by a student-T test, Tukey's or Mann-Whitney U test *a posteriori* (InStat). The levels of significance was set at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

5.3 Results and Discussion

5.3.1 RANK Expression in Human Primary Myotubes and Mice Skeletal Muscles

We previously showed that RANK is expressed in fully differentiated C2C12 mouse cell line, but not in proliferating C2C12 myoblasts¹². Myotubes are also able to synthesize OPG in a dose dependent manner following stimulation with lipopolysaccharide (LPS), whereas soluble RANKL protein was undetectable in the culture media¹². Primary human myotubes from one infant with a disease unrelated to DMD and two infants with DMD also showed expression of RANK protein (Fig. 5-1a). In addition, RANK mRNA is 5.5 fold higher in EDL muscles from dystrophic mdx mice relative to C57BL/6 mice (Fig. 5-1b). To explore the role of RANK in dystrophic skeletal muscle, we crossed dystrophic mdx mice with muscle-specific RANK knockout mice, thereafter named *mdx-RANK^{mko}*. *Mdx-RANK^{floxed/floxed}* mice that do not carry the Cre recombinase, thereafter named *mdx-RANK^{ff}*, appeared indistinguishable from mdx mice. Immunohistochemistry results confirmed the presence of dystrophin in EDL muscles from C57BL/6 mice and RANK protein on the membrane of skeletal muscle fibers from C57BL/6 and *mdx* mice. Dystrophin and RANK proteins were absent in skeletal muscles from *mdx-RANK^{mko}* mice (Fig. 5-1c).

5.3.2 Full-Length OPG-Fc Mitigates Muscular Dystrophy in Fast-Twitch EDL

Muscles

Because daily injections of full-length OPG-Fc at a dose of 1mg/kg/d for 10 days greatly improved the force and integrity of dystrophic muscles¹³, we next tested whether muscle RANK deletion would improve structural integrity and function of dystrophic muscles. Muscle RANK deletion resulted, respectively, in 83% and 67% gain of absolute and specific EDL muscle force when compared to the PBS-treated mdx mice (Fig. 5-2a-b). The absolute and specific forces of Sol and diaphragm (DIA) muscles were also significantly superior in *mdx-RANK^{mko}* mice relative to *mdx-RANK^{ff}* mice (Fig. 5-2a-b). The contractility properties and morphology of EDL and Sol muscles from *mdx-RANK^{ff}* mice were in all points comparable to mdx mice (Fig. 5-2a-b). Hematoxylin/eosin staining confirmed that

muscle integrity was strongly preserved in the full-length OPG-treated *mdx* mice and *mdx-RANK^{mk0}* mice (Fig. 5-2c). Surprisingly, full-length OPG-Fc completely restores function and integrity of EDL muscles and was significantly more effective than muscle RANK deletion during the most severe phase of muscle degeneration in dystrophic *mdx* mice. To identify the most effective dosing strategy, we treated *mdx* mice with different doses of full-length OPG-Fc for 10 days. High doses of OPG-Fc [5, 10, or 20 mg/kg] are typically used in bone studies²⁰. In skeletal muscle we showed that OPG-Fc [3 mg/kg/d] was no more effective than OPG-Fc [1 mg/kg/d] in preventing muscle degeneration in *mdx* dystrophic mice (Fig. 5-2d). Because full-length OPG-Fc serves as a decoy receptor for TRAIL and increases cell survival by blocking the pro-apoptotic effects of the RANKL/RANK interaction, *mdx* mice were then injected with anti-RANKL and anti-TRAIL antibodies to decipher the dual function of OPG^{21,22}. The inhibition of RANKL and TRAIL for 10 days increased the force production of dystrophic EDL muscles by 45% and 17% respectively, which were markedly lower than dystrophic EDL muscles from full-length OPG-treated *mdx* mice (233%) (Fig. 5-2e). However, the combination of anti-RANKL and anti-TRAIL was not superior to anti-RANKL treatment alone (Fig. 5-2e). To confirm the superiority of full-length OPG-Fc, *mdx* mice were treated with the truncated form of OPG-Fc that carries only the 4 domains of RANKL. As expected, the truncated OPG-Fc had similar effects than anti-RANKL treatment, increasing by 43% the force production of dystrophic EDL muscles. To corroborate that full-length OPG-Fc acts independently of RANKL, RANK/dystrophin double-deficient mice were treated with full-length OPG-Fc for 10 days. Dystrophic EDL muscles exhibited a significant gain of force (29%) relative to untreated RANK/dystrophin double-deficient mice, giving additional credence to the notion OPG-Fc may have its own muscle receptor (Fig. 5-2f). Our results indicate that anti-RANKL or anti-TRAIL or truncated OPG treatments or RANK deletion are much less effective than full-length OPG-Fc. We thus speculate and deduce that the heparin binding domain may be the most active domain against Duchenne muscular dystrophy.

5.3.3 Extracellular Ca²⁺ Is Necessary for Enhancing Force Production in Full Length OPG-Fc treated Dystrophic Mice

In another set of experiments, we found that one full-length OPG-Fc injection every two, three or five days has a limited effect on dystrophic muscles, and that daily injections are required to rescue dystrophic muscles (Fig 5-3a-b). Surprisingly, a single treatment with the full-length OPG-Fc in 34 day-old mdx mice produced a marked and significant gain in force production (136%) in dystrophic EDL muscles relative to PBS-treated mdx mice (Fig 5-3c). A closer look at our contractile and histological properties also showed that dystrophic EDL muscle lost 70% of its force relative to 5 week-old C57BL/6 which outpaced muscle degeneration (damage area occupied 22% of dystrophic EDL muscles) (Fig 5-3d). Muscle atrophy or muscle damage is thus insufficient to explain the significant decline in force production in dystrophic EDL muscles or the gain of force at 24h post OPG-Fc treatment. We thus hypothesized that (1) the excitation-contraction coupling (ECC) is compromised and insufficient Ca²⁺ is available in dystrophic muscle, leading to a loss of Ca²⁺ sparks and force in dystrophic muscles (i.e. difference between cytosolic Ca²⁺ during contraction - cytosolic Ca²⁺ at rest)²³⁻²⁶ (2) the full-length OPG-Fc may have inotropic and/or lusitropic effects, enhancing Ca²⁺ entry (SOCE), transient or storage and therefore rapidly improving ECC and ultimately the contractility of dystrophic muscles. To investigate whether extracellular Ca²⁺ enhances force production, dystrophic EDL muscles from mice treated 1 day with PBS and full-length OPG-Fc were electrically stimulated in a physiological solution containing 2 mM Ca²⁺ for 35 min, placed into a physiological solution with 0 mM Ca²⁺ for 180 min and then returned to a 2 mM Ca²⁺ for 120 min. Our preliminary results show that the absence of extracellular Ca²⁺ in the physiological solution reduced very significantly the effects of full-length OPG-Fc indicating that extracellular Ca²⁺ is essential to enhance force production in OPG-Fc treated mdx mice (Fig 5-3e). Different inhibitors such as verapamil (DHPR), 2-ABP (SOCE), streptomycin (stretch-activated channels) and thapsigargin (SERCA) will be tested to determine which type of Ca²⁺ channel or pump is important for enhancing force in full-length OPG-treated dystrophic mice,

5.3.4 Full-Length OPG-Fc Prevents Eccentric Contractions-induced Muscle Damage and Increases Functional Performance

Dystrophic muscles are vulnerable to repetitive eccentric contractions^{27,28}. Our results showed that full-length OPG-Fc markedly prevents the loss of force following 7 *ex vivo* eccentric contractions (Fig. 5-4a). To test whether the full-length OPG-Fc treatment provides a similar protection during a physiological eccentric protocol, PBS- and OPG-treated mice were submitted a 45 min downhill running protocol. We found that, 10% of the PBS-treated and 75% of the full-length OPG-Fc treated dystrophic mice were able to complete successfully the entire downhill running protocol without any interruption (Fig. 5-4b). The PBS and full-length OPG-Fc treated mice that failed to complete the eccentric protocol did, respectively, 63% and 91% of the expected distance (Fig. 5-4c). The first stop for the PBS-treated mdx mice occurred in average after 12 min of the downhill running, while full-length OPG-treated mdx mice stopped for the first time after 27 min (Fig. 5-4d). Following the eccentric protocol, mouse activity was measured by video-tracking software for 24h. As expected, the full-length OPG-Fc treatment enhanced voluntary cage activity by roughly 45% (Fig 5-4e). The open field activity measurement reflects locomotive function¹⁸ indicating that the full-length OPG-Fc prevents muscle dysfunction post intensive eccentric exercise.

5.3.5 Full-Length OPG-Fc Increases SERCA ATPase Parameters of Dystrophic EDL Muscles

Since RANKL/RANK interaction is important to maintain SERCA activity¹², and since SERCA overexpression in skeletal muscles mitigates muscular dystrophy in dystrophin and sarcoglycan null mice and since intrinsic laryngeal muscles that overexpress SERCA are protected against muscular dystrophy²⁹⁻³¹, we next tested whether full-length OPG-Fc might also increase SERCA activity and SERCA-1a and SERCA-2a protein contents. Full length OPG-Fc treatment increased by about 2.5 fold SERCA activity (Fig 5-5a-c) and drastically and selectively increased the expression of the slow-twitch SERCA-2a (650% gain), but not the fast-twitch SERCA-1a, this latter being the most common and abundant

isoform in fast-twitch EDL muscles (Fig. 5-5d). Double immunohistochemical labeling showed that the percentage of fast twitch fibers (IIa, IIb and IIx) expressing the slow-twitch SERCA-2a doubled following full-length OPG-Fc treatment in mdx mice (Fig 5-5e). This latter isoform is usually expressed and limited to slow-twitch muscle fibers and cardiac muscle³². The fast-twitch fibers that expressed the slow SERCA-2a isoform are extremely relevant, since it provides evidence that the expression of SERCA isoforms and muscle fiber typing are not entirely dependent on mechanical, hormonal or neuronal impulses and that the RANK/RANKL/OPG pathway can partly regulate the expression of SERCA isoforms and muscle phenotype, two indicators of muscle performance¹².

5.3.6 Full-Length OPG-Fc Binds Directly to Skeletal Muscle and Acts Independently of RANKL/RANK

Because the effect of full-length OPG-Fc is largely superior to muscle RANK deletion in enhancing force production of dystrophic muscles, we tested the possibility that full-length OPG-Fc binds directly to skeletal muscle cells. Confocal images showed that the presence of full-length OPG-Fc on the cell membrane of fully differentiated C2C12 myotubes *in vitro* (Fig 5-6a). Consistent with our observations on dystrophic mice, myotubes stimulated with full-length OPG-Fc [100 ng/ml] for 24h increased significantly SERCA-2a (205%) but not SERCA-1a content (Fig. 5-6b). Since the integrin linked kinase (ILK) and SERCA-2a form a putative functional complex where ILK activity modulates SERCA-2a expression in cardiac cells³³, we next examined whether ILK inhibitor (QLT0267)³⁴ influenced SERCA-2a expression in full-length OPG-stimulated myotubes. ILK inhibition diminished full-length OPG-Fc induced SERCA-2a expression in C2C12 myotubes, indicating that full-length OPG-Fc upregulates SERCA-2a expression through ILK activity (Fig 5-6c).

ILK is a critical component of the protein scaffold, highly enriched in the sarcomeric Z-disk costameres³³ and at the myotendinous junctions³⁵, force-regulating structures that connect myofibers to tendons^{36,37}. ILK interacts with the cytoplasmic domain of β_1 and β_3 integrin domains^{38,39}, and the attachment of myofibers to the extracellular matrix is predominantly mediated by integrins and the dystrophin-glycoprotein complex⁴⁰. β_1

integrin is essential for myogenesis and muscle homeostasis, and α_5 integrin and α_7 integrin-deficient mice suffer from progressive muscular dystrophy⁴¹⁻⁴³. Evidences from non- muscle cells, show that OPG binds to $\alpha_v\beta_3$ and/or $\alpha_v\beta_5$ integrins⁴⁴. In addition, the heparin-heparan sulphate chains on syndecan-1 (SDC-1) recognize heparin-binding domains and are capable to engage full-length OPG-Fc⁴⁵. SDC-1 cooperates with integrins and is necessary for the activation and clustering of $\alpha_v\beta_3$ integrin⁴⁶. Furthermore, OPG binds directly to $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins inhibiting TRAIL-induced apoptosis⁴⁴. To eliminate heparin and heparan sulphate, we next treated C2C12 myotubes with heparinases I or III ([10 or 100 mU/ml]) for 24 h⁴⁷. The full-length OPG-Fc treatment did not increase SERCA-2a content in heparinase I combined with heparinase III treated C2C12 myotubes, indicating that heparin and/or heparin sulphate and possibly downstream of ILK are important for full length OPG-Fc-induced SERCA-2a expression (Fig. 5-6d).

5.4 Perspective and Conclusion

Here, we uncover the critical role of the RANK/RANKL/OPG pathway in controlling muscle function and integrity in the mdx model of muscular dystrophy (Fig. 5-6e). Our observations that muscle RANK deletion or, to a greater extent, OPG-Fc treatment, primarily protect fast-twitch fibers are of paramount importance, since this powerful fiber type is more vulnerable than slow-twitch fibers to all forms of myopathies and defective Ca^{2+} release/uptake from SR are recognized as one hallmark of skeletal and cardiac muscle dysfunction^{26,48-51}. We anticipate that the present findings will be instrumental in the development of new treatments for several forms of neuromuscular and muscular diseases, and possibly aging or chronic systemic diseases in which a single therapeutic approach may be foreseeable to maintain both bone and skeletal muscle functions.

5.5 Disclosures Section

S.S.D., J.M.P. and J.F. conceived the project and its design. S.S.D., A.B.P., V.A.F., D.G. and A.R.T. performed experiments and data analysis. S.S.D and J.F. wrote the manuscript. All authors checked for scientific content and contributed to the final drafting of the

manuscript. This work was supported by grants to J.F. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, the Canadian Institutes of Health Research, Duchenne Alliance and Jese's Journey. We thank the Bioimaging platform at the CHU de Québec (CHUL), supported by the Canada Foundation for Innovation, for confocal analyses.

5.6 References

1. Liu, W. & Zhang, X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol. Med. Rep.* **11**, 3212–3218 (2015).
2. Hanada, R., Hanada, T., Sigl, V., Schramek, D. & Penninger, J. M. RANKL/RANK-beyond bones. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **89**, 647–656 (2011).
3. Baharuddin, N. A., Coates, D. E., Cullinan, M., Seymour, G. & Duncan, W. Localization of RANK, RANKL and osteoprotegerin during healing of surgically created periodontal defects in sheep. *J. Periodontal Res.* **50**, 211–219 (2015).
4. Honma, M., Ikebuchi, Y., Kariya, Y. & Suzuki, H. Regulatory Mechanisms of RANKL Presentation to Osteoclast Precursors. *Curr. Osteoporos. Rep.* **12**, 115–120 (2014).
5. Sköldenberg, O. *et al.* Denosumab for treating periprosthetic osteolysis; study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Musculoskelet. Disord.* **17**, 174 (2016).
6. Andrukhov, O. *et al.* Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness. *Dent. Mater. Off. Publ. Acad. Dent. Mater.* **32**, 1374–1384 (2016).
7. Nelson, C. A., Warren, J. T., Wang, M. W.-H., Teitelbaum, S. L. & Fremont, D. H. RANKL Employs Distinct Binding Modes to Engage RANK and the Osteoprotegerin Decoy Receptor. *Structure* **20**, 1971–1982 (2012).
8. Atkins, G. J. & Findlay, D. M. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* **23**, 2067–2079 (2012).
9. Reginster, J.-Y., Beaudart, C., Buckinx, F. & Bruyère, O. Osteoporosis and sarcopenia: two diseases or one? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **19**, 31–36 (2016).
10. Zhu, K. *et al.* Impaired Bone Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice with Muscle Atrophy. *J. Biol. Chem.* **290**, 8081–8094 (2015).
11. Compston, J. Emerging therapeutic concepts for muscle and bone preservation/building. *Bone* **80**, 150–156 (2015).
12. Dufresne, S. S. *et al.* Muscle RANK is a key regulator of calcium storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* ajpgcell.00285.2015 (2016). doi:10.1152/ajpcell.00285.2015
13. Dufresne, S. S. *et al.* Osteoprotegerin protects against muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* **185**, 920–926 (2015).
14. Dufresne, S. S., Boulanger-Piette, A., Bossé, S. & Frenette, J. Physiological role of receptor activator nuclear factor- κ B (RANK) in denervation-induced muscle atrophy and dysfunction. *Recept. Clin. Investig.* **3**, e13231–e13236 (2016).
15. Hanada, R. & Penninger, J. M. [Central regulation of body temperature by RANKL/RANK pathway]. *Clin. Calcium* **21**, 1201–1208 (2011).
16. Dumont, N. & Frenette, J. Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery in vivo and in vitro: a mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am. J. Pathol.* **176**, 2228–2235 (2010).
17. Thornton, A. M. *et al.* Store-operated Ca(2+) entry (SOCE) contributes to

normal skeletal muscle contractility in young but not in aged skeletal muscle. *Aging* **3**, 621–634 (2011).

18. Tatem, K. S. *et al.* Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring System for Skeletal Muscle Diseases. *J. Vis. Exp.* (2014). doi:10.3791/51785
19. Fajardo, V. A. *et al.* Co-Expression of SERCA Isoforms, Phospholamban and Sarcolipin in Human Skeletal Muscle Fibers. *PLoS ONE* **8**, e84304 (2013).
20. Lloyd, S. A. *et al.* Osteoprotegerin is an effective countermeasure for spaceflight-induced bone loss in mice. *Bone* **81**, 562–572 (2015).
21. Finnberg, N. K. *et al.* Agonists of the TRAIL Death Receptor DR5 Sensitize Intestinal Stem Cells to Chemotherapy-Induced Cell Death and Trigger Gastrointestinal Toxicity. *Cancer Res.* **76**, 700–712 (2016).
22. Smyth, M. J., Yagita, H. & McArthur, G. A. Combination Anti-CTLA-4 and Anti-RANKL in Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **34**, e104–106 (2016).
23. Lovering, R. M., Michaelson, L. & Ward, C. W. Malformed mdx myofibers have normal cytoskeletal architecture yet altered EC coupling and stress-induced Ca²⁺ signaling. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **297**, C571–580 (2009).
24. Capote, J., DiFranco, M. & Vergara, J. L. Excitation-contraction coupling alterations in mdx and utrophin/dystrophin double knockout mice: a comparative study. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **298**, C1077–1086 (2010).
25. Carlo, C., Pura, B., Magaly, R. & Marino, D. Differential effects of contractile potentiators on action potential-induced Ca(2+) transients of frog and mouse skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.* (2016). doi:10.1007/s10974-016-9455-3
26. Hernández-Ochoa, E. O., Vanegas, C., Iyer, S. R., Lovering, R. M. & Schneider, M. F. Alternating bipolar field stimulation identifies muscle fibers with defective excitability but maintained local Ca(2+) signals and contraction. *Skelet. Muscle* **6**, 6 (2016).
27. Blaauw, B. *et al.* Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **108**, 105–111 (2010).
28. Godfrey, C. *et al.* How much dystrophin is enough: the physiological consequences of different levels of dystrophin in the mdx mouse. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 4225–4237 (2015).
29. Marques, M. J., Ferretti, R., Vomero, V. U., Minatel, E. & Neto, H. S. Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **35**, 349–353 (2007).
30. Goonasekera, S. A. *et al.* Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* **121**, 1044–1052 (2011).
31. Mázala, D. A. G. *et al.* SERCA1 overexpression minimizes skeletal muscle damage in dystrophic mouse models. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **308**, C699–709 (2015).
32. Lambole, C. R., Murphy, R. M., McKenna, M. J. & Lamb, G. D. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *J. Physiol.* **592**, 1381–1395 (2014).
33. Traister, A. *et al.* Integrin-linked kinase mediates force transduction in cardiomyocytes by modulating SERCA2a/PLN function. *Nat. Commun.* **5**, 4533 (2014).

34. Kalra, J. *et al.* Validating the use of a luciferase labeled breast cancer cell line, MDA435LCC6, as a means to monitor tumor progression and to assess the therapeutic activity of an established anticancer drug, docetaxel (Dt) alone or in combination with the ILK inhibitor, QLT0267. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 826–838 (2011).
35. Wang, H.-V. *et al.* Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J. Cell Biol.* **180**, 1037–1049 (2008).
36. Benjamin, M. & Ralphs, J. R. Tendons and ligaments--an overview. *Histol. Histopathol.* **12**, 1135–1144 (1997).
37. Tarone, G. *et al.* Integrin function and regulation in development. *Int. J. Dev. Biol.* **44**, 725–731 (2000).
38. Brooker, S. M., Bond, A. M., Peng, C.-Y. & Kessler, J. A. β 1-integrin restricts astrocytic differentiation of adult hippocampal neural stem cells: β 1-Integrin Regulates Hippocampal NSC Fate. *Glia* **64**, 1235–1251 (2016).
39. Hou, Y., Mortimer, L. & Chadee, K. Entamoeba histolytica cysteine proteinase 5 binds integrin on colonic cells and stimulates NF κ B-mediated pro-inflammatory responses. *J. Biol. Chem.* **285**, 35497–35504 (2010).
40. Halayko, A. J. & Stelmack, G. L. The association of caveolae, actin, and the dystrophin-glycoprotein complex: a role in smooth muscle phenotype and function? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **83**, 877–891 (2005).
41. Heller, K. N. *et al.* Human α 7 Integrin Gene (*ITGA7*) Delivered by Adeno-Associated Virus Extends Survival of Severely Affected Dystrophin/Utrophin-Deficient Mice. *Hum. Gene Ther.* **26**, 647–656 (2015).
42. Miura, P. *et al.* Pharmacological activation of PPAR / stimulates utrophin A expression in skeletal muscle fibers and restores sarcolemmal integrity in mature mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 4640–4649 (2009).
43. Liu, J., Milner, D. J., Boppart, M. D., Ross, R. S. & Kaufman, S. J. 1D chain increases α 7 integrin and laminin and protects against sarcolemmal damage in mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1592–1603 (2012).
44. Lane, D. *et al.* Osteoprotegerin (OPG) activates integrin, focal adhesion kinase (FAK), and Akt signaling in ovarian cancer cells to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *J. Ovarian Res.* **6**, 82 (2013).
45. Yongchaitrakul, T., Manokawinchoke, J. & Pavasant, P. Osteoprotegerin induces osteopontin via syndecan-1 and phosphoinositol 3-kinase/Akt in human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* **44**, 776–783 (2009).
46. Janssen, M. L. *et al.* Tumor targeting with radiolabeled alpha(v)beta(3) integrin binding peptides in a nude mouse model. *Cancer Res.* **62**, 6146–6151 (2002).
47. Tkachenko, E. Syndecans: New Kids on the Signaling Block. *Circ. Res.* **96**, 488–500 (2005).
48. Treves, S., Jungbluth, H., Voermans, N., Muntoni, F. & Zorzato, F. Ca²⁺ handling abnormalities in early-onset muscle diseases: Novel concepts and perspectives. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2016). doi:10.1016/j.semcdb.2016.07.017
49. D’Adamo, M. C. *et al.* A Calsequestrin-1 Mutation Associated with a Skeletal Muscle Disease Alters Sarcoplasmic Ca²⁺ Release. *PloS One* **11**, e0155516 (2016).
50. Fernandez-Tenorio, M. & Niggli, E. Real-time intra-store confocal Ca²⁺ imaging in isolated mouse cardiomyocytes. *Cell Calcium* **60**, 331–340 (2016).
51. Liang, X. *et al.* Characterization of endonuclease G and mitochondria-

sarcoplasmic reticulum-related proteins during cardiac hypertrophy. *Pharm.* **70**, 586–592 (2015).

5.7 Figures and Legends

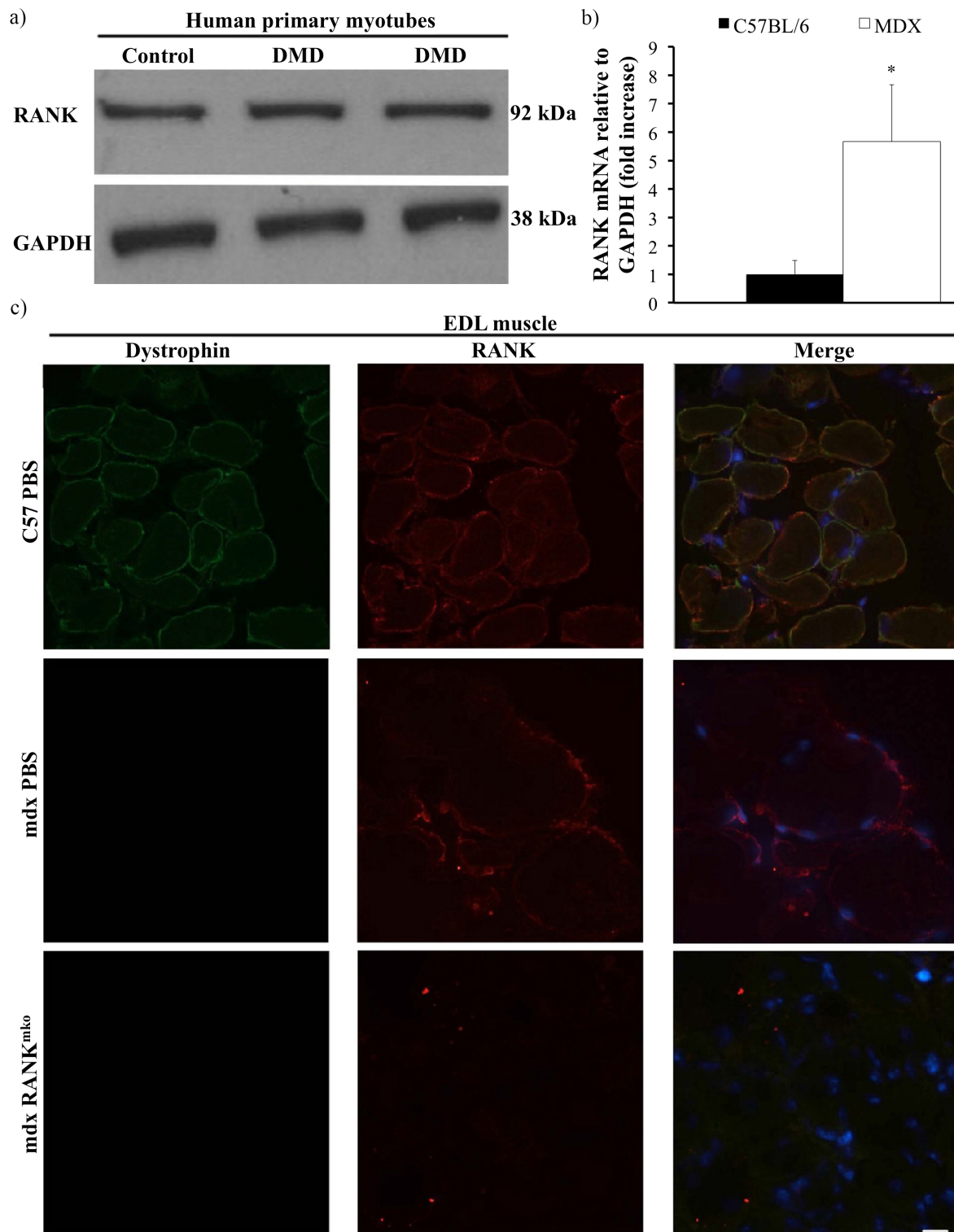


Figure 5-1: RANK expression in human primary myotubes and mice skeletal muscles.

(a) Western blot showing that RANK protein is expressed in fully differentiated human primary myotubes from one infant with no DMD-related disease (Control) and two infants diagnosed for DMD (DMD). GAPDH is shown as a loading control. **(b)** A quantitative real-time PCR analysis revealed that muscle RANK expression is increased 5.5 fold in dystrophic EDL muscles relative to control muscles. **(c)** Confocal images showing colocalization of dystrophin (green) and RANK (red) at basal membrane in EDL muscles from C57BL/6 mice. Dystrophin was not present in EDL muscles from mdx mice while dystrophin and RANK proteins are absent in EDL muscles from mdx-RANKmko mice. Data are shown as mean \pm s.e.m., one way ANOVA and Tukey's post-hoc tests * $p < 0.05$.

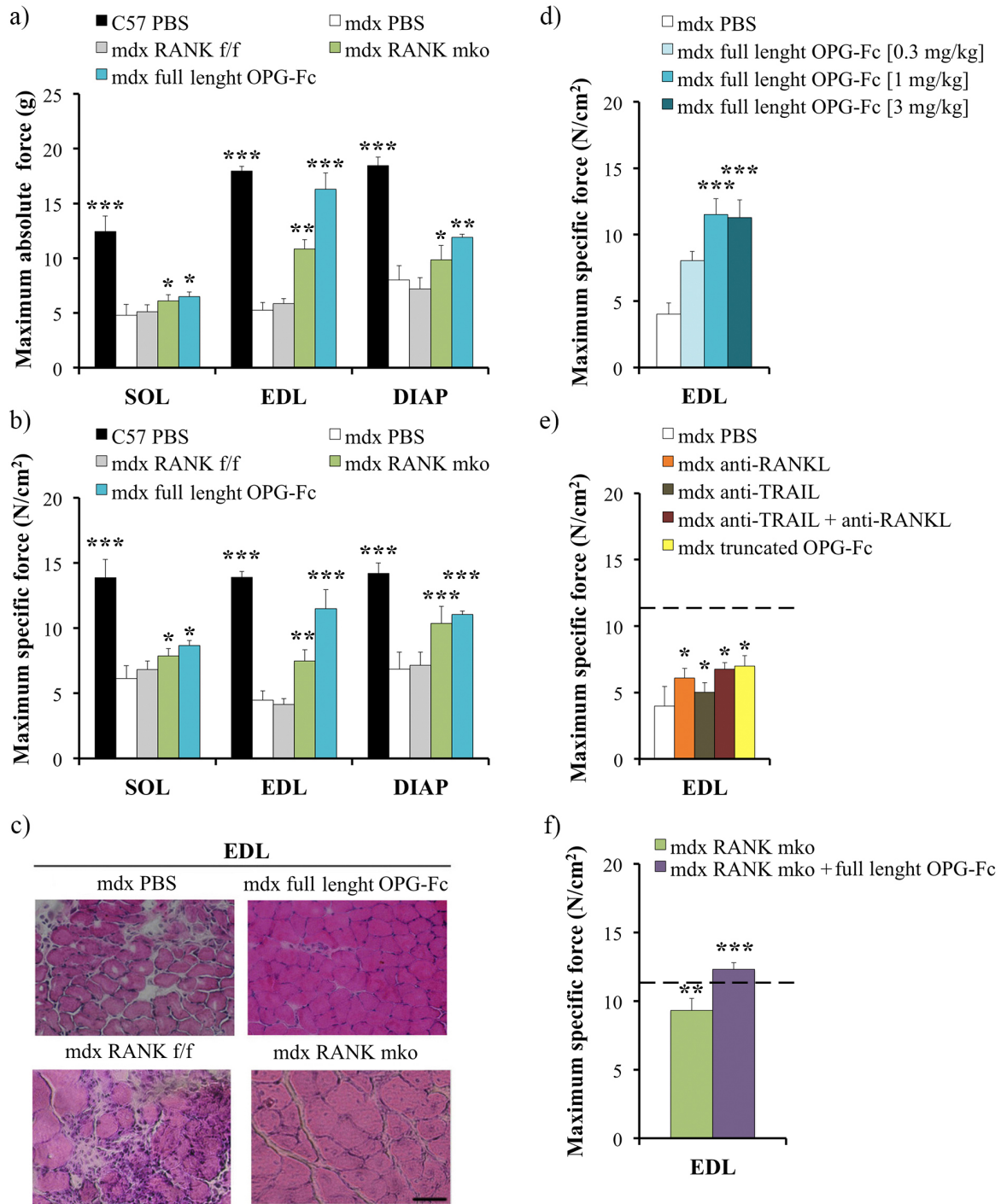


Figure 5-2: Full-length OPG-Fc, and to a lesser extent RANK deletion, mitigates muscular dystrophy in fast-twitch skeletal muscles.

(a) Maximum absolute force and (b) maximum specific force of Sol, EDL and DIA muscles were performed on 5-week-old C57BL/10j, mdx mice treated from days 25 to 35 with vehicle (PBS) or full-length OPG-Fc [1 mg/kg/d], mdxRANK^{mko} or mdxRANK^{f/f}

(n=6-8 per experimental group). Uninjured muscles from C57BL6/10j mice were used as controls. Full-length OPG-Fc treatment and, to a lesser extent, muscle RANK deletion, rescued muscle force, especially in fast-twitch EDL muscles. **(c)** EDL muscles from PBS-treated mdx mice or mdx-RANK^{f/f} showed irregular fiber sizes and focal and accumulation of perimysial connective tissue. Full-length OPG-Fc [1 mg/kg/d] treatments or RANK deletion (mdx-RANK^{mk0}) significantly protect the integrity and structure of dystrophic EDL muscles. **(d)** Full-length OPG-Fc [3 mg/kg/d] for 10 days is not superior to [1 mg/kg/d], this latter concentration is thus the optimal dose. **(e)** Contractile properties of EDL muscles were performed on 5-week-old mdx mice treated from days 25 to 35 with OPG-Fc full length i.p. [1 mg/kg/d] or anti-RANKL or/and anti-TRAIL antibodies or truncated-OPG-Fc. The inhibition of RANKL and TRAIL for 10 days increased the force production of dystrophic EDL muscles by 45% and 17% respectively. The truncated OPG-Fc had similar effects than anti-RANKL, increasing the force production of EDL muscles by 43%, which were markedly lower than dystrophic EDL muscles from full-length OPG-treated mdx mice (233%). Thus, OPG-Fc full-length acts independently of RANKL/RANK and TRAIL to enhance force in mdx mice. **(f)** mdxRANK^{mk0} mice treated from days 25 to 35 with full-length OPG-Fc [1 mg/kg/d] is much more effective in force production than RANK deletion alone. The dotted line is the visual representation of full-length OPG-Fc data. Data are shown as mean values +/- s.e.m.; one way ANOVA and Tukey's post-hoc tests * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Bar = 100 μ m.

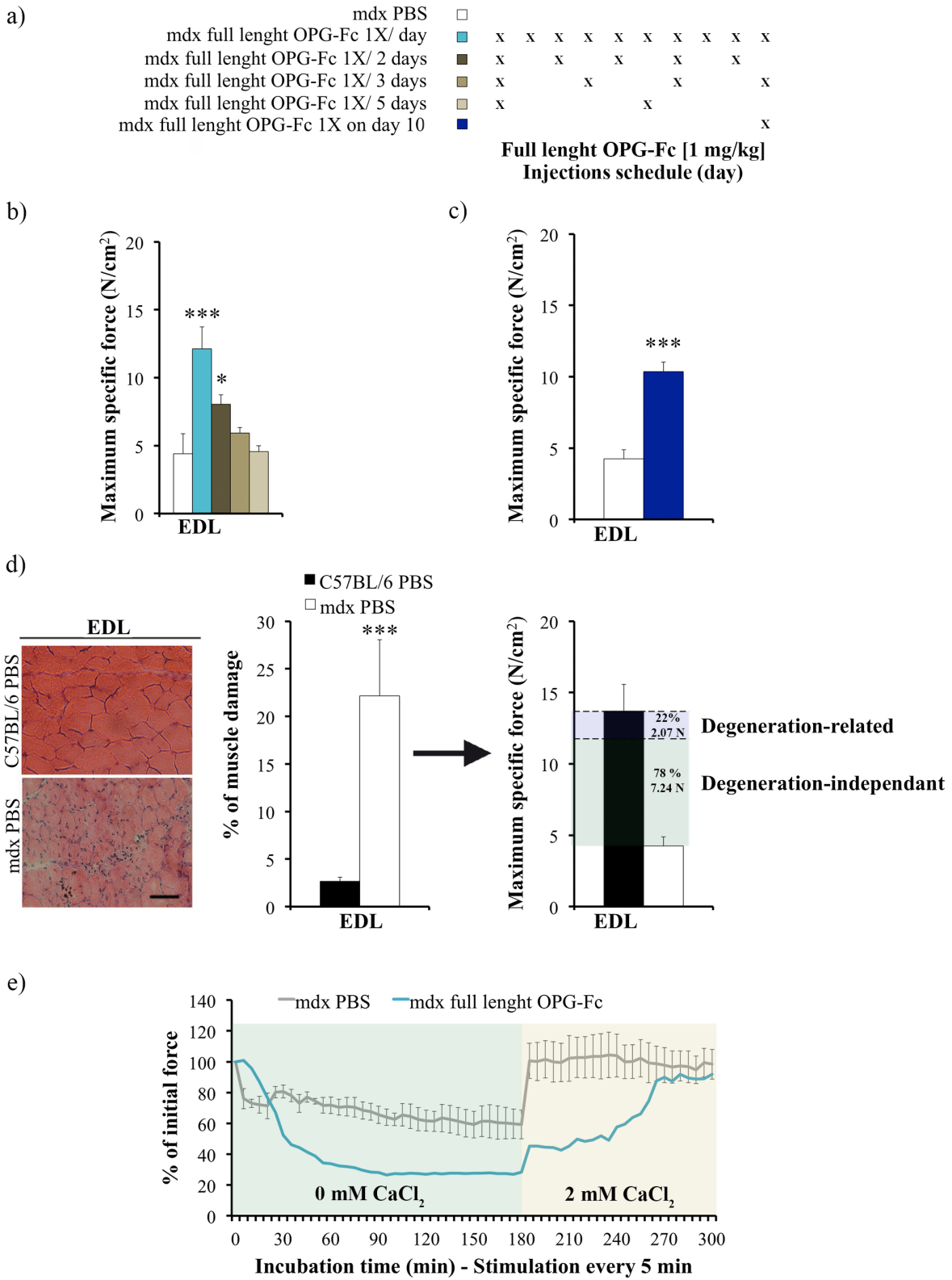


Figure 5-3: Extracellular Ca^{2+} is necessary for enhancing force production in full-length OPG-treated dystrophic mice.

(a-b) Maximum specific force of EDL muscles were performed on 5-week-old mdx mice treated with vehicle (PBS) or full-length OPG-Fc [1 mg/kg/d] every 1, 2, 3 or 5 days (n=6-8 per group) for 10 days. Daily full-length OPG-Fc treatment is required to mitigate muscular dystrophy in fast-twitch EDL muscles. **(c)** A single treatment with the full-length OPG-Fc in 5-week-old mdx mice increased very significantly force production of dystrophic EDL muscles (+136%). **(d)** The extent of muscle damage (22%) is insufficient to explain the significant decline in force (70%) of dystrophic EDL muscles. Therefore, an important part of the dysfunction (78%) is degeneration-independent which may explain the inotropic effect of full length OPG-Fc after only 24h in dystrophic EDL muscles. **(e)** Force production of EDL muscles from PBS-treated and full length OPG-Fc treated mdx mice declined by 41% and 72%, respectively in Ca²⁺ free solution. When Ca²⁺ free solution was replaced by a physiological solution containing 2.5 mM Ca²⁺ force production completely recovered in dystrophic EDL muscles, indicating full-length OPG-Fc depends at least in part on external Ca²⁺ ions to enhance force generation in dystrophic muscles. Data are shown as mean values +/- s.e.m.; Mann-Whitney U test or one way ANOVA and Tukey's post-hoc tests * p<0.05, *** p<0.001. Bars =100 µm.

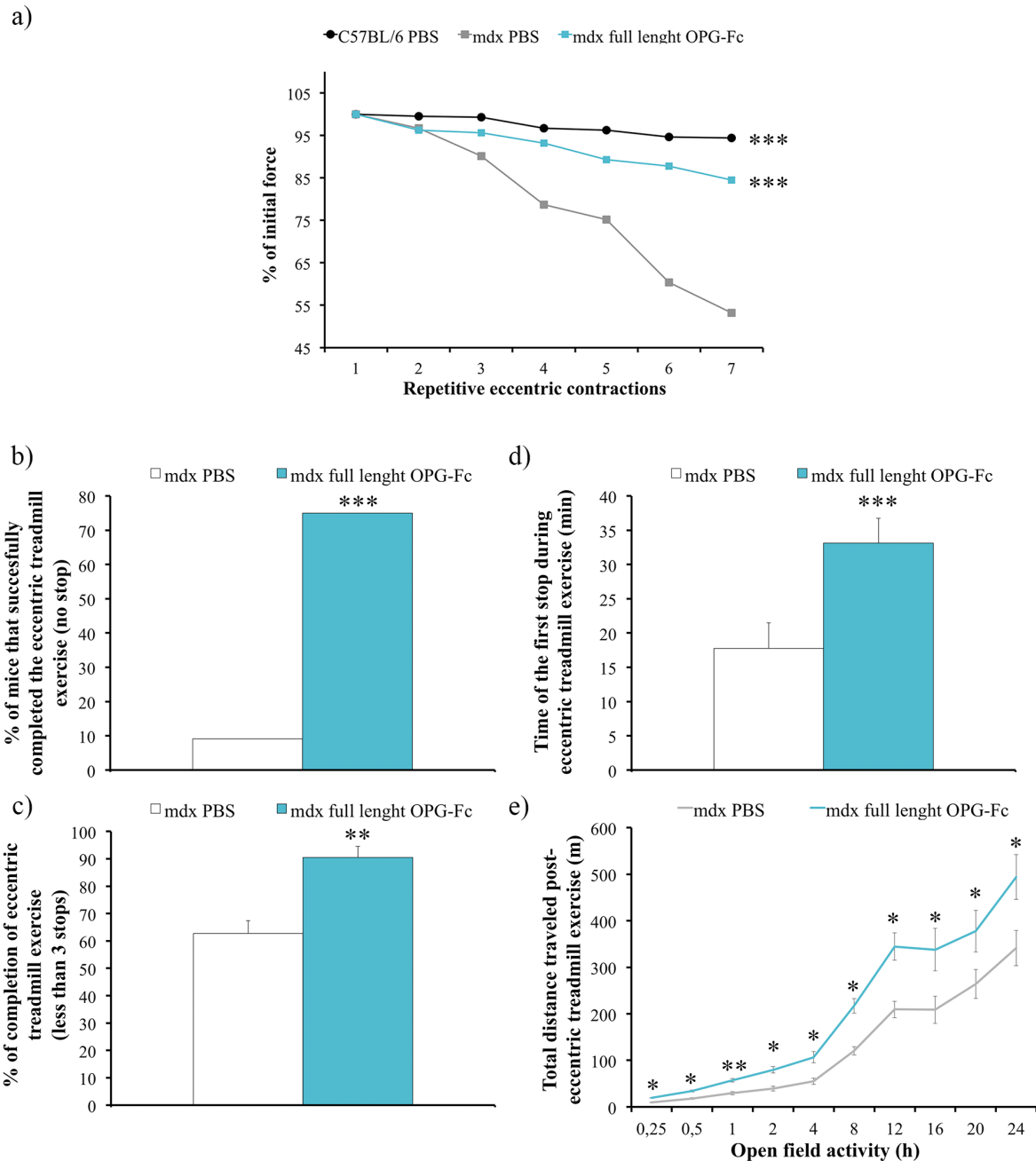


Figure 5-4: Full-length OPG-Fc prevents eccentric contractions-induced muscle damage and increased functional performance post-eccentric downhill running.

(a) *Ex vivo* eccentric protocol of EDL muscles were performed on 5-week-old C57BL/10j and mdx mice treated from days 25 to 35 with vehicle (PBS) or full-length OPG-Fc [1 mg/kg/d] (n=6 per group). Full-length OPG-Fc significantly prevented the loss of force following repetitive eccentric contractions. (b) In addition, functional performance was assessed on 6-month-old mdx mice treated with vehicle (PBS) or full-length OPG-Fc [1

mg/kg/d] (n=12 per group) for 10 days prior downhill running. 10% of the PBS-treated and 75% of the full-length OPG-Fc treated mdx mice were able to complete the downhill running protocol at a speed of 10m/s for 45min. **(c)** PBS and full-length OPG-Fc treated mice that failed to complete the protocol did respectively 63% and 91% of the total distance. **(d)** The first stop for PBS-treated mdx mice occurred after 12 min, while the full-length OPG-treated mdx mice stopped for the first time after 27min of downhill running. **(e)** The full-length OPG-Fc treatment increased by roughly 45% the voluntary cage activity post-eccentric downhill running (Fig 4e). Data are shown as mean values +/- s.e.m.; one way ANOVA and Tukey's post-hoc tests * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

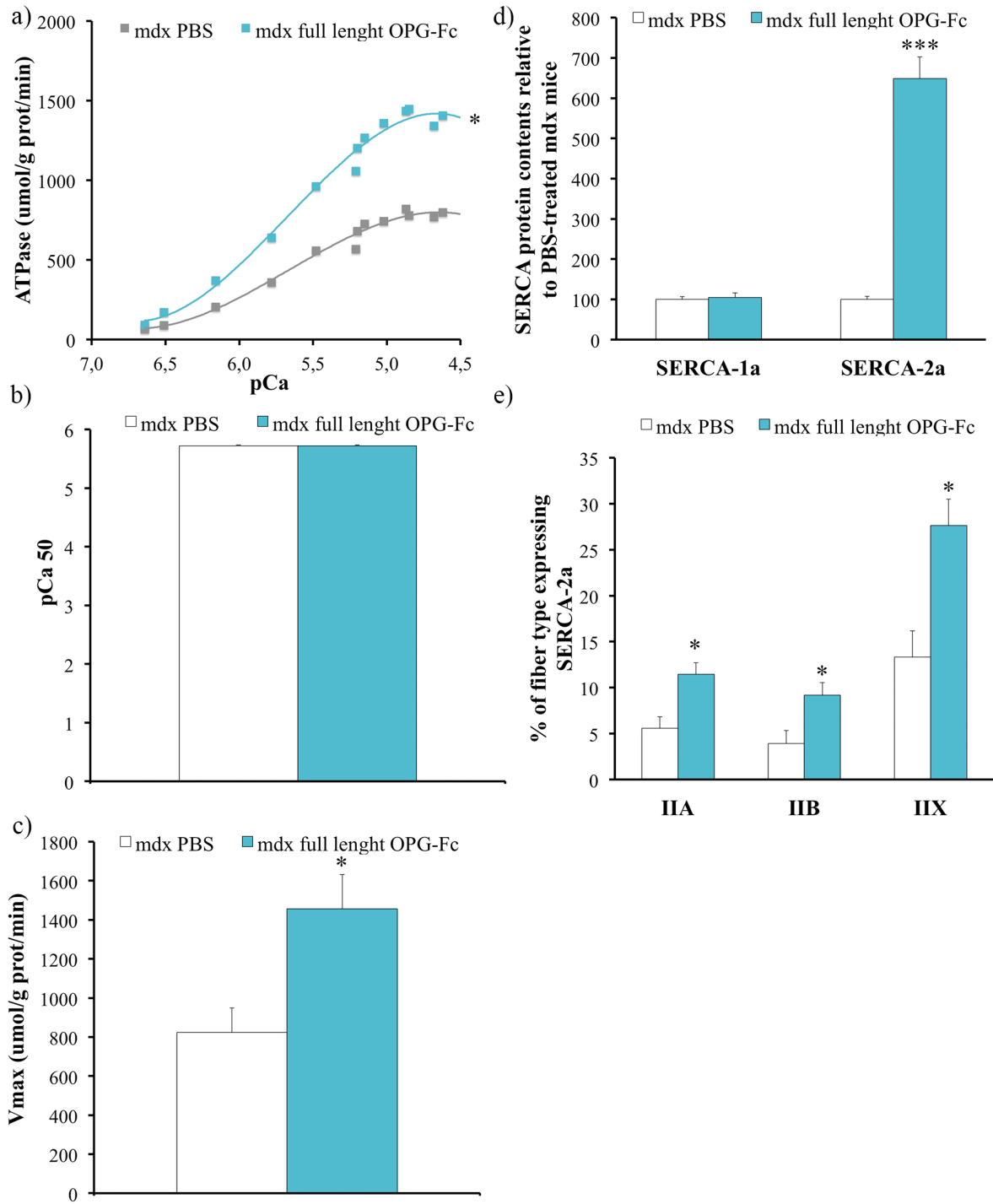


Figure 5-5: Full-length OPG-Fc treatment increased SERCA activity and SERCA-2a protein content in fast-twitch dystrophic EDL muscles

(a) OPG-Fc [1 mg/kg/d] treatment increased SERCA activity over different Ca^{2+} concentrations ranging from pCa 7,0-4,5 in homogenized dystrophic EDL muscles **(b)** with no change in pCa50 value. **(c)** OPG-Fc treatment increased maximal ATPase activity

(Vmax) by 80% in dystrophic EDL muscles. **(d)** Consistent with an increase in SERCA activity, OPG-Fc markedly enhanced SERCA-2a (650%) but not SERCA-1a content, compared to PBS-treated mdx mice. **(e)** Double immunohistochemistry labeling showed that the proportion of fast-twitch fiber types (IIa, IIB and IIX) expressing slow-twitch SERCA-2a doubled in dystrophic EDL muscles from OPG-Fc treated mdx mice. Data are shown as mean values \pm s.e.m.; one way ANOVA and Tukey's post-hoc tests * $p < 0.05$.

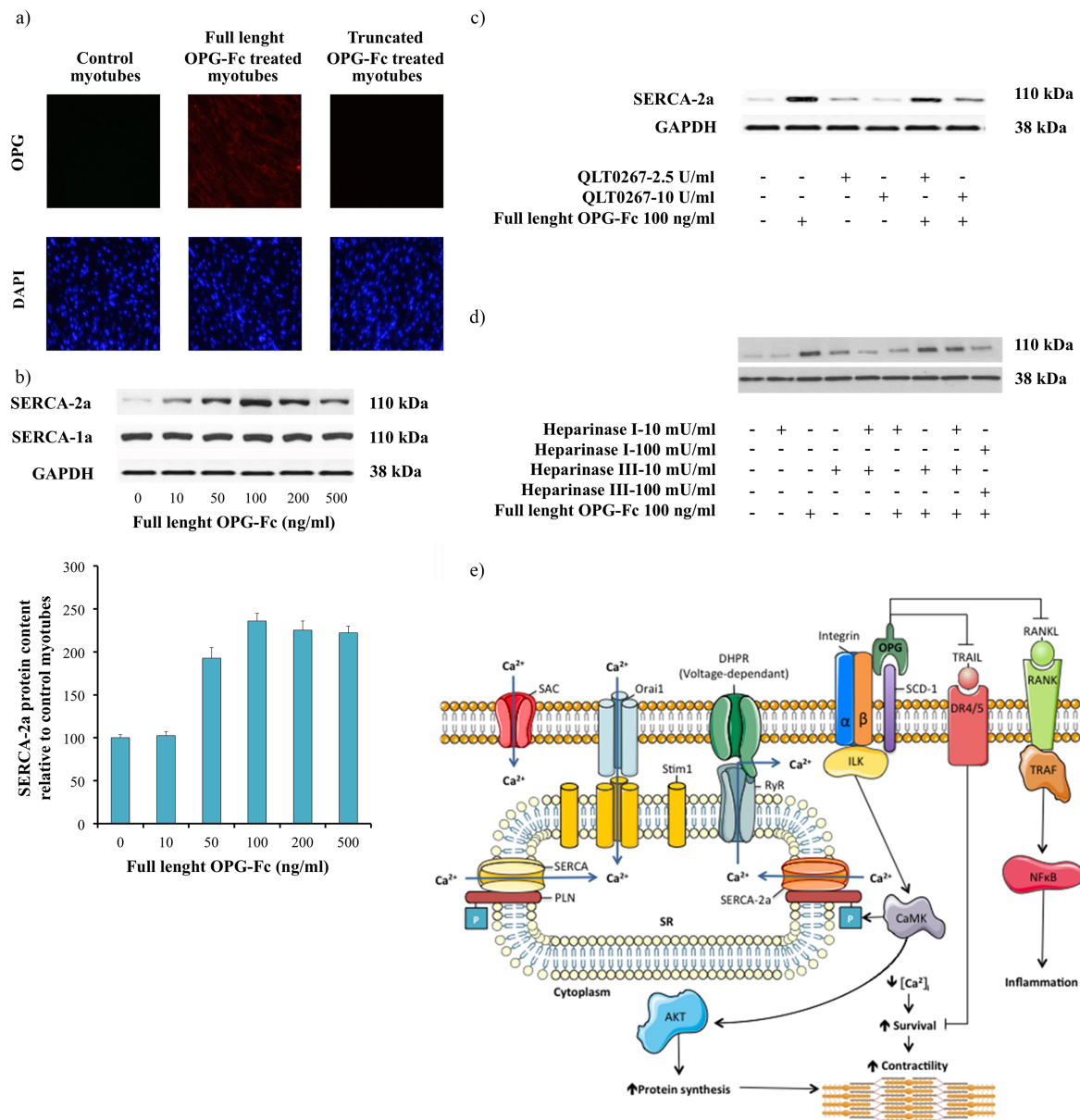


Figure 5-6: Full-length OPG-Fc binds directly to skeletal muscle and acts independently of RANKL/RANK.

(a) Confocal images showed that full-length OPG-Fc binds directly to muscle cells *in vitro*. **(b)** Fully differentiated C2C12 myotubes stimulated with a wide range of full-length OPG-Fc doses increased SERCA-2a, but not SERCA-1a protein content. **(c)** The integrin linked kinase (ILK) inhibitor (QLT0267; [2.5 or 10 U/ml]) reduced SERCA-2a expression in full-length OPG-Fc stimulated myotubes. **(d)** Heparinases I or III ([10 or 100 mU/ml])

treatment also attenuated OPG-Fc-induced SERCA-2a effects, suggesting that heparin binding domain of full-length OPG-Fc is the most active binding site on skeletal muscle cells. **(e)** Schematic representation and possible pathways through which full-length OPG-Fc may exert its effects on skeletal muscle. The full-length OPG-Fc binds to RANKL, TRAIL and also on an unknown molecule, possibly syndecan-1 (SDC-1), a proteoglycan containing heparin and heparan sulphate molecules. The binding to SDC-1 would induce the activation and clustering of integrin by lateral interactions leading to ILK activation and increase in SERCA-2a content.. Data are shown as mean values +/- s.e.m.; one way ANOVA and Tukey's post-hoc tests * $p < 0.05$. Please note that further study will be required to fully understand how full-length OPG-Fc protects dystrophic muscles and enhances functional performance.

Conclusion & perspectives

La stratégie expérimentale actuelle la plus étudiée par la communauté scientifique pour lutter contre la DMD demeure l'identification d'une méthode permettant la correction du gène défectueux de la dystrophine. Le concept théorique derrière une approche génétique est parfaitement cohérent mais sa faisabilité technique représente un immense défi. Les glucocorticoïdes, découverts il y a plus de 60 ans²⁰⁷, sont encore aujourd'hui le meilleur traitement même si les cliniciens sont très au fait des effets délétères sur l'os. La présente thèse visait à poser un regard différent sur les dysfonctions musculaires et osseuses dans la DMD et la possibilité que ces dysfonctions soient liées par une voie de signalisation commune, soit RANK/RANKL/OPG. Dans cette section, les principaux résultats et limitations seront brièvement abordés ainsi que les perspectives qui en découlent.

6.1 RANK est exprimé dans le muscle squelettique et impliqué dans la physiopathologie de ce tissu post-dénervation

L'objectif du chapitre II était de valider si la voie de signalisation la plus importante du remodelage osseux, soit RANK/RANKL/OPG, est aussi impliquée dans la dysfonction musculaire. Nous avons d'abord démontré par microscopie confocale que RANK est localisé sur les membranes des muscles squelettiques lents et rapides. Basé sur l'effet protecteur de la suppression de RANK sur la masse osseuse, nous avons utilisé une approche Cre-Lox afin d'inactiver spécifiquement l'expression de RANK musculaire (RANK^{mko})²¹⁹. L'hypothèse de recherche était que la fonction des muscles à phénotypes rapides (EDL) et lents (Sol) serait préservée chez les souris RANK^{mko} post-dénervation. Puisque la liaison RANK/RANKL est connue pour initier diverses voies signalétiques dépendantes du Ca²⁺, nous avons sélectionné de manière préférentielle, les processus biologiques musculaires liés au Ca²⁺. Nous avons initialement mis en lumière que la force des muscles rapides EDL RANK^{mko} des souris dénervées est augmentée, malgré la présence d'une atrophie plus importante de ce tissu. Bien qu'au premier regard ces observations

semblent contradictoires, en absence de gain de masse musculaire, l'ampleur de la force produite peut être influencée par la durée et/ou la quantité de Ca^{2+} libérée dans le cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ou par la sensibilité de la troponine C au Ca^{2+} ²²⁰. Ainsi une réduction du contenu calcique initial emmagasiné dans le RS diminuera l'amplitude de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libérée à la suite d'une contraction⁵⁵. À l'inverse, Lamboley et al. (2015) ont démontré qu'une augmentation du contenu calcique du RS ($[\text{Ca}^{2+}]_{rs}$) provoque une augmentation de la force générée par le muscle. En fait, un muscle qui reçoit un signal électro-chimique d'un seul potentiel d'action, produit une secousse musculaire, dont la tension créée est largement inférieure à celle provenant d'une réponse tétanique secondaire à la sommation de plusieurs potentiels d'action²²⁰. Posterino et al. (2003) ont constaté qu'une surcharge de la $[\text{Ca}^{2+}]_{rs}$ des fibres musculaires rapides isolées favorise une augmentation de l'amplitude et de la vitesse de production de la tension créée en réponse à une secousse musculaire²²¹. Allant de pair avec ces études, les muscles EDL des souris RANK^{mko} dénervées ont une concentration totale de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_t$), un indicateur indirect de la $[\text{Ca}^{2+}]_{rs}$ ^{55,220}, significativement supérieure aux animaux sauvages dénervés. De plus, cette variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_t$ n'était pas accompagnée de changement dans la concentration de la calsequestrine (CSQ), le tampon calcique principal du RS. Nous pouvons ainsi croire que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libérée fût relativement constante et que ces effets sur les propriétés contractiles semblent provenir d'une cinétique de recapture du Ca^{2+} plus lente, augmentant par le fait même la disponibilité du Ca^{2+} pour la troponine C et conduisant alors à une production de force musculaire augmentée^{59,179}. Toutefois, même si environ 97 % du contenu en Ca^{2+} dans le muscle au repos se retrouve dans le RS, le choix de mesurer uniquement la $[\text{Ca}^{2+}]_t$ et non l'ensemble des diverses sources de Ca^{2+} (ex. Ca^{2+} extracellulaire)^{220,222}, fragilise la portée des conclusions associées et contribue à rendre notre compréhension spéculative sur la relation RANK et RS. En outre, malgré que le SR joue des rôles indispensables dans l'homéostasie du Ca^{2+} , des difficultés techniques importantes limitent l'analyse de la dynamique des réservoirs calciques. Afin de repousser les limitations techniques, Okubo et al. (2015) ont développé un modèle génétique d'indicateur fluorescent du réticulum endoplasmique (RE; homologue structurel au RS chez les cellules non contractiles) pour visualiser la dynamique du Ca^{2+} . Selon leur analyse, l'inhibition de la SERCA par deux agents pharmacologiques (Cyclopiazonic Acid ou 2,5-Di-t-butyl-1,4-benzohydroquinone) provoque seulement une

perturbation minimale dans le réapprovisionnement du ER en Ca^{2+} après une stimulation et une libération préalable du Ca^{2+} . Nous nous sommes donc intéressés à l'expression et à l'activité de la pompe ATPasique SERCA pour mieux étudier son implication dans la $[\text{Ca}^{2+}]_t$ des muscles EDL des souris RANK^{mko} dénervées. L'absence de RANK réduit significativement l'activité enzymatique de SERCA, permettant possiblement de prolonger l'influx de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transitoire lors d'une contraction isométrique, augmentant la force tout en diminuant la résistance à la fatigue. Le ratio de la force produite lors d'une secousse sur la force isométrique maximale appuie cette hypothèse. Les mécanismes exacts pouvant expliquer la réduction de l'activité de la pompe ATPasique SERCA en absence de RANK demeurent encore inconnus. Généralement, lorsqu'une réduction de l'activité de la pompe ATPasique SERCA est corrélée à une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{rs}$, cela suggère que la source de cette augmentation calcique ne proviendrait pas de l'environnement intracellulaire. Nous nous sommes ainsi intéressés aux voies d'entrée extracellulaire. Les canaux *Store-operated Ca^{2+} entry* (SOCE), dont *stromal interaction molécule 1* (STIM) et Orai1, sont connus pour être sensibles au niveau de la $[\text{Ca}^{2+}]_{rs}$ et de s'activer lorsque ce dernier paramètre est anormalement bas^{73,78}. Le mécanisme utilisé par STIM-Orai1 pour augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_{rs}$ n'est pas clairement compris. Putney et al. (2011) ont proposé que le Ca^{2+} puisse se déplacer directement de l'espace extracellulaire au RS sans transiter par le cytoplasme et par conséquent, sans l'aide de la pompe ATPasique SERCA⁷⁴. Appuyant cette idée, les myotubes Stim1^{+/+}, mais pas ceux Stim1^{-/-}, conservent des $[\text{Ca}^{2+}]_{rs}$ stables lorsqu'ils sont exposés à une série de signaux dépolarisants. Ces résultats suggèrent aussi que STIM1 est important pour le réapprovisionnement du RS suite à une dépolarisation membranaire. De plus, les myotubes Stim1^{-/-} possèdent une $[\text{Ca}^{2+}]_{rs}$ basale inférieure aux myotubes STIM1^{+/+}⁷⁸. L'absence de RANK dans les muscles EDL des souris dénervées augmente l'expression de STIM1 de 184 % et pourrait expliquer partiellement la discordance entre la réduction de l'activité de la pompe ATPasique et l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_t$. Nos résultats démontrent clairement que les rôles physiopathologiques de la voie RANK/RANKL/OPG s'étendent bien au-delà du remodelage osseux. Le mécanisme complet par lequel cette triade influence le muscle squelettique demeure encore spéculatif et non élucidé, mais ces travaux salués par la revue *American Journal Physiology (Cell physiology)* offrent les premières évidences de ses fonctions sur ledit tissu.

6.2 La fonction musculaire des souris dystrophiques traitées avec l'OPG-Fc est préservée par un mécanisme indépendant de RANK/RANKL.

Aux chapitres III et V, notre intérêt s'est porté à évaluer l'influence de la triade RANK/RANKL/OPG dans la prévention de la perte fonctionnelle, *in vivo*, du muscle dystrophique des souris *mdx*. Les résultats précédents nous ont permis de constater que l'absence de RANK dans le muscle squelettique des souris dénervées limite la perte de force associée à dénervation. Nous avons donc testé l'efficacité de l'OPG-Fc à inhiber l'interaction RANK/RANKL dans un modèle de souris dystrophiques (*mdx*) connues pour présenter une dérégulation du $[Ca^{2+}]_i$, une vulnérabilité aux contractions excentriques et des cycles de dégénérescences musculaires. Des injections quotidiennes d'OPG-Fc pendant 10 jours durant le premier cycle de dégénérescence sur des souris *mdx* a conduit à une augmentation spectaculaire de l'intégrité musculaire, de la force musculaire de l'EDL (233 %), de la résistance aux contractions excentriques et de la capacité fonctionnelle par rapport aux souris *mdx* contrôles. Parallèlement aux injections d'OPG-Fc, nous avons croisé des souris *mdx* avec des souris *RANK^{mko}* afin de créer une souris ne possédant ni la dystrophine, ni RANK dans ses muscles (*mdx-RANK^{mko}*). L'absence de RANK dans les muscles EDL dystrophiques a augmenté la force musculaire de 83%. Bien que ce gain soit notable et significatif, il est largement inférieur à celui des souris traitées par injections à l'OPG-Fc. Les injections d'OPG-Fc aux souris *mdx-RANK^{mko}* augmentent la force musculaire et reproduisent les gains de force des souris *mdx* traitées à l'OPG-Fc nous indiquant que l'effet de l'OPG-Fc dans le muscle squelettique est en partie indépendant de RANK/RANKL. Au-delà de ses quatre domaines de liaison à RANKL, l'OPG-Fc possède deux domaines pour TRAIL et un domaine héparine¹¹¹. Nous avons par la suite injecté trois nouvelles molécules représentant les divers domaines de l'OPG, suivant le même protocole d'administration que l'OPG-Fc, soit anti-RANKL, anti-TRAIL et l'OPG-Fc tronquée qui ne possèdent que les quatre domaines RANKL. Ceux-ci ont respectivement augmenté la force des muscles EDL des souris de 45 %, 17 % et 43 %. Par déduction, nous spéculons

donc que le domaine de liaison à l'héparine de l'OPG-Fc pourrait être le site actif pour contrer la dystrophie musculaire de Duchenne.

Une corrélation entre les pertes de force et les aires de dommages musculaires des souris dystrophiques non traitées, nous permet de mettre en lumière une incohérence entre la dysfonction musculaire et la dégénérescence des tissus où les pertes de force sont 3 à 4 fois plus importantes que les dommages cellulaires mesurés. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il existerait une incapacité inhérente aux muscles dystrophiques à se contracter et qu'une mauvaise gestion du Ca^{2+} en serait l'une des causes. Nous avons donc injecté une dose unique d'OPG-Fc au 34e jour de vie des souris *mdx* et après seulement 24 heures, la force *ex vivo* de l'EDL a augmenté de 136%. Il est clair qu'il existe aucune régénérescence en 24h et que l'OPG-Fc a un effet inotrope et améliorerait la cinématique du calcium transitoire ou les réserves calciques dans le RS. Pour examiner si le Ca^{2+} extracellulaire favorise la production de force, les muscles dystrophiques EDL provenant de souris traitées avec du PBS ou de l'OPG-Fc ont été stimulés dans une solution physiologique contenant 2 mM Ca^{2+} , puis transférés dans une solution physiologique sans Ca^{2+} et les forces musculaires étaient enregistrées à toutes les 5 min sur une période de 300 min. Nos résultats préliminaires montrent que l'absence de Ca^{2+} extracellulaire réduit les effets de OPG-Fc et semblent suggérer que le Ca^{2+} extracellulaire est essentiel aux gains de force. Cependant, puisque ces données sont préliminaires et qu'elles n'incluent pas d'inhibiteurs spécifiques des divers canaux calciques extracellulaires, aucune conclusion et mécanisme réel de l'OPG-Fc ne peuvent être formulés sous la forme actuelle.

Les muscles rapides dystrophiques sont particulièrement vulnérables aux contractions excentriques se traduisant ainsi par une augmentation de leur dégénérescence face aux efforts physiques exigés par les activités de la vie quotidienne (AVQ)^{195,224}. Malgré que plusieurs agents pharmacologiques puissent induire une augmentation de la force isométrique *ex vivo*, la réalité est fort différente face aux contractions excentriques^{207,225}. Nous avons donc soumis les muscles EDL des souris *mdx* traitées à l'OPG-Fc à un protocole de contractions excentriques. Nous avons observé que les muscles traités à l'OPG-Fc préservaient de façon très significative la force suite aux contractions

excentriques répétées *ex vivo*. Bien que les propriétés contractiles *ex vivo* soient les mesures de référence en physiologie musculaire, nous avons aussi évalué la performance fonctionnelle des souris dystrophiques traitées à l'OPG suivant une épreuve de tapis roulant incliné. Sur le tapis roulant incliné, seulement 10 % des souris *mdx* non traitées ont réussi à terminer les 45 minutes de course. Dans ce même groupe, celles ayant échouées avaient réalisé 63 % de l'entraînement prescrit avant d'être retirées. Dans ces mêmes conditions, 75 % des souris dystrophiques traitées avec l'OPG-Fc ont terminé avec succès ce protocole. Il est encourageant d'observer que celles n'ayant pas atteint le fil d'arrivée avaient réalisé 91 % de l'objectif initial. Immédiatement après ce protocole, nous avons mesuré l'activité volontaire de ces animaux par un logiciel de suivi-vidéo pendant 24 heures. La distance parcourue par les souris *mdx* traitées à l'OPG-Fc a été de 45 % supérieure à celle des souris *mdx* non traitées. L'activité volontaire reflète la fonction locomotrice et est régulièrement utilisée comme indicateur fonctionnel de la progression de la maladie chez des souris dystrophiques^{226,227}. Cette mesure fonctionnelle démontre sans l'ombre d'un doute que l'efficacité de l'OPG-Fc ne se limite pas aux muscles dystrophiques EDL.

En accord avec le fondement de la théorie du désordre calcique suggérant que les dysfonctions des canaux calciques soient un aspect clé de la physiopathologie de la DMD et que l'intégrité des muscles intrinsèques du larynx qui possèdent naturellement une plus grande expression de la pompe ATPasique SERCA soit préservée chez les souris *mdx*, nous avons étudié le comportement de ladite pompe en présence d'OPG-Fc^{190,192}. L'OPG-Fc a significativement augmenté l'activité maximale de SERCA et l'expression protéique de son isoforme SERCA-2a de 650 %, alors que celle de SERCA-1a est demeurée inchangée dans le muscle EDL. Ce résultat est surprenant, puisque SERCA-2a est majoritairement exprimée dans les fibres lentes et que le muscle EDL est constitué essentiellement de fibres rapides connues pour être associées à SERCA-1a. Nos analyses immunohistochimiques démontrent que le pourcentage de fibres rapides (IIA, IIX, IIB) exprimant l'isoforme SERCA-2a a doublé dans le muscle EDL des souris *mdx* traitées à l'OPG-Fc. Ceci ouvre la porte à la possibilité que le phénotype musculaire et l'expression de l'isoforme de SERCA requise pour répondre à la fonction du muscle ne soient peut-être pas exclusivement sous le contrôle des environnements mécanique, hormonal ou nerveux et que la voie de

signalisation RANK/RANKL/OPG pourrait réguler partiellement ce processus. Puisque l'OPG-Fc est connue pour inhiber l'interaction RANK/RANKL, mais que celle-ci provoque une réponse diamétralement opposée à l'absence de RANK dans le muscle squelettique sur SERCA, il est plausible que l'OPG-Fc pourrait avoir une cible inconnue dans ce tissu indépendant de RANK/RANKL. Toutefois, nos expériences et analyses sur le comportement de SERCA en présence d'OPG-Fc ont été exclusivement conduites à un seul point dans le temps, soit à 35 jours de vie, limitant ainsi l'extrapolation de nos conclusions à d'autres phases de la progression de la maladie.

6.3 L'OPG-Fc et le formotérol ont des effets protecteurs et synergistes sur la fonction des muscles lents des souris *mdx*

Les habiletés des β -agonistes à induire une hypertrophie musculaire, une augmentation de la force musculaire et une réduction des dommages secondaires aux contractions excentriques font en sorte que cette approche pharmacologique est la plus fréquemment utilisée pour contrer la DMD^{194,195,202,203,229–231}. Cependant, leurs applications cliniques sont limitées par leurs effets secondaires à long terme, entre autres, sur le muscle cardiaque et le tissu osseux²⁰⁷. Il est bien connu que l'OPG-Fc inhibe l'ostéoporose en se liant à RANKL et que nous avons ultérieurement démontré son action régulatrice sur la pompe ATPasique SERCA un déterminant essentiel à l'homéostasie et à la performance des tissus musculaires squelettique et cardiaque. Les travaux du chapitre IV vise donc à vérifier si l'OPG-Fc potentialise les bienfaits des β -agonistes sur les muscles dystrophiques. Nous avons d'abord démontré que les muscles Sol et EDL des souris *mdx* avaient un contenu naturellement faible en récepteur adrénergiques β_2 (β_2 -AR) en comparaison aux souris sauvages et qu'un traitement de 10 jours avec de l'OPG-Fc restaure complètement son expression. L'utilisation du formotérol, un β -agoniste, à faible et forte dose n'a eu aucun impact sur cette variable. Nous avons ensuite étudié les propriétés contractiles de ces muscles pour vérifier si le gain d'expression du β_2 -AR se traduit par une diminution de la dose de formotérol nécessaire pour avoir un effet sur la force musculaire. Les résultats précédents démontraient que l'OPG-Fc augmentait radicalement la force des muscles rapides EDL,

mais avait un effet plus limité dans les muscles lents Sol. Sans surprise, la force isométrique des muscles EDL des souris traitées avec le formotérol, ainsi que les diverses combinaisons de formotérol et d'OPG-Fc n'était pas supérieure à celle de l'OPG-Fc seule. En revanche, l'OPG-Fc utilisé seul a induit un effet similaire à la dose la plus forte de formotérol 100 µg/kg (81%) sur la force musculaire des muscles Sol. Cependant, le résultat le plus important de cette étude est que la combinaison de l'OPG-Fc avec le formotérol à une dose 10 fois inférieures, soit 10 µg/kg, à celle nécessaire pour produire un effet similaire à l'OPG-Fc sur la force isométrique provoque une action synergiste et largement supérieure à l'OPG-Fc employée seule et restaure presque totalement les muscles Sol. En outre, il est particulièrement important de souligner qu'il n'y a aucune différence entre la combinaison de l'OPG-Fc avec 10 ou 100 µg/kg de formotérol et qu'une dose de 10 µg/kg est insuffisante pour induire des perturbations aux tissus cardiaques et osseux²⁰³. Le mécanisme par lequel l'OPG-Fc et le formotérol peuvent agir en synergie dans les muscles lents seulement demeure inconnu et la présente étude se veut descriptive et exploratoire. Notre compréhension de ce phénomène demeure spéculative. Contrairement au formotérol où les gains contractiles sousmentionnés sont observés autant chez les animaux dystrophiques que sauvages, l'OPG-Fc n'a aucun effet sur les muscles d'une souris sauvage et nécessite la présence d'un profil pathologique comme la dystrophie musculaire. Il est fort probable que la gestion du calcium soit impliquée dans le mécanisme de l'OPG-Fc sur le muscle squelettique. En effet, des voies dépendantes du Ca^{2+} sont essentielles à la production de force, au maintien de l'intégrité structurale, à l'activité et expression de SERCA et au phénotype musculaire, tous des paramètres modulés par un traitement à l'OPG-Fc.

6.4 Le mécanisme de l'OPG-Fc sur le tissu musculaire dépend essentiellement de son domaine héparine.

L'objectif principal du chapitre V était d'élucider le mécanisme d'action de l'OPG-Fc sur le tissu musculaire. Pour ce faire, nous avons élaboré une stratégie expérimentale *in vitro*, dont la variable d'intérêt primaire était l'expression de SERCA-2a. Notre choix de cibler celle-ci repose essentiellement sur nos expériences ultérieures *in vivo* où un traitement de 10 jours à l'OPG-Fc augmentait de 650% l'expression de SERCA-2a. Basée sur cette

observation que l'OPG-Fc est largement supérieur à la suppression de RANK musculaire sur la préservation de la force des souris *mdx*, nous avons émis l'hypothèse que l'OPG-Fc puisse se lier directement aux cellules musculaires. Conformément à cette hypothèse, l'imagerie confocale a démontré que l'OPG-Fc se lie efficacement aux cellules C2C12 *in vitro*. Nous avons ensuite stimulé des myotubes C2C12 avec une dose croissante d'OPG-Fc sur une période de 24h et obtenu une dose réponse typique pour l'expression de SERCA-2a, tandis que le contenu de SERCA-1a est demeuré inchangé. Pour mieux comprendre l'effet de l'OPG-Fc sur le contenu de SERCA-2a, nous nous sommes tournés vers les voies de régulation de SERCA-2a dans le muscle cardiaque, un tissu qui exprime préférentiellement cet isoforme. Nous avons découvert que SERCA-2a forme un complexe fonctionnel avec l'intégrine liée aux kinases (ILK)²³² qui contrôle l'expression et l'activité de SERCA-2a dans les cellules cardiaques. En collaboration avec une équipe de Vancouver, nous avons testé le QLT067 un inhibiteur d'ILK, sur des myotubes stimulés ou non avec de l'OPG-Fc²³³. Le QLT067 a réduit significativement, mais pas totalement, la surexpression de SERCA-2a induite par l'OPG-Fc. Les doses de QLT067 utilisées étaient non cytotoxiques, mais aucune mesure de son activité inhibitrice n'a été effectuée, limitant par le fait même notre compréhension de la part de responsabilité de l'ILK dans le mécanisme de l'OPG-Fc. Toutefois, il est connu que (1) l'ILK interagit avec le domaine cytoplasmique des intégrines β_1/β_3 de cellules non musculaires, (2) le domaine à l'héparine de l'OPG se lie à syndécane-1 par ses chaînes d'héparane sulfate et (3) la syndécane-1 puisse former un complexe avec les intégrines β_1/β_3 ^{191,234,235}. Nous avons donc utilisé de l'héparinases I et/ou III à diverses concentrations [10 ou 100 mU/ml] pour cliver les domaines héparine des myotubes avant un traitement à l'OPG-Fc²³⁴⁻²³⁶. En présence d'héparinase, l'OPG-Fc induit un effet limité sur l'expression de SERCA-2a suggérant que son domaine héparine pourrait être le site le plus actif de l'OPG-Fc sur les cellules du muscle squelettique. Cependant, bien que cet outil expérimental soit pertinent, il ne nous permet pas de connaître en détails la proportion réelle des domaines héparine clivés, par rapport à ceux non clivés. Ces données, bien qu'intéressantes, sont préliminaires et l'échantillonnage est trop petit pour confirmer la validité et la reproductibilité de ceux-ci. D'autres expériences sont en cours pour comprendre l'effet de l'OPG-Fc sur SERCA-2a.

6.5 Retour sur l'objectif principal

Somme toute, l'objectif principal de cette thèse était d'investiguer la possibilité que la triade RANK/RANKL/OPG soit impliquée dans la physiopathologie des dysfonctions musculaires lorsque celles-ci s'observent en tandem avec une atteinte osseuse. Bien que de nombreuses autres recherches soient nécessaires pour comprendre le mécanisme de cette triade dans le muscle squelettique, les travaux découlant de cette thèse offrent les premières assises sur les rôles physiologiques de cette triade sur le muscle squelettique. La recherche fondamentale est la pierre angulaire de la recherche clinique. Le transfert vers la clinique n'est possible que si la recherche fondamentale est en adéquation avec les besoins cliniques. La construction des projets de cette thèse, malgré certaines lacunes, était orientée directement vers le transfert des connaissances aux patients dystrophiques. La portée de nos résultats a été suffisante pour conduire à une collaboration avec une équipe chevronnée d'experts en recherche clinique sur la santé des osseux des enfants. Ainsi, d'ici quelques mois, un projet pilote verra le jour et des patients atteints de la DMD recevront un traitement au *denosumad*, un anti-rankl approuvé par la FDA^{237,238} afin de vérifier son efficacité sur les fonctions musculaire et osseuse des patients dystrophiques.

Annexe 1 : Rôles physiologiques de RANK dans la dysfonction et atrophie musculaires post-dénervation.

Physiological role of receptor activator nuclear factor-kB (RANK) in denervation-induced muscle atrophy and dysfunction

Sébastien S. Dufresne¹, Antoine Boulanger-Piette¹, Sabrina Bossé¹, and Jérôme Frenette^{1,2},

Affiliations

¹Centre Hospitalier Universitaire de Québec–Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval (CHUQ-CRCHUL), Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 4G2, Canada

²Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 4G2, Canada

Published in Receptors Clin Investig. 2016 May 30;3(2):e13231-e13236

Résumé

Le remodelage et l'homéostasie osseux sont principalement contrôlés par le récepteur activateur du facteur nucléaire κ B (RANK), son ligand (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG), un récepteur leurre soluble. Bien qu'il existe une forte association entre la perte de densité osseuse et le dysfonctionnement du muscle squelettique, la pertinence fonctionnelle d'un sentier signalétique particulier qui module de manière synchronisée à la fois les atteintes osseuses et musculaires reste incertaine. Notre récent article publié dans *American Journal of Physiology (Cell Physiology)* a démontré que RANK est également exprimé dans les myotubes C2C12 et les muscles squelettiques différenciés. Nous avons utilisé l'approche Cre-Lox pour inactiver RANK musculaire (RANK^{mk0}) et montré que cette suppression préserve la force des muscles à contraction rapide EDL dénervés. Cependant, RANK^{mk0} n'a eu aucun impact positif sur les muscles contraction lente soléaires. En outre, les muscles EDL dénervés RANK^{mk0} induit une augmentation de la concentration totale en calcium ($[Ca_t]$), qui a été surprenamment associée à une diminution de l'activité de la pompe SERCA. Fait intéressant, les niveaux de STIM-1, qui médient le Ca^{2+} après l'épuisement des réserves calciques du SR, étaient nettement plus élevés dans les muscles EDL RANK^{mk0} dénervés. Nous spéculons que l'influx de Ca^{2+} extracellulaire contrôlé par STIM-1 peut être important pour l'augmentation de la $[Ca_t]$ et du gain de la force dans les muscles EDL RANK^{mk0} dénervés. Dans l'ensemble, ces résultats ont montré pour la première fois que l'interaction RANK / RANKL joue un rôle dans l'atrophie et le dysfonctionnement musculaire induit par la dénervation.

Abstract

Bone remodeling and homeostasis are mainly controlled by the receptor-activator of nuclear factor κ B (RANK), its ligand RANKL, and the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG) pathway. While there is a strong association between osteoporosis and skeletal muscle dysfunction, the functional relevance of a particular biological pathway that synchronously regulates bone and skeletal muscle physiopathology remains elusive. Our recent article published in the American Journal of Physiology (Cell Physiology) showed that RANK is also expressed in fully differentiated C2C12 myotubes and skeletal muscles. We used the Cre-Lox approach to inactivate muscle RANK (*RANK^{mko}*) and showed that RANK deletion preserves the force of denervated fast-twitch EDL muscles. However, RANK deletion had no positive impact on slow-twitch Sol muscles. In addition, denervating *RANK^{mko}* EDL muscles induced an increase in the total calcium concentration ($[Ca_T]$), which was associated with a surprising decrease in SERCA activity. Interestingly, the levels of STIM-1, which mediates Ca^{2+} influx following the depletion of SR Ca^{2+} stores, were markedly higher in denervated *RANK^{mko}* EDL muscles. We speculated that an extracellular Ca^{2+} influx mediated by STIM-1 may be important for the increase in $[Ca_T]$ and the gain of force in denervated *RANK^{mko}* EDL muscles. Overall, these findings showed for the first time that the RANKL/RANK interaction plays a role in denervation-induced muscle atrophy and dysfunction.

A1.1 Introduction

Bone remodeling is an essential process for maintaining bone homeostasis throughout the life of an individual. It is under the control of local and systemic factors that orchestrate osteoblast/osteoclast activation.^[1-4] RANK, the receptor-activator of RANKL, and the OPG triad (RANK/RANKL/OPG) play important roles in fine-tuning the activity of these two bone cell types. RANKL is mainly expressed by bone marrow mesenchymal stromal cells and osteoblasts.^[5-6] The binding of RANKL to RANK on osteoclast precursors trimerizes its receptor and induces osteoclast differentiation and activation, resulting in bone resorption. RANK knockout impairs osteoclastogenesis and induces osteopetrosis, while the overproduction of RANKL induces osteoporosis.^[7,8] OPG, the third protagonist, is mainly produced by bone marrow mesenchymal stromal cells and osteoblasts, and exerts an inhibitory effect on the osteoclastic process. OPG has a high affinity for RANKL and inhibits the RANKL/RANK interaction and subsequent bone degradation. In addition to RANKL, OPG serves as a low affinity decoy receptor for TRAIL. Pre-clinical studies have suggested that this interaction increases cell survival by blocking the apoptotic effects of the RANKL/RANK interaction.^[9,10] The fact that the overexpression of OPG or an exogenous OPG treatment^[11] in mice result in osteopetrosis and that OPG-null mice are osteoporotic are testimony to the physiological importance of OPG.^[11]

Clinical studies have clearly shown that there is an association between osteoporosis and muscle atrophy and that the worsening of these conditions happens in tandem.^[12,13] While bones and skeletal muscles are closely related and are mechanically linked, the possibility of dynamic molecular cross-talk between these tissues and a common signaling pathway that can efficiently control them has been underappreciated to date. Since the RANK/RANKL/OPG pathway is the most important cytokine network involved in bone biology and diseases, we postulated that this bone pathway is also involved in muscle atrophy and dysfunction. We first showed, by Western blotting and confocal microscopy, that C2C12 myotubes and fully differentiated skeletal muscles express RANK on the membranes of fast and slow-twitch myofibers.^[14] Based on the protective effect of RANK deletion on bone mass,^[15] we next postulated that selective muscle RANK deletion

preserves muscle mass and function, and favors a fast-twitch phenotype following denervation.

A1.2 Muscle Phenotype and RANK

Skeletal muscles are primarily composed of four muscle fiber types: type I fibers (slow and oxidative), type IIa fibers (fast and oxidative), and type IIx and IIb fibers (fast and glycolytic). The function largely dictates the phenotype and composition of each skeletal muscle. For example, the Sol muscle, a postural muscle, is largely composed of slow oxidative type I fibers while the EDL muscle, a phasic muscle, is almost exclusively composed of fast-twitch fibers.^[16] These two muscles encompass the two extremes of the phenotypic spectrum of the skeletal muscle contractile apparatus. Type I fibers play an important role in maintaining the body in an upright position, while type IIb and IIx fibers are responsive during movement and physical activity. Type IIa fibers are a hybrid of type I and type IIb fibers and can perform short or prolonged exercises. Specific exercises, immobilization, unloading, denervation, muscle diseases, or glucocorticoid treatments affect all four muscle fiber phenotypes to different degrees. For instance, decreases in mechanical loading and neuromuscular activity favor muscle atrophy and a conversion of muscle fiber phenotypes from slow to fast.^[17] Functional muscle overload causes a gain in muscle mass, while prolonged exercise leads to the transformation of pre-existing fast-twitch muscle fibers to a slow-twitch oxidative phenotype. Type IIb fibers, the most powerful fibers, are converted to oxidative phenotype fibers (type I or IIa) and disappear through a necrotic process during myopathies, aging, and glucocorticoid treatments.^[18,19] Intracellular/cytosolic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) fluctuations play a crucial role in the maintenance and adaptation of muscle phenotypes. The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is caused by a Ca^{2+} influx from the extracellular space and/or Ca^{2+} release from $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stores. The SR is the major releasable $[\text{Ca}^{2+}]_i$ store. Ca^{2+} channels and pumps maintain a steep Ca^{2+} concentration gradient between different cell compartments. Generally speaking, the spatial pattern of increased free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at rest induces the activation of calmodulin and downstream Ca^{2+} decoders, namely calcineurin and CaMKII.^[20] These two decoders modify gene

transcription by activating transcription factors such as NFATc1 and MEF2, and transcription modulators such as HDAC and PGC-1 α , promoting the slow myofiber phenotype^[21] (Figure 1). Interestingly, the increase in $[Ca^{2+}]_{SR}$ is essential to activate NFATc1, while extracellular Ca^{2+} is required to maintain its activation^[22] and to replenish $[Ca^{2+}]_i$ stores.^[23] Since over 97% of $[Ca^{2+}]_i$ is stored in the SR at rest, the measurement of total Ca^{2+} ($[Ca_T]$) is an estimate of $[Ca^{2+}]_{SR}$ content.^[24] We used Cre-Lox technology to inactivate muscle RANK and found that the selective deletion of muscle RANK ($RANK^{mko}$) decreases $[Ca_T]$ in fast-twitch EDL muscles, but not in Sol muscles, when compared to $RANK^{flox/flox}$ ($RANK^{ff}$) muscles. However, sciatic denervation markedly increased $[Ca_T]$ in $RANK^{mko}$ EDL muscles. In addition, we discovered that denervated $RANK^{mko}$ EDL muscles are smaller, more fatigable, and surprisingly stronger than $RANK^{ff}$ EDL muscles. Since force production is usually proportional to muscle size, we hypothesized that the increase in $[Ca_T]$, i.e., $[Ca^{2+}]_{SR}$ at rest, would favor Ca^{2+} release, increasing free $[Ca^{2+}]_i$ and thereby the specific force of denervated $RANK^{mko}$ EDL muscles. The phenotypic profiles, which are consistent with these observations, showed a lower proportion of slow-twitch type I and fast-twitch type IIX fibers and a higher proportion of fast-twitch type IIA/IIB fibers in $RANK^{mko}$ EDL muscles relative to $RANK^{ff}$ EDL muscles. However, muscle fatigue was significant and could not be explained by the modest changes in myofiber type in sham and denervated $RANK^{mko}$ EDL muscles. In this context, it would be highly relevant to determine whether muscle RANK deletion influences mitochondria Ca^{2+} uptake, another important regulator of $[Ca^{2+}]_i$ and energy production. Our results showed for the first time that muscle RANK is an important regulator of Ca^{2+} storage, muscle phenotype, and muscle fatigue in normal and pathological conditions.

A1.3 Calcium Signalling, RANK, and Skeletal Muscle

Muscle contraction involves the depolarization of the transverse-tubular system and activation of DHPRs, which in turn opens RYR1 receptors adjacent to the SR membrane.^[25] This results in the rapid efflux of large amounts of Ca^{2+} into the cytoplasm and the binding of Ca^{2+} to troponin C, causing the formation of cross-bridges between actin

and myosin, the shortening of the sarcomere, and force development.^[26] To avoid permanent contraction and to allow muscle relaxation, Ca^{2+} is in part pumped back into the SR by an ATP-dependent Ca^{2+} pump called SERCA. Ca^{2+} reuptake into the SR is mainly controlled by the fast-twitch SERCA-1a and slow-twitch SERCA-2a isoforms in myofibers. The movement of Ca^{2+} is reduced when PLN is associated with SERCA. Under β -adrenergic stimulation, like the stress hormones adrenaline and noradrenaline, or sympathomimetic drugs, the phosphorylation-dependent dissociation of PLN by PKA increases SERCA activity and Ca^{2+} movement, enhancing skeletal muscle and heart functions (Figure annexe 1-1). Alternatively, PLN deletion increases cardiac output by decreasing the time to peak pressure and the half-relaxation time,^[27] indicating that efficient Ca^{2+} mobilization and the disinhibition of SERCA are prerequisites for powerful contractions. Conversely, dysfunctional SERCA expression and activity impair $[\text{Ca}^{2+}]_i$ homeostasis, reducing the force production and power output of skeletal and cardiac muscles.^[28,29] This is particularly true for fast-twitch muscles, like in dystrophic EDL muscles, where Ca^{2+} handling is altered with the expression of the slow isoform of SERCA-2a.^[30] Increased Ca^{2+} influx thus activates proteolytic pathway, which in turn causes even greater Ca^{2+} influx, giving rise to a possible vicious pathological cycle in dystrophic muscles.^[31] Interestingly, the overexpression of SERCA mitigates muscular dystrophy and rescues cardiac function in a model of pressure overload, highlighting the importance of SERCA in muscle performance and disease.^[32,33] In our paper, we report a number of intriguing and challenging observations, including the fact that RANK deletion in denervated EDL muscles increases $[\text{Ca}_T]$ and specific force and decreases SERCA activity. This apparent discrepancy between the increase in $[\text{Ca}_T]$ and the decrease in SERCA activity may be due to an alternative source of Ca^{2+} refilling the SR. Indeed, extracellular Ca^{2+} and SOCE are important for optimal muscle force production, while SOCE inhibition is associated with a decrease in contractile properties.^[34] More specifically, Orai-1 Ca^{2+} channels are key sensors and major contributors to Ca^{2+} entry into the SR via an interplay with STIM-1. When SR Ca^{2+} stores are depleted, STIM-1 activates Orai-1 to refill the stores.^[35] Additionally, Stiber et al. (2008) demonstrated that STIM-1^{+/+} myotubes maintain full Ca^{2+} stores, whereas STIM-1^{-/-} myotubes fail to refill SR Ca^{2+} stores following chronic stimulations.^[36] Interestingly, we showed that denervated *RANK^{mko}* EDL muscles have a

markedly higher STIM-1 content. Since the increase in $[Ca_T]$ and the decrease in SERCA activity in denervated *RANK^{mko}* EDL muscles are somewhat irreconcilable, we proposed that STIM-1 and Orai-1 compensate for the lack of SERCA activity, refilling SR Ca^{2+} stores in the absence of muscle RANK.

A1.4 RANKL/RANK Interactions and Intracellular Signaling Networks in Bone and Skeletal Muscle

In bone, RANKL/RANK interactions activate TRAF-6, which then induces the activation of downstream signaling molecules and $[Ca^{2+}]_i$ oscillations.^[37] SERCA is essential for $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and plays a critical role in osteoclastogenesis.^[38] It has recently been reported that SERCA-2a heterozygote mice (SERCA2a^{+/-}) present defects in osteoclast differentiation and the suppression of RANKL-induced Ca^{2+} oscillations.^[39] Tmem64, a positive modulator of osteoclast differentiation, regulates RANKL-induced Ca^{2+} signaling via SERCA2a.^[40] In addition to SERCA, Ca^{2+} oscillations may partly derive from extracellular Ca^{2+} . Gadolinium, a specific SOCE blocker, abolishes RANKL-induced Ca^{2+} oscillations^[41] while the knockdown of STIM-1 significantly reduces the frequency of RANKL-induced Ca^{2+} oscillations, indicating that SOCE and RANK communicate. TRP channels are also candidates for the Ca^{2+} influx involved in RANKL-induced Ca^{2+} oscillations.^[42] Chamoux et al. (2010) showed that RANKL induces a significant increase in $[Ca^{2+}]_i$ from outside, presumably through the TRPV-5 Ca^{2+} channel. While an elaborate approach has been proposed to elucidate how RANKL/RANK induces Ca^{2+} oscillations in bone cells, the knowledge of the importance of this pathway in skeletal muscle is extremely limited. Our work reported in the American Journal of Physiology (Cell Physiology) was, to our knowledge, the first attempt to assign a regulatory role for RANKL/RANK interactions on SERCA activity in bone and muscle cells.^[14] The identification of downstream effectors of muscle RANK will be an important step in determining precisely how the RANKL/RANK interaction modulates SERCA activity. Bioinformatic approaches may eventually be required to improve our understanding of the cell signaling network and to determine how the RANKL/RANK interaction regulates SERCA activity and possibly other Ca^{2+} channels in skeletal muscles.

A1.5 Future Directions and Perspectives

We convincingly show in another publication in the American Journal of Pathology (2015)^[43] that OPG-Fc (OPG fused to immunoglobulin Fc) completely restores the function of dystrophic EDL muscles and significantly improves the function of Sol and diaphragm muscles. OPG treatments also provide significant protection against eccentric-contraction-induced muscle damage. As observed with OPG-treated dystrophic mice, muscle RANK deletion preferentially protects fast-twitch fibers. It is important to note that fast-twitch fibers are essential for brief and powerful contractions. They are predominantly affected directly or indirectly by aging and by several forms of muscle disease and chronic illness, including diabetes, congestive heart failure, renal failure, chronic heart disease, and chronic obstructive pulmonary disease. Our results clearly show that the role of the RANK/RANKL/OPG pathway extends well beyond bone remodeling and osteoporosis, and that skeletal muscles and other tissues may share the RANK/RANKL/OPG pathway as a common denominator.

A1.6 Conflicting Interests

The authors have declared that no competing interests exist. Jérôme Frenette was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

A1.7 Authors' Contributions

J.F. and S.S.D. conceived the project and its design; J.F., S.S.D., A.B.P. and S.B. wrote the manuscript; and all authors checked for scientific content and approved the final manuscript.

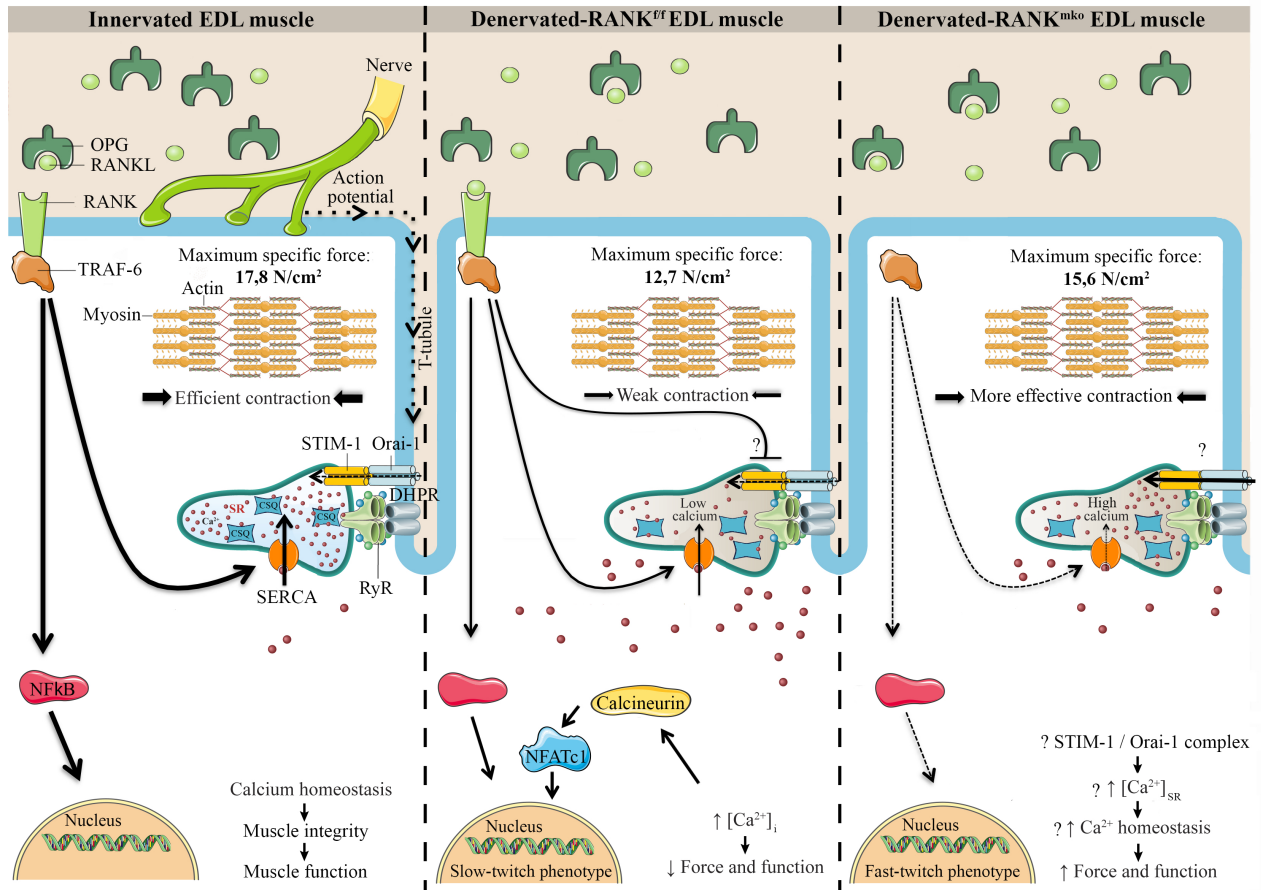
A1.8 References

1. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, Kostenuik PJ, Dougall WC, Sullivan JK, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 2012 May; 11:401–19.
2. Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 2012; 23:2067–79.
3. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143:123–50.
4. Silvestrini G, Ballanti P, Leopizzi M, Gualtieri N, Sardella D, Monnazzi P, et al. Effects of the administration of corticosterone, parathyroid hormone, or both, and of their withdrawal, on rat bone and cartilage histomorphometric parameters, and on osteoprotegerin and RANKL mRNA expression and proteins. *J Mol Histol* 2007; 38:215–26.
5. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 2014; 20:511.
6. Baharuddin NA, Coates DE, Cullinan M, Seymour G, Duncan W. Localization of RANK, RANKL and osteoprotegerin during healing of surgically created periodontal defects in sheep. *J Periodontal Res* 2015; 50:211–9.
7. Takayanagi H. The role of NFAT in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1116:227–37.
8. Thudium CS, Moscatelli I, Flores C, Thomsen JS, Brüel A, Gudmann NS, et al. A Comparison of Osteoclast-Rich and Osteoclast-Poor Osteopetrosis in Adult Mice Sheds Light on the Role of the Osteoclast in Coupling Bone Resorption and Bone Formation. *Calcif Tissue Int* 2014; 95:83–93.
9. Sundaram K, Sambandam Y, Balasubramanian S, Pillai B, Voelkel-Johnson C, Ries WL, et al. STAT-6 mediates TRAIL induced RANK ligand expression in stromal/preosteoblast cells. *Bone* 2015; 71:137–44.
10. Nelson CA, Warren JT, Wang MW-H, Teitelbaum SL, Fremont DH. RANKL Employs Distinct Binding Modes to Engage RANK and the Osteoprotegerin Decoy Receptor. *Structure* 2012; 20:1971–82.
11. Bargman R, Posham R, Boskey A, Carter E, DiCarlo E, Verdelis K, et al. High- and low-dose OPG–Fc cause osteopetrosis-like changes in infant mice. *Pediatr Res* 2012; 72:495–501.
12. Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 2010; 205:201–10.
13. Zhu K, Yi J, Xiao Y, Lai Y, Song P, Zheng W, et al. Impaired Bone Homeostasis in Amyotrophic Lateral Sclerosis Mice with Muscle Atrophy. *J Biol Chem* 2015; 290:8081–94.
14. Dufresne SS, Dumont NA, Boulanger-Piette A, Fajardo VA, Gamu D, Kake-Guena SA, et al. Muscle RANK is a key regulator of calcium storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 310:663-72.

15. Xing L, Chen D, Boyce BF. Mice Deficient in NF- κ B p50 and p52 or RANK Have Defective Growth Plate Formation and Post-natal Dwarfism. *Bone Res* 2013; 1:336–45.
16. Khodabukus A, Baar K. Contractile and Metabolic Properties of Engineered Skeletal Muscle Derived From Slow and Fast Phenotype Mouse Muscle: In vitro mouse phenotype and function. *J Cell Physiol* 2015; 230:1750–7.
17. Däpp C, Schmutz S, Hoppeler H, Flück M. Transcriptional reprogramming and ultrastructure during atrophy and recovery of mouse soleus muscle. *Physiol Genomics* 2004; 20:97–107.
18. Arnardottir S, Borg K, Ansved T. Sporadic inclusion body myositis: morphology, regeneration, and cytoskeletal structure of muscle fibres. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75:917–20.
19. Gueugneau M, Coudy-Gandilhon C, Théron L, Meunier B, Barboiron C, Combaret L, et al. Skeletal muscle lipid content and oxidative activity in relation to muscle fiber type in aging and metabolic syndrome. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2015; 70:566–76.
20. Eilers W, Jaspers RT, de Haan A, Ferrié C, Valdivieso P, Flück M. CaMKII content affects contractile, but not mitochondrial, characteristics in regenerating skeletal muscle. *BMC Physiol* 2014; 14:7.
21. Norrbom J, Sundberg CJ, Ameln H, Kraus WE, Jansson E, Gustafsson T. PGC-1 α mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2004; 96:189–94.
22. Stiber JA, Tabatabaei N, Hawkins AF, Hawke T, Worley PF, Williams RS, et al. Homer modulates NFAT-dependent signaling during muscle differentiation. *Dev Biol* 2005; 287:213–24.
23. Valdes JA, Gaggero E, Hidalgo J, Leal N, Jaimovich E, Carrasco MA. NFAT activation by membrane potential follows a calcium pathway distinct from other activity-related transcription factors in skeletal muscle cells. *AJP Cell Physiol* 2008; 294:715–25.
24. Lamboley CRH, Kake Guena SA, Touré F, Hébert C, Yaddaden L, Nadeau S, et al. New method for determining total calcium content in tissue applied to skeletal muscle with and without calsequestrin. *J Gen Physiol* 2015; 145:127–53.
25. Delbono O. Expression and regulation of excitation-contraction coupling proteins in aging skeletal muscle. *Curr Aging Sci* 2011; 4:248–59.
26. Zhang T, Taylor J, Jiang Y, Pereyra AS, Messi ML, Wang Z-M, et al. Troponin T3 regulates nuclear localization of the calcium channel Cav β 1a subunit in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 2015; 336:276–86.
27. Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, et al. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 1994; 75:401–9.
28. Krishna A, Valderrábano M, Palade PT, Clark JW. Rate-dependent Ca²⁺ signalling underlying the force-frequency response in rat ventricular myocytes: a coupled electromechanical modeling study. *Theor Biol Med Model* 2013; 10:54.
29. Fajardo VA, Bombardier E, McMillan E, Tran K, Wadsworth BJ, Gamu D, et al. Phospholamban overexpression in mice causes a centronuclear myopathy-like phenotype. *Dis Model Mech* 2015; 8:999–1009.
30. Divet A, Lompré A-M, Huchet-Cadiou C. Effect of cyclopiazonic acid, an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase, on skeletal muscles from normal and mdx mice. *Acta Physiol Scand* 2005; 184:173–86.
31. Brussee V, Tardif F, Tremblay JP. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable

- to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord* 1997; 7:487–92.
32. Goonasekera SA, Lam CK, Millay DP, Sargent MA, Hajjar RJ, Kranias EG, et al. Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J Clin Invest* 2011; 121:1044–52.
 33. Ferretti R, Marques MJ, Pertille A, Santo Neto H. Sarcoplasmic-endoplasmic-reticulum Ca²⁺-ATPase and calsequestrin are overexpressed in spared intrinsic laryngeal muscles of dystrophin-deficient mdx mice. *Muscle Nerve* 2009; 39:609–15.
 34. Thornton AM, Zhao X, Weisleder N, Brotto LS, Bougoin S, Nosek TM, et al. Store-operated Ca(2+) entry (SOCE) contributes to normal skeletal muscle contractility in young but not in aged skeletal muscle. *Aging* 2011; 3:621–34.
 35. Kiviluoto S, Decuyppere J-P, De Smedt H, Missiaen L, Parys JB, Bultynck G. STIM1 as a key regulator for Ca²⁺ homeostasis in skeletal-muscle development and function. *Skelet Muscle* 2011; 1:16.
 36. Stiber J, Hawkins A, Zhang Z-S, Wang S, Burch J, Graham V, et al. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2008; 10:688–97.
 37. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 1998; 273:20551–5.
 38. Mentaverri R, Kamel S, Brazier M. Involvement of capacitive calcium entry and calcium store refilling in osteoclastic survival and bone resorption process. *Cell Calcium* 2003; 34:169–75.
 39. Yang Y-M, Kim MS, Son A, Hong JH, Kim K-H, Seo JT, et al. Alteration of RANKL-Induced Osteoclastogenesis in Primary Cultured Osteoclasts From SERCA2^{+/-} Mice. *J Bone Miner Res* 2009; 24:1763–9.
 40. Kim H, Kim T, Jeong B-C, Cho I-T, Han D, Takegahara N, et al. Tmem64 Modulates Calcium Signaling during RANKL-Mediated Osteoclast Differentiation. *Cell Metab* 2013; 17:249–60.
 41. Kim MS, Yang Y-M, Son A, Tian YS, Lee S-I, Kang SW, et al. RANKL-mediated Reactive Oxygen Species Pathway That Induces Long Lasting Ca²⁺ Oscillations Essential for Osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2010; 285:6913–21.
 42. Chamoux E, Bisson M, Payet MD, Roux S. TRPV-5 Mediates a Receptor Activator of NF- B (RANK) Ligand-induced Increase in Cytosolic Ca²⁺ in Human Osteoclasts and Down-regulates Bone Resorption. *J Biol Chem* 2010; 285:25354–62.
 43. Dufresne SS, Dumont NA, Bouchard P, Lavergne É, Penninger JM, Frenette J. Osteoprotegerin protects against muscular dystrophy. *Am J Pathol* 2015; 185:920–6.

A1.9 Figure and Legends



Annexe: 1-1: Schematic and hypothetical representation depicting the function of RANK in skeletal muscle

The action potential is conducted into the interior of the muscle cell along the T-tubules where DHPR, a voltage sensor protein, triggers Ca²⁺ release from the SR through RyR and muscle contraction. Once released, SERCA pumps the Ca²⁺ back into the SR, allowing muscle relaxation and preparing muscle for the next contraction. In bone cells, RANKL/RANK interaction is important for SERCA activation, [Ca²⁺]_i oscillations and osteoclastogenesis. In skeletal muscle, a rise in [Ca²⁺]_i would stimulate calcineurin, a calcium dependent protein phosphatase that subsequently dephosphorylates NFATc1 and promotes a slower muscle phenotype. Muscle specific RANK deletion (RANK^{mko}) reduces SERCA activity, but protects against sciatic denervation-induced muscle dysfunction and favors a fast-twitch phenotype. We speculate that the STIM-1/Orai-1 complex would compensate for the lack of SERCA activity, refilling Ca²⁺ stores and improving muscle

function in atrophied and denervated RANK^{mk0} EDL muscles. Although the complete and precise role of muscle RANK remains poorly understood, our article in the American Journal of Physiology (Cell Physiology) shows that muscle RANK is an important regulator of Ca²⁺ storage, muscle phenotype, and muscle function in normal and pathological conditions.

Annexe 2 : Inflammation et régénération musculaire, une arme à double tranchant.

Inflammation et régénération musculaire, une arme à double tranchant.

Sébastien S. Dufresne^{1,2}, Jérôme Frenette^{1,2}, Nicolas A. Dumont^{3,4}

¹ Centre de recherche du centre hospitalier universitaire de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada.

² Département de réadaptation, Faculté de médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.

³ Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire Ste-Justine. Montréal, QC, Canada.

⁴ École de réadaptation, Faculté de Médecine, Université de Montréal. Montréal, QC, Canada.

Publié dans Med Sci (Paris). 2016 Jun-Jul;32(6-7):591-7.

doi:10.1051/medsci/20163206022

Résumé

Les lésions musculaires sont des blessures fréquentes et d'origines diverses. Une réaction inflammatoire d'intensité variée est généralement associée à la plupart des atteintes musculaires. Cette réaction inflammatoire était traditionnellement considérée néfaste pour la guérison musculaire, et les anti-inflammatoires ont longtemps été le traitement de choix pour ce type de blessure. Bien que certaines études scientifiques aient démontré que l'inflammation pouvait induire des dommages collatéraux, de nouvelles évidences s'accumulent en faveur d'un rôle essentiel de certaines cellules inflammatoires pour une régénération musculaire optimale. En particulier, l'aptitude des macrophages à changer d'un profil pro-inflammatoire à anti-inflammatoire fait de ces derniers des acteurs centraux de la régénération musculaire. Cet article vise à synthétiser les connaissances actuelles quant aux effets des différentes cellules inflammatoires (résidentes et infiltrantes) sur la fonction des cellules myogéniques et sur la régénération musculaire.

Abstract

Muscle injuries are very frequent and are associated with an inflammatory reaction that varies in intensity. Classically the inflammatory process was considered harmful for muscle regeneration and anti-inflammatory agents are still part of a conventional therapy. Over the last decades, it has been demonstrated under some conditions that the inflammatory response could be detrimental for the musculoskeletal tissue. However, accumulating evidence indicate that controlled and efficient inflammatory response is necessary for an optimal muscle recovery. Among the resident and infiltrating leukocytes that participate into the inflammatory process, macrophages play a critical role in muscle regeneration due to their ability to switch from pro-inflammatory to anti-inflammatory phenotypes depending on their microenvironment. The present review synthesizes the recent advances regarding the interactions of the different infiltrating and resident leukocytes on myogenic cell function and muscle regeneration.

A2.1 Introduction

Le muscle squelettique est composé majoritairement de fibres musculaires, de longues cellules cylindriques responsables de la contraction musculaire qui génère le mouvement. Entre la fibre musculaire et la matrice extracellulaire (nommée membrane basale) se retrouvent les cellules satellites qui sont quiescentes dans un muscle sain, mais qui sont responsables de la régénération musculaire à la suite d'une blessure [1]. Différents types cellulaires se retrouvent dans l'espace interstitiel du muscle comme les mastocytes, généralement à proximité des vaisseaux sanguins, certains monocytes sanguins dits patrouilleurs, qui sont localisés au niveau de la paroi endothéliale, et les macrophages résidents, au sein de l'épimysium et du pérимыsium¹ (*Figure annexe 2-1*) [2]. La fonction et la régulation des macrophages résidents dans le tissu musculaire sont mal caractérisées. Dans le muscle sain, le maintien de la population de macrophages résidents ne dépend pas du recrutement des monocytes circulants, mais plutôt de leur capacité d'auto-renouvellement [3]. Dans différents tissus, les macrophages résidents participent au maintien de l'homéostasie ainsi qu'au débridement et au remodelage tissulaire [4]. Dans le tissu musculaire, ces cellules agissent comme des sentinelles. Elles perçoivent les perturbations de l'homéostasie tissulaire et favorisent le recrutement des leucocytes sanguins [5].

Plusieurs types de lésions peuvent affecter l'intégrité et les fonctions musculaires, tels que les claquages, les contusions, les coupures, l'atrophie et les pathologies affectant le muscle (par exemple, les dystrophies musculaires). À la suite d'un dommage, un processus myogénique s'enclenche et permet ainsi la régénération du tissu lésé qui dépend majoritairement de l'activité des cellules satellites [1]. Ces cellules s'activent en réponse au traumatisme et prolifèrent rapidement, générant un grand nombre de cellules myogéniques, les myoblastes, qui se différencient en myocytes qui fusionnent pour former les myotubes (fibres musculaires immatures) [1].

¹ L'épimysium est une couche de tissu conjonctif dense qui entoure tout le muscle ; le pérимыsium est une couche de tissu conjonctif lâche entourant un faisceau de fibres musculaires squelettiques.

En parallèle à ce processus myogénique, le traumatisme musculaire est également à l'origine d'une réaction inflammatoire d'intensité variable qui participe au nettoyage du tissu endommagé et favorise le retour à l'homéostasie. L'initiation, le développement et la résolution de l'inflammation nécessitent l'interaction complexe et coordonnée de différentes cellules inflammatoires (les leucocytes). Classiquement, la réaction inflammatoire stérile (en absence d'agents infectieux) se caractérise par l'activation rapide de cellules sentinelles qui est suivie d'une infiltration massive et de courte durée de neutrophiles et, finalement, du recrutement de monocytes qui se différencient en macrophages [6]. Ces différents leucocytes affectent non seulement le comportement des autres types de cellules leucocytaires, mais également le comportement des cellules myogéniques. Le présent article vise à synthétiser les connaissances scientifiques actuelles concernant les interactions existant entre les leucocytes et les cellules myogéniques au cours des différentes phases du processus de régénération musculaire.

A2.2 Initiation de l'Inflammation et Régénération Musculaire

À la suite d'une blessure, le tissu endommagé libère de nombreuses molécules : des débris de matrice extracellulaire et également certains éléments intracellulaires comme l'ADN, des *heat shock proteins* (HSP) et la protéine associée à la chromatine HMGB1 (*high-mobility group box 1*). Ces molécules, lorsqu'elles sont libérées et présentes dans le milieu extracellulaire, sont nommées *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Elles sont détectées par les cellules sentinelles qui réagissent en sécrétant rapidement des cytokines pro-inflammatoires telles que le *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), le *macrophage-inflammatory protein 2* (MIP-2) et le *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* (CINC), ce qui permet le recrutement rapide des leucocytes circulants [2, 5, 6] (**Figure annexe 2-2**). Les mastocytes sont particulièrement importants dans les premiers instants de la réaction inflammatoire. Ils sont capables de sécréter des facteurs préformés et accumulés dans leurs granules comme le TNF- α , l'histamine et la tryptase. Les mastocytes peuvent également synthétiser *de novo* une panoplie d'autres cytokines comme l'interleukine-6 (IL-6), l'IL-

1b, etc. [7]. En plus de leur rôle important dans le recrutement des leucocytes sanguins, ces différentes cytokines peuvent favoriser l'activation et la prolifération des myoblastes [2, 8] (**Figure annexe 2-2**). En effet, un milieu de culture conditionné par des mastocytes induit *in vitro* la prolifération des myoblastes [9] et *in vivo*, l'inhibition des mastocytes perturbe le recrutement des leucocytes et la récupération musculaire à long terme [10]. L'initiation de l'inflammation est donc directement reliée à l'activation des cellules myogéniques.

A2.3 Développement de l'Inflammation et Régénération Musculaire

Les granulocytes, particulièrement les neutrophiles, envahissent rapidement le tissu musculaire endommagé, où ils phagocytent les agents pathogènes et les débris cellulaires (**Figure annexe 2-2**) [2]. Ils libèrent également des enzymes et des facteurs oxydants afin d'optimiser leur capacité de clairance du tissu endommagé [11]. Ainsi, dans un modèle de blessure musculaire induite par une toxine ou une infection, la suppression des neutrophiles entraîne la persistance des fibres nécrotiques [12]. La forte capacité catabolique des neutrophiles a cependant été associée également à l'induction de dommages collatéraux observés à la suite du recrutement massif de ces cellules induit par ischémie-reperfusion du tissu musculaire [13]. Les effets positifs ou négatifs des neutrophiles sur la régénération tissulaire dépendraient de leur degré d'activation qui varie selon le type et la gravité de la lésion tissulaire. Ainsi, dans un modèle modéré de dommage, produit par la remise en charge de muscles atrophiés, les neutrophiles ne présentent pas d'effet néfaste sur le regain de la force musculaire. Cependant, dans ce même modèle, l'ajout d'un agent bactérien active les neutrophiles qui induisent alors des dommages secondaires au tissu musculaire [14]. Récemment, un effet favorable sur la régénération musculaire d'un autre type de granulocytes, les éosinophiles, a été montré *via* leur capacité à produire de l'IL-4 [15]. La sécrétion importante de cette cytokine anti-inflammatoire influence le destin cellulaire des progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs), des cellules qui peuvent se différencier soit en fibroblastes, soit en adipocytes. L'IL-4 libérée par les éosinophiles favorise donc la prolifération des FAPs, inhibe leur différenciation en adipocytes et augmente leur capacité

de phagocytose des débris tissulaires, permettant ainsi une meilleure régénération musculaire [15].

Les granulocytes sont également à l'origine de la libération de cytokines qui vont influencer le déroulement de l'inflammation. La sécrétion de cytokines comme MIP-1a et MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) par les neutrophiles favorise ainsi le recrutement des monocytes sanguins (**Figure annexe 2-2**) [16]. Chez l'homme, deux catégories de monocytes ont été identifiées en fonction de l'expression de différents marqueurs de surface : les monocytes classiques $CD14^{++}CD16^{-}$ et les monocytes $CD14^{low}CD16^{++}$. Chez la souris, les monocytes CX_3CR1 (*chemokine [C-X₃-C motif] receptor 1*) $^{low}CCR2$ (*chemokine [C-C motif] receptor 2*) $^{+}Ly6C$ (*lymphocyte antigen 6 complex*) $^{+}$ (ci-après nommés $Ly6C^{+}$) et les monocytes $CX_3CR1^{high}CCR2^{-}Ly6C^{-}$ (ci-après nommés $Ly6C^{-}$) sont respectivement les homologues des monocytes humains $CD14^{++}CD16^{-}$ et $CD14^{low}CD16^{++}$ [17]. Les monocytes classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$) représentent environ 90 % de la population totale des monocytes chez l'homme alors que leur équivalent murin ($Ly6C^{+}$) représente environ 50-60 % [17]. Les deux types de monocytes ont des fonctions et des propriétés différentes. Grâce à leurs récepteurs CX_3CR1 , les monocytes $Ly6C^{-}$ patrouillent les vaisseaux sanguins dans les tissus sains. Les monocytes $Ly6C^{+}$, quant à eux, infiltrent les tissus endommagés à l'aide de leur récepteur $CCR2$ [17-19].

À la suite de leur infiltration dans le tissu, les monocytes $Ly6C^{+}$ vont entreprendre un processus de maturation en macrophages $Ly6C^{+}$. L'accumulation de ces macrophages dans le tissu lésé peut également avoir pour origine une prolifération locale [20]. Les macrophages $Ly6C^{+}$ sont identifiés comme des macrophages pro-inflammatoires : ils sécrètent de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-a et l'IL-1b [18]. En plus de favoriser le recrutement leucocytaire, les macrophages $Ly6C^{+}$, par l'environnement pro-inflammatoire qu'ils induisent, affectent les cellules myogéniques en favorisant la prolifération des myoblastes et en réprimant leur différenciation [18]. *In vivo*, la suppression des macrophages est associée à une persistance des débris tissulaires, à une accumulation de tissu adipeux et fibreux et à une déficience dans la prolifération des cellules myogéniques [21]. L'accumulation transitoire et contrôlée de leucocytes pro-

inflammatoires est donc nécessaire afin de bien coordonner l'activité des cellules myogéniques et permettre une régénération musculaire optimale.

A2.4 Résolution de l'Inflammation et Régénération Musculaire

Dans les premières 24 à 48 heures suivant une blessure musculaire, les cellules Ly6C⁺ sont les macrophages qui prédominent dans le tissu lésé. Cependant, par la suite, les macrophages Ly6C⁻ deviennent la population majoritaire. Pourtant, les monocytes Ly6C⁻ n'infiltrent pas significativement le tissu musculaire lésé. Il a en effet été montré que l'accumulation de ces macrophages provenait de la maturation de macrophages Ly6C⁺ induite, entre autres, après qu'ils aient phagocyté des neutrophiles apoptotiques ou des débris cellulaires (**Figure annexe 2-2**) [18]. Le changement de phénotype des macrophages est très important puisque ces deux populations ont des effets différents. Contrairement aux Ly6C⁺, les macrophages Ly6C⁻ expriment des niveaux plus faibles de cytokines pro-inflammatoires. En revanche, ils produisent de hauts niveaux de molécules anti-inflammatoires et de facteurs de croissance comme l'IL-10 et le TGF- β (*tumor growth factor-beta*) [18]. Ainsi, les macrophages Ly6C⁻ sont identifiés comme cellules anti-inflammatoires et ont pour rôle de diminuer l'infiltration leucocytaire. Les macrophages anti-inflammatoires ont également un effet différent sur les cellules myogéniques. Ils répriment la prolifération des myoblastes et stimulent leur différenciation et leur fusion en myotubes *via* la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 (**Figure annexe 2-2**). La sécrétion du facteur de croissance IGF-1 (*insulin growth factor-1*) par les macrophages anti-inflammatoires permet également de stimuler la croissance des fibres musculaires en activant la voie de signalisation Akt-1 (protéine kinase B ou PKB) qui promeut la synthèse protéique et diminue la dégradation des protéines [22]. *In vivo*, un modèle de souris transgéniques, déficientes pour l'activation du facteur de transcription C/EBP β (*CCAAT-enhancer-binding protein*) chez lesquelles la transition des macrophages vers le phénotype anti-inflammatoire est inhibée, a montré que le nettoyage des débris tissulaires n'est pas affecté en l'absence des macrophages anti-inflammatoires, mais que la

différenciation des myoblastes et la croissance des fibres musculaires étaient déficientes [23].

Il est important de noter que les phases pro- et anti-inflammatoires peuvent se chevaucher, les différentes sous-populations de macrophages se retrouvant alors simultanément au niveau de la même zone régénérative [24, 25]. Chez l'homme, il a été observé que les zones régénératives d'un muscle contenant des myoblastes prolifératifs présentent préférentiellement des macrophages pro-inflammatoires. À l'inverse, les zones régénératives du même muscle qui contiennent des myocytes différenciés renferment quant à elles majoritairement des macrophages anti-inflammatoires [25]. Cette proximité des deux types cellulaires renforce l'hypothèse selon laquelle les macrophages exercent un effet paracrine sur les cellules myogéniques. Il a de plus été montré que le contact physique direct entre macrophages et cellules myogéniques *via* certaines molécules d'adhésion favorisait la survie des myoblastes et des myotubes [26].

En parallèle à la réaction impliquant les cellules de l'immunité innée, les cellules de l'immunité adaptative pourraient également participer au processus de régénération musculaire. Bien qu'ils soient classiquement associés à l'immuno-surveillance, des lymphocytes et des cellules dendritiques ont été observés au niveau de muscles blessés en condition stérile [5]. Les lymphocytes pourraient influencer soit directement, soit indirectement, la régénération musculaire stérile. Des souris déficientes en lymphocytes T régulateurs (Tregs) présentent des concentrations élevées d'interféron-gamma (IFN-g) concourant au maintien du phénotype pro-inflammatoire des macrophages [27]. *In vitro*, les lymphocytes sécrètent des cytokines susceptibles de favoriser directement la myogenèse [28]. Différentes études ont montré que les lymphocytes Tregs favorisent la conversion des macrophages vers le phénotype anti-inflammatoire, qu'ils stimulent la prolifération des cellules satellites à la suite d'une blessure stérile et promeuvent la régénération musculaire (**Figure annexe 2-2**) [29, 30]. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de comprendre le rôle exact et les mécanismes d'action des différents types de lymphocytes dans la régénération musculaire stérile.

A2.5 Inflammation et Conditions Pathologiques ou Chroniques

A2.5.1 Dystrophie musculaire

Les évidences scientifiques démontrent clairement les effets positifs des différents leucocytes sur la régénération musculaire dans des modèles de blessures musculaires aiguës et stériles. Cependant, une infiltration chronique ou mal coordonnée de ces divers types cellulaires peut nuire à la régénération musculaire. Ainsi, des blessures musculaires successives induites par deux injections de notexine² séparées de quelques jours provoquent une régénération musculaire asynchrone, un recrutement leucocytaire chronique et augmentent la fibrose tissulaire [31]. Plusieurs conditions dégénératives ou pathologiques entraînent de façon similaire une dérégulation du recrutement leucocytaire. Ainsi, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), une maladie génétique induite par l'absence d'une protéine structurale importante, la dystrophine, est caractérisée par des cycles de dégénération et de régénération provoquant nécrose tissulaire, fibrose et infiltration inflammatoire chronique [32]. Bien que la structure primaire des muscles dystrophiques soit altérée, une partie importante des dommages observés est tributaire des événements secondaires dont, entre autres, l'état inflammatoire chronique. Les neutrophiles et les mastocytes jouent un rôle néfaste dans les muscles de souris dystrophiques (*mdx*), et la déplétion de ces cellules diminue la nécrose cellulaire (**Figure annexe 2-3**) [33, 34]. Les mastocytes et les neutrophiles représentent une source importante d'enzymes protéolytiques (par exemple de sérine protéases, chymase, élastase, cathepsine G) et d'agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide hypochloreux (HOCl) qui peuvent induire des effets myotoxiques lorsqu'ils sont présents en concentration importante. Les macrophages, bien qu'essentiels à la réparation tissulaire lors d'une blessure aiguë, sont « désorganisés » dans ce type de blessure chronique. En effet, les macrophages pro-inflammatoires, qui demeurent normalement actifs quelques jours à la suite d'une blessure aiguë, sont présents de façon chronique dans les muscles dystrophiques, ce qui limite leur changement de phénotype vers un profil anti-inflammatoire qui est l'acteur de la réparation

² La notexine est une toxine de la famille des phospholipases A2 extraite du venin de *Notechis scutatus scutatus*, serpent tigre australien.

musculaire [24]. Cette présence prolongée des macrophages pro-inflammatoires est à l'origine des effets myotoxiques [24]. De plus, dans les muscles de souris dystrophiques *mdx*, les macrophages présentent un phénotype hybride et sécrètent du TGF- β qui agit sur les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs) et stimule la fibrose (**Figure annexe 2-3**) [35]. Les lymphocytes sont eux aussi impliqués dans la dégénérescence des muscles dystrophiques [30]. Ainsi, dans les souris dystrophiques *mdx*, la déplétion des lymphocytes B et T diminue grandement la fibrose dans le diaphragme et les muscles de la cuisse (**Figure annexe 2-3**) [36]. Néanmoins, l'ablation du thymus, siège des lymphocytes T, augmente, à long terme, la dysfonction musculaire des souris dystrophiques. Ceci pourrait provenir de la suppression des lymphocytes Tregs [37]. En effet, ces lymphocytes jouent un rôle dans les sites nécrosés des souris *mdx* où ils augmentent l'expression d'IL-10, favorisant ainsi l'activité des macrophages anti-inflammatoires [27]. La dégénération chronique observée dans les muscles dystrophiques affecte donc le recrutement et l'activité des leucocytes qui, à leur tour, perturbent l'activité des cellules myogéniques.

A2.5.2 Vieillesse

Bien que non pathologique, le vieillissement est associé à une détérioration chronique du tissu musculaire et à une diminution de sa capacité de régénération. Des études récentes ont montré l'apparition de déficits intrinsèques dans les cellules satellites provenant de muscles âgés [38]. De plus, les facteurs extrinsèques, tels que le vieillissement du système immunitaire, les changements hormonaux, ou la dénutrition, peuvent affecter de façon importante la capacité régénérative des muscles âgés. Plus spécifiquement, le vieillissement du système immunitaire se traduit par un déficit d'activation des macrophages [39]. En effet, bien que l'infiltration des macrophages soit similaire dans un muscle jeune ou âgé, il existe dans les macrophages présents dans les muscles âgés une déficience de polarisation vers les phénotypes pro- ou anti-inflammatoires [39, 40]. Cette absence de conversion phénotypique des macrophages se traduit par une diminution de la sécrétion de plusieurs cytokines ayant un potentiel myogénique. *In vitro*, des expériences de coculture de myoblastes âgés avec des macrophages provenant de donneurs jeunes ou âgés ont montré

une augmentation significative de la prolifération des myoblastes en présence de macrophages de sujets jeunes [41]. Les perturbations dans le recrutement et l'activité des leucocytes peuvent donc nuire à la régénération des muscles vieillissants [42].

A2.6 Perspectives

Les modalités anti-inflammatoires sont couramment utilisées pour le traitement des blessures musculo-squelettiques. Ces thérapies présentent un potentiel thérapeutique pour de nombreuses conditions pathologiques chroniques [43]. Les anti-inflammatoires corticostéroïdiens demeurent l'un des seuls traitements efficaces pour préserver, partiellement et temporairement, la fonction musculaire chez les patients atteints de DMD [43]. Cependant, ils agissent à différents niveaux et génèrent de nombreux effets secondaires. L'ensemble des résultats présentés dans cette revue montre que l'activation et l'accumulation coordonnée et contrôlée des différents types de leucocytes sont essentielles afin de guider de façon optimale le comportement des cellules myogéniques [44]. L'efficacité des thérapies anti-inflammatoires sur la régénération du tissu musculosquelettique lors d'une blessure aiguë et stérile est controversée [45]. L'amélioration de notre compréhension des mécanismes inflammatoires a permis d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques comme le développement d'inhibiteurs spécifiques de cytokines inflammatoires, d'agents anaboliques, ou d'agents anti-fibrotiques [46]. L'avantage principal de ces nouvelles thérapies est leur spécificité qui permet de cibler directement les effets néfastes de l'inflammation chronique sans pour autant supprimer les effets positifs des différents acteurs inflammatoires. Ces nouvelles molécules spécifiques pourraient potentiellement diminuer les effets secondaires relatifs aux traitements conventionnels. Bien qu'ils ne s'attaquent pas directement à la cause primaire des pathologies, ces traitements présentent néanmoins un potentiel thérapeutique important et pourraient aider à préserver la fonction musculaire et la qualité de vie des patients atteints de dysfonctions musculaires.

A2.7 Liens d'intérêt

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

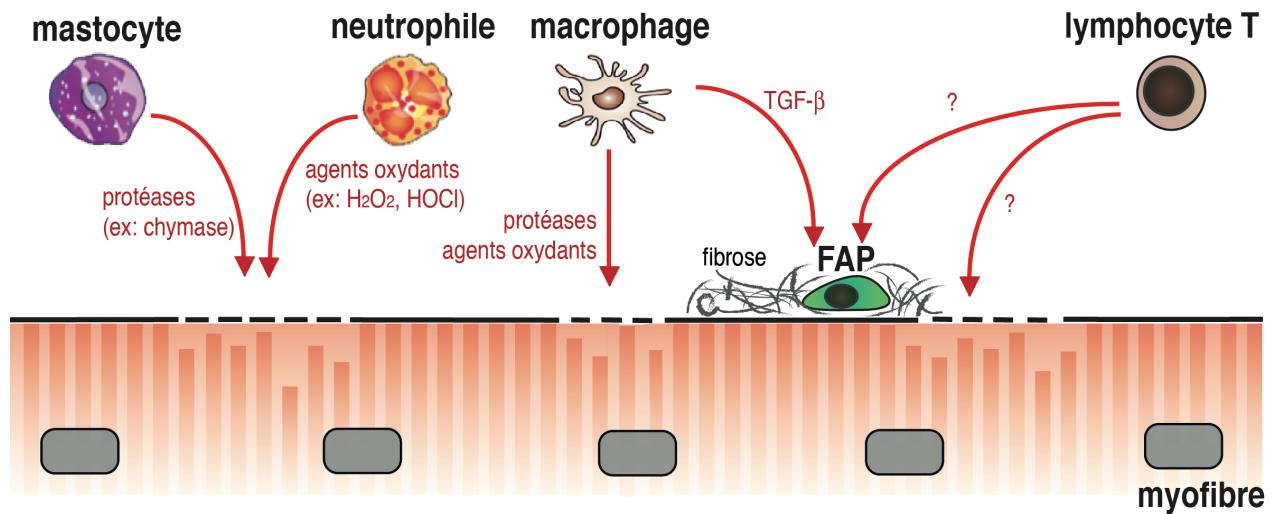
A2.9 Références

1. Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes M-C, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol* 2015 ; 5 : 1027-59.
2. Bentzinger CF, Wang YX, Dumont NA, Rudnicki MA. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep* 2013 ; 14 : 1062-72.
3. Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2014 ; 14 : 392-404.
4. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 2013 ; 14 : 986-95.
5. Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, *et al.* Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum* 2010 ; 62 : 268-79.
6. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010 ; 10 : 427-39.
7. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005 ; 6 : 135-42.
8. Duchesne E, Tremblay M-H, Côté CH. Mast cell tryptase stimulates myoblast proliferation; a mechanism relying on protease-activated receptor-2 and cyclooxygenase-2. *BMC Musculoskelet Disord* 2011 ; 12 : 235.
9. Duchesne E, Bouchard P, Roussel M-P, Côté CH. Mast cells can regulate skeletal muscle cell proliferation by multiple mechanisms. *Muscle Nerve* 2013 ; 48 : 403-14.
10. Dumont N, Lepage K, Côté CH, Frenette J. Mast cells can modulate leukocyte accumulation and skeletal muscle function following hindlimb unloading. *J Appl Physiol (Bethesda Md 1985)* 2007 ; 103 : 97-104.
11. Dumas A, Pouliot M. Le neutrophile : ennemi ou ami ? *Méd Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 699-704.
12. Teixeira CFP, Zamuner SR, Zuliani JP, *et al.* Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom. *Muscle Nerve* 2003 ; 28 : 449-59.
13. Iwahori Y, Ishiguro N, Shimizu T, *et al.* Selective neutrophil depletion with monoclonal antibodies attenuates ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Reconstr Microsurg* 1998 ; 14 : 109-16.
14. Dumont N, Bouchard P, Frenette J. Neutrophil-induced skeletal muscle damage: a calculated and controlled response following hindlimb unloading and reloading. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008 ; 295 : R1831-8.
15. Heredia JE, Mukundan L, Chen FM, *et al.* Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* 2013 ; 153 : 376-88.
16. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, *et al.* The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000 ; 177 : 195-203.
17. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003 ; 19 : 71-82.
18. Arnold L, Henry A, Poron F, *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J*

- Exp Med* 2007 ; 204 : 1057-69.
19. Auffray C, Fogg D, Garfa M, *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007 ; 317 : 666-70.
 20. Côté CH, Bouchard P, Rooijen N van, *et al.* Monocyte depletion increases local proliferation of macrophage subsets after skeletal muscle injury. *BMC Musculoskeletal Disord* 2013 ; 14 : 359.
 21. Segawa M, Fukada S, Yamamoto Y, *et al.* Suppression of macrophage functions impairs skeletal muscle regeneration with severe fibrosis. *Exp Cell Res* 2008 ; 314 : 3232–3244.
 22. Dumont N, Frenette J. Macrophages protect against muscle atrophy and promote muscle recovery *in vivo* and *in vitro*: a mechanism partly dependent on the insulin-like growth factor-1 signaling molecule. *Am J Pathol* 2010 ; 176 : 2228-35.
 23. Ruffell D, Mourkioti F, Gambardella A, *et al.* A CREB-C/EBPbeta cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 17475-80.
 24. Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, *et al.* Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2009 ; 18 : 482-96.
 25. Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, *et al.* Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells* 2013 ; 31 : 384-96.
 26. Sonnet C, Lafuste P, Arnold L, *et al.* Human macrophages rescue myoblasts and myotubes from apoptosis through a set of adhesion molecular systems. *J Cell Sci* 2006 ; 119 : 2497-507.
 27. Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, *et al.* Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 2014 ; 6 : 258ra142.
 28. Al-Shanti N, Durcan P, Al-Dabbagh S, *et al.* Activated lymphocytes secretome inhibits differentiation and induces proliferation of C2C12 myoblasts. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2014 ; 33 : 117-28.
 29. Castiglioni A, Corna G, Rigamonti E, *et al.* FOXP3+ T Cells recruited to sites of sterile skeletal muscle injury regulate the fate of satellite cells and guide effective tissue regeneration. *PloS One* 2015 ; 10 : e0128094.
 30. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, *et al.* A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* 2013 ; 155 : 1282-95.
 31. Dadgar S, Wang Z, Johnston H, *et al.* Asynchronous remodeling is a driver of failed regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Biol* 2014 ; 207 : 139-58.
 32. Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes M-C, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol* 2015 ; 5 : 1027-59.
 33. Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2006 ; 16 : 591-602.
 34. Radley HG, Grounds MD. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol Dis* 2006 ; 23 : 387-97.
 35. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med* 2015 ; 21 : 786-94.

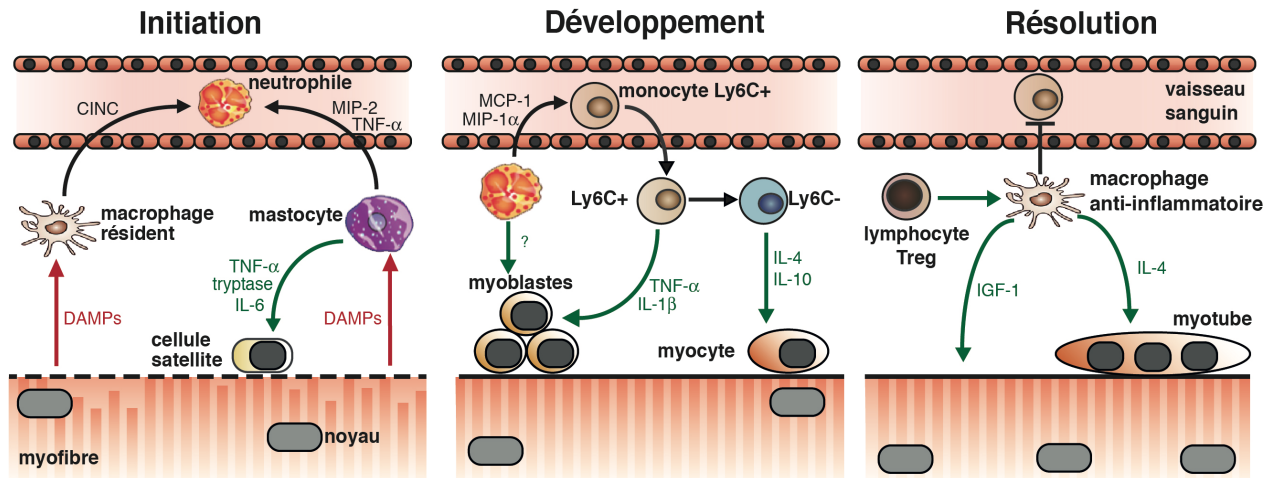
36. Farini A, Meregalli M, Belicchi M, *et al.* T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. *J Pathol* 2007 ; 213 : 229-38.
37. Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, *et al.* Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm* 2013 ; 2013 : 491497.
38. Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Dev Camb Engl* 2015 ; 142 : 1572-81.
39. Przybyla B, Gurley C, Harvey JF, *et al.* Aging alters macrophage properties in human skeletal muscle both at rest and in response to acute resistance exercise. *Exp Gerontol* 2006 ; 41 : 320-7.
40. Mahbub S, Deburghraeve CR, Kovacs EJ. Advanced age impairs macrophage polarization. *J Interferon Cytokine Res* 2012 ; 32 : 18-26.
41. Paliwal P, Pishesha N, Wijaya D, Conboy IM. Age dependent increase in the levels of osteopontin inhibits skeletal muscle regeneration. *Aging* 2012 ; 4 : 553-66.
42. Peake J, Gatta PD, Cameron-Smith D. Aging and its effects on inflammation in skeletal muscle at rest and following exercise-induced muscle injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010 ; 298 : R1485-95.
43. Villalta SA, Rosenberg AS, Bluestone JA. The immune system in Duchenne muscular dystrophy: Friend or foe. *Rare Dis* 2015 ; 3 : e1010966.
44. Chazaud B, Chrétien F, Gherardi RK. Les macrophages régulent les différentes phases de la régénération musculaire. *Méd Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 794-5.
45. Marsolais D, Frenette J. Inflammation et réparation tendineuse. *Méd Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 181-6.
46. LUCA A DE. Pre-clinical drug tests in the mdx mouse as a model of dystrophinopathies: an overview. *Acta Myol* 2012 ; 31 : 40-7.

A2.10 Figures et légendes



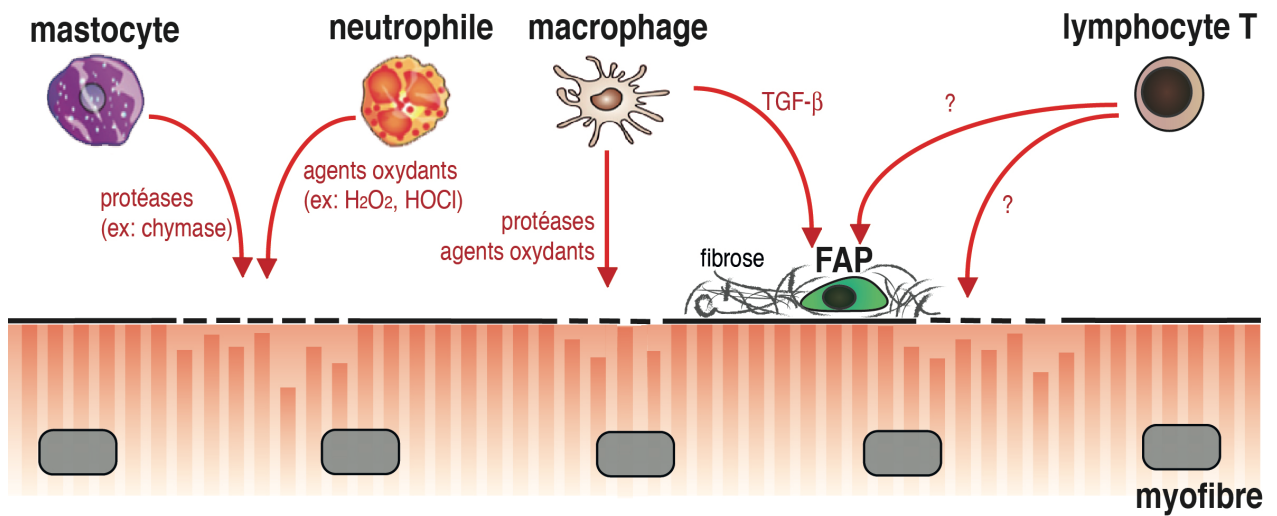
Annexe: 2-1: *Leucocytes dans le muscle squelettique sain*

Le schéma montre la localisation de différents types de leucocytes dans le tissu musculaire sain. Les mastocytes et les macrophages résidents se retrouvent dans les compartiments interstitiels du muscle. De nombreux leucocytes sont présents dans la circulation sanguine tels que les neutrophiles, les lymphocytes, les éosinophiles et les monocytes Ly6C⁻ et Ly6C⁺.



Annexe: 2-2: Effets des différents leucocytes sur la régénération musculaire suite à une blessure aiguë et stérile.

Lors de la phase d'initiation de l'inflammation (schéma de gauche), le tissu lésé libère des molécules (DAMPs) permettant l'activation des cellules sentinelles telles que les mastocytes et les macrophages résidents. Ces derniers relâchent une panoplie de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*), le MIP-2 (*macrophage-inflammatory protein 2*) et le CINC (*cytokine-induced neutrophil chemoattractant*), qui vont favoriser l'infiltration des neutrophiles sanguins. La sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les mastocytes va également favoriser l'activation et la prolifération des cellules satellites. Lors de la phase de développement de l'inflammation (schéma du milieu), les neutrophiles promeuvent le recrutement des monocytes sanguins Ly6C⁺. Suite à leur infiltration, les monocytes Ly6C⁺ entament un processus de maturation en macrophages Ly6C⁺. Les monocytes/macrophages Ly6C⁺ génèrent des facteurs pro-inflammatoires favorisant la prolifération des myoblastes. Par la suite, les macrophages Ly6C⁺ évoluent en macrophages Ly6C⁻ qui libèrent des facteurs anti-inflammatoires favorisant la différenciation des myoblastes en myocytes. Lors de la phase de résolution de l'inflammation (schéma de droite), les lymphocytes T régulateurs (Tregs) stimulent la conversion des macrophages vers le phénotype anti-inflammatoire. Les macrophages anti-inflammatoires sécrètent des cytokines anti-inflammatoires qui répriment le recrutement leucocytaire en plus de favoriser la fusion des myotubes, ainsi que des facteurs de croissance favorisant la croissance des fibres musculaires. IL- : interleukine ; MCP : *monocyte chemoattractant protein* ; IGF : *insulin growth factor*.



Annexe: 2-3: Leucocytes dans une condition musculaire dégénérative chronique.

Dans un modèle de blessure musculaire chronique, comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), l'activité des différents leucocytes est mal régulée. Les mastocytes, neutrophiles et macrophages libèrent de façon non contrôlée des protéases et des agents oxydants qui entraînent des dommages musculaires. Les macrophages et les lymphocytes libèrent également des facteurs comme le TGF- β (*tumor growth factor-beta*) qui stimulent l'activité des FAPs (progéniteurs fibro-adipogéniques) et augmentent la fibrose musculaire. H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; HOCl : acide hypochloreux.

Annexe 3 : Caractérisation des souches mycolactone-positive et mycolactone-négative du *M. ulcerans* sur le muscle squelettique : IGF-1 limite le catabolisme musculaire induit par la mycolactone

Investigation of wild-type and mycolactone-negative mutant *M. ulcerans* on skeletal muscle : IGF-1 protects against mycolactone-induced muscle catabolism

Sébastien S. Dufresne¹ and Jérôme Frenette^{1,2}

Affiliations

¹ Centre de Recherche du CHU de Québec- CHUL, Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 4G2

² Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, QC, Canada G1V 0A6.

Published in: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R753–R762, 2013.

Résumé

L'ulcère de Buruli (UB) est une maladie tropicale endémique et infectieuse causée par le *Mycobacterium ulcerans* (MU) qui affecte la majorité des tissus sous-cutanés, dont le muscle squelettique. Le muscle infecté est assujéti à des dysfonctionnements et contractures graves. L'objectif de cette étude est d'étudier les effets d'une infection par les souches mycolactone-positive (WT) et mycolactone-négative (Mneg) de MU sur les myotubes ou les muscles squelettiques différenciés. L'infection par le MU-WT a diminué de 22% et 29% la force musculaire maximale aux 7^e et 42^e jours post-infection respectivement. Le MU-Mneg n'a induit aucune perte de force au 7^e jour post-infection, mais une diminution significative de 13% a été observée au 42^e jour. À ce même moment, les concentrations tissulaires de neutrophiles et de macrophages étaient augmentées de 13,2 et 4,3 fois suite à l'infection par le MU-WT et seulement de 2,4 et 5,5 fois dans le groupe MU-Mneg. *In vitro*, la prolifération des myoblastes a diminué de 20%, le diamètre de myotubes a chuté de 45%, les niveaux protéiques de myosine ont diminué de 32%, alors que ceux de MuRF-1 ont augmenté de 22,8% lorsque les myotubes C2C12 étaient incubés pendant 48 h avec MU-WT à un ratio 5:1. Aucun effet significatif n'a été observé avec la souche MU-Mneg. Fait intéressant, l'addition de 1000 ng/ml d'IGF-1 à la co-culture MU-WT / C2C12 a amélioré de manière significative tous lesdits paramètres biologiques. Cet article a clairement établi que le dysfonctionnement musculaire et l'inflammation chronique en présence du MU-WT est en grande partie causée par la libération de la mycolactone et que l'ajout de l'IGF-1 recombinant a été suffisant pour atténuer certains des effets anti-prolifératifs et atrophiques de la mycolactone.

Abstract

Buruli ulcer (BU), which is caused by *Mycobacterium ulcerans* (MU), is an endemic and neglected tropical disease that affects mostly subcutaneous tissues. Skeletal muscle under infected skin is also subject to serious dysfunctions and contractures. The goal of this study was to investigate the effects of an infection with the wild-type *Mycobacterium ulcerans* (WT-MU) or the mycolactone-negative *Mycobacterium ulcerans* (M^{neg}-MU) mutant strains on myotubes or fully differentiated skeletal muscles. WT-MU infection decreased by 22%, and the maximal muscle force decreased by 29% at days 7 and 42 post-infection, respectively, while M^{neg}-MU induced no decrease on day 7 post-infection and there was a low but significant 13% decrease in muscle force on day 42. A 13.2-fold and 4.3-fold increase in neutrophil and macrophage concentrations was observed on day 42 following the injection of WT-MU. However, the increases in neutrophil and macrophage concentrations were 2.4-fold and 5.5-fold in M^{neg}-MU. Myoblast proliferation decreased by 20%, myotube diameter by 45%, and MyHC levels by 32% while MuRF-1 levels increased by 22.8% when C2C12 cells and WT-MU were co-cultured for 48h at a multiplicity of infection of 5:1. In contrast, M^{neg}-MU had no significant effect. Interestingly, the addition of 1000 ng/ml of IGF-1 to the WT-MU/C2C12 co-culture significantly improved all these biological parameters. The present investigation clearly established that muscle dysfunction and chronic inflammation in the presence of WT-MU is largely caused by the release of mycolactone and the addition of recombinant IGF-1 was sufficient to alleviate some of the antiproliferative and atrophic effects of mycolactone.

A3.1 Introduction

Buruli ulcer (BU), which is caused by *Mycobacterium ulcerans* (MU) infections, is a disease of wet tropical and subtropical zones and is closely related to tuberculosis and leprosy (38, 47). It is widely distributed in over 30 countries, and the rate of morbidity may surpass tuberculosis and leprosy in some endemic regions of Africa (2, 49). Each year, 5000-6000 new cases of BU are reported and more than 50% of which are in children under 15 years of age (10, 37). Recent animal studies have shown that BU spreads well beyond the skin and significantly affects the underlying tissues, including skeletal muscles. (25-28).

Mycolactone, a macrolide toxin with highly destructive capacities, is the deleterious agent of MU. It can cause skin necrosis, cell cycle arrest, immunosuppression, cell death by apoptosis, and necrosis (19, 23, 36, 48). Mycolactone-negative MU mutants are reportedly non-virulent and non-cytotoxic for subcutaneous tissues and leukocytes (1, 8, 36). Mycolactone diffuses passively through infected tissues and can rapidly penetrate cells. It enters the cytoplasm, but not the nuclear membrane (45). Once inside the cell, mycolactone blocks the expression of several cytokines and chemokines in leukocytes (7, 24, 42). Recent evidence found on human monocytes suggests that the mechanism by which mycolactone modulates protein synthesis inhibits the translation of mRNA into a specific subset of proteins (42). The injection of mycolactone into soleus muscles induces an important, persistent loss in muscle force. Mycolactone hijacks some key components of muscle growth and repair processes and, as a result, impairs muscle regeneration (26).

Akt1, or protein kinase B (PKB), is one of the most important signaling pathways for protein synthesis and muscle growth. IGF-1 activates Akt1 and acts as a key regulator of both atrophy and hypertrophy (35). The phosphorylation of Akt1 by the IGF-1 receptor blocks muscle protein breakdown by downregulating ubiquitin E3 ligase MAFbx/atrogen-1 and muscle ring finger protein 1 (MuRF-1) through the phosphorylation (inactivation) of the Forkhead Box O (FOXO) transcription factor (40). Akt1 is also well known for its ability to stimulate the mammalian target of rapamycin (mTOR), which in turn promotes

protein synthesis by phosphorylating p70-S6 kinase 1 (p70S6K1) and eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1 (4E-BP1) (44). Since mycolactone is a macrolide molecule that purportedly acts independently of mTOR, and given that this signaling pathway is a potential effector of IGF-1, using IGF-1 to counter the catabolic effects of mycolactone is worth investigating (40).

The first objective of the present study was to compare and characterize the effect of wild-type *Mycobacterium ulcerans* (WT-MU) and a mycolactone-negative mutant *Mycobacterium ulcerans* (M^{neg}-MU) strain on fully differentiated skeletal muscles and on cultured myoblasts and myotubes. The second objective was to determine whether the addition of exogenous IGF-1 would rescue myoblast proliferation and prevent mycolactone-induced myotube atrophy. Hypotheses were that only WT-MU influence differentiated skeletal muscle/cultured muscular cells, and that IGF-1 protects myoblasts and myotubes against mycolactone. Our results confirmed that WT-MU and, to a much lesser extent, M^{neg}-MU, decreased muscle force and increased leukocyte accumulation in brachial biceps muscles, a subcutaneous muscle near the site of infection. Moreover, WT-MU, but not M^{neg}-MU, inhibited myoblast proliferation and induced myotube atrophy, mainly through the activation of MuRF-1. The addition of exogenous IGF-1 rescued myoblast proliferation and myotube atrophy, downregulated MuRF-1 expression, and preserved the content in myosin heavy chain (MyHC), the key protein of the contractile apparatus.

A3.2 Materials and methods

A3.2.1 Animals

Ninety-six male C57BL/6 mice weighing 20-22 g (Charles Rivers Laboratories, Senneville, QC, Canada) were housed one per cage in our animal facility. Food and water were provided *ad libitum*. All animal procedures were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee according to the Canadian Council on Animal Care guidelines.

A3.2.2 Mycobacterium Ulcerans and Mycolactone

WT-MU was originally isolated from a human ulcer in 2005 and was identified by RT-PCR using the specific insertion sequence IS2404 and by Ziehl-Neelsen staining (25-28). M^{neg}-MU was a spontaneous mutant isolated from nonpigmented colonies of MU 1615, a strain from Malaysia that produces mycolactone A/B (34). M^{neg}-MU was kindly given by Dr. Pamela L.C. Small (University of Tennessee, USA). The two strains were grown for 6-8 weeks on Loewenstein-Jensen agar medium at 30°C in a low-oxygen environment containing 5% CO₂. Purified and synthetic mycolactone A/B was graciously provided by Dr. Yoshito Kishi (Harvard University, USA).

A3.2.3 Injection Procedures

WT-MU and M^{neg}-MU were suspended and homogenized in ID broth solution (purified water (one liter), potassium chloride (7,5g), calcium chloride (0,5g), tricine glycine (0,895 g) and polysorbate 80 (0,025%)) (BD Pharmingen, San Jose, California, USA) using a syringe needle, and total counts were determined using a Petroff-Hausser chamber and a microscope at 400x magnification (46). The mice were anesthetized with isoflurane. WT-MU and M^{neg}-MU were subcutaneously injected at a concentration of 1×10^6 acid-fast bacilli

(30 μ l, AFB) in proximity to the right brachial biceps (proximate-infected biceps muscle (PIB)). The mice were sacrificed on days 3, 7, or 42 post-infection. Mice uninfected or subcutaneously injected with ID broth solution (30 μ l) in proximity to the right biceps were used as controls.

A3.2.4 Isometric Contractile Properties and Tissue Freezing

The mice received buprenorphine as an analgesic (0.1 mg/kg, i.p.) at least 15 min before being anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg, i.p.) (18). The right brachial biceps were dissected and incubated in a buffered physiological salt solution (Krebs-Ringer) as previously described (16, 18, 41). Time-to-peak twitch tension (TPT, ms), half-relaxation time (1/2 RT, ms), twitch tension (P_t , g), maximum tetanic tension (P_0 , g), and maximum specific tetanic tension (sP_0 , N/cm²) values were obtained using a 305B-LR dual-mode lever arm system controlled by dynamic muscle control and data acquisition software (Aurora Scientific Inc., Aurora, ON, Canada). The cross-sectional areas of the brachial biceps were estimated by dividing the wet weight by the optimal muscle length multiplied by the muscle density (1.06 g/cm³) multiplied by the fiber-to-muscle length ratio, which was previously estimated, in our lab, to be 0.96 for mouse brachial biceps. At the end of the contractile property measurements, the tendons were removed, and the muscles were weighed, embedded in tissue freezing medium (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, USA), frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C until used for the immunohistochemical assays.

A3.2.5 Immunohistochemical Analyses

Transversal sections (10 μ m thick) of bicep muscles were cut at -20°C (CM1850 cryostat, Leica Microsystems, Germany) and adhered to Snowcoat X-tra™ slides (Surgipath, Richmond, IL, USA). The sections were fixed for 10 min in cold acetone and were quenched in 0.3 % hydrogen peroxide in PBS. Non-specific binding sites were blocked for 45 min in a buffer containing 100 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.2%

gelatin, 3% BSA, 2% horse serum, and 0.02% sodium azide. The sections were immunolabeled for 2 h at room temperature with rat anti-mouse F4/80 (1:100, Serotec, Oxford, UK) or Ly-6G and Ly-6C (Gr-1) antibodies (1:300, BD Pharmingen, USA) to identify macrophages and neutrophils, respectively. Marked cells were counted at 400x magnification, and the total areas of the sections were determined and multiplied by the thicknesses to express the number of each cell type per mm³. The concentrations of inflammatory cells were measured in duplicate in two mid-belly sections of right bicep muscles.

A3.2.6 Myofiber Cross-Sectional Area

Muscle tissue (10 µm thick) of the biceps were stained with H&E (Sigma-Aldrich). Three images of each muscle section were randomly acquired (×200 magnification), and approximately 150 fibers per section were analyzed. Myofiber cross-sectional areas (CSA) were calculated using ImageJ software (version 1.43, NIH, Bethesda, MA, USA).

A3.2.7 Cell Viability Rate

To determine non-cytotoxic conditions, myotubes and myoblasts were incubated with WT MU, M^{neg}MU, 10 ng/ml of mycolactone and 1000 ng of IGF-1 for a period of 48h. Cells were harvested and centrifuged at 500 × g for 3 min, washed once with PBS and resuspended in 200 µl media culture without serum on ice. The viability rate was quantified by flow cytometry using FITC annexin V/ propidium Iodide (PI) labeling of the myoblasts and myotube (apoptosis detection kit TACS by flow cytometry, Trevigen, Gaithersburg, MD). Annexin V labeled with fluorophore can identify apoptotic cells by binding to phospholipid phosphatidylserine exposed on the outer leaflet of the plasma membrane, while PI is a standard flow cytometric viability probe that discriminates between viable and nonviable cells. Thus, cells positive for FITC Annexin V and negative for PI undergo apoptosis. Cells positive for FITC Annexin V and PI are either at the end stage of apoptosis, are undergoing necrosis, or are already dead. Cells staining negative for FITC Annexin V and PI are alive. Flow cytometry was performed on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo software.

A3.2.8 Ziehl-Neelsen Staining

To locate MU in tissue, transversal sections (10 µm thick) of bicep muscles and skin were cut at -20 °C (CM1850 cryostat, Leica Microsystems, Germany) and adhered to Snowcoat X-tra™ slides (Surgipath, Richmond, IL, USA). Tissue sections were treated consecutively with hot carbol fuchsin solution for 10 min, tap water for 1 min, 20% sulphuric acid for 1 min and tap water for 1 min. Tissue sections were then immersed in methylene blue for 1 min, then rinsed with tap water and mounted. AFB stained pink, straight or a slightly curved rod-shape, and some had a beaded appearance.

A3.2.9 C2C12 Myoblast Proliferation

C2C12 myoblasts were cultured in DMEM (Hyclone) supplemented with 10% FBS and were seeded in DMEM supplemented with 1% FBS in 96-well plates at a density of 3,000 or 8,000 myoblasts/well for 24-h and 48-h proliferation assays. The numbers of WT-BU and M^{neg}-MU were estimated using a Petroff-Hausser counting chamber. The MU were added to the cultured myoblasts at multiplicities of infection (MOI) of 1:1, 2:1 or 5:1 (MU/myoblast). The MU/myoblast co-cultures were then incubated at 30°C for 24 or 48 h, and myoblast proliferation was determined using the tetrazolium colorimetric method (CellTiter 96 Aqueous, Promega, Madison, WI, USA) and compared to the standard curve. In a second set of experiments, C2C12 myoblasts were exposed to the same numbers of WT-MU or to 10 ng/ml of pure mycolactone. Thereafter, the WT-MU/myoblast co-cultures and myoblasts that had been exposed to mycolactone were treated with various concentrations of recombinant IGF-1 (0, 100, 200, 400, 500, or 1,000 ng/ml) (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) during 24 and 48 h.

A3.2.10 C2C12 Myotube Diameter Analysis

Confluent myoblasts in 6-well plates (300,000 cells/well) were incubated in DMEM supplemented with 1% FBS for 1 week to differentiate them into myotubes. WT-MU and M^{neg}-MU at MOI of 1:1, 2:1 or 5:1 (MU/myoblast) based on the initial number of

myoblasts or mycolactone (10 ng/ml) were then added to the myotubes for 24 and 48 h. Myotube diameters were measured using a light microscope (Nikon, Japan) at 100x magnification (16). Three sites in each well were blindly identified and were observed throughout the experiment. Myotube diameters were quantified using ImageJ software (version 1.43, NIH, Bethesda, MA, USA). Two or three measurements were performed per myotube and were averaged to give a single value. The diameters of 150 to 200 myotubes per well were measured.

A3.2.11 Western Blots

WT-MU (MOI of 1/1 and 5/1), M^{neg}-MU (MOI of 1/1 and 5/1), mycolactone (10 ng/ml), IGF-1 (1,000 ng/ml) and various combinations were then added to the myotubes for 48 h. The treated myotubes were washed with PBS, incubated for 30 min at 4°C in lysis buffer containing P8340 protease inhibitor cocktail (1 µl/ml, Sigma), and centrifuged for 10 min at 10,000 x *g*. The protein contents of the homogenates were measured using BCA protein assay kits (EMD Chemical, Darmstadt, Germany). The absorbance was measured at 560 nm and was compared to a standard curve. For the Western blot analyses, 40 µg of protein was separated on 9% SDS-polyacrylamide gels, and the protein bands were transferred to polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were blocked for 1 h in 5% skim milk and were then incubated overnight at 4°C with anti-MyHC (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-Akt1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-phosphorylated-Akt1, (1:200, EMD Millipore, Temecula, CA, USA), anti-atrogin-1 (1:500, ECM Biosciences, Versailles, KY) or anti-MuRF-1 antibody (1:1000, Santa Cruz Biotechnology). The membranes were rinsed and were incubated for 1 h with goat anti-rabbit (for MyHC, atrogin-1 and phosphorylated-Akt1, 1:10 000, Santa Cruz Biotechnology) or bovine anti-goat (for MuRF-1 and Akt1, 1:10,000, Santa Cruz Biotechnology) or horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted in 5% skim milk. The bands were revealed using the ECL-Plus chemiluminescent detection system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Images of the membranes were acquired, scanned, and analyzed using Quantity One software (version 4.6.6, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Because IGF-1 and mycolactone modulate the expression of several

muscle proteins frequently used as internal controls (actine, desmin, histone 3 and GAPDH), we stained Western blots with Ponceau Red as an alternative protein-loading control (21, 39).

A3.2.12 Statistical Analysis

All values are expressed as means \pm standard errors of the mean (SEM). The data were analyzed by two-way ANOVA to determine whether the variations among the experimental groups were significant (InStat software, version 3). When a significant F ratio was obtained, a posteriori test was performed (Tukey's protected least-significant differences test) to determine whether there were any specific differences. The level of significance was set at $p < 0.05$.

A3.3 Results

A3.3.1 WT-MU and, to a Much Lesser Extent, M^{neg}-MU, are Found in the Periphery of Skeletal Muscle, and Induced Leukocyte Accumulation and Loss of Muscle Function.

Ziehl-Neelsen staining showed positive labeling for AFB after 42 days in skin mice injected with WT-MU or M^{neg}-MU (Figure annexe 3-1A). PIB muscles were also positive (3/8 bicep muscles) for AFB in mice injected with MT-MU at 42 days post-infection. PIB muscles that were positive for AFB exhibited more important muscle necrosis and damage. All PIB muscles with M^{neg}-MU were negative for AFB. Furthermore, WT-MU increased neutrophil concentration by 15- and 13-fold at days 7 and 42 post-infection, respectively (Figures annexe 3-1B, 3-1C). WT-MU also increased the macrophage concentration by 4.5- and 4.3-fold at days 7 and 42 post-infection. While the numbers of neutrophils and macrophages were significantly higher in PIB muscles WT-MU, M^{neg}-MU only increased the numbers of neutrophils and macrophages by 5.6- and 2.5-fold, respectively, on day 42 post-infection compared to control values (Figures annexe 3-1B, 3-1D). No differences were observed in all experimental groups on day 3 post-infection.

To assess the functional impact of WT-MU and M^{neg}-MU, control and PIB muscles were isolated and electrically stimulated to measure their contractile properties. Muscle force production was affected by WT-MU on day 7 post-infection, as indicated by the Pt, P₀, and sP₀ values that decreased by 18%, 22%, and 25%, respectively. On the other hand, M^{neg}-MU had no effect on muscle contractility on day 7 post-infection (Figure annexe 3-2). On day 42 after WT-MU infection, the Pt, P₀, and sP₀ values decreased by 29%, 29%, and 31%. These results are significantly lower than at day 7 post-infection. Interestingly, M^{neg}-MU significantly decreased the Pt and P₀ values by 14.4% and 13.9%, respectively, by day 42 post-infection, indicating that the presence of MU alone without mycolactone secretion can negatively affect muscle function. No significant differences with respect to TPT and RT ½ were observed in all groups. Consistent with the loss of muscle force and function in WT-MU, the myofiber cross-sectional area was also decreased by 28% relative to control

after 42 days post-infection (Figure annexe 3-3). No differences in the myofiber cross-sectional area were found in M^{neg}-MU.

A3.3.2 WT-MU, but not M^{neg}-MU, Inhibits Myoblast Proliferation and Induces Myotube Atrophy.

First, we determined by flow cytometry that 10 ng/ml was very close to the maximum dose of mycolactone that did not induce significant apoptosis and necrosis of myotubes/myoblasts. Indeed, C2C12 myotubes or myoblasts exposed to 10 ng/ml of mycolactone during 48 h had a viability rate of $99 \pm 0,5$ % (Figure annexe 3-4). Treatment with 50 ng/ml of mycolactone decreased the viability rate at 52,5% and at 41,9% when the concentration is 100 ng/ml. Cells incubated with MOI of 5/1 of WT-MU and M^{neg}-MU are still alive. We then compared and characterized the effect of WT-MU and M^{neg}-MU on muscle cell proliferation and atrophy. To do so, myoblasts and myotubes were exposed to four different MOIs of WT-MU and M^{neg}-MU or a combination of M^{neg}-MU and 10 ng/ml of mycolactone. A MU/myoblast MOI of 1:1 had no significant impact on myoblast proliferation (Figure annexe 3-5). However, a WT-MU MOI of 2:1 inhibited myoblast proliferation by approximately 20%. The inhibitory effect of WT-MU on myoblast proliferation reached 40% at MOIs of 5:1 compared to control myoblasts after 24 and 48 h. M^{neg}-MU had no effect on myoblast proliferation after 24 and 48 h regardless of the MOI. However, the combination of M^{neg}-MU and 10 ng/ml of mycolactone decreased myoblast proliferation by over 50% after 24 and 48 h (Figure annexe 3-5). In regard to myotube atrophy, a WT-MU MOI of 1:1 reduced myotube diameters by 19% and 13% after 24 and 48 h, respectively (Figure annexe 3-6). Moreover, WT-MU MOIs of 2:1 and 5:1 induced 25-30% and 30-45% decreases in myotube diameter after 24 and 48 h, respectively.

A3.3.3 The Addition of Exogenous IGF-1 Partially Rescues the Inhibitory Effects of WT-MU and Mycolactone on Myoblast Proliferation and Myotube Atrophy.

Exogenous IGF-1 was added to reverse the inhibitory effect of WT-MU and mycolactone on myoblast proliferation and myotube growth. Proliferation decreased by 45% when the myoblasts were exposed to 10 ng/ml of mycolactone for 24 h. However, IGF-1 [1000 ng/ml] limited the mycolactone-induced decrease in myoblast proliferation to 16% after 24 h. Mycolactone caused a 66% decrease in myoblast proliferation after 48 h, while the addition of IGF-1 [1000 ng/ml] significantly reduced the decrease to 45% relative to control values after 48 h (Fig. A.3.7A). Consistent with the results obtained with mycolactone, the addition of IGF-1 [500-1000 ng/ml] was sufficient to partially rescue the proliferation of myoblasts co-cultured with WT-MU for 24 or 48 h (Figure annexe 3-7B). Since myotube atrophy correlates with myofibrillar loss and ubiquitin E3 ligase activation, AKT-1, pAKT-1, atrogen-1, MyHC and MuRF-1 levels were quantified in the presence of WT-MU, M^{neg}-MU, mycolactone, and/or IGF-1. When myotubes were co-cultured with WT-MU at a MOI of 5:1, MyHC levels decreased by 32% while MuRF-1 levels increased by 22% relative to the control values (Figures annexe 3-8A, 3-8B). Levels of atrogen-1, AKT-1 and pAKT-1 did not change in this co-culture (Figures annexe 3-8C-E). IGF-1 totally prevented the decrease in MyHC levels and reduced MuRF-1 expression to a similar level to that of the control. The M^{neg}-MU/ myotube co-culture did not produce any significant changes in MyHC, MuRF-1, atrogen-1, AKT-1 and p-AKT-1 levels (Figures annexe 3-8A-E). However, the addition of mycolactone to the M^{neg}-MU/myotube co-culture induced changes in MyHC and MuRF-1 levels that were similar to those observed with the WT-MU/ myotube co-cultures.

A3.4 Discussion

BU was originally thought to be associated with an immune system dysfunction (22, 33). We recently showed that BU extends well beyond the skin and significantly affects underlying skeletal muscles (25-28). The present study showed that WT-MU is much more cytotoxic for myoblasts, myotubes, and fully differentiated skeletal muscles than M^{neg}-MU, indicating that the major culprit involved in muscle damage/dysfunction is mycolactone. However, M^{neg}-MU still induced a moderate but significant loss in muscle force production. Likewise, histologic observations showed that M^{neg}-MU caused significant accumulations of neutrophils and macrophages in the infected muscles, albeit to a much lesser extent than WT-MU. Consistent with these results, Oliveira et al. (2005) reported that a non-virulent MU strain caused chronic leukocyte infiltration in subcutaneous tissues on day 60 post-infection (36). Since M^{neg}-MU is reportedly harmless for biological tissues, the presence of neutrophils and macrophages in chronically infected tissues may be responsible for the muscle dysfunction observed on day 42 post-infection (1, 19). Neutrophils are likely responsible for the cell damage, the perpetuation of the pathogenic process, and the inflammation seen in chronically infected tissues (30). The persistence of neutrophils in skeletal muscle infected with MU is consistent with previous results showing that macrophage inflammatory protein-2, a chemokine important for neutrophil recruitment, is continuously produced by macrophages infected with WT-MU (45). Importantly, the excessive release of proteases and reactive oxygen species by neutrophils may be detrimental if uncontrolled or unrepressed (12). For example, the infiltration of neutrophils in a sterile and non-necrotic condition, such as in the hindlimb unloading and reloading protocol, was not associated with secondary damage to the muscle. However, the addition of lipopolysaccharide in the microenvironment overstimulated neutrophil activity, resulting in the induction of secondary damage to the muscle (13). These results highlight that the stimulatory environment fine-tunes neutrophil activity and suggest that these leukocytes might be harmful in chronic WT-MU infection.

Initially, mycolactone has been associated with reduced leukocyte recruitment in skin and lymph nodes (1, 8, 42). However, cumulative evidence indicates that leukocyte recruitment is clearly tissue specific and that the inhibitory effects of mycolactone on leukocyte recruitment may be different in skeletal muscles (1, 8, 17, 42). For example, L-selectins are highly expressed on activated T cells and are essential for the initial tethering and rolling of circulating lymphocytes. Mycolactone suppresses L-selectin expression, preventing T cell homing to peripheral lymph nodes (22). However, it appears that selectins are not required for macrophage invasion, since α -4 integrin can compensate for selectin-rolling functions in skeletal muscle (17, 29). Moreover, the observation that muscle inflammation is more severe in the presence of WT-MU suggests that mycolactone could recruit leukocytes through an indirect mechanism. Indeed, mycolactone induces cell damage, which in turn results in the release of chemoattractant molecules that might recruit leukocytes into necrotic areas of skeletal muscles. Muscle cells as well as non-muscle cells such as endothelial cells, adipocytes, mast cells, fibroblasts, and macrophages are all potential sources of chemoattractants (9). However, their chemotactic activities following MU infections have yet to be defined (1). Together, these results indicate that WT-MU induces mild, chronic tissue inflammation and that the immunosuppressive effect of mycolactone is not sufficient to prevent leukocyte infiltration into skeletal muscle.

Our results also indicated that WT-MU and mycolactone, but not M^{neg} -MU, decreased myotube diameter and MyHC levels. MyHC is selectively targeted for degradation following cachectic syndromes, muscle disuse, and dystrophy (5, 6, 14). The calcium-dependent cysteine proteases, calpains, are well-known for their important role in the initiation of the proteolytic process (32, 43). Interestingly, it has recently been shown that mycolactone mobilizes and partially depletes the intracellular calcium store in T cells *in vitro* (4). This observation provides support for the possibility that mycolactone may stimulate MyHC degradation through an increase in intracellular calcium mobilization and the activation of calpains. However, while calpains induce the dismantling of complex muscle proteins, the ubiquitin/proteasome pathway, more particularly, the ubiquitin E3 ligase MuRF-1, is an important muscle proteolysis system involved in MyHC degradation (29). Indeed, knocking out MuRF-1 prevents the loss of MyHC and protects against muscle

atrophy in a variety of muscle wasting conditions (3, 5, 15). Importantly, WT-MU and mycolactone, but not M^{neg}-MU, stimulated the ubiquitin/proteasome pathway. The present findings also showed that the addition of IGF-1 is sufficient to antagonize the inhibitory effect of mycolactone on myoblast proliferation and myotube atrophy. The binding of IGF-1 to its receptor triggers the PI3K/AKT/mTOR pathway, which stimulates various biological activities such as growth, proliferation and protein synthesis (31). The activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway by IGF-1 also phosphorylates the FOXO transcription factor and thereby inhibits the transcriptional rate of the E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and MAFbx (20). Our results are thus consistent with previous observations suggesting that mycolactone acts independently of PI3K/AKT/mTOR and that the IGF-1 signaling pathway suppresses MuRF-1 activation and prevents the decrease in MyHC levels (11, 24).

A3.5 Conclusion and Perspectives

Although mycolactone is clearly the culprit of this necrotic and infectious disease, our results indicate that M^{neg}-MU also induces a mild inflammation, which eventually leads to a loss of muscle force. Pinpointing the contribution of all subsets of leukocytes such as neutrophils, macrophages, eosinophils, and T cells in muscle dysfunction will certainly be worth investigating during the course of the BU disease. The observation that IGF-1 also reduces the negative action of mycolactone on myoblast proliferation and myotube atrophy is very interesting, and may open new possible interventions for BU. Further studies are required to determine how mycolactone induces muscle atrophy and fibrosis and whether exogenous IGF-1 combined with antibiotics are able to minimize or reverse the extent of muscle injury/atrophy/dysfunction during the progression of the disease.

A3.6 Acknowledgments

We thank Dr. Pamela Small (University of Tennessee, USA) for the mycolactone-negative *M. ulcerans* strain, Dr. Sévérin Anagonou (Université d'Abomey-Calavi, Benin) for *M. ulcerans* wild-type strain 957-05, and Dr. Yoshito Kishi (Harvard University, USA) for the purified mycolactone. We also thank Patrice Bouchard, Nicolas Dumont, and Élise Duchesne for their careful reading of this paper. This investigation was supported by grants to J. Frenette from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

A3.7 Disclosures

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

A3.8 References

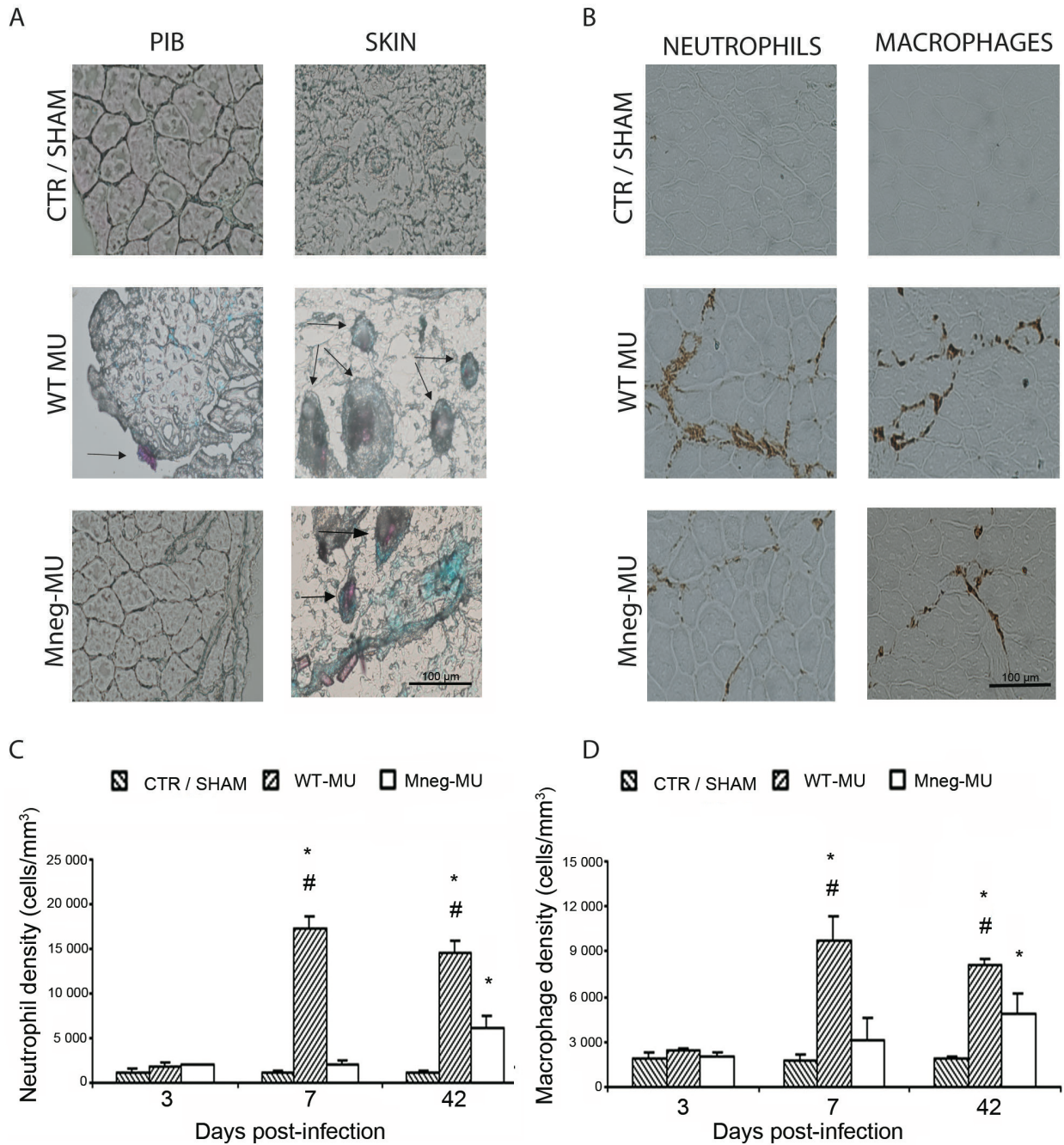
1. **Adusumilli S, Mve-Obiang A, Sparer T, Meyers W, Hayman J, and Small PL.** Mycobacterium ulcerans toxic macrolide, mycolactone modulates the host immune response and cellular location of M. ulcerans in vitro and in vivo. *Cellular microbiology* 7: 1295-1304, 2005.
2. **Barker DJ.** Epidemiology of Mycobacterium ulcerans infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 43-50, 1973.
3. **Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, and Glass DJ.** Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294: 1704-1708, 2001.
4. **Boulkroun S, Guenin-Mace L, Thoulouze MI, Monot M, Merckx A, Langsley G, Bismuth G, Di Bartolo V, and Demangel C.** Mycolactone suppresses T cell responsiveness by altering both early signaling and posttranslational events. *J Immunol* 184: 1436-1444, 2010.
5. **Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, and Glass DJ.** The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism* 6: 376-385, 2007.
6. **Cosper PF, and Leinwand LA.** Myosin heavy chain is not selectively decreased in murine cancer cachexia. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2011.
7. **Coutanceau E, Decalf J, Martino A, Babon A, Winter N, Cole ST, Albert ML, and Demangel C.** Selective suppression of dendritic cell functions by Mycobacterium ulcerans toxin mycolactone. *The Journal of experimental medicine* 204: 1395-1403, 2007.
8. **Coutanceau E, Marsollier L, Brosch R, Perret E, Goossens P, Tanguy M, Cole ST, Small PL, and Demangel C.** Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of Mycobacterium ulcerans: the contribution of endogenous mycolactone toxin. *Cellular microbiology* 7: 1187-1196, 2005.
9. **De Buck M, Gouwy M, Proost P, Struyf S, and Van Damme J.** Identification and characterization of MIP-1alpha/CCL3 isoform 2 from bovine serum as a potent monocyte/dendritic cell chemoattractant. *Biochemical pharmacology* 2012.
10. **Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Scott JT, Dramaix M, and Portaels F.** Mycobacterium ulcerans disease: role of age and gender in incidence and morbidity. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 9: 1297-1304, 2004.
11. **Demangel C, Stinear TP, and Cole ST.** Buruli ulcer: reductive evolution enhances pathogenicity of Mycobacterium ulcerans. *Nature reviews Microbiology* 7: 50-60, 2009.
12. **Dubois AV, Gauthier A, Brea D, Varaigne F, Diot P, Gauthier F, and Attucci S.** Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012.
13. **Dumont N, Bouchard P, and Frenette J.** Neutrophil-induced skeletal muscle damage: a calculated and controlled response following hindlimb unloading and reloading. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 295: R1831-1838, 2008.

14. **Fermoselle C, Rabinovich R, Ausin P, Puig-Vilanova E, Coronell C, Sanchez F, Roca J, Gea J, and Barreiro E.** Does oxidative stress modulate limb muscle atrophy in severe copd patients? *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2012.
15. **Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R, and Olson EN.** Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *The Journal of clinical investigation* 117: 2486-2495, 2007.
16. **Fremont P, Riverin H, Frenette J, Rogers PA, and Cote C.** Fatigue and recovery of rat soleus muscle are influenced by inhibition of an intracellular carbonic anhydrase isoform. *The American journal of physiology* 260: R615-621, 1991.
17. **Frenette J, Chbinou N, Godbout C, Marsolais D, and Frenette PS.** Macrophages, not neutrophils, infiltrate skeletal muscle in mice deficient in P/E selectins after mechanical reloading. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 285: R727-732, 2003.
18. **Frenette J, St-Pierre M, Cote CH, Mylona E, and Pizza FX.** Muscle impairment occurs rapidly and precedes inflammatory cell accumulation after mechanical loading. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 282: R351-357, 2002.
19. **George KM, Chatterjee D, Gunawardana G, Welty D, Hayman J, Lee R, and Small PL.** Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* 283: 854-857, 1999.
20. **Glass DJ.** PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Current topics in microbiology and immunology* 346: 267-278, 2010.
21. **Gomes AV, Waddell DS, Siu R, Stein M, Dewey S, Furlow JD, and Bodine SC.** Upregulation of proteasome activity in muscle RING finger 1-null mice following denervation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26: 2986-2999, 2012.
22. **Guenin-Mace L, Carrette F, Asperti-Boursin F, Le Bon A, Calechurn L, Di Bartolo V, Fontanet A, Bismuth G, and Demangel C.** Mycolactone impairs T cell homing by suppressing microRNA control of L-selectin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 12833-12838, 2011.
23. **Hayman J.** Out of Africa: observations on the histopathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Journal of clinical pathology* 46: 5-9, 1993.
24. **Hong H, Coutanceau E, Leclerc M, Calechurn L, Leadlay PF, and Demangel C.** Mycolactone diffuses from *Mycobacterium ulcerans*-infected tissues and targets mononuclear cells in peripheral blood and lymphoid organs. *PLoS neglected tropical diseases* 2: e325, 2008.
25. **Houngbedji GM, Bouchard P, and Frenette J.** *Mycobacterium ulcerans* infections cause progressive muscle atrophy and dysfunction, and mycolactone impairs satellite cell proliferation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 300: R724-732, 2011.
26. **Houngbedji GM, Cote CH, Small PL, and Frenette J.** Limited repair and structural damages displayed by skeletal muscles loaded with mycolactone. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11: 238-244, 2009.
27. **Houngbedji GM, and Frenette J.** [Buruli ulcer - beyond the skin, impact on skeletal muscle]. *Medecine sciences : M/S* 27: 187-192, 2011.

28. **Houngbedji MG, Boissinot M, Bergeron GM, and Frenette J.** Subcutaneous injection of *Mycobacterium ulcerans* causes necrosis, chronic inflammatory response and fibrosis in skeletal muscle. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 10: 1236-1243, 2008.
29. **Jung U, and Ley K.** Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *J Immunol* 162: 6755-6762, 1999.
30. **Kaplan MJ, and Radic M.** Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 189: 2689-2695, 2012.
31. **Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD, and Glass DJ.** 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. *The Journal of biological chemistry* 280: 2737-2744, 2005.
32. **Lim CC, Zuppinger C, Guo X, Kuster GM, Helmes M, Eppenberger HM, Suter TM, Liao R, and Sawyer DB.** Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 279: 8290-8299, 2004.
33. **Marsollier L, Stinear T, Aubry J, Saint Andre JP, Robert R, Legras P, Manceau AL, Audrain C, Bourdon S, Kouakou H, and Carbonnelle B.** Aquatic Plants Stimulate the Growth of and Biofilm Formation by *Mycobacterium ulcerans* in Axenic Culture and Harbor These Bacteria in the Environment. *Applied and environmental microbiology* 70: 1097-1103, 2004.
34. **Mve-Obiang A, Lee RE, Umstot ES, Trott KA, Grammer TC, Parker JM, Ranger BS, Grainger R, Mahrous EA, and Small PL.** A newly discovered mycobacterial pathogen isolated from laboratory colonies of *Xenopus* species with lethal infections produces a novel form of mycolactone, the *Mycobacterium ulcerans* macrolide toxin. *Infection and immunity* 73: 3307-3312, 2005.
35. **Nader GA.** Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37: 1985-1996, 2005.
36. **Oliveira MS, Fraga AG, Torrado E, Castro AG, Pereira JP, Filho AL, Milanezi F, Schmitt FC, Meyers WM, Portaels F, Silva MT, and Pedrosa J.** Infection with *Mycobacterium ulcerans* induces persistent inflammatory responses in mice. *Infection and immunity* 73: 6299-6310, 2005.
37. **Organization WH.** Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection). In: *Fact sheet #1992012*.
38. **Raghunathan PL, Whitney EA, Asamoah K, Stienstra Y, Taylor TH, Jr., Amofah GK, Ofori-Adjei D, Dobos K, Guarner J, Martin S, Pathak S, Klutse E, Etuaful S, van der Graaf WT, van der Werf TS, King CH, Tappero JW, and Ashford DA.** Risk factors for Buruli ulcer disease (*Mycobacterium ulcerans* Infection): results from a case-control study in Ghana. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40: 1445-1453, 2005.
39. **Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, and de Medina FS.** Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical biochemistry* 401: 318-320, 2010.
40. **Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, and Goldberg AL.** Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 117: 399-412, 2004.

41. **SEGAL SS, FAULKNER, J.A.** Temperature-dependent physiological stability of rat skeletal muscle in vitro. *American journal of physiology Cell physiology* 1985.
42. **Simmonds RE, Lali FV, Smallie T, Small PL, and Foxwell BM.** Mycolactone inhibits monocyte cytokine production by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 182: 2194-2202, 2009.
43. **Solomon V, and Goldberg AL.** Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *The Journal of biological chemistry* 271: 26690-26697, 1996.
44. **Sue C. Bodine*‡, TNS, Michael Gonzalez*, William O. Kline*, Gretchen L. Stover*, Roy Bauerlein*, and Elizabeth Zlotchenko* AS, John C. Lawrence†, David J. Glass* and George D. Yancopoulos*‡.** Akt mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* 3: 1014-1019, 2001.
45. **Torrado E, Adusumilli S, Fraga AG, Small PL, Castro AG, and Pedrosa J.** Mycolactone-mediated inhibition of tumor necrosis factor production by macrophages infected with Mycobacterium ulcerans has implications for the control of infection. *Infection and immunity* 75: 3979-3988, 2007.
46. **Treuer R, and Haydel SE.** Acid-fast staining and Petroff-Hausser chamber counting of mycobacterial cells in liquid suspension. *Current protocols in microbiology* Chapter 10: Unit 10A 16, 2011.
47. **van der Werf TS, Stienstra Y, Johnson RC, Phillips R, Adjei O, Fleischer B, Wansbrough-Jones MH, Johnson PD, Portaels F, van der Graaf WT, and Asiedu K.** Mycobacterium ulcerans disease. *Bulletin of the World Health Organization* 83: 785-791, 2005.
48. **van der Werf TS, van der Graaf WT, Tappero JW, and Asiedu K.** Mycobacterium ulcerans infection. *Lancet* 354: 1013-1018, 1999.
49. **Walsh DS, Portaels F, and Meyers WM.** Buruli ulcer (Mycobacterium ulcerans infection). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102: 969-978, 2008.

A3.9 Figures and legends

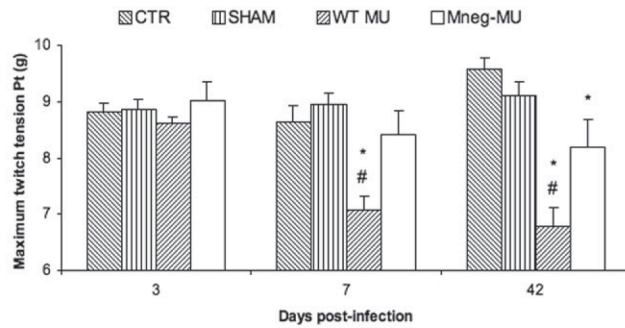


Annexe: 3-1: Histological and immunological analyses from mice infected with *Mycobacterium ulcerans*.

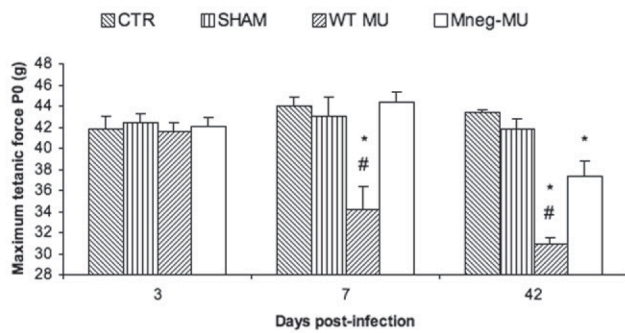
(A) Bicep muscles and skin from control and sham (CTR/Sham), M^{neg}-MU and WT-MU were stained with Ziehl-Neelsen after 42 days post-injection. Ziehl-Neelsen staining showed the presence of M^{neg}-MU and WT-MU infections in skin, but only WT-MU was

detected in the periphery of some bicep muscles (arrows). **(B)** Bicep muscles from control and sham (CTR/Sham), M^{neg}-MU, and WT-MU were immunolabeled for neutrophils and macrophages. The concentrations of **(C)** neutrophils and **(D)** macrophages in bicep muscles were determined at 3, 7, and 42 days post-infection. All data are means \pm SEM. n = 5 independent experiments per group. * Significantly different from CTR., # significantly different from M^{neg}-MU ($p \leq 0.05$). Scale bar = 100 μ m.

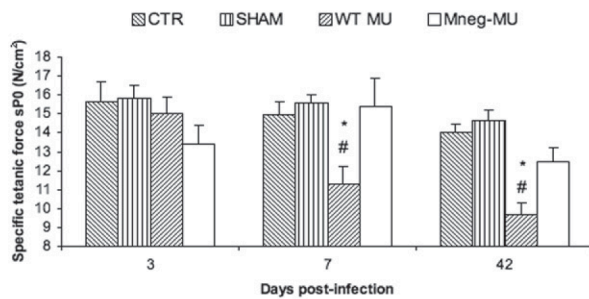
A



B



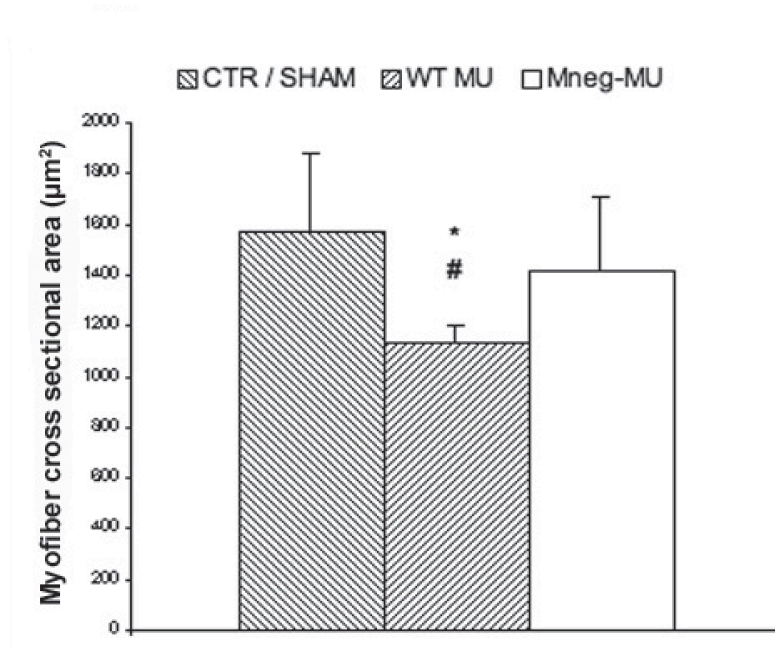
C



Annexe: 3-2: Isometric contractile properties of infected bicep muscles.

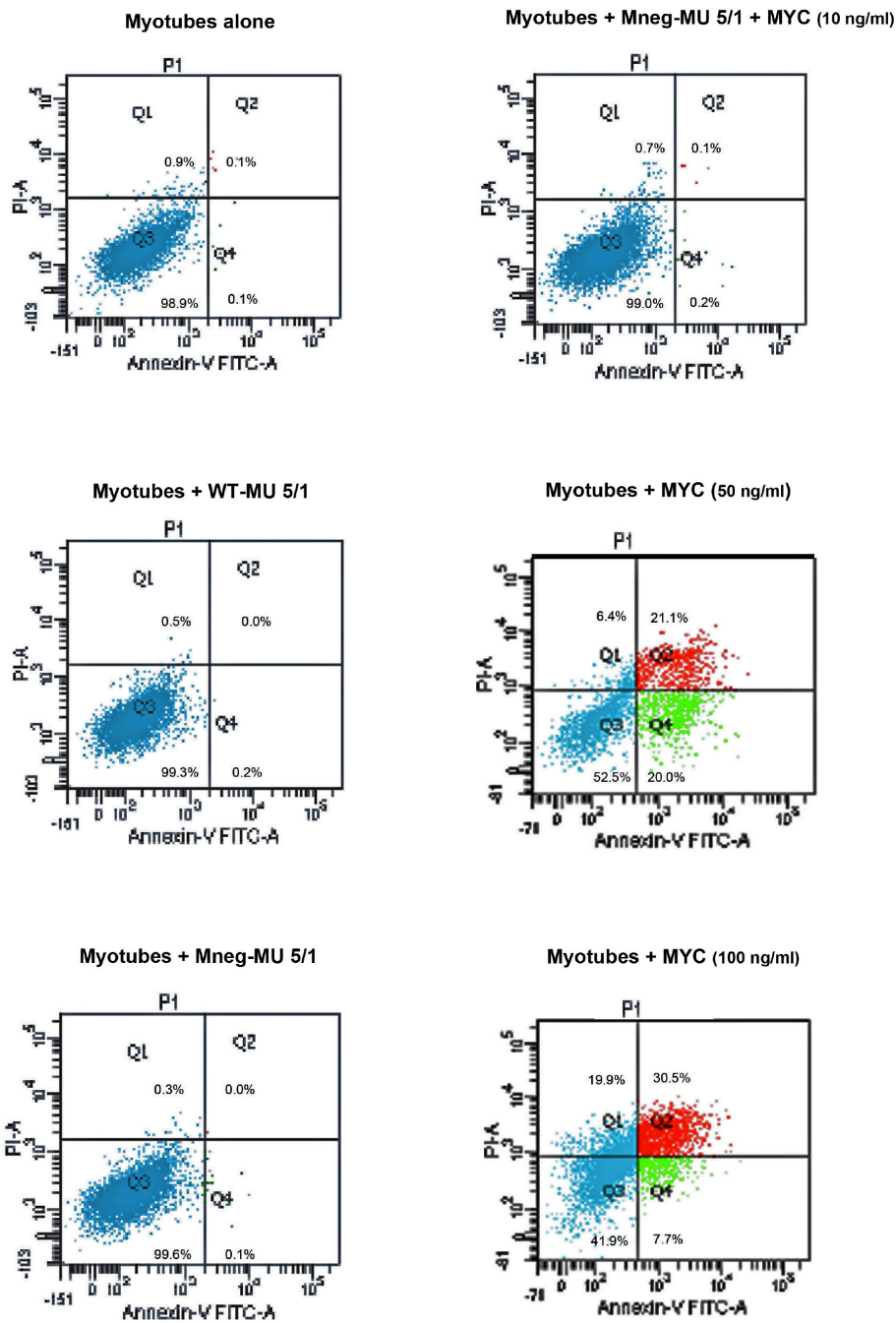
Isometric contractile properties of infected bicep muscles. (A) Maximum twitch tension, Pt (B) maximum tetanic force, P₀ and (C) maximum specific tetanic force, sP₀ are shown for control (CTR), ID broth-injected (Sham), WT-MU, and M^{neg}-MU at days 3, 7, and 42 post-

infection. Pt, P₀, and sPo decreased progressively from day 7 through day 42 following the WT-MU infection, while Pt and P₀ decreased significantly by day 42 following the M^{neg}-MU infection. All data are means ± SEM. n = 8 independent experiments per group, * Significantly different from CTR, # significantly different from matched M^{neg}-MU (p ≤0.05).



Annexe: 3-3: Physiological fiber cross-sectional areas of infected bicep muscles.

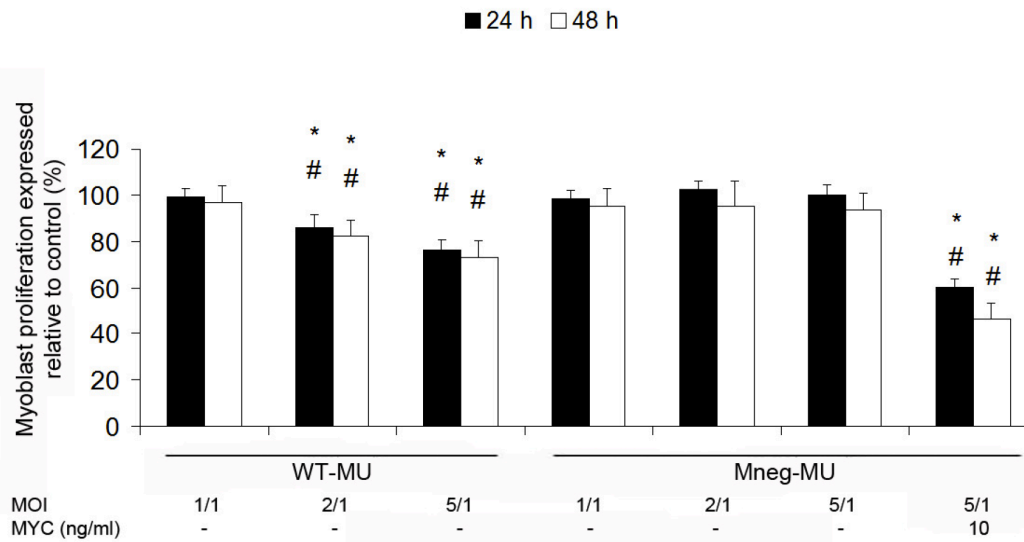
Physiological fiber cross-sectional areas of a bicep muscle are shown for control (CTR), WT-MU, and M^{neg}-MU at days 42 post-infection. PCSA decreased by 28,02% following the WT-MU infection, while any difference were observed following the M^{neg}-MU infection. All data are means ± SEM. n = 4 independent experiments per group, * Significantly different from CTR, # significantly different from matched M^{neg}-MU (p ≤0.05).



Annexe: 3-4: Detection of apoptosis feature by Annexin V- propidium iodide (PI).

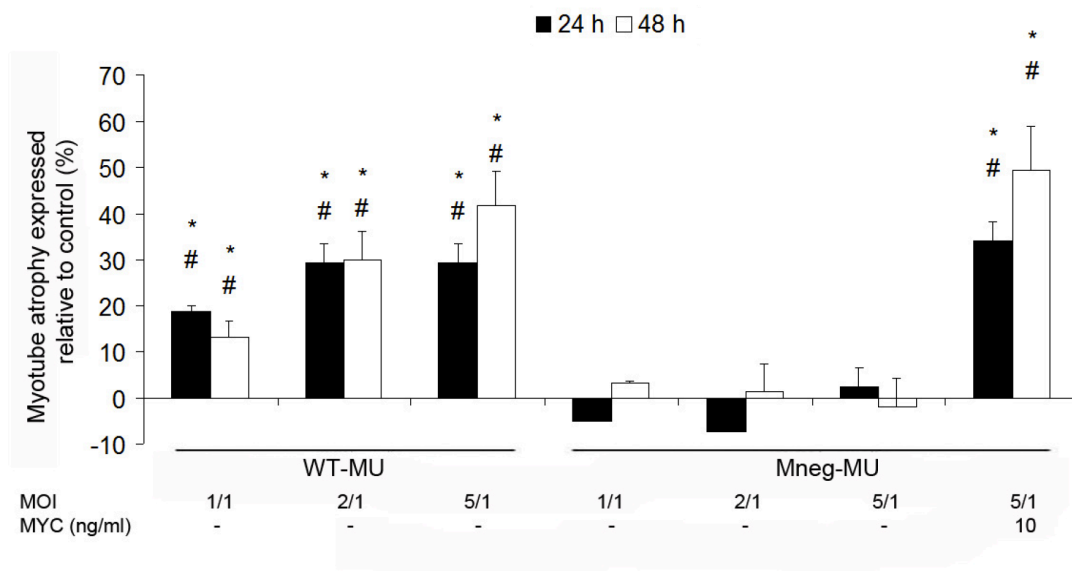
Myotubes exposed to WT (MOI 5/1), M^{neg} MU (MOI 5/1), mycolactone (10, 50 100 ng/ml) and M^{neg} MU at MOI of 5/1 + mycolactone 10 ng/ml were stained with annexin V – FITC and PI for FACS analysis after 48 h of co-culture. Cell populations shown in the

lower left quadrant represent living cells, the lower right quadrant represents apoptotic cells, the upper right quadrant represents necrotic cells and the upper left quadrant represents pre-necrotic cells. Myotubes treated with WT-MU, M^{-neg} MU or mycolactone (10 ng/ml) had a viability rate over $99 \pm 0,5\%$ and these conditions were therefore used to study myoblast proliferation and myotube atrophy for the next experiments. As expected, myotubes treated with 50 and 100 ng/ml of mycolactone had a viability rate of 52,5% and 41,9% respectively. All data are means \pm SEM. All experiments were performed in triplicate.



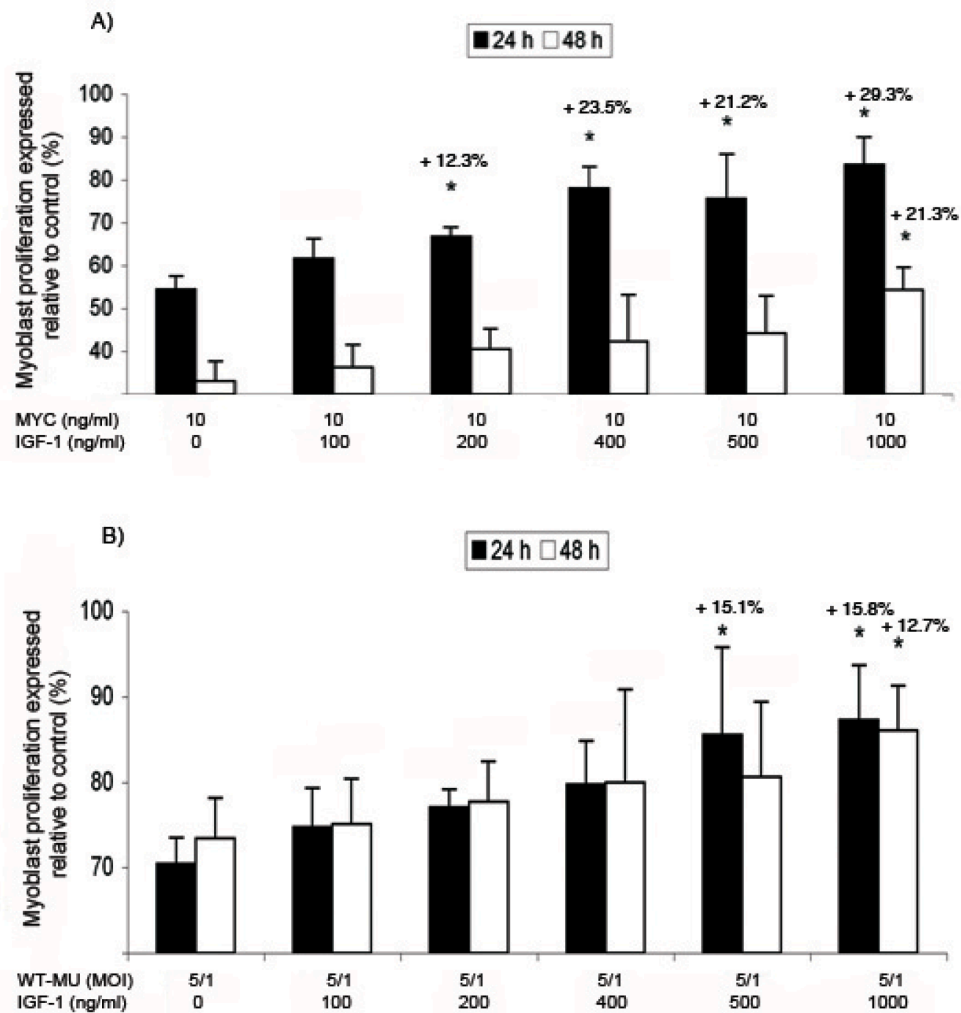
Annexe: 3-5: C2C12 myoblast proliferation in the presence of *Mycobacterium ulcerans*.

WT-MU, but not M^{neg}-MU, inhibited C2C12 myoblast proliferation after 24 and 48 h. A non-cytotoxic concentration of mycolactone (10 ng/ml) was also sufficient to inhibit myoblast proliferation. All data are means ± SEM. n = 5 independent experiments per group. * Significantly different from CTR, # significantly different from matched M^{neg}-MU (p ≤ 0.05).



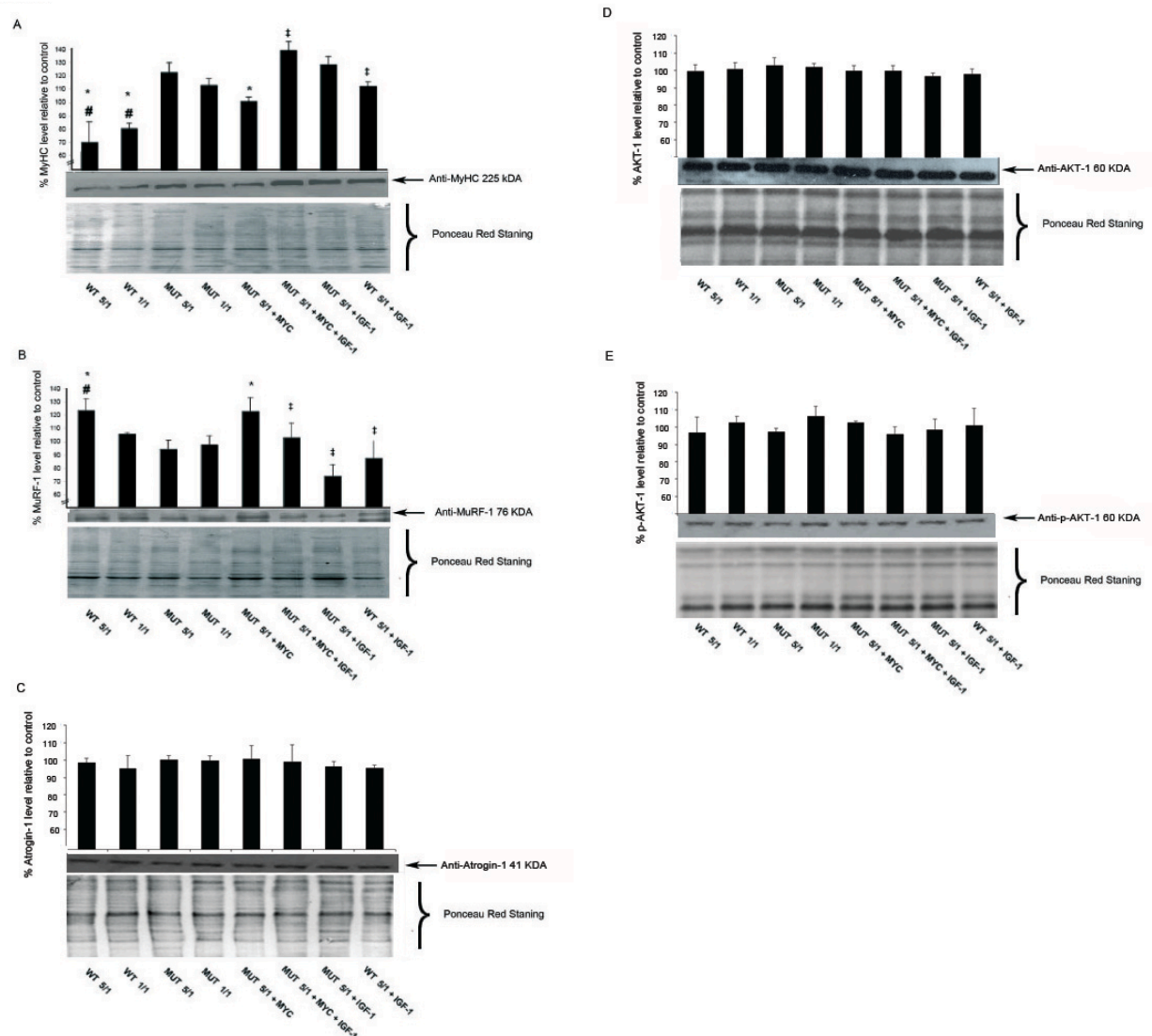
Annexe: 3-6: C2C12 myotube atrophy in the presence of *Mycobacterium ulcerans*.

WT-MU, but not M^{neg}-MU, induced significant myotube atrophy after 24 and 48 h. Mycolactone (10 ng/ml) also induced significant myotube atrophy. All data are means ± SEM. n = 5 independent experiments per group. * Significantly different from CTR, # significantly different from matched M^{neg}-MU (p ≤ 0.05).



Annexe: 3-7: IGF-1 partially reverses the negative effect of WT-MU and mycolactone on C2C12 myoblasts

(A-B) Various concentrations of IGF-1 (0-1000ng/ml) were added to the culture medium of C2C12 myoblasts that had previously been treated with 10 ng/ml of mycolactone or WT-MU at an MOI of 5:1. IGF-1 (>200 ng/ml) rescued the proliferation of myoblasts exposed to 10 ng/ml of mycolactone, while >500ng/ml IGF-1 promoted the proliferation of myoblasts in the presence of WT-MU. Each percentage shows the variation in myoblast proliferation expressed relative to cells treated without IGF-1. All data are means \pm SEM. n = 5 independent experiments per group, *Significantly different from CTR, ($p \leq 0.05$).



Annexe: 3-8: Myosin heavy chain (MyHC), muscle ring finger protein-1 (MuRF-1), atrogin-1, Akt-1 and p-Akt-1 levels in myotubes exposed to various conditions *in vitro*

Expression of (A) MyHC, (B) MuRF-1, (C) atrogin-1, (D) Akt-1 and (E) p-Akt-1 relative to control were determined by Western blots from myotubes exposed to WT-MU (1/1 or 5/1), M^{neg}-MU (1/1 or 5/1), M^{neg}-MU (5/1) + 10 ng/ml of mycolactone, M^{neg}-MU (5/1) + 10 ng/ml of mycolactone (10 ng/ml) + 1000 ng/ml of IGF-1, M^{neg}-MU (5/1) + 1000 ng/ml of IGF-1, or WT-MU (5/1) + 1000 ng/ml of IGF-1. Protein levels were normalized using the densitometric values determined from Ponceau red stained blots (lower panel). All data are means ± SEM. All experiments were performed in triplicate. * Significantly different from CTR, † significantly different from the matched group without IGF-1, # significantly different from matched M^{neg}-MU (p ≤ 0.05).

Références

1. LE COMMISSAIRE À LA SANTÉ ET AU BIEN-ÊTRE: LES URGENCES AU QUÉBEC: ÉVOLUTION DE 2003-2004 À 2012-2013.
2. Institut national de santé publique du Québec: Évaluation de l'implantation du Programme de prévention des troubles musculo-squelettiques liés au travail du Réseau de santé publique en santé au travail : synthèse [Internet]. Available from: <http://www.inspq.qc.ca>
3. Reginster J-Y, Beaudart C, Buckinx F, Bruyère O: Osteoporosis and sarcopenia: two diseases or one? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016, 19:31–36.
4. DiGirolamo DJ, Kiel DP, Esser KA: Bone and Skeletal Muscle: Neighbors With Close Ties: BONE AND SKELETAL MUSCLE: NEIGHBORS WITH CLOSE TIES. *J Bone Miner Res* 2013, 28:1509–1518.
5. Leibbrandt A, Penninger JM: RANK/RANKL: Regulators of Immune Responses and Bone Physiology. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1143:123–150.
6. Nagy V, Penninger JM: The RANKL-RANK Story. *Gerontology* 2015, .
7. Bargman R, Posham R, Boskey A, Carter E, DiCarlo E, Verdelis K, Raggio C, Pleshko N: High- and low-dose OPG-Fc cause osteopetrosis-like changes in infant mice. *Pediatr Res* 2012, 72:495–501.
8. Walsh MC, Choi Y: Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol* 2014, 5:511.
9. Hanada R, Penninger JM: [Central regulation of body temperature by RANKL/RANK pathway]. *Clin Calcium* 2011, 21:1201–1208.
10. Page G, Miossec P: RANK and RANKL expression as markers of dendritic cell-T cell interactions in paired samples of rheumatoid synovium and lymph nodes. *Arthritis Rheum* 2005, 52:2307–2312.
11. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM: RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002, 20:795–823.
12. Cianferotti L, Brandi ML: Muscle–bone interactions: basic and clinical aspects. *Endocrine* 2014, 45:165–177.
13. Frontera WR, Ochala J: Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 2015, 96:183–195.
14. Narici M, Franchi M, Maganaris C: Muscle structural assembly and functional consequences. *J Exp Biol* 2016, 219:276–284.
15. Kim S-H, Turnbull J, Guimond S: Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 2011, 209:139–151.
16. Gillies AR, Lieber RL: Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* 2011, 44:318–331.
17. Gautel M, Djinović-Carugo K: The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. *J Exp Biol* 2016, 219:135–145.
18. Anastasi G, Cutroneo G, Rizzo G, Favaloro A: Sarcoglycan subcomplex in normal and pathological human muscle fibers. *Eur J Histochem EJH* 2007, 51 Suppl 1:29–33.
19. Shin J, Tajrishi MM, Ogura Y, Kumar A: Wasting mechanisms in muscular

- dystrophy. *Int J Biochem Cell Biol* 2013, 45:2266–2279.
20. Carmignac V, Durbeej M: Cell-matrix interactions in muscle disease. *J Pathol* 2012, 226:200–218.
 21. Mayer U: Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem* 2003, 278:14587–14590.
 22. Janghra N, Morgan JE, Sewry CA, Wilson FX, Davies KE, Muntoni F, Tinsley J: Correlation of Utrophin Levels with the Dystrophin Protein Complex and Muscle Fibre Regeneration in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Muscle Biopsies. *PloS One* 2016, 11:e0150818.
 23. Koubassova NA, Bershitsky SY, Ferenczi MA, Narayanan T, Tsaturyan AK: Tropomyosin movement is described by a quantitative high-resolution model of X-ray diffraction of contracting muscle. *Eur Biophys J EBJ* 2016, .
 24. Zhang T, Taylor J, Jiang Y, Pereyra AS, Messi ML, Wang Z-M, Hereñú C, Delbono O: Troponin T3 regulates nuclear localization of the calcium channel Cav β 1a subunit in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 2015, 336:276–286.
 25. Chu M, Gregorio CC, Pappas CT: Nebulin, a multi-functional giant. *J Exp Biol* 2016, 219:146–152.
 26. Ma X-W, Li Q, Xu P-T, Zhang L, Li H, Yu Z-B: Tetanic contractions impair sarcomeric Z-disk of atrophic soleus muscle via calpain pathway. *Mol Cell Biochem* 2011, 354:171–180.
 27. Haizlip KM, Harrison BC, Leinwand LA: Sex-Based Differences in Skeletal Muscle Kinetics and Fiber-Type Composition. *Physiology* 2015, 30:30–39.
 28. Biewener AA: Locomotion as an emergent property of muscle contractile dynamics. *J Exp Biol* 2016, 219:285–294.
 29. Liu G, Mac Gabhann F, Popel AS: Effects of fiber type and size on the heterogeneity of oxygen distribution in exercising skeletal muscle. *PloS One* 2012, 7:e44375.
 30. Cartee GD, Arias EB, Yu CS, Pataky MW: Novel single skeletal muscle fiber analysis reveals a fiber type-selective effect of acute exercise on glucose uptake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016, 311:E818–E824.
 31. Mackrell JG, Arias EB, Cartee GD: Fiber type-specific differences in glucose uptake by single fibers from skeletal muscles of 9- and 25-month-old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012, 67:1286–1294.
 32. Schiaffino S, Reggiani C: Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 2011, 91:1447–1531.
 33. Schiaffino S, Hanzlíková V, Pierobon S: Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 1970, 47:107–119.
 34. van Lunteren E, Leahy P: Gene expression microarrays and respiratory muscles. *Respir Physiol Neurobiol* 2007, 156:103–115.
 35. Greising SM, Gransee HM, Mantilla CB, Sieck GC: Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2012, 4:457–473.
 36. Acevedo LM, Rivero J-LL: New insights into skeletal muscle fibre types in the dog with particular focus towards hybrid myosin phenotypes. *Cell Tissue Res* 2006, 323:283–303.
 37. Neunhäuserer D, Zebedin M, Obermoser M, Moser G, Tauber M, Niebauer J,

- Resch H, Galler S: Human skeletal muscle: transition between fast and slow fibre types. *Pflugers Arch* 2011, 461:537–543.
38. Glaser BW, You G, Zhang M, Medler S: Relative proportions of hybrid fibres are unaffected by 6 weeks of running exercise in mouse skeletal muscles. *Exp Physiol* 2010, 95:211–221.
39. Gehlert S, Bloch W, Suhr F: Ca²⁺-Dependent Regulations and Signaling in Skeletal Muscle: From Electro-Mechanical Coupling to Adaptation. *Int J Mol Sci* 2015, 16:1066–1095.
40. Jiang LQ, Garcia-Roves PM, de Castro Barbosa T, Zierath JR: Constitutively active calcineurin in skeletal muscle increases endurance performance and mitochondrial respiratory capacity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, 298:E8–E16.
41. Stiber JA, Tabatabaei N, Hawkins AF, Hawke T, Worley PF, Williams RS, Rosenberg P: Homer modulates NFAT-dependent signaling during muscle differentiation. *Dev Biol* 2005, 287:213–224.
42. Musarò A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N: IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 1999, 400:581–585.
43. McCullagh KJA, Calabria E, Pallafacchina G, Ciciliot S, Serrano AL, Argentini C, Kalhovde JM, Lømo T, Schiaffino S: NFAT is a nerve activity sensor in skeletal muscle and controls activity-dependent myosin switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:10590–10595.
44. Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN: Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J Clin Invest* 2007, 117:2459–2467.
45. Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM: An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:7111–7116.
46. Manring H, Abreu E, Brotto L, Weisleder N, Brotto M: Novel excitation-contraction coupling related genes reveal aspects of muscle weakness beyond atrophy—new hopes for treatment of musculoskeletal diseases. *Front Physiol* [Internet] 2014 [cited 2016 Mar 25], 5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00037/abstract>
47. Martyn J a. J, Fagerlund MJ, Eriksson LI: Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia* 2009, 64 Suppl 1:1–9.
48. Bannister RA: Bridging the myoplasmic gap II: more recent advances in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *J Exp Biol* 2016, 219:175–182.
49. Woll KH, Neumcke B: Conductance properties and voltage dependence of an anion channel in amphibian skeletal muscle. *Pflugers Arch* 1987, 410:641–647.
50. Imbrici P, Altamura C, Pessia M, Mantegazza R, Desaphy J-F, Camerino DC: ClC-1 chloride channels: state-of-the-art research and future challenges. *Front Cell Neurosci* 2015, 9:156.
51. Tricarico D, Selvaggi M, Passantino G, De Palo P, Dario C, Centoducati P, Tateo A, Curci A, Maqoud F, Mele A, Camerino GM, Liantonio A, Imbrici P, Zizzo N: ATP Sensitive Potassium Channels in the Skeletal Muscle Function: Involvement of the KCNJ11(Kir6.2) Gene in the Determination of Mechanical Warner Bratzer Shear Force. *Front Physiol* 2016, 7:167.

52. Silva J: Slow inactivation of Na(+) channels. *Handb Exp Pharmacol* 2014, 221:33–49.
53. Lowe JS, Palygin O, Bhasin N, Hund TJ, Boyden PA, Shibata E, Anderson ME, Mohler PJ: Voltage-gated Nav channel targeting in the heart requires an ankyrin-G dependent cellular pathway. *J Cell Biol* 2008, 180:173–186.
54. Ruff RL: Sodium channel slow inactivation and the distribution of sodium channels on skeletal muscle fibres enable the performance properties of different skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand* 1996, 156:159–168.
55. Fryer MW, Stephenson DG: Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol* 1996, 493 (Pt 2):357–370.
56. Clarke OB, Hendrickson WA: Structures of the colossal RyR1 calcium release channel. *Curr Opin Struct Biol* 2016, 39:144–152.
57. D'Adamo MC, Sforza L, Visentin S, Grottesi A, Servettini L, Guglielmi L, Macchioni L, Saredi S, Curcio M, De Nuccio C, Hasan S, Corazzi L, Franciolini F, Mora M, Catacuzzeno L, Pessia M: A Calsequestrin-1 Mutation Associated with a Skeletal Muscle Disease Alters Sarcoplasmic Ca²⁺ Release. *PloS One* 2016, 11:e0155516.
58. Lamboley CR, Murphy RM, McKenna MJ, Lamb GD: Endogenous and maximal sarcoplasmic reticulum calcium content and calsequestrin expression in type I and type II human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2013, 591:6053–6068.
59. Murphy RM, Larkins NT, Mollica JP, Beard NA, Lamb GD: Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. *J Physiol* 2009, 587:443–460.
60. Wang Y, Xu L, Duan H, Pasek DA, Eu JP, Meissner G: Knocking down type 2 but not type 1 calsequestrin reduces calcium sequestration and release in C2C12 skeletal muscle myotubes. *J Biol Chem* 2006, 281:15572–15581.
61. Chaube R, Hess DT, Wang Y-J, Plummer B, Sun Q-A, Laurita K, Stamler JS: Regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor/Ca²⁺-release channel RyR1 by S-palmitoylation. *J Biol Chem* 2014, 289:8612–8619.
62. Briston SJ, Dibb KM, Solaro RJ, Eisner DA, Trafford AW: Balanced changes in Ca buffering by SERCA and troponin contribute to Ca handling during -adrenergic stimulation in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 2014, 104:347–354.
63. Fajardo VA, Bombardier E, Vigna C, Devji T, Bloemberg D, Gamu D, Gramolini AO, Quadrilatero J, Tupling AR: Co-Expression of SERCA Isoforms, Phospholamban and Sarcoplipin in Human Skeletal Muscle Fibers. *Ervasti JM, editor. PLoS ONE* 2013, 8:e84304.
64. Gillis TE, Marshall CR, Tibbits GF: Functional and evolutionary relationships of troponin C. *Physiol Genomics* 2007, 32:16–27.
65. Caremani M, Melli L, Dolfi M, Lombardi V, Linari M: Force and number of myosin motors during muscle shortening and the coupling with the release of the ATP hydrolysis products. *J Physiol* 2015, 593:3313–3332.
66. Offer G, Ranatunga KW: The endothermic ATP hydrolysis and crossbridge attachment steps drive the increase of force with temperature in isometric and shortening muscle. *J Physiol* 2015, 593:1997–2016.
67. Tupling AR: The decay phase of Ca²⁺ transients in skeletal muscle: regulation and physiology. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* 2009, 34:373–376.
68. Stammers AN, Susser SE, Hamm NC, Hlynsky MW, Kimber DE, Kehler DS,

- Duhamel TA: The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA). *Can J Physiol Pharmacol* 2015, 93:843–854.
69. Lamboley CR, Murphy RM, McKenna MJ, Lamb GD: Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *J Physiol* 2014, 592:1381–1395.
 70. Fajardo VA, Bombardier E, McMillan E, Tran K, Wadsworth BJ, Gamu D, Hopf A, Vigna C, Smith IC, Bellissimo C, Michel RN, Tarnopolsky MA, Quadrilatero J, Tupling AR: Phospholamban overexpression in mice causes a centronuclear myopathy-like phenotype. *Dis Model Mech* 2015, 8:999–1009.
 71. Gamu D, Bombardier E, Smith IC, Fajardo VA, Tupling AR: Sarcolipin provides a novel muscle-based mechanism for adaptive thermogenesis. *Exerc Sport Sci Rev* 2014, 42:136–142.
 72. Chen G, Carroll S, Racay P, Dick J, Pette D, Traub I, Vrbova G, Eggli P, Celio M, Schwaller B: Deficiency in parvalbumin increases fatigue resistance in fast-twitch muscle and upregulates mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 281:C114–C122.
 73. Thornton AM, Zhao X, Weisleder N, Brotto LS, Bougoin S, Nosek TM, Reid M, Hardin B, Pan Z, Ma J, Parness J, Brotto M: Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) contributes to normal skeletal muscle contractility in young but not in aged skeletal muscle. *Aging* 2011, 3:621–634.
 74. Putney JW: The Physiological Function of Store-operated Calcium Entry. *Neurochem Res* 2011, 36:1157–1165.
 75. Kiviluoto S, Decuyper J-P, De Smedt H, Missiaen L, Parys JB, Bultynck G: STIM1 as a key regulator for Ca²⁺ homeostasis in skeletal-muscle development and function. *Skelet Muscle* 2011, 1:16.
 76. Mignen O, Thompson JL, Shuttleworth TJ: STIM1 regulates Ca²⁺ entry via arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane: Plasma membrane STIM1 regulates the ARC channels. *J Physiol* 2007, 579:703–715.
 77. Clapham DE: Calcium signaling. *Cell* 2007, 131:1047–1058.
 78. Stiber J, Hawkins A, Zhang Z-S, Wang S, Burch J, Graham V, Ward CC, Seth M, Finch E, Malouf N, Williams RS, Eu JP, Rosenberg P: STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2008, 10:688–697.
 79. Liang X, Ma K, Rao Y, Hong D, Huo Z, Ye Z, Huang M, Zhang X, Zhao Q: Characterization of endonuclease G and mitochondria-sarcoplasmic reticulum-related proteins during cardiac hypertrophy. *Pharm* 2015, 70:586–592.
 80. Williams GSB, Boyman L, Chikando AC, Khairallah RJ, Lederer WJ: Mitochondrial calcium uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110:10479–10486.
 81. Dorn GW, Maack C: SR and mitochondria: calcium cross-talk between kissing cousins. *J Mol Cell Cardiol* 2013, 55:42–49.
 82. Andrukhov O, Huber R, Shi B, Berner S, Rausch-Fan X, Moritz A, Spencer ND, Schedle A: Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater* 2016, 32:1374–1384.
 83. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer Stolz D, Liu L, Tuan R, Robinson LJ, Schlesinger PH, Nelson DJ: Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In

Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev* 2016, .

84. Ren L, Yang P, Wang Z, Zhang J, Ding C, Shang P: Biomechanical and biophysical environment of bone from the macroscopic to the pericellular and molecular level. *J Mech Behav Biomed Mater* 2015, 50:104–122.
85. Atkins GJ, Findlay DM: Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 2012, 23:2067–2079.
86. Chapurlat RD, Confavreux CB: Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatol Oxf Engl* 2016, 55:1714–1725.
87. Blair HC, Zaidi M, Schlesinger PH: Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J* 2002, 364:329–341.
88. Manaka S, Tanabe N, Kariya T, Naito M, Takayama T, Nagao M, Liu D, Ito K, Maeno M, Suzuki N, Miyazaki M: Low-intensity pulsed ultrasound-induced ATP increases bone formation via the P2X7 receptor in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *FEBS Lett* 2015, 589:310–318.
89. Knight MN, Hankenson KD: Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care* 2013, 2:306–316.
90. James AW: Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica* 2013, 2013:684736.
91. Wang N, Zhang J, Yang JX: Growth factor progranulin blocks tumor necrosis factor- α -mediated inhibition of osteoblast differentiation. *Genet Mol Res GMR* 2016, 15.
92. Takarada T, Nakazato R, Tsuchikane A, Fujikawa K, Iezaki T, Yoneda Y, Hinoi E: Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. *Dev Camb Engl* 2016, 143:211–218.
93. Hirai T, Kobayashi T, Nishimori S, Karaplis AC, Goltzman D, Kronenberg HM: Bone Is a Major Target of PTH/PTHrP Receptor Signaling in Regulation of Fetal Blood Calcium Homeostasis. *Endocrinology* 2015, 156:2774–2780.
94. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M: Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol* 2010, 30:3071–3085.
95. Marie PJ, Hay E, Saidak Z: Integrin and cadherin signaling in bone: role and potential therapeutic targets. *Trends Endocrinol Metab TEM* 2014, 25:567–575.
96. Vervloet MG, Massy ZA, Brandenburg VM, Mazzaferro S, Cozzolino M, Ureña-Torres P, Bover J, Goldsmith D, CKD-MBD Working Group of ERA-EDTA: Bone: a new endocrine organ at the heart of chronic kidney disease and mineral and bone disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014, 2:427–436.
97. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H: Regulatory Mechanisms of RANKL Presentation to Osteoclast Precursors. *Curr Osteoporos Rep* 2014, 12:115–120.
98. Miyamoto T: Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *Keio J Med* 2011, 60:101–105.
99. Sato H, Yoshida M, Murase H, Nakagawa H, Doi T: Combinatorial Solid-Phase Synthesis and Biological Evaluation of Cyclodepsipeptide Destruxin B as a Negative Regulator for Osteoclast Morphology. *ACS Comb Sci* 2016, 18:590–595.
100. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS: Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Res*

Int 2015, 2015:421746.

101. Shemesh M, Addadi S, Milstein Y, Geiger B, Addadi L: Study of Osteoclast Adhesion to Cortical Bone Surfaces: A Correlative Microscopy Approach for Concomitant Imaging of Cellular Dynamics and Surface Modifications. *ACS Appl Mater Interfaces* 2016, 8:14932–14943.
102. Clover J, Dodds RA, Gowen M: Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts in situ and in culture. *J Cell Sci* 1992, 103 (Pt 1):267–271.
103. Georgess D, Machuca-Gayet I, Blangy A, Jurdic P: Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption. *Cell Adhes Migr* 2014, 8:191–204.
104. van den Dries K, Bolomini-Vittori M, Cambi A: Spatiotemporal organization and mechanosensory function of podosomes. *Cell Adhes Migr* 2014, 8:268–272.
105. Kanzaki H, Shinohara F, Kanako I, Yamaguchi Y, Fukaya S, Miyamoto Y, Wada S, Nakamura Y: Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes. *Redox Biol* 2016, 8:186–191.
106. Silva I, Branco JC: Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatol Port* 2011, 36:209–218.
107. Yu J, Yun H, Shin B, Kim Y, Park E-S, Choi S, Yu J, Amarasekara DS, Kim S, Inoue J-I, Walsh MC, Choi Y, Takami M, Rho J: Interaction of Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 (TRAF6) and Vav3 in the Receptor Activator of Nuclear Factor κ B (RANK) Signaling Complex Enhances Osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2016, 291:20643–20660.
108. Lee K, Chung YH, Ahn H, Kim H, Rho J, Jeong D: Selective Regulation of MAPK Signaling Mediates RANKL-dependent Osteoclast Differentiation. *Int J Biol Sci* 2016, 12:235–245.
109. Zhou L, Song F, Liu Q, Yang M, Zhao J, Tan R, Xu J, Zhang G, Quinn JMW, Tickner J, Xu J: Berberine Sulfate Attenuates Osteoclast Differentiation through RANKL Induced NF- κ B and NFAT Pathways. *Int J Mol Sci* 2015, 16:27087–27096.
110. Weichhaus M, Chung STM, Connelly L: Osteoprotegerin in breast cancer: beyond bone remodeling. *Mol Cancer* 2015, 14:117.
111. Nelson CA, Warren JT, Wang MW-H, Teitelbaum SL, Fremont DH: RANKL Employs Distinct Binding Modes to Engage RANK and the Osteoprotegerin Decoy Receptor. *Structure* 2012, 20:1971–1982.
112. Irie A, Takami M, Kubo H, Sekino-Suzuki N, Kasahara K, Sanai Y: Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. *Bone* 2007, 41:165–174.
113. Liu Y, Du H, Wang Y, Liu M, Deng S, Fan L, Zhang L, Sun Y, Zhang Q: Osteoprotegerin-Knockout Mice Developed Early Onset Root Resorption. *J Endod* 2016, 42:1516–1522.
114. Finnberg NK, Gokare P, Navaraj A, Lang Kuhs KA, Cerniglia G, Yagita H, Takeda K, Motoyama N, El-Deiry WS: Agonists of the TRAIL Death Receptor DR5 Sensitize Intestinal Stem Cells to Chemotherapy-Induced Cell Death and Trigger Gastrointestinal Toxicity. *Cancer Res* 2016, 76:700–712.
115. De Toni EN, Thieme SE, Herbst A, Behrens A, Stieber P, Jung A, Blum H, Göke B, Kolligs FT: OPG is regulated by beta-catenin and mediates resistance to TRAIL-induced apoptosis in colon cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008, 14:4713–4718.

116. Goswami S, Sharma-Walia N: Osteoprotegerin rich tumor microenvironment: implications in breast cancer. *Oncotarget* 2016, 7:42777–42791.
117. Robinson DE, Buttle DJ, Short RD, McArthur SL, Steele DA, Whittle JD: Glycosaminoglycan (GAG) binding surfaces for characterizing GAG-protein interactions. *Biomaterials* 2012, 33:1007–1016.
118. Tat SK, Padrines M, Theoleyre S, Couillaud-Battaglia S, Heymann D, Redini F, Fortun Y: OPG/membranous–RANKL complex is internalized via the clathrin pathway before a lysosomal and a proteasomal degradation. *Bone* 2006, 39:706–715.
119. Lane D, Matte I, Laplante C, Garde-Granger P, Rancourt C, Piché A: Osteoprotegerin (OPG) activates integrin, focal adhesion kinase (FAK), and Akt signaling in ovarian cancer cells to attenuate TRAIL-induced apoptosis. *J Ovarian Res* 2013, 6:82.
120. Bogl LH, Latvala A, Kaprio J, Sovijärvi O, Rissanen A, Pietiläinen KH: An investigation into the relationship between soft tissue body composition and bone mineral density in a young adult twin sample. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2011, 26:79–87.
121. Binkley TL, Specker BL: Muscle-bone relationships in the lower leg of healthy pre-pubertal females and males. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008, 8:239–243.
122. Wetzsteon RJ, Zemel BS, Shults J, Howard KM, Kibe LW, Leonard MB: Mechanical loads and cortical bone geometry in healthy children and young adults. *Bone* 2011, 48:1103–1108.
123. Goldspink G: Changes in muscle mass and phenotype and the expression of autocrine and systemic growth factors by muscle in response to stretch and overload. *J Anat* 1999, 194 (Pt 3):323–334.
124. Mabilieu G, Mieczkowska A, Libouban H, Simon Y, Audran M, Chappard D: Comparison between quantitative X-ray imaging, dual energy X-ray absorptiometry and microCT in the assessment of bone mineral density in disuse-induced bone loss. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2015, 15:42–52.
125. Warner SE, Sanford DA, Becker BA, Bain SD, Srinivasan S, Gross TS: Botox induced muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone* 2006, 38:257–264.
126. Atomi Y: Gravitational Effects on Human Physiology. *Subcell Biochem* 2015, 72:627–659.
127. Giarmatzis G, Jonkers I, Wesseling M, Van Rossom S, Verschueren S: Loading of Hip Measured by Hip Contact Forces at Different Speeds of Walking and Running. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2015, 30:1431–1440.
128. Novotny SA, Warren GL, Lin AS, Guldberg RE, Baltgalvis KA, Lowe DA: Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. *Neuromuscul Disord NMD* 2011, 21:183–193.
129. Nakagaki WR, Bertran CA, Matsumura CY, Santo-Neto H, Camilli JA: Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of mdx mice. *Bone* 2011, 48:372–379.
130. Qin W, Sun L, Cao J, Peng Y, Collier L, Wu Y, Creasey G, Li J, Qin Y, Jarvis J, Bauman WA, Zaidi M, Cardozo C: The Central Nervous System (CNS)-independent Anti-bone-resorptive Activity of Muscle Contraction and the Underlying Molecular and Cellular Signatures. *J Biol Chem* 2013, 288:13511–13521.
131. Shen H, Grimston S, Civitelli R, Thomopoulos S: Deletion of connexin43 in

osteoblasts/osteocytes leads to impaired muscle formation in mice. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2015, 30:596–605.

132. Bonewald LF: Does Defective Bone Lead to Defective Muscle?: DOES DEFECTIVE BONE LEAD TO DEFECTIVE MUSCLE? *J Bone Miner Res* 2015, 30:593–595.

133. Bivi N, Nelson MT, Faillace ME, Li J, Miller LM, Plotkin LI: Deletion of Cx43 from osteocytes results in defective bone material properties but does not decrease extrinsic strength in cortical bone. *Calcif Tissue Int* 2012, 91:215–224.

134. Tagliaferri C, Wittrant Y, Davicco M-J, Walrand S, Coxam V: Muscle and bone, two interconnected tissues. *Ageing Res Rev* 2015, 21:55–70.

135. Guo B, Zhang Z-K, Liang C, Li J, Liu J, Lu A, Zhang B-T, Zhang G: Molecular Communication from Skeletal Muscle to Bone: A Review for Muscle-Derived Myokines Regulating Bone Metabolism. *Calcif Tissue Int* 2016, .

136. Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S: Role of myostatin in metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004, 7:451–457.

137. Sipos W, Duvigneau JC, Schmoll F, Exel B, Hofbauer G, Baravalle G, Hartl RT, Dobretsberger M, Pietschmann P: Characterization of the cytokine pattern of porcine bone marrow-derived cells treated with 1alpha,25(OH)D. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2005, 52:382–387.

138. Walrand S: Effect of vitamin D on skeletal muscle. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 2016, 14:127–134.

139. Ceglia L, da Silva Morais M, Park LK, Morris E, Harris SS, Bischoff-Ferrari HA, Fielding RA, Dawson-Hughes B: Multi-step immunofluorescent analysis of vitamin D receptor loci and myosin heavy chain isoforms in human skeletal muscle. *J Mol Histol* 2010, 41:137–142.

140. Girgis CM, Cha KM, Houweling PJ, Rao R, Mokbel N, Lin M, Clifton-Bligh RJ, Gunton JE: Vitamin D Receptor Ablation and Vitamin D Deficiency Result in Reduced Grip Strength, Altered Muscle Fibers, and Increased Myostatin in Mice. *Calcif Tissue Int* 2015, 97:602–610.

141. Jackson WM, Aragon AB, Onodera J, Koehler SM, Ji Y, Bulken-Hoover JD, Vogler JA, Tuan RS, Nesti LJ: Cytokine expression in muscle following traumatic injury. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc* 2011, 29:1613–1620.

142. Ramirez DM, Ramirez MR, Reginato AM, Medici D: Molecular and cellular mechanisms of heterotopic ossification. *Histol Histopathol* 2014, 29:1281–1285.

143. Peake JM, Gatta P Della, Suzuki K, Nieman DC: Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects. *Exerc Immunol Rev* 2015, 21:8–25.

144. Cullen T, Thomas AW, Webb R, Hughes MG: Interleukin-6 and associated cytokine responses to an acute bout of high-intensity interval exercise: the effect of exercise intensity and volume. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* 2016, 41:803–808.

145. Liu F, Aubin JE, Malaval L: Expression of leukemia inhibitory factor (LIF)/interleukin-6 family cytokines and receptors during in vitro osteogenesis: differential regulation by dexamethasone and LIF. *Bone* 2002, 31:212–219.

146. Jähn K, Lara-Castillo N, Brotto L, Mo CL, Johnson ML, Brotto M, Bonewald LF: Skeletal muscle secreted factors prevent glucocorticoid-induced osteocyte apoptosis

- through activation of β -catenin. *Eur Cell Mater* 2012, 24:197–209; discussion 209–210.
147. Pérez-López FR, Ara I: Fragility fracture risk and skeletal muscle function. *Climacteric J Int Menopause Soc* 2016, 19:37–41.
148. Sartori R, Sandri M: Bone and morphogenetic protein signalling and muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015, 18:215–220.
149. Ireland A, Degens H, Maffulli N, Rittweger J: Tennis service stroke benefits humerus bone: is torsion the cause? *Calcif Tissue Int* 2015, 97:193–198.
150. Rossi P, Marzani B, Giardina S, Negro M, Marzatico F: Human skeletal muscle aging and the oxidative system: cellular events. *Curr Aging Sci* 2008, 1:182–191.
151. Girgis CM: Integrated therapies for osteoporosis and sarcopenia: from signaling pathways to clinical trials. *Calcif Tissue Int* 2015, 96:243–255.
152. Sharples AP, Hughes DC, Deane CS, Saini A, Selman C, Stewart CE: Longevity and skeletal muscle mass: the role of IGF signalling, the sirtuins, dietary restriction and protein intake. *Aging Cell* 2015, 14:511–523.
153. Retamales A, Zuloaga R, Valenzuela CA, Gallardo-Escarate C, Molina A, Valdés JA: Insulin-like growth factor-1 suppresses the Myostatin signaling pathway during myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015, 464:596–602.
154. Gallagher PM, Touchberry CD, Teson K, McCabe E, Tehel M, Wacker MJ: Effects of an acute bout of resistance exercise on fiber-type specific GLUT4 and IGF-1R expression. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* 2013, 38:581–586.
155. Nakamura K, Kurokawa T, Aoyama I, Hanada K, Tamura M, Kawaguchi H: Stimulation of bone formation by intraosseous injection of basic fibroblast growth factor in ovariectomised rats. *Int Orthop* 1998, 22:49–54.
156. Deng C, Wang P, Zhang X, Wang Y: Short-term, daily exposure to cold temperature may be an efficient way to prevent muscle atrophy and bone loss in a microgravity environment. *Life Sci Space Res* 2015, 5:1–5.
157. Graebe A, Schuck EL, Lensing P, Putcha L, Derendorf H: Physiological, pharmacokinetic, and pharmacodynamic changes in space. *J Clin Pharmacol* 2004, 44:837–853.
158. Arfat Y, Xiao W-Z, Iftikhar S, Zhao F, Li D-J, Sun Y-L, Zhang G, Shang P, Qian A-R: Physiological effects of microgravity on bone cells. *Calcif Tissue Int* 2014, 94:569–579.
159. Ohira T, Kawano F, Ohira T, Goto K, Ohira Y: Responses of skeletal muscles to gravitational unloading and/or reloading. *J Physiol Sci JPS* 2015, 65:293–310.
160. Söderpalm A-C, Magnusson P, Ahlander A-C, Karlsson J, Kroksmark A-K, Tulinius M, Swolin-Eide D: Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD* 2007, 17:919–928.
161. Sbrocchi AM, Rauch F, Jacob P, McCormick A, McMillan HJ, Matzinger MA, Ward LM: The use of intravenous bisphosphonate therapy to treat vertebral fractures due to osteoporosis among boys with Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 2012, 23:2703–2711.
162. Fairclough RJ, Wood MJ, Davies KE: Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet* 2013, 14:373–378.
163. Nowak KJ, Davies KE: Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* 2004, 5:872–876.
164. Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC: Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal

- Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol Rev* 2016, 96:253–305.
165. Le Rumeur E, Hubert J-F, Winder SJ: A new twist to coiled coil. *FEBS Lett* 2012, 586:2717–2722.
166. Le Rumeur E, Winder SJ, Hubert J-F: Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1804:1713–1722.
167. Moore CJ, Winder SJ: The inside and out of dystroglycan post-translational modification. *Neuromuscul Disord NMD* 2012, 22:959–965.
168. Bozzi M, Morlacchi S, Bigotti MG, Sciandra F, Brancaccio A: Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol* 2009, 28:179–187.
169. Zhan Y, Tremblay MR, Melian N, Carbonetto S: Evidence that dystroglycan is associated with dynamin and regulates endocytosis. *J Biol Chem* 2005, 280:18015–18024.
170. Nastase MV, Young MF, Schaefer L: Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 2012, 60:963–975.
171. Flanigan KM: The muscular dystrophies. *Semin Neurol* 2012, 32:255–263.
172. Marshall JL, Chou E, Oh J, Kwok A, Burkin DJ, Crosbie-Watson RH: Dystrophin and utrophin expression require sarcospan: loss of $\alpha 7$ integrin exacerbates a newly discovered muscle phenotype in sarcospan-null mice. *Hum Mol Genet* 2012, 21:4378–4393.
173. Hirst RC, McCullagh KJA, Davies KE: Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol Myopathies Cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol* 2005, 24:209–216.
174. Young MF, Fallon JR: Biglycan: a promising new therapeutic for neuromuscular and musculoskeletal diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2012, 22:398–400.
175. Woods CE, Novo D, DiFranco M, Capote J, Vergara JL: Propagation in the transverse tubular system and voltage dependence of calcium release in normal and mdx mouse muscle fibres. *J Physiol* 2005, 568:867–880.
176. Woods CE, Novo D, DiFranco M, Vergara JL: The action potential-evoked sarcoplasmic reticulum calcium release is impaired in mdx mouse muscle fibres. *J Physiol* 2004, 557:59–75.
177. Yeung EW, Whitehead NP, Suchyna TM, Gottlieb PA, Sachs F, Allen DG: Effects of stretch-activated channel blockers on [Ca²⁺]_i and muscle damage in the mdx mouse. *J Physiol* 2005, 562:367–380.
178. Head SI: Branched fibres in old dystrophic mdx muscle are associated with mechanical weakening of the sarcolemma, abnormal Ca²⁺ transients and a breakdown of Ca²⁺ homeostasis during fatigue. *Exp Physiol* 2010, 95:641–656.
179. Doran P, Dowling P, Lohan J, McDonnell K, Poetsch S, Ohlendieck K: Subproteomics analysis of Ca²⁺-binding proteins demonstrates decreased calsequestrin expression in dystrophic mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem* 2004, 271:3943–3952.
180. Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, Matecki S, Lacampagne A, Marks AR: Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat Med* 2009, 15:325–330.
181. Bellinger AM, Reiken S, Dura M, Murphy PW, Deng S-X, Landry DW, Nieman D,

- Lehnart SE, Samaru M, LaCampagne A, Marks AR: Remodeling of ryanodine receptor complex causes “leaky” channels: a molecular mechanism for decreased exercise capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105:2198–2202.
182. Berger J, Berger S, Hall TE, Lieschke GJ, Currie PD: Dystrophin-deficient zebrafish feature aspects of the Duchenne muscular dystrophy pathology. *Neuromuscul Disord NMD* 2010, 20:826–832.
183. Corona BT, Balog EM, Doyle JA, Rupp JC, Luke RC, Ingalls CP: Junctophilin damage contributes to early strength deficits and EC coupling failure after eccentric contractions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010, 298:C365–C376.
184. Pasternak C, Wong S, Elson EL: Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol* 1995, 128:355–361.
185. Lyfenko AD, Dirksen RT: Differential dependence of store-operated and excitation-coupled Ca²⁺ entry in skeletal muscle on STIM1 and Orai1. *J Physiol* 2008, 586:4815–4824.
186. Edwards JN, Friedrich O, Cully TR, von Wegner F, Murphy RM, Launikonis BS: Upregulation of store-operated Ca²⁺ entry in dystrophic mdx mouse muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010, 299:C42–C50.
187. Launikonis BS, Murphy RM, Edwards JN: Toward the roles of store-operated Ca²⁺ entry in skeletal muscle. *Pflugers Arch* 2010, 460:813–823.
188. Kargacin ME, Kargacin GJ: The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered in dystrophic muscle. *Biochim Biophys Acta* 1996, 1290:4–8.
189. Gehrig SM, van der Poel C, Sayer TA, Schertzer JD, Henstridge DC, Church JE, Lamon S, Russell AP, Davies KE, Febbraio MA, Lynch GS: Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* 2012, 484:394–398.
190. Marques MJ, Ferretti R, Vomero VU, Minatel E, Neto HS: Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 2007, 35:349–353.
191. Goonasekera SA, Lam CK, Millay DP, Sargent MA, Hajjar RJ, Kranias EG, Molkentin JD: Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J Clin Invest* 2011, 121:1044–1052.
192. Vallejo-Illarramendi A, Toral-Ojeda I, Aldanondo G, López de Munain A: Dysregulation of calcium homeostasis in muscular dystrophies. *Expert Rev Mol Med* 2014, 16:e16.
193. Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K: Muscle Plasticity and β 2 -Adrenergic Receptors: Adaptive Responses of β 2 -Adrenergic Receptor Expression to Muscle Hypertrophy and Atrophy. *J Biomed Biotechnol* 2011, 2011:1–10.
194. Church JE, Trieu J, Sheorey R, Chee AY-M, Naim T, Baum DM, Ryall JG, Gregorevic P, Lynch GS: Functional β -Adrenoceptors Are Important for Early Muscle Regeneration in Mice through Effects on Myoblast Proliferation and Differentiation. *Alway SE, editor. PLoS ONE* 2014, 9:e101379.
195. Lynch GS, Hinkle RT, Faulkner JA: Power output of fast and slow skeletal muscles of mdx (dystrophic) and control mice after clenbuterol treatment. *Exp Physiol* 2000, 85:295–299.
196. Berdeaux R, Stewart R: cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. *AJP Endocrinol Metab* 2012, 303:E1–E17.

197. Cairns SP, Borrani F: β -Adrenergic modulation of skeletal muscle contraction: key role of excitation-contraction coupling: β -Adrenergic processes and muscle contraction. *J Physiol* 2015, 593:4713–4727.
198. Li Y, He J, Sui S, Hu X, Zhao Y, Li N: Clenbuterol upregulates histone demethylase JHDM2a via the β 2-adrenoceptor/cAMP/PKA/p-CREB signaling pathway. *Cell Signal* 2012, 24:2297–2306.
199. Koopman R, Gehrig SM, Léger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, Lynch GS: Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic β -adrenoceptor stimulation in mice. *J Physiol* 2010, 588:4811–4823.
200. Sin DD, Reid WD: Is inflammation good, bad or irrelevant for skeletal muscles in COPD? *Thorax* 2007, 63:95–96.
201. Cates CJ, Jaeschke R, Schmidt S, Ferrer M: Regular treatment with formoterol and inhaled steroids for chronic asthma: serious adverse events. *Cochrane Database Syst Rev* 2013, 6:CD006924.
202. Conte TC, Silva LH, Silva MT, Hirabara SM, Oliveira AC, Curi R, Moriscot AS, Aoki MS, Miyabara EH: The β 2-adrenoceptor agonist formoterol improves structural and functional regenerative capacity of skeletal muscles from aged rat at the early stages of postinjury. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012, 67:443–455.
203. Harcourt LJ, Schertzer JD, Ryall JG, Lynch GS: Low dose formoterol administration improves muscle function in dystrophic mdx mice without increasing fatigue. *Neuromuscul Disord NMD* 2007, 17:47–55.
204. Dupont-Versteegden EE, Katz MS, McCarter RJ: Beneficial versus adverse effects of long-term use of clenbuterol in mdx mice. *Muscle Nerve* 1995, 18:1447–1459.
205. Zhang Q, Xiang J, Wang X, Liu H, Hu B, Feng M, Fu Q: Beta(2)-adrenoceptor agonist clenbuterol reduces infarct size and myocardial apoptosis after myocardial ischaemia/reperfusion in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 2010, 160:1561–1572.
206. Foster H, Popplewell L, Dickson G: Genetic therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2012, 23:676–687.
207. Kornegay JN, Spurney CF, Nghiem PP, Brinkmeyer-Langford CL, Hoffman EP, Nagaraju K: Pharmacologic management of Duchenne muscular dystrophy: target identification and preclinical trials. *ILAR J* 2014, 55:119–149.
208. Sharples AP, Stewart CE, Seaborne RA: Does skeletal muscle have an “epi”-memory? The role of epigenetics in nutritional programming, metabolic disease, aging and exercise. *Aging Cell* 2016, 15:603–616.
209. Ghosh S, Dass JFP: Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene* 2016, 584:97–109.
210. Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PML, Carathers M, Li Z-W, Beg AA, Ghosh S, Sahenk Z, Weinstein M, Gardner KL, Rafael-Fortney JA, Karin M, Tidball JG, Baldwin AS, Guttridge DC: Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest* 2007, 117:889–901.
211. Hinz M, Scheidereit C: The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep* 2014, 15:46–61.

212. Chu H-X, Zhu J-F, Huang J-J, Jiang Z-Y, Lu M-C, Zhang X-J, Sun H-P, You Q-D: Insights into targeting NEMO for pharmacological regulation. *Curr Drug Targets* 2014, 15:874–887.
213. Huang J-J, Chu H-X, Jiang Z-Y, Zhang X-J, Sun H-P, You Q-D: Recent advances in the structure-based and ligand-based design of IKK β inhibitors as anti-inflammation and anti-cancer agents. *Curr Med Chem* 2014, 21:3893–3917.
214. Habineza Ndikuyeze G, Gaurnier-Hausser A, Patel R, Baldwin AS, May MJ, Flood P, Krick E, Propert KJ, Mason NJ: A phase I clinical trial of systemically delivered NEMO binding domain peptide in dogs with spontaneous activated B-cell like diffuse large B-cell lymphoma. *PloS One* 2014, 9:e95404.
215. Reay DP, Bastacky SI, Wack KE, Stolz DB, Robbins PD, Clemens PR: D-Amino Acid Substitution of Peptide-Mediated NF- κ B Suppression in mdx Mice Preserves Therapeutic Benefit in Skeletal Muscle, but Causes Kidney Toxicity. *Mol Med Camb Mass* 2015, 21:442–452.
216. Petnikota H, Madhuri V, Gangadharan S, Agarwal I, Antonisamy B: Retrospective cohort study comparing the efficacy of prednisolone and deflazacort in children with muscular dystrophy: A 6 years' experience in a South Indian teaching hospital. *Indian J Orthop* 2016, 50:551–557.
217. Griggs RC, Miller JP, Greenberg CR, Fehlings DL, Pestronk A, Mendell JR, Moxley RT, King W, Kissel JT, Cwik V, Vanasse M, Florence JM, Pandya S, Dubow JS, Meyer JM: Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 2016, .
218. Pincus T, Cutolo M: Clinical trials documenting the efficacy of low-dose glucocorticoids in rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* 2015, 22:46–50.
219. Hanada R, Hanada T, Sigl V, Schramek D, Penninger JM: RANKL/RANK-beyond bones. *J Mol Med Berl Ger* 2011, 89:647–656.
220. Lamboley CRH, Kake Guena SA, Touré F, Hébert C, Yaddaden L, Nadeau S, Bouchard P, Wei-LaPierre L, Lainé J, Rousseau EC, Frenette J, Protasi F, Dirksen RT, Pape PC: New method for determining total calcium content in tissue applied to skeletal muscle with and without calcein. *J Gen Physiol* 2015, 145:127–153.
221. Posterino GS, Lamb GD: Effect of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content on action potential-induced Ca²⁺ release in rat skeletal muscle fibres. *J Physiol* 2003, 551:219–237.
222. Manno C, Ríos E: A better method to measure total calcium in biological samples yields immediate payoffs. *J Gen Physiol* 2015, 145:167–171.
223. Okubo Y, Suzuki J, Kanemaru K, Nakamura N, Shibata T, Iino M: Visualization of Ca²⁺ Filling Mechanisms upon Synaptic Inputs in the Endoplasmic Reticulum of Cerebellar Purkinje Cells. *J Neurosci* 2015, 35:15837–15846.
224. Brussee V, Tardif F, Tremblay JP: Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscul Disord NMD* 1997, 7:487–492.
225. Fairclough RJ, Perkins KJ, Davies KE: Pharmacologically targeting the primary defect and downstream pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Curr Gene Ther* 2012, 12:206–244.
226. Tatem KS, Quinn JL, Phadke A, Yu Q, Gordish-Dressman H, Nagaraju K: Behavioral and Locomotor Measurements Using an Open Field Activity Monitoring

- System for Skeletal Muscle Diseases. *J Vis Exp* [Internet] 2014 [cited 2016 Oct 26], . Available from: <http://www.jove.com/video/51785/behavioral-locomotor-measurements-using-an-open-field-activity>
227. Kobayashi YM, Rader EP, Crawford RW, Campbell KP: Endpoint measures in the mdx mouse relevant for muscular dystrophy pre-clinical studies. *Neuromuscul Disord* 2012, 22:34–42.
228. Brini M, Carafoli E: Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev* 2009, 89:1341–1378.
229. Ryall JG, Schertzer JD, Murphy KT, Allen AM, Lynch GS: Chronic 2-adrenoceptor stimulation impairs cardiac relaxation via reduced SR Ca²⁺-ATPase protein and activity. *AJP Heart Circ Physiol* 2008, 294:H2587–H2595.
230. Ryall JG, Schertzer JD, Alabakis TM, Gehrig SM, Plant DR, Lynch GS: Intramuscular 2-agonist administration enhances early regeneration and functional repair in rat skeletal muscle after myotoxic injury. *J Appl Physiol* 2008, 105:165–172.
231. Schertzer JD, Plant DR, Ryall JG, Beitzel F, Stupka N, Lynch GS: Beta2-agonist administration increases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity in aged rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, 288:E526–E533.
232. Traister A, Li M, Aafaqi S, Lu M, Arab S, Radisic M, Gross G, Guido F, Sherret J, Verma S, Slorach C, Mertens L, Hui W, Roy A, Delgado-Olguín P, Hannigan G, Maynes JT, Coles JG: Integrin-linked kinase mediates force transduction in cardiomyocytes by modulating SERCA2a/PLN function. *Nat Commun* 2014, 5:4533.
233. Kalra J, Anantha M, Warburton C, Waterhouse D, Yan H, Yang Y-J, Strut D, Osooly M, Masin D, Bally MB: Validating the use of a luciferase labeled breast cancer cell line, MDA435LCC6, as a means to monitor tumor progression and to assess the therapeutic activity of an established anticancer drug, docetaxel (Dt) alone or in combination with the ILK inhibitor, QLT0267. *Cancer Biol Ther* 2011, 11:826–838.
234. Yongchaitrakul T, Manokawinchoke J, Pavasant P: Osteoprotegerin induces osteopontin via syndecan-1 and phosphoinositol 3-kinase/Akt in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 2009, 44:776–783.
235. Beauvais DM, Ell BJ, McWhorter AR, Rapraeger AC: Syndecan-1 regulates $\alpha_v \beta_3$ and $\alpha_v \beta_5$ integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *J Exp Med* 2009, 206:691–705.
236. Tkachenko E: Syndecans: New Kids on the Signaling Block. *Circ Res* 2005, 96:488–500.
237. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, Kostenuik PJ, Dougall WC, Sullivan JK, Martin JS, Dansey R: Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 2012, 11:401–419.
238. Sköldenberg O, Rysinska A, Eisler T, Salemyr M, Bodén H, Muren O: Denosumab for treating periprosthetic osteolysis; study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2016, 17:174.