



La communication os-muscle dans la dystrophie musculaire : une interaction musculaire hors triade pour l'ostéoprotégérine

Thèse

Antoine Boulanger Piette

Doctorat en médecine moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Antoine Boulanger Piette, 2019

**La communication os-muscle dans la dystrophie
musculaire: une interaction musculaire hors triade pour
l'ostéoprotégérine**

Thèse

Antoine Boulanger Piette

Sous la direction de :

Jérôme Frenette, directeur de recherche

Résumé de la thèse

La dystrophie musculaire de Duchenne est caractérisée par une dégénérescence musculaire progressive accompagnée d'une fragilité osseuse exacerbée par la norme de soins actuelle. Au-delà de la relation mécanique qui unit leur croissance, maintenance ou dégénérescence, les muscles et les os interagiraient à l'échelle moléculaire via des sentiers signalétiques communs. La voie RANK/RANKL/OPG, un gouverneur du remodelage osseux, est au nombre de ces voies suite à la découverte de la triade en contexte musculaire, de la capacité des cellules musculaires à sécréter de l'OPG, de la localisation du récepteur RANK au sarcolemme et de l'effet inotropique de la délétion musculaire de RANK sur l'atrophie induite par dénervation. Élément déterminant, le bénéfice musculaire d'un traitement au FL-OPG-Fc, protagoniste de la triade fusionnée à un fragment Fc, est supérieur aux stratégies pharmacologiques ou génétiques d'inhibition de RANK/RANKL pour la souris dystrophique et suggère un effet biologique hors-triade. Malgré ces évidences morcelées et compte tenu de la structure du FL-OPG-Fc, un potentiel mécanisme d'action musculaire est inconnu. Ce mécanisme constitue l'idée originale de cette thèse et nécessite investigation à l'aide d'un modèle pré-clinique prédictif et fidèle au déroulement de la pathologie. Le but de cette thèse est **1)** caractériser à différents stades de vie les propriétés fonctionnelles et contractiles d'un nouveau modèle dystrophique pré-clinique murin ainsi que les paramètres discriminants par rapport à la souris sauvage, **2)** mettre à jour les connaissances sur la cohésion signalétique ainsi que le dialogue moléculaire bidirectionnel muscle-os en contexte de dystrophie musculaire et **3)** investiguer la capacité du FL-OPG-Fc à interagir directement avec les cellules musculaires, en explorer la signalisation cellulaire puis vérifier la présence d'un effet bénéfique aigu sur la contractilité de muscles dystrophiques.

Premièrement, nos recherches sur le nouveau modèle ont démontré que l'haploinsuffisance en utrophine dans la souris délétée en dystrophine n'a pas d'impact sur sa performance fonctionnelle et contractile à 1, 2 et 5 mois d'âge. Ces données ont permis d'établir que la souris déficiente en dystrophine était pertinente pour nos études, moyennant l'utilisation préférentielle de variables expérimentales discriminantes par rapport à la souris sauvage telles que la force maximale spécifique et la résistance aux contractions excentriques. Deuxièmement, en ce qui a trait aux voies communes et aux dialogues muscle-os en contexte de dystrophie musculaire, nos travaux de synthèse ont répertorié des interactions basées sur des myokines, ostéokines et cytokines de double

origine déclenchant des sentiers signalétiques menant entre autres à l'inflammation, la fibrose, la synthèse ou la dégradation protéique. Collectivement, les sources citées par notre ouvrage soulignent l'importance de considérer les muscles et les os en tant qu'unité pour orienter les recherches précliniques vers le développement d'approches multifonctionnelles efficaces à traiter ces affections musculaires et osseuses de manière simultanée. Troisièmement, nos travaux de recherche ont montré que le FL-OPG-Fc peut directement associer et influencer le muscle squelettique grâce à son domaine de liaison à l'héparine tant pour les fibres saines que celles déficientes en dystrophine, et ce, au moins en partie de manière indépendante du récepteur RANK. Puis, cette liaison musculaire peut engendrer une cascade de signalisation cellulaire incluant les protéines FAK/Akt/CaMKII/PLN. Concrètement, nos résultats ont indiqué que le FL-OPG-Fc peut avoir un effet protecteur dans les cellules musculaires contre les dommages causés par une surcharge calcique. Finalement, le FL-OPG-Fc peut avoir un effet potentiateur sur les contractions téaniques des muscles dystrophiques de phénotype rapide, effet nécessitant la présence du domaine de liaison à l'héparine pour s'opérer.

Globalement, cette thèse apporte une contribution à l'avancement des connaissances sur le développement scientifique de modèles précliniques de DMD, sur les sentiers communs aux muscles et aux os, sur l'existence ainsi que le domaine de l'interaction du FL-OPG-Fc directement sur les cellules musculaires et sur une des voies de signalisation potentielles par laquelle le FL-OPG-Fc peut les influencer. Ces avancées biologiques repoussent les connaissances au sujet de la voie RANK/RANKL/OPG au sein de la communication muscle-os. Ces résultats peuvent également être mis en perspective de situations physiologiques comme la croissance, la maintenance et l'homéostasie, où ce dialogue pourrait s'exprimer dans la régulation réciproque du muscle et de l'os. Finalement, les connaissances générées au sujet de la protéine OPG pourront contribuer à la compréhension des rôles hors-triade de l'OPG répertoriés pour de multiples types cellulaires non-osseux.

Table des matières

Résumé de la thèse	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures et tableaux	vii
Liste des abréviations	viii
Épigraphe	x
Remerciements	xi
Avant-propos	xiii
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 - Le muscle en contexte physiologique	3
1.2.1 La polyvalence et plasticité du muscle squelettique	3
1.2.2 Le tissu musculaire, organisé et hétérogène.....	3
1.2.3 L'échafaudage des fibres musculaires, le cytosquelette.....	5
1.2.4 Le déroulement du couplage excitation-contraction et de la relaxation.....	7
1.2.5 La signalisation du calcium, de physiologique à pathologique	9
1.2.6 Conclusion du muscle à l'état physiologique.....	11
1.3 – La dystrophie musculaire de Duchenne.....	11
1.3.1 Le portrait de la DMD, au-delà de la dystrophine	11
1.3.2 Les déterminants de la faiblesse des fibres musculaires dystrophiques...	14
1.3.3 Un continuum de modèles expérimentaux sur la DMD	17
1.3.4 L'utrophine, protéine homologue de la dystrophine.....	18
1.3.5 Le modèle mdx délété ou haploinsuffisant en utrophine.....	20
1.4 – L'émergence d'interactions os-muscle.....	23
1.4.1 Diaphonie muscle-os dans la DMD	23
1.5 - RANK/RANKL/OPG, le gouverneur de l'os.....	25
1.5.1 RANK/RANKL/OPG comme acteur signalétique musculaire.....	27
1.5.2 La voie RANK dans la DMD	29
1.6 – Le FL-OPG-Fc à titre de molécule d'action musculaire	30
1.6.1 La structure de l'OPG et son développement biomédical	30
1.6.2 Le FL-OPG-Fc et ses domaines au-delà de RANKL/RANK	32
1.7 - Les protéoglycanes musculaires comme cible potentielle du FL-OPG-Fc.....	34
1.7.1 Un éventail de protéoglycanes musculaires.....	34
1.7.2 Les intégrines, rôles et signalisation en aval.....	36
1.8 – Objectifs et hypothèses.....	39
Chapitre 2 : L'haploinsuffisance en utrophine n'aggrave pas la performance fonctionnelle, la résistance aux contractions excentriques et la production de force des souris dystrophiques	41
Titre original de l'article	42
Résumé	43
Abstract	44
2.1 Introduction.....	45
2.2 Materials and methods	47
2.3 Results	51

2.4 Discussion.....	53
2.5 Conclusion	55
2.6 Acknowledgments.....	56
2.7 Authors contribution.....	56
2.8 References.....	56
2.9 Figures, tables and legends	60
Chapitre 3 : Cibler l'unité muscle-os, faire d'une pierre deux coups dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne	66
Titre original de l'article	67
Résumé	68
Abstract	69
3.1 Introduction.....	70
3.2 Muscle and Skeletal Decline in DMD: the Scope of the Problem.....	70
3.3 Muscle-Bone Interactions in Muscular Dystrophy.....	71
3.4 Myokines and Their Effects on Bone Tissue in DMD.....	72
3.5 Osteokines and Their Effects on Muscle Tissue in DMD	75
3.6 Treating the Bone-Muscle Complex with Single or Combined Drugs in DMD ..	77
3.7 RANK/RANKL/OPG and Muscular Dystrophy.....	79
3.8 Conclusion	81
3.9 References.....	82
3.10 Figures, tables and legends.....	93
Chapitre 4 : L'ostéoprotégérine pleine longueur se lie aux cellules musculaires via son domaine de liaison à l'héparine et augmente rapidement la force de muscles EDL dystrophiques.....	94
Titre original de l'article	95
Résumé	96
Abstract	97
4.1 Introduction.....	98
4.2 Materials and methods	100
4.3 Results	103
4.4 Discussion.....	106
4.5 Conclusion	108
4.6 Abbreviations	109
4.7 Acknowledgements	110
4.8 Funding.....	110
4.9 Authors contributions	110
4.10 References	110
4.11 Figures, tables and legends.....	114
Chapitre 5 : Conclusion	124
5.1 - L'haploinsuffisance en utrophine n'affecte pas la fonction musculaire de la mdx.....	124
Les interactions muscle-os dans la DMD	130
L'OPG peut interagir directement avec les cellules musculaires.....	131
Bibliographie.....	139

Liste des figures et tableaux

Figure 1.1 Protéines sarcolemmales et structure des sarcomères.....	7
Figure 1.2 Structure de la dystrophine et de l'utrophine.....	20
Figure 1.3 Ostéokines, cytokines de double-origine et myokines.....	24
Figure 1.4 Représentation schématique de la triade RANK/RANKL/OPG et répercussions de la manipulation de ses éléments sur la densité osseuse.....	26
Figure 1.5 Structure de l'OPG.....	31
Figure 1.6 Représentation schématique des protéoglycanes, localisation dans la matrice extracellulaire et proximité avec les intégrines.....	35
Figure 1.7 Illustration du mécanisme d'activation des intégrines <i>outside-in</i> et <i>inside-out</i>	38
Tableau 1.1 : Résumé des résultats sur les variables principales des travaux publiés comparant le modèle <i>mdx/utrn+/+</i> et le modèle <i>mdx/utrn+/-</i>	22
Figure 2.1 <i>Functional performances of wild-type, mdx/utrn +/+, and mdx/utrn +/- mice</i>	59
Figure 2.2 <i>Ex vivo contractile properties and resistance to seven eccentric contractions of extensor digitorum longus muscles from wild-type, mdx/utrn+/+, and mdx/utrn+/- mice</i>	60
Figure 2.3 <i>Histological, morphological and biochemical features of wild-type, mdx/utrn+/+, and mdx/utrn+/- mice</i>	62
Table 2.1 <i>Body weight and morphological characteristics of EDL muscles from wild-type, mdx/utrn+/+, and mdx/utrn+/- mice at 1, 2, and 5 months of age</i>	63
Figure 3.1 <i>Myokines, osteokines, and dual-origin cytokines involved in Duchenne muscular dystrophy</i>	92
Figure 4.1 <i>FL-OPG binds to myotubes through its heparin-binding domain</i>	113
Figure 4.2 <i>FL-OPG-Fc activates FAK/Akt/CaMKII, increases PLN phosphorylation and reduces Ca²⁺ overload-induced damage in myotubes</i>	115
Figure 4.3 <i>FL-OPG-Fc binds to dystrophic EDL muscles</i>	117
Figure 4.4 <i>A single FL-OPG-Fc injection increases dystrophic EDL tetanic forces</i>	119
Figure 4.5 <i>Schematic and hypothetical binding and action of FL-OPG-Fc on muscle cells</i>	121
Figure 4.S1 <i>OPG peaks in serum 30 min following FL-OPG-Fc injection</i>	121
Table 4.1 <i>Morphology and contractile properties of EDL muscles</i>	122

Liste des abréviations

ADP	Adénosine diphosphate
Akt	<i>Protein kinase B</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BMD	Dystrophie musculaire de Becker
CaMK	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CaN	<i>Calcineurin</i>
DAPC	<i>Dystrophin-associated protein complex</i>
DGC	<i>Dystrophin-glycoprotein complex</i>
DHPR	<i>Dihydropyridine receptors</i>
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FDB	<i>Flexor digitorum brevis</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor-2</i>
FL-OPG-Fc	<i>Full-length osteoprotegerin fused to immunoglobulin fragment complex</i>
FSHD	Dystrophie facio scapulo humérale
HDAC	<i>Histone deacetylases</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IKK	<i>I kappa-B kinase</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1β</i>
IL-6	<i>Interleukin-6</i>
ILK	<i>Integrin linked kinase</i>
IP ₃ R	<i>Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
Mdx	Modèle murin délété en dystrophine
Mdx/utrn-/-	Modèle murin délété en dystrophine et en utrophine
Mdx/utrn+/-	Modèle murin délété en dystrophine et haplo-insuffisant pour utrophine
MEF2	<i>Myocyte enhancer factor-2</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
OPG-Fc	<i>Osteoprotegerin fused to immunoglobulin fragment complex</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i>
PLN	<i>Phospholamban</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
RS	Réticulum sarcoplasmique
RYR	<i>Ryanodine receptors</i>
SERCA	<i>Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</i>
STIM-1	<i>Stromal interaction protein 1</i>
TA	<i>Tibialis anterior</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>

TR-OPG-Fc *Truncated osteoprotegerin fused to immunoglobulin fragment complex*
TRPC *Transient receptor potential-canonical*
VEGF *Vascular endothelial growth factor*

Épigraphe

« Tout travail scientifique est une réalisation communautaire et non pas l'œuvre d'un cavalier seul. Qui sait où Darwin se serait égaré en 1837 sans Gould, sans Owen, et sans la vie scientifique très active de Londres et de Cambridge ? »

Stephen Jay Gould 1988

Remerciements

D'emblée, j'aimerais diriger ma gratitude vers mon directeur Pr. Jérôme Frenette, littéralement l'unique superviseur de mes études en recherche, de mes premières expériences à titre de jeune stagiaire à mes études de maîtrise jusqu'à la fin de mon parcours doctoral. Arboriculteur fruitier dans l'âme, le dépassement de soi, la poursuite de l'excellence, la résolution de problèmes complexes et le regard scientifique critique ou autocritique sont au nombre des fruits qu'il a su faire pousser en moi. Adeptes de la course de fond et véritable boxeur scientifique, sa tenacité est un modèle pour se rendre au bout des kilomètres et rondes nécessaires à tout accomplissement. Merci pour notre excellente relation même dans les moments où l'oxygène se faisait rare et merci pour ta flexibilité par rapport au développement de ma carrière non-conventionnelle. En appui à mon directeur se tient mon comité d'évaluation m'ayant accompagné durant mes études supérieures, merci à Claude H. Côté et Denis R. Joannis pour leur mentorat, conseils et suggestions.

Évoluer dans un laboratoire est avant tout un travail d'équipe pour laquelle j'ai pu assister à plusieurs versions où j'ai pu apprendre de chacune et chacun. Je tiens à saluer et remercier les nombreux membres passés et présents pour leur amitié, compétence et dévouement; étudiants (Mélicha, Nicolas, Sébastien, Rachelle, Dounia, Laetitia, Zineb), professionnels de recherche (Éliane, Patrice, Sabrina, Anteneh, Françoise) et stagiaires (Rares Ovidiu, Joseph-Émile, Frédérique, Louis-Bénédicté). Merci également aux nombreux collaborateurs, employés de l'animalerie, membres de l'axe neurosciences, du centre de recherche et de l'Université Laval pour leur collaboration essentielle. Les études graduées sont également un moment clé pour l'apprentissage de compétences transversales, je voudrais remercier les membres des divers comités/chantiers/clubs sur lesquels j'ai siégé et surtout les employeurs qui m'ont fait confiance et permis d'acquérir de l'expérience professionnelle inestimable (Université Laval, Québec International, *Forbion Capital Partners*, *BDC Capital Healthcare Venture Fund*). En tant qu'étudiant gradué, j'ai également eu le privilège d'être appuyé par une multitude d'entités au-delà de mon laboratoire. Merci aux principaux pour votre reconnaissance et générosité; la Fondation Le Grand Défi Pierre Lavoie, la Fondation du CHU de Québec et le Fonds du Département de Réadaptation de l'Université Laval.

Les derniers et non les moindres, merci à ma famille grandissante pour votre présence, amour et support inconditionnels. Pouvoir compléter 9 ans d'université et traverser la

montagne russe du Ph.D. implique d'être né sous une bonne étoile et se tenir sur une pyramide de probabilités favorables. Je pense avoir la chance d'avoir eu une éducation exemplaire bien au-delà de mon cheminement académique, je vous en suis infiniment reconnaissant et être présent pour vous demeurera toujours une priorité. En plus de ma famille, merci à mes amis et partenaires au fil de ces années pour les nombreux voyages, activités, projets, parties, sorties et échanges qui m'ont permis de vivre ma vie en parallèle, un incontournable pour l'équilibre d'un candidat au Ph.D dans un système académique sous une multitude de pressions.

Avant-propos

La présente thèse en est une par insertion d'articles constituée d'une introduction de facture traditionnelle, de l'insertion de deux articles de recherche originaux, d'un article de revue pertinent à la thématique et d'une conclusion générale en français. Les trois articles sont inclus à titre de premier auteur et ma contribution dans chaque article fut dans l'élaboration de l'idée de départ, la planification du design expérimental, la collecte des données, la revue de littérature, l'écriture du premier jet, la soumission et la complétion des rondes de révision pour ceux qui sont publiés au moment d'écrire ces lignes. La contribution des coauteurs est essentiellement à la collecte de données, mis-à-part mon directeur Jérôme Frenette et le professionnel de recherche Anteneh Argaw qui ont tous deux contribué aux étapes de conception, de rédaction et de révision. Les articles publiés n'ont subi aucune modification lors de leur insertion dans la thèse, outre l'uniformisation du format. Les articles inclus dans la thèse sont issus des travaux de doctorat exclusivement et n'incluent pas les 2 articles publiés en tant que premier auteur en lien avec la maîtrise ainsi que les 6+ articles co-signés en tant que collaborateur durant mon parcours.

Le premier article, chapitre 2, est : *Utrophin haploinsufficiency does not worsen the functional performance, resistance to eccentric contractions and force production of dystrophic mice*. Il a été publié en juin 2018 dans le journal *PloS One* avec les coauteurs suivants : Dounia Hamoudi, Laetitia Marcadet, Frédérique Kyomi Labelle, Rares Ovidiu David, Sabrina Bossé, Anteneh Argaw et Jérôme Frenette.

Le deuxième article, chapitre 3, est : *Targeting the Muscle-Bone Unit: Filling Two Needs with One Deed in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy*. Il a été publié en septembre 2018 dans le journal *Current Osteoporosis Reports* dans la section *Muscle and Bone* avec les coauteurs suivants : Dounia Hamoudi, Laetitia Marcadet, Françoise Morin, Anteneh Argaw, Leanne Ward et Jérôme Frenette.

Le troisième article, chapitre 4, est : *Full-length osteoprotegerin binds to myofibers via its heparin-binding domain and increases rapidly the force of dystrophic EDL muscles*. L'essentiel de ces travaux a été présenté au *World Muscle Society Congress* en octobre 2018 et son résumé publié dans le journal *Neuromuscular Disorders*. Au moment du dépôt initial, le manuscrit ci-joint est en préparation pour une soumission dans le *Journal of Clinical Investigation* en 2019 avec les coauteurs suivants : Laetitia Marcadet, Zineb Bouredji, Dounia Hamoudi, Anteneh Argaw et Jérôme Frenette.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Problématique

Les rôles essentiels revêtis par le muscle squelettique exigent une polyvalence métabolique, une synchronie progressive de ses unités contractiles et qui plus est, une structure cytosquelettique lui conférant une compliance variable tout en permettant la transmission efficace de la force générée. Les composantes du cytosquelette agissent souvent à titre de maillons d'une chaîne élaborée dont l'absence de certains de ses éléments engendre une fragilité se matérialisant entre autres sous la forme d'une susceptibilité exagérée aux dommages lors de la contraction. C'est le cas de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), où l'absence de la dystrophine au sein de ce complexe protéique est la cause d'une myopathie léthale affectant 1 à 20 sur 100 000 naissances masculines selon la zone géographique (1). Bien que le standard de soins et l'espérance de vie des patients vivant avec la DMD aient augmenté, l'absence de traitement guérissant ou palliant totalement son évolution lui confère un statut de besoin médical non comblé. De par sa nature dégénérative grave dès un âge relativement bas, la DMD est un fardeau émotionnel, occupationnel et financier pour les familles, le système de la santé, les professionnels de la santé et par le fait même, la société. Une étude transversale internationale dirigée en 2014 sur 770 patients a révélé que les coûts directs liés à la santé pour les patients vivant avec la DMD étaient de 7 à 16 fois supérieurs comparativement à l'individu moyen, et atteignaient de 23 à 35 fois la moyenne si l'on incluait les coûts indirects (2). Des travaux récents ont aussi dévoilé que les coûts grimpaient dramatiquement lors de la transition de la phase ambulatoire à la phase non-ambulatoire, soit de 5,7 fois, encourageant la recherche dédiée à retarder la dégénérescence et donc prolonger la capacité locomotrice (1). Cette dégénérescence engendre en effet une perte de fonction progressive limitant la locomotion au quotidien puis mène éventuellement à des complications cardio-respiratoires nécessitant une assistance mécanique qui se solde par une défaillance fatale. Devant le constat de l'importance de la DMD, la recherche fondamentale et pré-clinique basées sur les hypothèses modernes de la pathophysiologie de la DMD sont d'une haute pertinence. En effet, la recherche biomédicale fondamentale orientée vers des solutions universelles pour la DMD, et même applicable à d'autres myopathies partageant des mécanismes d'action, est primordiale.

Pour effectuer ces recherches, la communauté scientifique requiert des modèles animaux valides dont la valeur prédictive favorise le succès translationnel. C'est pourquoi cette thèse comprend d'abord des travaux de caractérisation sur un nouveau modèle potentiellement plus fidèle au déroulement de la DMD humaine que le modèle murin délété en dystrophine (mdx), travaux qui ont permis de déterminer le modèle à préconiser pour les études subséquentes. Par la suite, en ce qui a trait à nos hypothèses sur la pathophysiologie de la DMD, notre laboratoire s'intéresse à la relation moléculaire muscle-os en contexte de dystrophie musculaire comme potentielle source d'innovations biologiques. À l'heure actuelle, il y a un manque d'information et de sensibilisation au sujet de ces interactions bi-directionnelles au sein des groupes travaillant sur la DMD et c'est pourquoi nos travaux visent à combler ce manque par l'entremise d'une revue des évidences récentes incluant notre thématique de recherche. Notre intérêt spécifique est la triade de cytokines qui gouverne le remodelage osseux, le *receptor activator of nuclear factor kappa-B* (RANK), le *RANK-ligand* (RANKL) et l'*osteoprotegerin* (OPG) à titre d'éléments manipulables dans la DMD. Nos travaux précédents ont ouvert un champ de recherche via la démonstration qu'un traitement au *full-length osteoprotegerin fused to immunoglobulin fragment complex* (FL-OPG-Fc), augmentait la fonction de muscles dystrophiques, et ce, de manière supérieure à l'inhibition de RANKL ou à la délétion spécifique de RANK musculaire. Actuellement, les explications sont toutefois limitées à ce sujet et plusieurs questions fondamentales demeurent en suspens quant à l'étude d'un mécanisme biologique hors-triade musculaire pour le FL-OPG-Fc.

En sommes, suite à cette problématique (1.1), l'introduction de la thèse s'attardera brièvement sur le muscle dans son état physiologique (1.2), puis plus en détails sur la DMD et les modèles pré-cliniques à l'étude (1.3), sur l'émergence d'interactions muscle-os (1.4), la triade RANK/RANKL/OPG (1.5), le FL-OPG-Fc à titre de molécule d'intérêt musculaire (1.6), les potentielles cibles musculaires d'interactions et de signalisation du FL-OPG-Fc (1.7) et finalement un retour sur les objectifs et les hypothèses qui formeront le corps de la thèse (1.8).

1.2 - Le muscle en contexte physiologique

1.2.1 La polyvalence et plasticité du muscle squelettique

Le tissu musculaire squelettique est doté d'une polyvalence étendue ainsi que d'une plasticité étoffée. Il est flexible, dynamique et adaptatif, un organe hautement spécialisé réunissant des caractéristiques de base dont l'excitabilité, la contractilité, la tonicité et l'élasticité. Il accomplit des fonctions essentielles telles que la respiration, la locomotion, le support postural, la thermogénèse et l'homéostasie énergétique (3,4). Sa capacité d'adaptation élevée permet le remodelage de sa machinerie structurale, contractile et métabolique, mettant au diapason ses propriétés aux stimuli externes appliqués en adoptant un véritable continuum phénotypique. Ces signaux modulent étroitement sa réponse adaptative et peuvent prendre les formes suivantes : la stimulation mécanique, le stress métabolique, l'innervation motrice, la disponibilité en nutriments, le bilan endocrinien, le profil pharmacologique, etc. (5–8). Le muscle est par ailleurs situé au carrefour d'interactions systémiques, d'une part à l'écoute des signaux en aval mais également un effectif participant de la physiologie intégrative par la libération endocrine ou paracrine de son secrétôme composé de divers cytokines et peptides, nommés myokines (9–12). Cette réactivité peut entraîner des changements significatifs au profit ou au détriment des tissus impliqués dans la diaphonie. Il peut, d'autre part, survenir des situations délétères au tissu musculaire telles que l'alitement prolongé, l'immobilisation, la dénervation progressive ou traumatique, divers cancers, le vieillissement, la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'hypogravité et l'insuffisance cardiaque (13,14). Ces situations affectent négativement le muscle en termes mécaniques mais aussi en outre par l'entremise de facteurs systémiques et peuvent mener à une dégradation plus ou moins progressive de la fonction, allant de l'altération biochimique mineure à l'atrophie sévère.

1.2.2 Le tissu musculaire, organisé et hétérogène

Afin de mener à bien ses fonctions, le tissu musculaire est organisé avec précision, supporté d'une architecture dense composée d'un nombre élevé de fibres musculaires échafaudées dans un cytosquelette élaboré, entouré d'un espace interstitiel interactif, alimenté par des structures endothéliales et synchronisé par des afférences motrices. Le degré d'enveloppe ultime propre à la fibre musculaire est le sarcolemme, situé sous

l'endomysium, il est constitué de deux couches distinctes. La première, la membrane basale, est formée de collagène, fibronectine, laminine et glycoprotéines. La deuxième, la membrane plasmique, est constituée d'une double couche de phospholipides et est directement en contact avec le milieu sarcoplasmique. C'est au sein de ces membranes que siègent et parcourent différents récepteurs et canaux raccordant les milieux extracellulaires, cytosoliques et nucléaires. Mentionnons notamment des récepteurs sensibles aux signaux hormonaux, au stress mécanique, aux nutriments, aux neurotransmetteurs, etc. (15). Au chapitre des canaux, prévalent les canaux sodiques, potassiques, chloriques et calciques. Ces canaux peuvent être passifs ou actifs, transportant avec ou contre le gradient de concentration des ions selon une activation dépendante du potentiel membranaire ou par liaison avec un ligand spécifique (16,17). Directement adossés sous la membrane plasmique, on retrouve les multiples noyaux à l'origine du caractère multinucléé des fibres. Cette centaine de noyaux par fibre est répartie uniformément et palliera à une demande en synthèse protéique élevée, que ce soit à des fins d'homéostasie, d'hypertrophie ou de réparation. De manière similaire, on retrouve entre le sarcolemme et la membrane basale des cellules satellites quiescentes démontrant une dispersion assez homogène (18). Une fois recrutées par un stimulus propice à leur activation de nature intrinsèque et/ou micro environnementale, leur destinée sera de contribuer à la réserve de cellules satellites ou encore d'être commises à la différenciation en myoblastes. Ces myoblastes fusionneront afin de former des myotubes et contribueront aux myofibres matures déjà en place (19,20). Un autre élément essentiel est la présence du lit capillaire et du réseau lymphatique au pourtour des fibres performant la perfusion de ces dernières ainsi que les apports et échanges métaboliques en plus d'interactions moléculaires multiples (21). Également, on observe dans l'espace interstitiel la présence d'une population leucocytaire résidente, majorée de la fraction infiltrante lors de blessures physiques et/ou d'appels par messagers chimiques. Mastocytes, neutrophiles et macrophages sont au nombre de ces cellules et arborent une attraction et une chronologie d'activation définie par les messagers produits (22). Ces acteurs vont être modulés par la présence de facteurs pro et anti-inflammatoires, contribuant à l'exacerbation ou à la résolution de ce profil selon leurs phénotypes et médiateurs sécrétés. Au final, ces structures, organites et types cellulaires sont coordonnés, permettent le maintien de l'état homéostatique et soutiennent une fonction principale du tissu musculaire, l'activité contractile.

C'est à l'intérieur des fibres que se retrouvent les myofibrilles constituées d'un alignement de myofilaments agencés en série dont les segments sont appelés sarcomères, l'essence même de cette activité contractile, l'unité fonctionnelle de base du muscle lui conférant des propriétés nécessaires au couplage excitation-contraction et la formation éventuelle des ponts croisés. Chacune des myofibrilles est entourée d'un réseau de tubules et citernes qui constituent le réticulum sarcoplasmique (RS). Ce réservoir est essentiel aux mouvements calciques entre autres requis lors de la contraction. Le calcium entreposé et disponible à la libération est situé dans la partie terminale de ces citernes tandis que la partie centrale est vouée à la recapture du calcium permettant la relaxation musculaire. À proximité, on retrouve des organites et autres éléments essentiels comme des mitochondries, des gouttelettes de substrat lipidique ou des granules de glycogène, des lysosomes, l'appareil de golgi, des ribosomes, etc. Les paragraphes précédents fournissent donc un bref aperçu de l'importance capitale du maintien de l'organisation tissulaire dans la synchronisation des membranes, canaux, récepteurs, réservoirs, filaments, ions, organites, substrats, leucocytes et autres éléments permettant l'accomplissement des fonctions musculaires.

1.2.3 L'échafaudage des fibres musculaires, le cytosquelette

L'organisation tissulaire fine rendant possible la coordination des unités contractiles à la structure musculaire est critique à la génération de la force et à la pérennité des fibres musculaires. Le cytosquelette solidifie l'architecture musculaire, accommode la structure lors des variations géométriques associées à la contraction et il fournit un ancrage aux sarcomères permettant la transmission de la force au sarcolemme, puis ultimement, à la matrice extracellulaire. Il est dynamique et permet de préserver l'intégrité musculaire face au stress encouru lors de la contraction, de positionner des organites cellulaires, de rendre possible la myogenèse, d'orienter les myotubes lors de la régénération, etc. Au-delà de leurs rôles structuraux, plusieurs protéines cytosquelettiques pourraient revêtir des rôles reliés à la signalisation moléculaire et à l'expression génique (23,24). Les fonctions de ces protéines doivent donc être considérées non-seulement en terme de maillons d'une chaîne structurale mais aussi de relais signalétique de ce réseau, qui compte le cytosquelette extra-myofibrillaire, extra-sarcomérique et intra-myofibrillaire.

Concrètement, le cytosquelette extra-myofibrillaire est d'abord formé par le *dystrophin-*

glycoprotein complex (DGC). Cet hétéro-oligomère regroupant un large éventail de protéines a comme fonction d'intégrer les costamères au sarcolemme, de connecter structurellement les filaments d'actine au sarcolemme et de protéger ce dernier du stress mécanique lors de la contraction. Le DGC est subdivisé en trois sous-complexes, le dystroglycan, le sarcoglycan-sarcospan et le dystrophine-syntrophine-dystrobrevine. Quoique non-requise théoriquement pour l'assemblage des costamères, la dystrophine est un élément mécanique multidimensionnel y étant enrichi via un couplage au filament costamérique d' γ -actine (25). Les costamères sont des complexes de protéines subsarcolemmales qui intègrent physiquement les disques Z des sarcomères au sarcolemme, maintenant l'uniformité de la longueur de sarcomères adjacents durant la contraction ou l'étirement et minimisant le stress mécanique transmis aux membranes. Le constituant principal est le complexe intégrine-vinculine-taline, concentré à la jonction neuromusculaire et myotendineuse mais également retrouvé uniformément au sarcolemme (26). Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires qui se présentent sous une multitude de combinaisons de sous-chaînes et de chaînes α et β . Le complexe inclut aussi l' α -actinine, la desmine et un nombre grandissant de protéines participant ou interagissant avec le réseau cytosquelettique. Il représente un important lien au sarcolemme dans ces régions, un point d'ancrage des filaments intermédiaires, un médiateur d'interactions de la matrice extracellulaire, un acteur de différenciation et un récepteur de la migration des myoblastes (27). Les filaments intermédiaires font également partie du cytosquelette extramyofibrillaire et servent entre autres à lier les disques Z de sarcomères successifs ou de myofibrilles adjacents (23,24,28). À cela s'ajoute un réseau complexe de microtubules multidirectionnels sous forme d'une grille dotée d'une instabilité dynamique, spécialement dans la région subsarcolemmale, représentant un cytosquelette extra-sarcomérique permettant l'intégration d'organites cellulaires variés, particulièrement les noyaux (29,30). Quant à lui, le cytosquelette intra-myofibrillaire comprend la protéine géante titine et la nébuline, l'élastique titine relie la myosine aux disques Z et à la ligne M, tandis que la rigide nébuline joint l'actine aux disques Z. Le disque Z, constitué d' α -actinine, est la délimitation intersarcomérique. Il sert d'attache aux filaments minces et fait le lien entre les sarcomères. Les filaments épais sont quant à eux ancrés à la ligne M (23,24). La description du cytosquelette sous-entend donc un réseau des protéines réciproquement liées dans lequel le manque d'un élément peut compromettre l'ensemble.

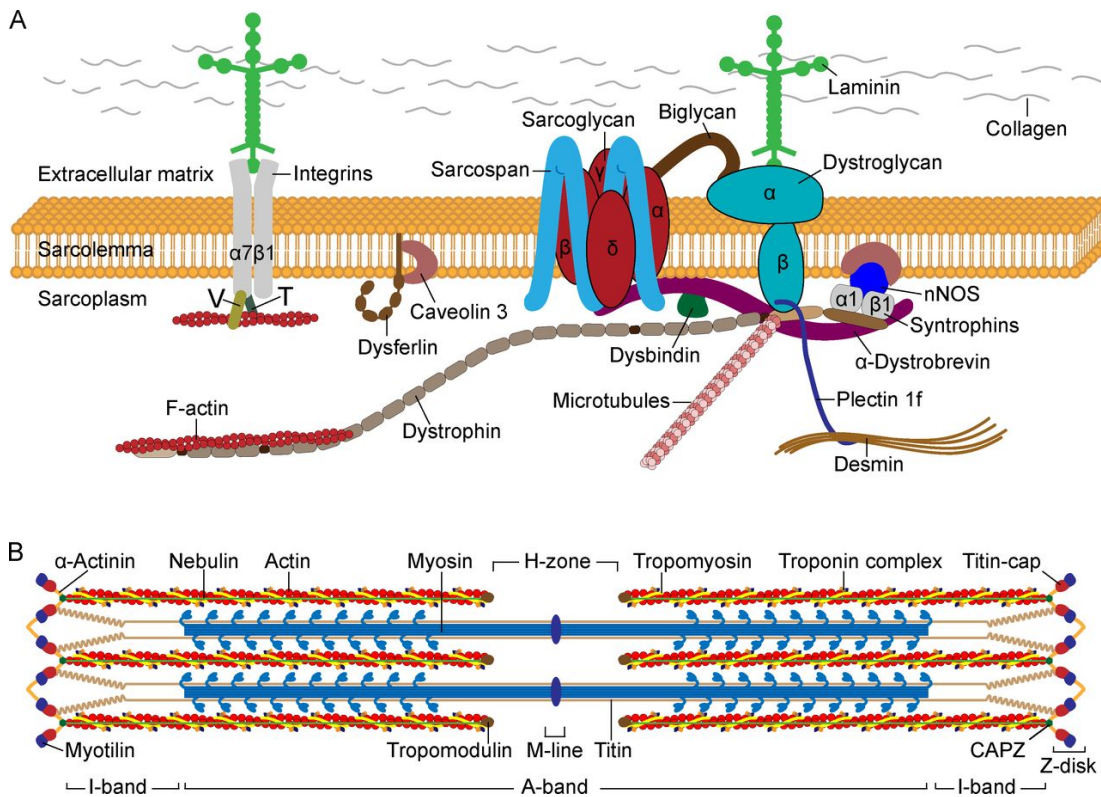


Figure 1.1 Protéines sarcolemmales (A) et structure des sarcomères (B). Tirée de (31)

1.2.4 Le déroulement du couplage excitation-contraction et de la relaxation

L'architecture musculaire et les structures cytosquelettiques représentent donc le siège de la transmission de la force. Cette dernière est générée lors du processus d'excitation-contraction, dont la fonction première est de convertir un signal électrique en un signal chimique qui résultera en une action mécanique. À l'atteinte du seuil électrophysiologique, le potentiel d'action créé va migrer et parcourir la membrane plasmique jusqu'à l'atteinte des tubules transverses, véritables invaginations permettant de rejoindre les citernes du RS qui lui sont physiquement attachées (32). Cet assemblage se nomme « triade » et comprend deux citernes terminales du RS pour un tubule T adjacent disposé perpendiculairement. Lors de la dépolarisation, les *dihydropyridine receptors* (DHPR/Cav1.1) tapissant les tubules T agissent comme détecteurs du voltage et accusent un changement de conformation permettant, via ses sous-unités α_1 s et β_1 a, l'ouverture des *ryanodine receptors* (RYR) du RS via une interaction physique (33). De plus, RYR

encourage le flux calcique en exerçant une action rétrograde sur DHPR, indépendante de ce dit flux (34). Aussi, les protéines junctine, triadine et calséquestrine sont de puissants régulateurs de RYR et forment un complexe quaternaire qui contribue à la stabilité de l'état d'ouverture ou de fermeture du canal selon l'état des niveaux calciques du réservoir (35–37). Ces étapes déclenchent la libération massive de calcium des citernes terminales du RS vers le sarcoplasme, contributeur principal de l'influx calcique utile à la contraction, et donc de la cascade d'évènements menant à l'exposition des filaments minces au calcium et à la contraction à proprement dit (38).

À l'état de repos, la formation de ponts croisés est impossible car le site de liaison de la myosine sur l'actine est masqué par le complexe tridimensionnel troponine-tropomyosine. À ce moment, la tête de myosine est dite armée. La présence du flux de calcium libéré par RYR, qui se liera en partie sur la troponine C, engendre un changement conformationnel du complexe troponine-tropomyosine. Ce faisant, le site de liaison de la myosine sur l'actine est dévoilé et la liaison est rendue possible. L'activité ATP-ase de la myosine est alors stimulée et l'hydrolyse de l'adénosine tri-phosphate (ATP) en adénosine diphosphate + phosphate inorganique (ADP) précédemment liée sur la tête globulaire de la myosine abaisse son état énergétique. Cela permet l'inclinaison de 90° à 45° de cette dernière et il en résulte le glissement de l'actine. Cette étape constitue le mouvement, et suite à sa complétion, de l'ATP est de nouveau liée à la tête de myosine ce qui dissocie le pont croisé par baisse d'affinité et rend possible de nombreux cycles de mouvement additionnels (39). Ceux-ci atteindront de prochains sites de liaison sur l'actine. Cet enchaînement d'évènements devrait se poursuivre tant et aussi longtemps que le calcium et les substrats énergétiques seront disponibles, dans les limites de l'amplitude des sarcomères et de la nature de la stimulation. Notons qu'une force peut être produite sans nécessairement produire de mouvement, c'est la contraction dite isométrique. De plus, il faut être conscient qu'avant d'observer un mouvement vectoriel produit par la contraction, la force produite doit se transmettre à toutes les structures musculaires. On entend ici les lignes Z entre les sarcomères, le cytosquelette inter-sarcomérique et inter-fibres, la matrice extracellulaire et le tendon. Ces composantes élastiques en série et en parallèle absorbent en quelque sorte une partie de la force appliquée jusqu'à l'atteinte de leur propre limite de compliance, la transférant au prochain pallier structural qui fera de même jusqu'au raccourcissement musculaire global. Le couplage excitation-contraction se solde notamment lorsque la stimulation du potentiel d'action cesse et que la fibre se repolarise

au potentiel membranaire de repos. C'est ultimement le retrait d'ions calciques du milieu sarcoplasmique principalement par les ATP-ases du RS qui rétablira le gradient calcique de repos et qui, en quelques millisecondes, mènera à la relaxation suite à la dissociation du calcium des sites de la troponine C. Ces pompes responsables du remplissage du réticulum sarcoplasmique et permettant un gradient calcique 10000 fois supérieur par rapport au milieu cytosolique sont connues sous le nom de *Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase* (SERCA). Elles sont en partie responsables de maintenir la cellule à une concentration calcique de $10^{-7}M$, comparativement à $10^{-5}M$ lors d'une contraction, tandis que le RS et le milieu extracellulaire se trouveront à environ $10^{-3}M$ (40,41). Le principal régulateur associé aux pompes SERCA est phospholamban (PLN), un inhibiteur qui peut être renversé selon deux éventualités. Dans un premier temps, par une élévation du Ca^{2+} cytosolique et autrement, via des sentiers de signalisation où PLN sera phosphorylé aux sites Ser16 et Thr17 de son domaine N-terminal cytosolique. En ce qui concerne le site Ser16, cela peut survenir par la voie protéine kinase K (PKA). Il est également phosphorylable au site Thr17 par la voie Ca^{2+} /calmodulin dépendant kinase (CAMKII) [106, 110, 125-128]. Au-delà des pompes SERCA et de la contraction/relaxation, la fine régulation de ce gradient ionique est contrôlée par plusieurs autres acteurs et est capitale pour la survie et la fonction de la cellule à plus long terme.

1.2.5 La signalisation du calcium, de physiologique à pathologique

Capitale pour la résolution de la contraction à court terme, la gestion du niveau de calcium cytosolique est en outre au cœur de plusieurs processus signalétiques. Initialement déterminé lors de l'expression du programme génétique lié au développement embryonnaire par des facteurs myogéniques intrinsèques, le phénotype sera aussi modulé par des paramètres neuraux, mécaniques, hormonaux et métaboliques (7,8,42). Second messenger ubiquitaire, le calcium influence entre autres la signalisation cellulaire qui détermine et maintient la nature du phénotype musculaire, un régulateur de sa plasticité. Par exemple, le niveau de calcium cytosolique est plus élevé dans les fibres lentes que rapides. Le calcium peut se lier à la protéine intermédiaire calmoduline, ce qui engendre la phosphorylation ou la déphosphorylation de cibles signalétiques associées à la régulation du phénotype. Par ailleurs, la liaison du calcium régule en partie la phosphatase *calcineurin* (CaN) faisant partie de la voie CaN / *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), aussi impliquée dans la spécification pro-oxydative. D'autre part, la Ca^{2+} /calmodulin-

dependent protein kinase (CaMK) est en partie dépendante de la liaison au calcium pour jouer son rôle d'activatrice du *myocyte enhancer factor-2* (MEF2), qui cause ultimement la phosphorylation et l'exportation nucléaire des *histone deacetylases* (HDAC) qui sont impliqués dans le phénotype. Réunissant des signaux de CaMK et CaN, la transcription du *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α* (PGC-1 α) est donc aussi intimement reliée aux niveaux calciques (42). Ces éléments signalétiques soulignent donc des effets de mouvements calciques transitoires et chroniques sur la physiologie musculaire au-delà de la contractilité.

Lorsque ces niveaux calciques cytosoliques sont déréglés en termes absolus et dans une dimension temporelle prolongée, dans les environs de la centaine nanomolaire, ils peuvent activer des voies revêtant un potentiel rôle délétère pour la cellule musculaire menant à la dysfonction mitochondriale ou à la défaillance de l'autophagie, par exemple (43). La dérégulation du calcium est un phénomène sous-jacent à la myotoxicité de certaines toxines comme la cardiotoxine et à la pathophysiologie musculaire lors de l'hypoxie, la septicémie, la cachéxie, la sarcopénie, l'insuffisance cardiaque et les dystrophies musculaires (44). Un mode d'atteinte aux protéines musculaires est la protéolyse via les calpaïnes suite à l'atteinte de concentration calciques élevées de manière soutenue. Les calpaïnes sont des *non-lysosomal Ca²⁺-dependent cysteine proteases* et le tissu musculaire squelettique en contient trois isoformes; mu-calpaïne, m-calpaïne et calpaïne-3. Grâce à leur activité de clivage, les deux premières formes seraient des médiateurs de différents événements cellulaires comme la myogenèse, la différenciation, ainsi que l'homéostasie et la mort cellulaire. Calpaïne-3, quant à elle, serait plus particulièrement dédiée au remodelage sarcomérique, son substrat préférentiel étant les protéines du cytosquelette. Les calpaïnes ne seraient pas aptes à dégrader les protéines en acides aminés ou même en segments peptidiques. Leur rôle en serait plutôt un de dépliement, rendant ces chaînes peptidiques accessibles au système ubiquitine-protéasome pour la dégradation subséquente. Un système de dégradation en aval serait donc nécessaire afin de guider les protéines suite au désassemblage par les calpaïnes. L'ampleur des concentrations calciques ainsi que la durée de ces mouvements ioniques vont déterminer la spécificité et la durée d'activation des formes de calpaïnes (45,46). Ces concentrations sont également au nombre des multiples facteurs internes pouvant enclencher la signalisation de mort cellulaire préprogrammée; l'apoptose. Dans ce cas, une élévation prolongée du calcium cytosolique au-dessus des seuils physiologiques peut

induire indirectement des mécanismes apoptotiques lors de la surcharge calcique des mitochondries entraînant une libération de facteurs pro-apoptotiques (47). Cette section survolant le rôle du calcium à titre de second messenger illustre bien les répercussions de perturbations dans sa gestion telles que répertoriées dans les hypothèses modernes de la pathophysiologie de la DMD (48).

1.2.6 Conclusion du muscle à l'état physiologique

La présente section concernant le muscle squelettique en contexte physiologique a d'emblée abordé sa polyvalence et sa plasticité, puis a touché ses degrés d'organisation et son hétérogénéité en terme de types cellulaires y étant hébergés. Ensuite, le cytosquelette, le couplage excitation-contraction et la relaxation ont été traités. Finalement, le rôle du calcium à titre de second messenger a été évoqué. La brève introduction de ces thèmes cache une haute complexité et une fine interaction permettant de conserver un état homéostasique et fonctionnel. À cette introduction s'ajoute des processus significatifs non-abordés tels que la myogenèse, la différenciation, l'atrophie, la régénérescence, la synthèse protéique, les myokines, la dégradation, l'inflammation, et autres. Des défaillances ou altérations de ces fins processus peuvent mener ou contribuer à des états pathologiques, dégénératifs, myopathiques, etc. Dans le cadre de la présente thèse, l'introduction couvrira désormais plus en détails la myopathie du sujet principal, la DMD et son principal modèle de recherche pré-clinique murin.

1.3 – La dystrophie musculaire de Duchenne

1.3.1 Le portrait de la DMD, au-delà de la dystrophine

La DMD est une maladie monogénique orpheline récessive liée au chromosome X touchant presque exclusivement les jeunes garçons (49). Elle est causée par l'absence de la dystrophine, protéine structurale de 427 kDa arrimant les sarcomères au sarcolemme et jouant un rôle important dans la transmission de la force des myofibrilles à la matrice extracellulaire. Tel que discuté précédemment dans la section sur le cytosquelette, la dystrophine est au cœur du DGC et contribue ainsi à préserver l'intégrité cytosquelettique cellulaire contre le stress mécanique occasionné par la contraction, particulièrement de type excentrique (50,51). En termes succincts, la DMD est donc caractérisée par une

dramatique susceptibilité aux dommages reliés à la contraction générant des cycles de régénérescence/dégénérescence musculaire accompagnés d'une infiltration leucocytaire liée à une réaction inflammatoire chronique et générant un stress oxydatif important. Éventuellement survient l'épuisement des cellules satellites et donc un déséquilibre de la capacité régénérative au profit de la nécrose, une fibrose progressive ainsi qu'une adiposité intramusculaire accrue. Ces événements occasionnent une dégénérescence graduelle de la masse musculaire et de la force (49,52–54), affectant particulièrement les fibres rapides (55). Le mécanisme complexe de cette nécrose musculaire n'est toujours pas complètement élucidé mais la fragilité membranaire au stress mécanique encourue par l'absence de la dystrophine dans son rôle primaire de stabilisation membranaire n'expliquerait pas complètement l'établissement et la progression de la DMD (50,51). Par exemple, des processus altérés comme la fatigabilité, fibrose, adiposité, régénération, vasorégulation, structure synaptique, cognition et fonction ne s'expliquent pas uniquement par la fragilité mécanique (56). De plus, les patients DMD et les modèles animaux vivent une phase précoce exempte de signes de pathologie, et ce, malgré l'absence de la dystrophine (56). À la lumière de ces observations, les multiples systèmes secondaires compromis dans la DMD seraient à la fois des conséquences et des contributeurs significatifs de la pathologie.

Ces systèmes secondaires sont donc inscrits au chapitre des hypothèses contemporaines de la pathophysiologie de la DMD traitées dans le paragraphe suivant, au-delà de la fragilité musculaire liée à l'absence de la dystrophine. D'une part, la désorganisation du cytosquelette entraînerait des micro-lésions qui altèreraient la perméabilité membranaire et l'activité de canaux ioniques perturbant ainsi l'homéostasie (54,57,58), particulièrement calcique, événement pivot dans la DMD (59–62) qui serait même perturbé avant la tenue des premiers signes de dégénération (63,64). Cet influx calcique occasionnant une haute concentration calcique intracellulaire (57,61,65–68) déclencherait l'activation de la voie protéolytique des calpaines et subséquemment, de la voie de dégradation du protéasome (67,69). Ces événements résultent en la destruction de composantes membranaires, favorisant à leurs tours l'entrée calcique et de macromolécules, contribuant à la dégénérescence. D'autre part, ce dommage et cette nécrose stimuleraient l'infiltration leucocytaire chronique, accompagnée de ses dommages collatéraux et libération de facteurs et molécules pro-inflammatoires ou pro-oxydatives diversifiés (56). Cette réponse

immunitaire, activée par les molécules endogènes libérées par le tissu lésé, pourrait amplifier et non résoudre la pathologie, tel qu'illustré par la déplétion des neutrophiles ou macrophages diminuant significativement les dommages dans les muscles dystrophiques (56). Simultanément surviendrait une dysfonction de la perméabilité du pore de transition mitochondriale (70,71) menant à la production de radicaux libres via l'enzyme *NADPH oxydase*, entretenant une fois de plus la réciprocity entre le stress oxydatif, dommage cellulaire et l'influx calcique (72–78). Cet influx calcique extracellulaire serait causé par une altération des canaux *store-operated calcium entry* (SOCE) et *transient receptor potential-canonical* (TRPC), des hémicanaux connexines 39/43/45 (79) et des canaux dépendants de l'étirement (57,80–82). D'autre part, ce débalancement serait couplé, à l'interne, à une fuite du réticulum sarcoplasmique via le *IP3 inositol 1,4,5-triphosphate receptor* (IP₃R) et la s-nitrosylation ou la s-glutathionylation de RyR (83,84). L'importance de l'homéostasie calcique est bien décrite par le fait qu'en conditions physiologiques la surexpression de TRPC2 est suffisante pour augmenter la concentration calcique intracellulaire et engendrer un phénotype partiel de dystrophie musculaire (85). Le même principe vaut pour la *stromal interaction molecule-1* (STIM-1), composante de SOCE qui agit à titre de senseur du calcium du RS, pour qui un gain de fonction peut mener à un influx problématique (34,86). Aussi, les ATPases SERCA accuseraient des dysfonctionnalités dans les muscles dystrophiques sous la forme d'une baisse d'activité, contribuant à leur tour à la perte d'homéostasie ionique par la recapture calcique compromise (87). En conditions dystrophiques, la surexpression de SERCA ou d'un mutant de perte de fonction des TRPC6 amenuise la dégénération musculaire en optimisant la gestion du Ca²⁺ (88–90) tandis que de façon similaire, les muscles du larynx surexprimant de façon naturelle SERCA sont épargnés (91). Dans la même ligne de pensée, la pathologie de la DMD est absente dans les muscles extraoculaires, résistance conférée par la gestion intrinsèque de l'homéostasie calcique (92). Un exemple supplémentaire réside dans le fait que le processus nécrotique engendré par la perte de l'homéostasie calcique est diminué pour la souris mdx surexprimant *calpastatin*, un inhibiteur endogène des calpaïnes (93). Finalement, la dystrophine est un acteur de signalisation au cœur des complexes costamériques dystrophine-glycoprotéines et intégrine-vinculine-taline-laminine (23,94), dont l'absence mène la perte du complexe associé à dystrophine, déstabilise le réseau de costamères et perturberait non seulement des protéines de gestion du calcium mais de la signalisation cellulaire associée à la perfusion, à la méchanotransduction ou à des modifications post-traductionnelles. Au final,

les hypothèses contemporaines de la pathophysiologie de la DMD réconcilient ces différents aspects structuraux, calciques, physico-chimiques et signalétiques dans un mécanisme intégrateur dont les parties en aval et en amont sont inévitablement interreliés, mais dont la chronologie et contribution exactes à la dégénération et la faiblesse sont à démontrer (48).

1.3.2 Les déterminants de la faiblesse des fibres musculaires dystrophiques

En parallèle à ces mécanismes pathophysiologiques, survient la faiblesse musculaire caractéristique de la DMD. La perte de matériel contractile au profit de tissus collagéniques et adipeux suite à la nécrose ne serait pas l'unique déterminant de la diminution de la force spécifique retrouvée dans les muscles squelettiques dystrophiques. Outre les nombreuses données animales, ceci est illustré par la normalisation de la force générée en fonction de l'aire de surface contractile disponible pour des patients DMD mesurée par technique d'imagerie corrigeant pour l'infiltration adipeuse, montrant que même en présence de quantité de tissu contractile équivalente, il y a réduction de la qualité musculaire dans tous les groupes musculaires testés (95,96). En termes généraux, les raisons avancées pour cette baisse de qualité comprennent une capacité contractile compromise, une réduction et un délai de la transmission de la force à la structure cytosquelettique, un désalignement des fibres et la modification des propriétés passives musculaires comme la rigidité dépendante entre autres du cytosquelette et du contenu fibrotique (95,97). Parce que les présents travaux se concentrent sur le jeune modèle mdx durant sa première phase de dégénérescence où l'hypertrophie compensatoire, l'oedème, la fibrose et l'adiposité ne sont pas significativement installés par rapport aux muscles sains, ce sont les processus de génération de la force qui seront explorés plus en détails. Les paramètres contributoires à la force produite lors d'une contraction tétanique sont multiples et comprennent notamment son état d'étirement, l'aire de surface ainsi que l'angle de pennation des fibres, le pH cellulaire, la conductivité des tubules transverses, l'ampleur de la libération calcique du RS, les statuts ioniques intra/extra cellulaires de calcium/sodium/potassium/magnésium, la saturation et l'affinité de la troponine pour le calcium, l'isoforme et activité ATPasique de la myosine lors processus de formation du nombre variable de ponts croisés en parallèle, la disponibilité en substrats énergétiques

tels que l'ATP, etc (98). C'est donc potentiellement au sein de ces éléments que la faiblesse pourrait en partie tirer son origine.

D'emblée, la déstabilisation de la membrane occasionnée par l'absence de la dystrophine engendre des conséquences morphologiques comme des changements à la jonction neuromusculaire mais aussi physico-chimiques comme l'augmentation du niveau de molécules extracellulaires variées, de calcium intracellulaire et des espèces oxygénées réactives, ce qui pourrait avoir un rôle délétère direct sur la fonction des sarcomères, par l'oxydation de lipides sarcolemmaux ou par la modification post-traductionnelle de protéines membres du couplage excitation-contraction (99,100). Une publication oriente ces éléments et les résume en démontrant que si la dystrophine joue un rôle dans le couplage excitation-contraction, ce serait en aval des processus de mouvement des charges au sarcolemme (101). À cette étape, les fibres musculaires dystrophiques isolées d'*extensor digitorum longus* (EDL) / *flexor digitorum brevis* (FDB) accuseraient une altération significative de la capacité intrinsèque du RS à relâcher du calcium dans le cytosol qui serait réduite d'environ 25 à 70% selon l'étude et l'état de la fibre (63,102–107), pouvant contribuer à la faiblesse musculaire d'après la dépendance physiologique de la tension développée au calcium cytoplasmique, moyennant une concentration inférieure à celle de la saturation myofibrillaire (108,109). Dans ces études, ce déficit n'est pas relié à la propagation électrique, à une différence de structure du système des tubules transverses, ou à la dépendance au voltage du relargage calcique mais bel et bien associé à une libération calcique diminuée. Parallèlement, des fibres dystrophiques pelées isolées mécaniquement ont révélé une baisse plus rapide de la génération de force dépendante de la dépolarisation par rapport à des fibres normales ainsi qu'un temps de récupération de cette réponse plus long, et ce, sans changement initial de la génération de la force, de la recapture du calcium du RS ou des propriétés du matériel contractile (110,111). Cette dysfonction suggère une défaillance de l'excitabilité et s'accompagne d'une baisse de la contraction passive induite par la caféine, un activateur des RYR, indiquant donc une fois de plus une activité diminuée des canaux de libération du calcium du RS (112). L'expression et la fonction même de RYR1 seraient compromises même dans les stades les plus précoces de la maladie et cela expliquerait en partie cette libération calcique moindre (113). Aussi, l'expression d'autres composantes en lien avec la libération calcique peut être réduite dans les muscles dystrophiques, comme par exemple celles des protéines, DHPR, FKBP12, un modulateur de RYR, de la famille des

calséquestrine ou encore la sous-expression drastique de l'agent chélateur sarcalumenin (110,114–116). Ces composantes influenceraient à leur tour les réserves calciques et donc la charge calcique potentiellement libérable du RS, qui pourrait être compromise, égale ou surchargée pour les RS dystrophiques, élément controversé selon le caractère indirect ou la nature de la technique de mesure directe utilisée (82,84,115,117–121). Outre la libération calcique, le niveau basal de calcium cytosolique mesuré dans des fibres isolées ou en culture serait plus élevé pour les fibres dystrophiques (122), tel que discuté précédemment dans le mécanisme nécrotique, pouvant possiblement diminuer l'amplitude calcique disponible pour la génération de la force, encore une fois conditionnellement à des niveaux inférieurs à la saturation myofibrillaire. Des niveaux de calcium cytosolique élevés sont souvent qualifiés d'événements intermédiaires dans la DMD et sont d'ailleurs associés au développement de plusieurs maladies musculaires qui comprennent de la faiblesse (123,124).

Certaines études mitigent toutefois les découvertes précédentes en mettant de l'avant une différence non-significative dans l'amplitude des courants calciques reliés à des potentiels d'actions pour les fibres dystrophiques (67,125,126), illustrant les limites et la variabilité de ces techniques de mesures ioniques, tandis que certains travaux précisent que la présence d'altération de l'amplitude des courants calciques n'apparaît que suite à plusieurs contractions téaniques, incorporant les notions de résistance à la fatigue ou d'excitabilité en contexte de contractions répétées (122). Quant à elle, une étude récente démontre l'hétérogénéité des fibres de muscles dystrophiques en distinguant une sous-population de morphologie normale d'une sous-population malformée, et c'est dans cette dernière catégorie de fibres que l'on retrouve une baisse d'ampleur de la libération calcique liée à un potentiel d'action (127). D'autre part, des investigations sur les contractions excentriques répétées suggèrent que la perte de force immédiatement encourue est associée à une excitabilité réduite et non à une baisse de transmission neuromusculaire ou à une défaillance dans le couplage excitation-contraction ou une perte de fonction myofibrillaire (128). Progressant en aval du couplage excitation-contraction dans la compréhension de la faiblesse, des expériences sur molécules de myosine isolées montrent une fonction égale pour les fibres dystrophiques par rapport aux fibres saines en ce qui concerne la vélocité de propulsion du filament d'actine ou la force de la myosine, et ce, malgré une baisse de force spécifique des lanières de diaphragme dystrophiques en contractilité *ex vivo* (129). Par contre, d'autres travaux suggèrent un retard significatif dans

le temps de saturation du complexe Ca^{2+} -troponine C et un temps raccourci d'attache des ponts croisés (108,109). Ces travaux supplémentaires augmentent la complexité d'interprétation de l'état du couplage excitation-contraction des muscles dystrophiques mais semblent néanmoins converger vers la conclusion que ce processus serait perturbé à plusieurs étapes distinctes.

En dépit de la nature controversée de certaines évidences et les limites des techniques expérimentales, il semble y avoir un consensus quant à la présence de dysfonctions dans le couplage excitation-contraction en aval des processus de mouvements des charges au sarcolemme, représentant donc de potentiels déterminants de la faiblesse musculaire des muscles dystrophiques. Ces altérations peuvent provenir de modifications post-traductionnelles pouvant les influencer directement dans leur micro-environnement mais aussi via la perte de l'intégrité membranaire affectant l'expression et la fonction même des protéines et structures y étant hébergées. Le double regard nécrose-faiblesse nécessite de plus amples recherches pré-cliniques dirigées vers la compréhension des phénomènes rapidement réversibles et des mécanismes intimement liés à l'absence d'intégrité structurale encourue par l'absence de la dystrophine. Tester ces variables de manière prédictive, rigoureuse et reproductible nécessite des devis expérimentaux pré-cliniques et cliniques valides.

1.3.3 Un continuum de modèles expérimentaux sur la DMD

Le succès de ces devis expérimentaux cliniques sur de nouvelles modalités thérapeutiques est relié à l'échafaudage précis des critères d'évaluation, de la mise en marche coordonnée des opérations, du recrutement adéquat des patients, de l'adoption des meilleures pratiques cliniques, de protocoles standardisés, etc. Malgré l'expertise présente dans ces champs, les taux de succès translationnel de composés pré-cliniques prometteurs demeurent marginaux. En amont de ces facteurs, la translation des résultats est d'abord dépendante de la validité, la valeur prédictive, la reproductibilité et la méthodologie des modèles pré-cliniques (130–132), ce qui optimise la valeur scientifique, éthique et économique de la recherche. Les mécanismes de la pathophysiologie de la DMD ainsi que les approches thérapeutiques lui étant reliés sont investigués en partie grâce à une soixantaine de modèles animaux disponibles, principalement rongeurs et canins. Parmi ceux-ci, le modèle murin mdx classique, muté sur l'exon 23 (133), est largement accepté à titre de modèle précoce et plusieurs découvertes sur la DMD en sont

issues, notamment grâce à la possibilité de générer des modèles transgéniques double/triple et d'initier des expériences à grande échelle moyennant des ressources raisonnables. Lors du premier cycle de dégénérescence suite au sevrage vers l'âge de 3-5 semaines, la nécrose musculaire est particulièrement présente et accompagnée d'une infiltration leucocytaire importante, rendant l'étude de composés thérapeutiques possible à court terme (49).

Au-delà de ces études à court terme, la principale limite du modèle mdx est que certaines caractéristiques physiques de la souris adulte paraissent normales et s'éloignent du portrait clinique dégénératif de la DMD, et ce, couplé à une espérance de vie qui n'est que légèrement raccourcie. À l'exception du diaphragme, la régénération permet un phénotype non-progressif des muscles des pattes en plus de ne pas comporter de fibrose significative jusqu'à un âge avancé (134). En effet, en dépit d'une fragilité structurale persistante, l'hypertrophie compensatoire des muscles des pattes permet aux mdx adultes de développer des forces absolues normales dans le cadre de plusieurs tests musculaires fonctionnels, jusqu'à l'apparition d'une dégénération en âge avancé, âge qui s'écarte néanmoins du caractère pédiatrique/adulte de la DMD. Tester l'efficacité de traitements chroniques est donc mitigé pour la mdx car certains paramètres d'intérêt s'améliorent indépendamment du traitement par divers mécanismes compensatoires. Ces phénomènes sont les cibles de la création de modèles transgéniques sévères dont l'objectif est de se rapprocher du phénotype des patients vivant avec la DMD. Ces modèles transgéniques visent, entre autres, à contrecarrer des mécanismes compensatoires comme la réserve de cellules satellites, la longueur des télomères et les protéines structurales clés naturellement surexprimées dont l'utrophine dans la lignée mdx.

1.3.4 L'utrophine, protéine homologue de la dystrophine

L'utrophine et la dystrophine possèdent une haute similarité structurale et sont fonctionnellement interchangeables au sein des costamères (135,136). En effet, toutes deux peuvent stabiliser le sarcolemme et pallier aux dommages induits par la contraction en liant les filaments d'actine au sarcolemme (51,137,138). À titre de comparaison, leurs structures partagent un domaine de liaison à l'actine en N-terminale, une région centrale de répétitions de spectrines et en C-terminale, un domaine de liaison au *dystrophin-associated protein complex* (DAPC) (139). Des études biochimiques suggèrent que les

deux protéines diffèrent quant à leur mode de liaison à l'actine et aux β -dystroglycanes car l'utrophine ne possède pas exactement la même grappe de répétitions de spectrines basiques du domaine central de la dystrophine. Des expériences de liaison ont toutefois démontré une grande affinité de liaison à l'actine, soit 1 utrophine pour 14 monomères d'actine (140). En situation physiologique, l'utrophine se retrouve principalement à la jonction myotendineuse, jonction neuromusculaire et dans les régions extrasynaptiques sarcolemmales de fibres en régénération (138,141,142). En contexte de dystrophie musculaire, les niveaux d'utrophine sont distribués de manière uniforme au sarcolemme et sont corrélés avec la sévérité de la maladie pour les patients de la dystrophie musculaire de Becker (*Becker muscular dystrophy*, BMD) et DMD à titre de phénomène compensatoire (143,144). Pour la mdx, l'apparition de la maladie correspond à la baisse d'utrophine au sarcolemme (145). Par ailleurs, une relation dose-dépendante existe entre les hauts niveaux d'utrophine et l'amélioration de la pathologie conférée par son bénéfice structural (146). En effet, des approches pharmacologiques et génétiques induisant l'expression de hauts niveaux d'utrophine améliorent plusieurs paramètres phénotypiques de la pathologie pour la mdx et possiblement les humains (137,146–154). L'efficacité de l'utrophine est le mieux illustrée grâce au modèle Fiona, une souris mdx qui surexprime l'utrophine à des hauts niveaux où l'on retrouve un rétablissement complet de la force maximale spécifique et de la résistance aux contractions excentriques de l'EDL (146). À titre de comparaison, la quantité d'utrophine nécessaire à compenser la dystrophie musculaire serait 2 fois inférieure à la celle de dystrophine requise pour le même effet, soulignant ses capacités (140). Finalement, fait intéressant témoignant de la pertinence physiologique de l'utrophine, les fibres dystrophiques de phénotype lent sont partiellement protégées de la dystrophie et bénéficient de niveaux d'utrophine supérieurs aux fibres rapides (155). Basée sur ce rationnel, la lignée doublement délétée en dystrophine et en utrophine (mdx/utr^{-/-}) a été générée, cette modification génétique aggrave la dégénérescence et engendre un modèle expérimental dystrophique sévère (156).

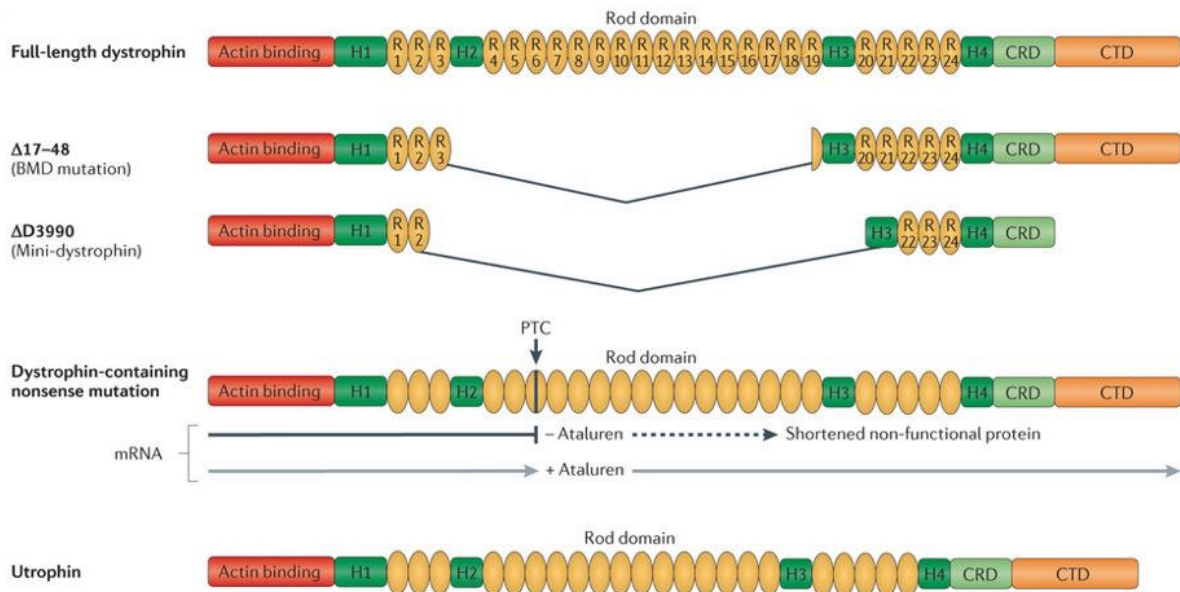


Figure 1.2 Structure de la dystrophine et de l'utrophine. Tirée de (157).

1.3.5 Le modèle mdx délété ou haploinsuffisant en utrophine

La lignée mdx/utrn^{-/-} accuse un poids de corps diminué, une nécrose accentuée, une fibrose augmentée, une espérance de vie réduite et autres symptômes musculo-squelettiques et cardiaques (135,156,158–160). Cependant, la courte espérance de vie couplée à la difficile reproduction de la lignée engendre des difficultés techniques pour le lancement d'études prolongées à grande envergure. Aussi, certaines critiques sont dirigées vers le fait qu'une absence complète d'utrophine n'est pas fidèle au phénotype des patients qui comprend une augmentation intrinsèque de la protéine, tel que discuté plus haut. La lignée mdx haplo-insuffisante pour l'utrophine (mdx/utrn^{+/-}), est issue de cette réflexion. Le postulat initial à l'égard de cette lignée est qu'elle serait dotée d'une utilisabilité supérieure à la mdx/utrn^{-/-} et d'une transférabilité clinique accrue par rapport à la mdx due à son phénotype intermédiaire. Suite à sa genèse, un nombre limité de laboratoires ont effectué des expériences de validation du modèle à différents âges d'intérêt, et ce, en grande majorité en ce qui concerne la fonction de l'animal entier et la caractérisation histologique de divers groupes musculaires. Globalement, ces études ont démontré que la mdx/utrn^{+/-} possède une espérance de vie légèrement inférieure à la mdx et suggèrent un phénotype modéré quant à certaines performances fonctionnelles ou

indices histologiques de dystrophie, particulièrement les mesures inflammatoires et fibrotiques (156,161–164).

Dans le cadre de la planification des travaux contenus dans cette thèse sur le modèle mdx/utrn+/-, la littérature existante a été considérée et évaluée selon des critères basés sur des standards révisés par les pairs et issus de consensus internationaux. Tel que suggéré par les recommandations dédiées à améliorer les phases précliniques en DMD du réseau TREAT-NMD sur les maladies neuromusculaires (www.treat-nmd.eu) et autres consensus ou articles de revue (130–132,165), les procédures sur l’outil de criblage thérapeutique qu’est la mdx en études de preuve de concept exploratoires devraient : inclure les données des groupes contrôles sains à titre de référence, considérer les particularités phénotypiques des différents groupes musculaires, utiliser un échantillonnage conférant une puissance statistique adéquate, investiguer des âges correspondant à différentes phases de vie, ajuster le nombre d’animaux par cage, adopter la prise de données à l’aveugle, tester la reproductibilité des résultats dans un laboratoire indépendant et effectuer la combinaison de tests fonctionnels, histologiques et contractiles. Les paramètres clés des différentes lignées mdx selon ces sources sont l’espérance de vie, le poids de corps, l’activité de la créatine kinase circulante, la force de préhension normalisée par le poids, le test de suspension, des tests de locomotion/activité, la contractilité *ex vivo/in situ*, l’histologie (noyaux centraux, aire de surface des fibres, fibrose) et la fonction cardiaque. En supplément, l’exercice ou les contractions excentriques peuvent être envisagés pour exacerber le phénotype. Aussi, le score de récupération, des mesures longitudinales et l’expression de dystrophine/utrophine peuvent être utilisés. À la lumière de ces recommandations, le tableau suivant résume les travaux publiés au sujet du modèle mdx/utrn+/-.

Article	Âge	n	Aire Inflammation	Aire Fibrose	Contenu Fibrose	NC	ASF	CK	Poids	Notes
Zhou et al. 2008	3 m	3	DIA (+) QUAD (+)	DIA (=) QUAD (=)	X	X	X	X	(=)	Aire fibrose non quantitative, absence de contrôles WT dans l’étude
	6 m	3	DIA (=) QUAD (+)	DIA (+) QUAD (+)	DIA (+) QUAD (+)	X	X	X	(=)	

Huang et al. 2011	3 m	17	DIA (=)	DIA (=)	X	X	X	X	X	Fonction respiratoire (pléthysmographie) aggravée à 6 mois mais pas à 3 mois, aire inflammation/fibrose non quantitative
		-								
	6 m	20	DIA (=)	DIA (+)	X	X	X	X	X	
		-								
		26								
Van Putten et al. 2012	4-15 sem en longitudinale	6	X	TA (=) Tri (=) QUAD (=) Fibrose/ nécrose	X	TA (=)	TA (=)	(=)	(+)	Force de préhension pattes avant normalisée (=), rotarod temps course (-) > 11 sem, suspension cable 2 pattes (-) > 8 sem, suspension cable 4 pattes (-) > 8 sem. Tests de fonction à haute variabilité, tests de suspension non-normalisés par le poids
	3 m histo									
Gutpell et al. 2015	2 m	5	X	DIA (=) GM (+)	X	DIA (=) GM (=)	X	X	X	Comparée à la souris WT, la mdx/utrn+/- est significativement plus fibrotique que la mdx/utrn+/+, mais pas toujours différentes entre elles. Mélange mâles et femelles
	10 m	5	X	DIA (=) GM (=)	X	DIA (=) GM (=)	X	X	X	
McDonald et al. 2015	3 m	6	X	Tri Col IV (+) Col I (+)	X	Tri (=)	Tri (=)	X	(+)	Suspension sur grille inversée 4 pattes diminuée à 1 et 3 m seulement (n=6, 1-12 m), rotarod fréquence des chutes aggravée à 6 m seulement (n=7-12, 1-12m)
	6 m	6	X	Tri Col IV (+) Col I (=)	X	Tri (+)	Tri (=)	X	(+)	
	12 m	6	X	Tri Col IV (+) Col I (+)	X	Tri (+)	Tri (=)	X	(=)	

Tableau 1.1 : Résumé des résultats sur les variables principales des travaux publiés comparant le modèle mdx/utrn+/+ et le modèle mdx/utrn+/- . (+) représente une augmentation significative, (-) une réduction significative et (=) une absence de différence significative entre le modèle mdx/utrn+/+ et le modèle mdx/utrn+/- . NC ; noyaux centraux, ASF ; aire de surface des fibres, CK ; créatine kinase sérique, Col ; collagène, m ; mois, sem ; semaines, Tri ; triceps, DIA ; diaphragme, TA ; tibialis anterior, GM ; gastrocnemius, QUAD ; quadriceps X ; absence de données.

La synthèse de ces études soumises aux critères d'études de la DMD suggérés par la littérature couverte dans le paragraphe précédent révèle plusieurs limitations intrinsèques liées au design expérimental, au choix incomplet d'expériences et à la puissance statistique associée à certaines expériences. Notamment, l'hétérogénéité des résultats fonctionnels et l'absence de contractilité *ex-vivo/in situ* demeurent des questions ouvertes. De plus, des conclusions contradictoires intra et inter-études rapportées dans le faible nombre de publications sèment le doute sur la validité du modèle en ce qui a trait à sa sévérité en comparaison à la mdx (156,161–164). Finalement, les études comportant des contrôles sauvages permettent de vérifier la justesse des outils de discrimination du phénotype dystrophique validant le modèle mdx pour certaines variables. Quoi qu'il en soit, il semble y avoir une certaine convergence quant à la pertinence du modèle mdx/utrn+/- pour l'étude des processus ou thérapies anti-inflammatoires/fibrotiques mais les répercussions réelles sur la fonction musculaire, variable déterminante pour les études sur la DMD, sont inconnues. Devant cette problématique, l'objectif principal du chapitre 2 de la thèse est de **contribuer à l'avancement des pratiques pré-cliniques de la communauté de la recherche en DMD en comblant ce manque d'information par le biais de notre caractérisation du modèle mdx/utrn+/- en terme de fonction et de contractilité, en plus d'investiguer des paramètres discriminant la souris dystrophique de la souris saine en fonction de l'âge**. Ces travaux ont été la base du choix du modèle pour les expériences subséquentes de la thèse, étape essentielle dans l'élaboration d'un protocole expérimental. Les résultats ont été publiés en juin 2018 dans le journal PLOS ONE et se retrouvent en page 42 de la thèse.

1.4 – L'émergence d'interactions os-muscle

1.4.1 Diaphonie muscle-os dans la DMD

Le muscle squelettique et l'os se développent, agissent et vieillissent à l'unisson (166). Au chapitre de l'évolution en tandem, l'ostéoporose et l'atrophie/dysfonction musculaire se déroulent simultanément lors de l'hypogravité, l'alitement, la paralysie locale, le vieillissement et certaines maladies neuromusculaires (167–171). Fait notable, la DMD comprend une dégénérescence en tandem de la fonction musculaire et de la densité osseuse (172). La dysfonction musculaire est en effet associée à une fragilité osseuse qui

occasionne une prévalence de fractures accrue, représentant une problématique clinique considérable (173–175). En supplément de cette cohésion mutuelle intrinsèque à la DMD, est survenue la reconnaissance d'effets ostéotoxiques des glucocorticoïdes, la norme de soins toujours en vigueur pour la DMD (176–178). En fait, cette perte de fonction osseuse est multifactorielle car elle comprend également l'effet de la sédentarité (179). Au-delà de la relation mécanique dynamique qui unit l'os et le muscle, des interactions moléculaires pourraient déclencher des sentiers signalétiques menant à l'inflammation, à la fibrose et à la dégradation protéique (180).

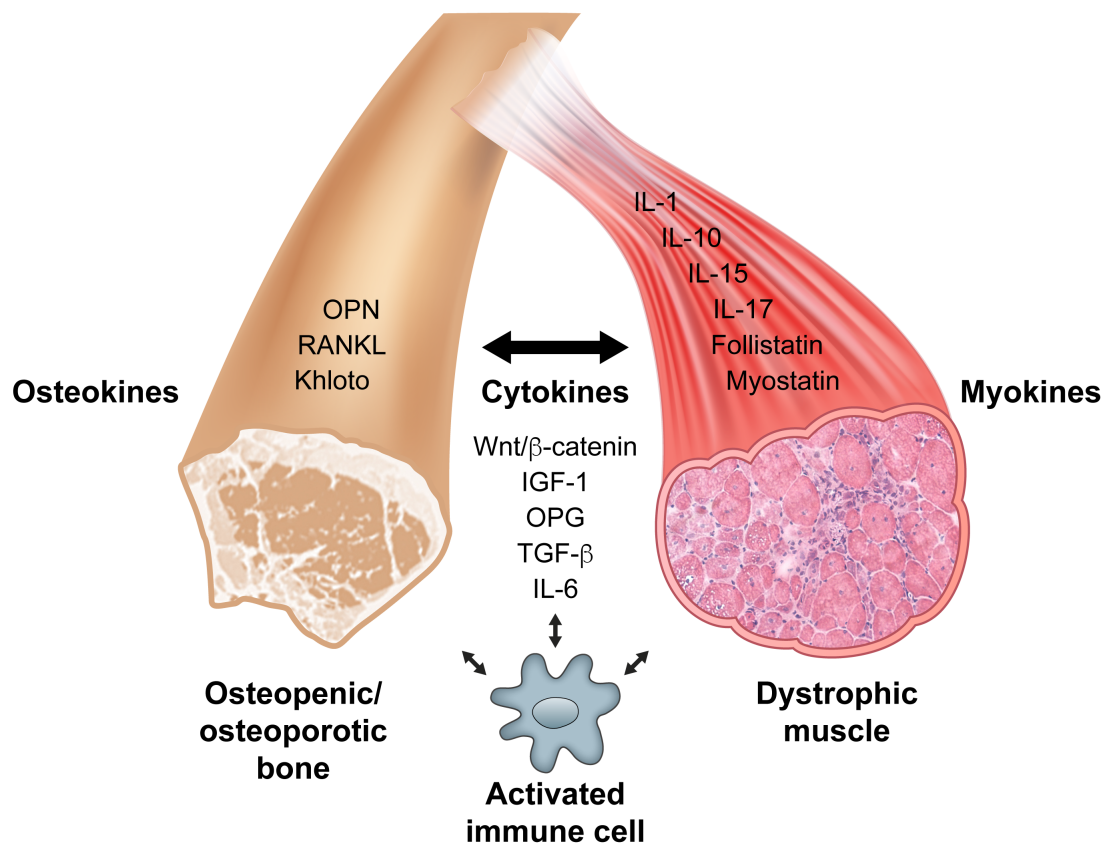


Figure 1.3 Ostéokines, cytokines de double-origine et myokines. Tirée de (181)

Dans ce contexte, les muscles et les os produisent un sécrétome de cytokines composé de facteurs de croissance, de signaux de remodelage matricielle, de molécules inflammatoires, etc. (11,182,183). Ces molécules libérées, nommées myokines et ostéokines, suggèrent l'existence de dialogues et d'interactions paracrines/endocrines

(175,184–188). À l'aide de modèles animaux dystrophiques, une équipe à d'ailleurs spécifiquement démontré des altérations des niveaux de l'expression musculaire de plus de 24 myokines ayant la capacité d'influencer l'os, contribuant à cette notion d'influence réciproque (189). Malgré des évidences fragmentées de ce dialogue, aucun ouvrage moderne ne fait explicitement converger les découvertes récentes dans la DMD. De plus, certaines équipes se penchent sur des traitements musculaires limitant les effets négatifs sur l'os, des traitements bénéfiques à la fois pour les muscles et les os ou même des traitements bénéfiques basés sur les interactions muscle-os dans la DMD. Une fois de plus, aucun article ne passe en revue les principales approches thérapeutiques novatrices dans le domaine. Devant cette problématique, l'objectif principal du chapitre 3 est **d'aborder la nature de la dégénérescence musculaire et osseuse conjointe de la DMD, puis d'intégrer les interactions moléculaires bi-directionnelles et les avenues thérapeutiques ayant le potentiel de traiter les deux tissus simultanément, incluant l'émergence de la voie RANK/RANKL/OPG**. Ces travaux ont été publiés en octobre 2018 dans la section *Muscle and Bone* du journal *Current Osteoporosis Reports* et se retrouvent en page 66 de la thèse.

1.5 - RANK/RANKL/OPG, le gouverneur de l'os

Participant considérable de cette diaphonie muscle-os, l'os est un tissu spécialisé d'une composition structurale complexe permettant ses fonctions mécaniques et métaboliques. La triade RANK/RANKL/OPG est une voie importante de la biologie du remodelage constant nécessaire à la maintenance de ce tissu, accompagnée et influencée par d'autres voies comme celle de la vitamine D ou des hormones parathyroïdienne ou stéroïdiennes, etc. (190–192). Elle comprend RANK, RANKL et OPG (193), qui sont membres de la superfamille du *tumor necrosis factor* (TNF) et forment un système de cytokines régulant la différenciation et la fonction ostéoclastique (194,195). Lors du remodelage osseux qui survient au cœur de nombreux sites microscopiques, les ostéoclastes sont responsables de la déminéralisation et la résorption osseuse tandis que les ostéoblastes contribuent à la production, maturation puis minéralisation de nouveau tissu osseux, le tout dans une régulation réciproque (190–192). La liaison RANKL/RANK à des monocytes précurseurs d'ostéoclastes induit la formation d'ostéoclastes multinucléés matures menant à la dégradation osseuse (190–192). En se liant à RANKL, l'OPG

prévient l'interaction subséquente sur RANK, l'ostéoclastogenèse et donc l'ostéoporose dans certaines situations (196). Un exemple concret de la portée physiologique de cette balance est que la surexpression d'OPG induit l'ostéopétrose tandis que les souris déficientes en OPG souffrent d'ostéoporose sévère (197,198). Le ratio RANKL/OPG dans le microenvironnement osseux est donc un facteur de remodelage décisif de l'architecture, la masse, la densité, la force et l'intégrité de l'os (190–192). De par son rôle capital dans l'homéostasie osseuse, des mutations au cœur de la triade sont à l'origine de maladies comme l'ostéopétrose autosomale récessive, l'ostéolyse expansive familiale, ou la maladie de Paget juvénile (190–192). Aussi, les études génétiques de la signalisation RANK/RANKL/OPG ont révélé son implication dans des contextes physiologiques ou pathologiques en dehors de l'os tels que l'artériosclérose, l'arthrite rhumatoïde, le développement des ganglions lymphatiques, l'activation des cellules immunitaires T et même le tissu musculaire (190,199).

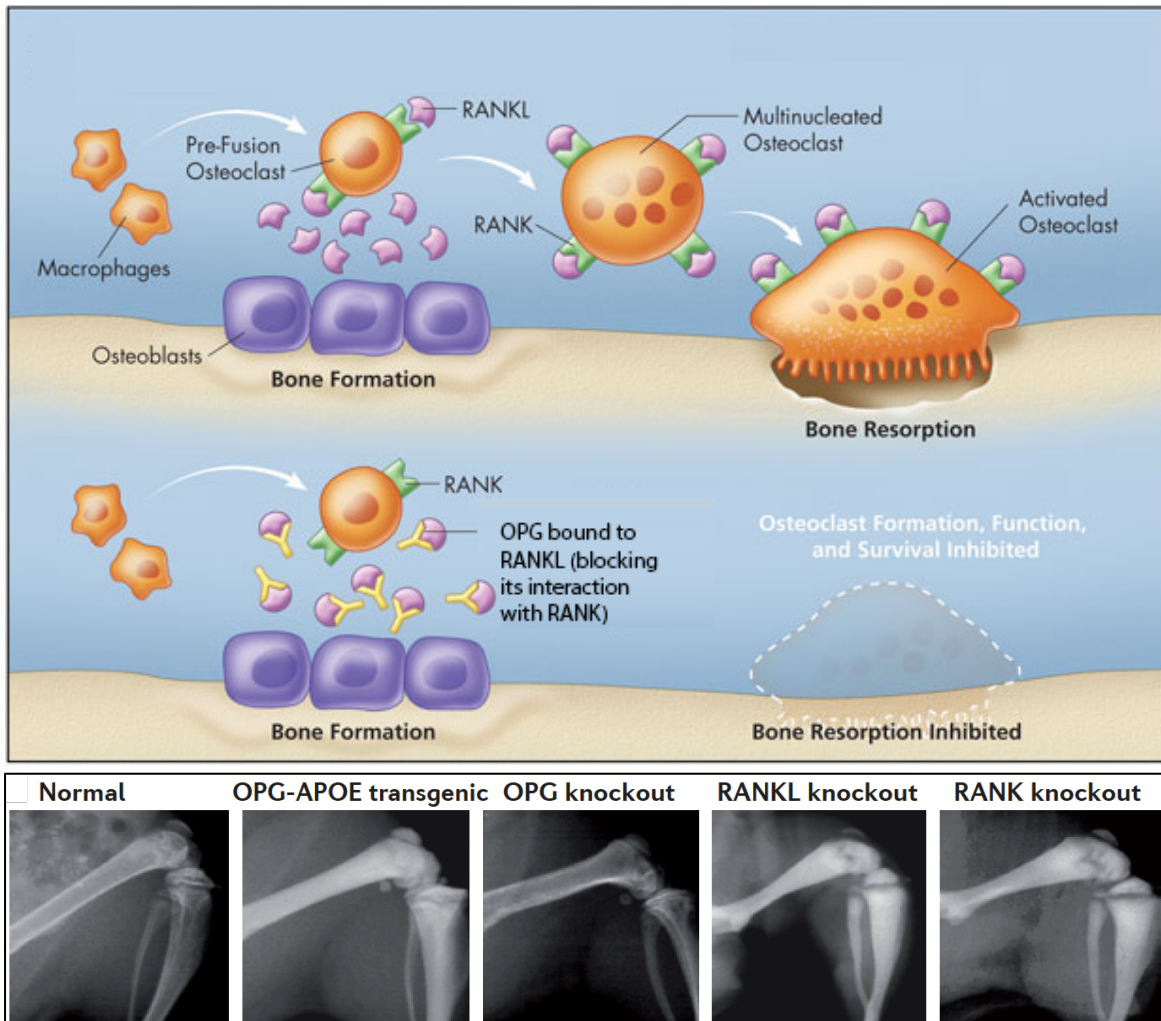


Figure 1.4 Représentation schématique de la triade RANK/RANKL/OPG et répercussions de la manipulation de ses éléments sur la densité osseuse. Adaptée de (200).

1.5.1 RANK/RANKL/OPG comme acteur signalétique musculaire

Au-delà du siège original de cette triade régulatrice, l'ARN messager ou encore les protéines RANK, RANKL et OPG ont été répertoriés dans les muscles lisses, cardiaques et squelettiques, témoignant de la faisabilité de leur implication musculaire (201–204). Notre laboratoire a précisé la présence du récepteur RANK au sarcolemme des muscles squelettiques, localisation rendant possible la tenue d'interactions avec le RANKL soluble circulant s'il traverse les capillaires, et a confirmé que les cellules musculaires ont la capacité de libérer de l'OPG à titre de potentielle myokine (194,205). D'ailleurs, l'étude des cytokines systémiques suivant un protocole de contractions excentriques du quadriceps humain a révélé une augmentation dans le ratio OPG/RANKL (-RANKL,+OPG), possible

réaction anti-inflammatoire compensatoire selon les perspectives des auteurs (206). Quant à la complétion d'un marathon de course à pied, il a été démontré qu'elle influence positivement le ratio sérique OPG/RANKL (-RANKL,+OPG), phénomène lié à la stimulation mécanique ou hormonale de l'exercice, une fois de plus sans ajouter de précision quant à la provenance de la modification de ces cytokines qui pourrait inclure le muscle squelettique (207). Fait intéressant, une équipe a récemment précisé à l'aide de cultures de cellules musculaires primaires humaines qu'à titre de myokine, l'OPG serait excrétée spécifiquement par les fibres rapides de type II et exercerait une action anti-inflammatoire sur des tissus distaux, dans ce cas le pancréas (208). Une autre piste est un qu'un protocole de stimulation musculaire électrique dans un modèle de blessure spinale permet une protection partielle de la perte osseuse associée, entre autres, à une augmentation du ratio sérique OPG/RANKL (+OPG) (209). Du côté du microenvironnement muscle-os, un modèle de paralysie musculaire à la toxine botulique n'affectant que minimalement la cinématique et tension de marche, tentant de dissocier l'effet de la perte de fonction musculaire de la perte de locomotion mécanique sur l'os, a accusé une perte de fonction osseuse tibiale couplée à une diminution du ratio OPG/RANKL (+RANKL) peu après la paralysie du mollet (210). Dans leur ensemble, ces résultats directs et indirects semblent suggérer la participation des cellules musculaires à la résultante du ratio OPG/RANKL systémique, sans toutefois nous informer si la triade peut à son tour influencer les cellules musculaires.

Le paragraphe précédent nous renseigne sur le fait que les connaissances sur la triade et le tissu musculaire sont limitées mais convergent quand à la possibilité d'inscrire RANK/RANKL/OPG au tableau des voies communes aux muscles et aux os. En ce qui a trait à des voies en aval de RANK, plusieurs redondances musculaires ont émergées, notamment au sujet de sentiers signalétiques osseux impliquant les protéines aussi retrouvées en contexte musculaire (TRAF6, JNK, MAPK, ERK, Akt, Src, Wnt, IKK, PLC, NF-kB, CaN, NFAT) (190,191,199). Dans l'os, l'interaction RANKL/RANK provoque l'oligomérisation de RANK et active la signalisation cellulaire conférée par le recrutement de *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF). Plus précisément, le domaine cytoplasmique de RANK peut lier TRAF2/5/6, induisant l'activation de la cascade cellulaire de *ikappa-B kinase* (IKK) / *nuclear factor kappa-B* (NF-kB) et nombre de programmes de transcription associés à l'ostéoclastogenèse (211). Plusieurs de ces acteurs sont présents

dans les cellules musculaires et sont impliqués dans des processus cruciaux comme la différenciation, la myogenèse, la synthèse protéique, la régulation de la masse, l'homéostasie énergétique, la détermination du phénotype, etc (42,212,213). Ces voies peuvent également médier ou contribuer à certaines situations délétères ou pathologiques. D'abord, nos travaux sur le récepteur RANK en contexte de dénervation sciatique ont révélé que la délétion spécifique de RANK musculaire prévenait en partie la perte de force spécifique en réduisant la masse musculaire sans augmenter la force absolue, en plus d'influencer l'homéostasie calcique du muscle EDL (205). D'autre part, dans des modèles de dénervation, de jeûne ou d'atrophie induite par le dexaméthasone, la délétion ou l'inhibition spécifique musculaire de TRAF6 ou d'IKK réduisent l'atrophie musculaire et l'expression de la machinerie du système ubiquitine protéasome par des mécanismes multiples (213–217). Ces exemples soutiennent l'hypothèse que RANK/RANKL pourrait être une variable contributive dans la pathophysiologie du muscle squelettique en conditions atrophiantes, et possiblement dans des maladies neuromusculaires incluant la DMD

1.5.2 La voie RANK dans la DMD

En ce qui concerne les investigations précliniques de la voie RANK et de ses acteurs en amont dans la DMD, les évidences sont substantielles mais l'interprétation est plus complexe. D'emblée, nos travaux montrent que l'ARNm de RANK est augmenté plusieurs fois dans les EDL dystrophiques tandis que la délétion musculaire spécifique de RANK y majore la force maximale spécifique tant pour la jeune souris mdx que la mdx adulte (218). Protéine adaptatrice recrutée à RANK, les niveaux et l'activité de TRAF6 sont augmentés tandis que son inhibition améliore la fonction et réduit la nécrose, l'inflammation ainsi que l'activité de NF- κ B de la jeune mdx (219). Découverte contradictoire, les mêmes travaux démontrent que pour la mdx adulte, l'ablation de TRAF6 accentue les dommages musculaires et la fibrose, possiblement en compromettant l'autophagie (219). Lors de devis expérimentaux subséquents, la délétion de TRAF6, cette fois spécifique aux cellules satellites, aggrave le phénotype dystrophique des souris mdx adultes en compromettant la régénération de fibres endommagées, une trouvaille cohérente avec les résultats précédents sur la mdx adulte ajoutant une notion temporelle au mécanisme (220). En aval, il est connu que l'activité de *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) et de NF- κ B sont activées pour les patients DMD et les mdx, alimentant l'inflammation et la nécrose (221–226).

Également, des cibles génétiques de NF-κB, telles que les cytokines pro-inflammatoires TNF-α, *interleukin-1β* (IL-1β), *interleukin-6* (IL-6) et *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) sont augmentées pour les patients DMD et les mdx (223,227–230). Réciproquement, les niveaux de TNF-α augmentés dans la DMD et les mdx sont confirmés à titre d'inducteurs de la réaction inflammatoire médiée par NF-κB (231). Conformément à ces observations, l'inhibition pharmacologique ou génétique de la voie NF-κB via IKK dans la souris mdx réduit la réaction inflammatoire, le dommage et la nécrose, menant à un gain de force musculaire (223,232–235), possiblement via une relation réciproque entre la régulation calcique et NF-κB (84). Finalement, des travaux récents démontrent une augmentation drastique de l'ARNm et de la protéine RANKL dans des homogénats de *tibialis anterior* (TA) dystrophiques, augmentation non-accompagnée de changements pour l'OPG, soulevant un possible déséquilibre de la triade au niveau du microenvironnement musculaire dystrophique (189). En complément, l'étude de cas d'un traitement à l'anticorps monoclonal anti-RANKL chez une patiente vivant avec la Dystrophie facio scapulo humérale (FSHD) a montré des gains à court et moyen termes suivant un traitement unique, et ce, dans des tests de force, de mobilité et d'apparences symptomatiques (236). Logiquement, l'outil pharmacologique qu'est le FL-OPG-Fc se liant à RANKL contrecarrerait l'interaction de cette molécule à son récepteur RANK et donc l'activation subséquente de la voie TRAF/IKK/NF-κB.

1.6 – Le FL-OPG-Fc à titre de molécule d'action musculaire

1.6.1 La structure de l'OPG et son développement biomédical

L'OPG natif, ou endogène, est une protéine constituée de 401 acides aminés qui arbore un poids moléculaire de 60 kDa sous la forme monomérique et comprend 7 domaines (D1-D7). En N-terminal, on retrouve un peptide signalétique dont le clivage engendre la formation de la protéine dimérique mature. S'en suivent les domaines de liaison à RANKL riches en cystéines D1 à D4, puis les domaines de liaison au *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) D5 et D6. Enfin, en C-terminal, on retrouve le domaine de liaison à l'héparine D7 et une cystéine, tous deux impliqués dans l'homodimérisation (196,237). L'OPG natif est d'emblée synthétisé sous forme de monomère pour ensuite subir l'homodimérisation avant d'être excrété en dimère de 380 acides aminés dans le milieu. La conformation prédominante de l'OPG dans la circulation est controversée, elle a

été rapportée comme principalement monomérique ou dimérique selon les techniques de mesure (196,238–240). Cette conformation quaternaire de l'OPG est critique pour son activité biologique, en effet, l'affinité à RANKL et la capacité de liaison à l'héparine sont grandement supérieures dans le cas de conformation dimérique (241,242). En contexte physiologique, ce sont principalement les cellules stromales ou lymphocytes B de la moelle osseuse, les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses qui sécrètent l'OPG. Cela est entre autres destiné à balancer le ratio RANKL/OPG et donc réguler l'ostéoclastogenèse ou autres processus influencés par les niveaux de RANKL et d'OPG (243).

Malgré l'efficacité de l'OPG natif à réguler la différenciation ostéoclastique *in vitro*, de larges doses sont nécessaires à supprimer la résorption osseuse animale. En quête d'optimisation des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, la protéine a d'abord été tronquée de ses domaines TRAIL et du domaine héparine car ils causent une baisse des niveaux circulants de par des liaisons non-spécifiques. Subséquemment, le PEG-OPG fut créé sous forme de monomère doté d'un groupement PEG avec l'objectif d'en augmenter la demi-vie. Parallèlement, l'approche utilisant la protéine RANK-Fc fut testée et démontrée supérieure à l'OPG natif et au PEG-OPG. Finalement, une version améliorée de la protéine OPG fut testée en clinique sous la forme du Fc-OPG puis remplacé par l'OPG-Fc, 20 fois plus efficace. Il est à noter que le développement biomédical s'est arrêté sur l'utilisation de l'anticorps anti-RANKL, favorisant la spécificité dédiée aux applications osseuses (200). La création d'une protéine de fusion telle que l'OPG-Fc a pour objectif initial l'amélioration de la pharmacocinétique du composé, généralement l'augmentation de la demi-vie par l'augmentation de la taille absolue, la diminution de la sensibilité aux protéases ou peptidases et la réduction de la filtration glomérulaire. La fusion à un fragment Fc, domaine d'une immunoglobuline humaine IgG, est une approche répandue dont le taux de prolongation de la demi-vie est variable selon le partenaire (244). De plus, dans le cas de l'OPG-Fc, le groupement Fc favoriserait le maintien de la conformation dimérique et donc une bioactivité supérieure par une affinité à RANKL et à l'héparine plus grande (241,242,245). Dans le cadre des études de notre laboratoire, c'est la forme pleine longueur FL-OPG-Fc qui a été préconisée pour ses propriétés pharmacologiques avantageuses.

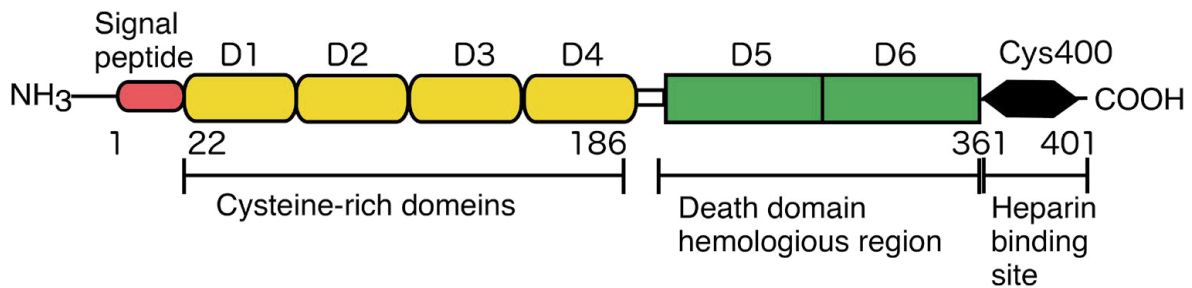


Figure 1.5 Structure de l'OPG. Tirée de (246)

1.6.2 Le FL-OPG-Fc et ses domaines au-delà de RANKL/RANK

Nos travaux antérieurs ont montré une action bénéfique d'un traitement au FL-OPG-Fc sur la fonction musculaire et les indices de phénotype dystrophique de la mdx, amélioration qui s'est révélée supérieure à un traitement à l'anti-RANKL, au *truncated OPG-Fc* pour ses domaines TRAIL et héparine (TR-OPG-Fc), à l'anti-TRAIL, à l'anti-RANKL et l'anti-TRAIL combinés ou à la délétion de RANK musculaire. Par ailleurs, le traitement au FL-OPG-Fc de la mdx délétée pour RANK musculaire a conféré un gain additionnel pour la fonction musculaire. Aussi, certaines divergences discriminantes ont été notées entre le traitement au FL-OPG-Fc et la délétion de RANK musculaire de la souris mdx, notamment le fait que le FL-OPG-Fc améliore la résistance aux contractions excentriques et l'activité maximale de SERCA, phénomènes non-reproduits par l'approche génétique (247). Ces observations ont donc mené à l'élaboration de l'hypothèse que le FL-OPG-Fc pourrait avoir une action biologique indépendante de son inhibition de l'interaction RANKL/RANK.

Une action biologique indépendante de la triade est d'ailleurs rapportée dans certaines situations pour l'OPG, notamment pour l'os lui-même, la vasculature, le système immunitaire, le pancréas et les cellules tumorales (208,248). Ces implications sous-entendent une liaison à un ligand autre que RANKL, sous la forme d'éléments membranaires ou composés circulants. D'abord, de par la présence des sites de liaison à TRAIL en position D5-D6, dont l'affinité est environ égale à celle de l'OPG pour RANKL, il a été constaté que l'OPG pouvait interférer avec la transduction du signal apoptotique de TRAIL sur des cellules de Jurkat, lignée de lymphocytes T utilisée pour des études oncologiques sanguines (249). De la même manière, l'OPG serait un facteur paracrine de survie cellulaire de par son inhibition du signal apoptotique induit par TRAIL pour les

cellules de myélomes multiples, de cancer prostatique et de cancer du sein (250–252). Notons que son rôle peut être variable en conditions oncologiques. Par exemple, l'OPG pourrait limiter l'incidence et la croissance tumorale locale d'ostéosarcome et d'autres maladies osseuses cancéreuses via son activité anti-RANKL (253,254). Dans un autre registre, la présence d'un domaine de liaison à l'héparine de l'OPG est associée à une variété d'interactions avec des chaînes de glycoaminoglycanes retrouvées sur des protéoglycanes qui pourraient permettre un raffinement de la fonction de l'OPG dans l'ostéoclastogénèse, possiblement via une gestion de sa biodisponibilité (255,256). Le fait que la liaison de l'OPG à RANKL ne nécessite pas le domaine héparine pour être effective renforce le caractère indépendant des rôles lui étant associés (255). Dans le cas de l'ostéosarcome, la gestion de la biodisponibilité de l'OPG et donc de la dégradation osseuse incluse dans la maladie, serait intimement liée au domaine héparine et à une liaison à des glycoaminoglycanes, plus précisément des héparanes sulfates (256). À ce sujet, un traitement à l'héparine ou à certains glycosaminoglycanes encouragent la résorption osseuse en inhibant non-seulement la liaison de l'OPG à RANKL (257), mais en influençant l'effet direct de l'OPG sur les ostéoblastes (258). Tous ces résultats nous informent donc des multiples actions revêtues par l'OPG pleine longueur grâce à ses domaines de liaison à TRAIL et à l'héparine.

La liaison hors-triade de l'OPG à des protéoglycanes héparanes sulfates est d'abord soulignée par son implication dans la chimiotaxie et dans la migration des monocytes périphériques, entre autres via la signalisation cellulaire de PKC-Pi3K/Akt, activée via son interaction spécifique avec le protéoglycane syndécane-1 et compromise par la dégradation des chaînes d'héparanes sulfates sur la surface cellulaire (259). Dans cette étude, les auteurs concluent que l'OPG circulant pourrait prévenir la migration prématurée de monocytes sanguins par des facteurs chémoattractants vers une destination inflammatoire chronique (259). C'est également par syndécane-1 que l'OPG peut avoir une liaison directe, puis une internalisation et dégradation, au sein des cellules de myélomes multiples, phénomène une fois de plus dépendant des chaînes d'héparanes sulfates membranaires (260). Finalement, une partie des effets pro-angiogéniques de l'OPG seraient aussi médiés par une liaison à syndécane-1 sur les cellules endothéliales (261). Outre la famille des syndécanes, l'OPG aurait la capacité de stimuler directement la prolifération et la migration de cellules endothéliales dépendante d'une activation des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ et de la *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), kinase

reliée aux intégrines (262). Cette activation des intégrines $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$ par l'OPG a été corroborée dans les cellules de cancer ovarien, cette fois couplée à l'activation de la signalisation *focal adhesion kinase* (FAK) et *protein kinase B* (Akt) qui atténue l'apoptose induite par TRAIL de manière indépendante de la liaison de l'OPG pour TRAIL (263). De plus, au-delà des syndécanes et intégrines, plusieurs protéines de la matrice extracellulaires de cellules vasculaires peuvent lier l'OPG dont le collagène de type I/IV, la vitronectine, la fibronectine et la laminine (264). En joignant nos observations musculaires à la capacité structurale de l'OPG à interagir avec des ligands qui diffèrent de RANKL, nous avons interrogé la plateforme bioinformatiques PrePPI, une base de données structurale sur les interactions protéines-protéines (265). En résumé, ce logiciel confirme la haute probabilité d'interactions musculaires de l'OPG à de multiples protéines comme des glycoprotéines, glycoaminoglycanes, protéoglycanes et autres composantes de la matrice extracellulaire.

1.7 - Les protéoglycanes musculaires comme cible potentielle du FL-OPG-Fc

1.7.1 Un éventail de protéoglycanes musculaires

On retrouve une variété dynamique de protéoglycanes à titre de composantes de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire des fibres musculaires. Ils comprennent un cœur protéique auquel est attaché de manière covalente un nombre variable de chaînes de glycoaminoglycanes de différentes longueurs et structures définissant leurs actions tant locale que distante, dont les deux principales familles sont les chondroitines/dermatanes sulfates et les héparanes sulfates (266). En général, les protéoglycanes sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques, activant ou liant une variété de protéines de liaison solubles telles que des facteurs de croissance, des chimiokines, des récepteurs membranaires et autres éléments de la matrice extracellulaire régulant le développement et l'homéostasie tissulaire (267–269). Quant à eux, les protéoglycanes héparanes sulfates comprennent les perlécans, glypicans, agrines ainsi que les syndécanes et sont impliqués lors de la myogenèse, du développement, de la régénération, de la modulation de l'activité et du stockage de facteurs de croissance, de la protection de protéines contre la protéolyse, de l'adhésion cellule-cellule et de l'adhésion cellule-matrice extracellulaire (270). Les protéoglycanes héparanes sulfates sont les

principaux protéoglycanes musculaires et peuvent être transportés à la membrane basale, liés dans la membrane plasmique ou encore transmembranaires comme les glypicanes et les syndécanes (271). Cet arrangement spatial mais également temporel lors des différents stades de différenciations permet aux protéoglycanes d'être des molécules clés pour les interactions avec l'environnement extracellulaire comme par exemple dans leur coopération dynamique avec les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance lors de processus cellulaires (272). Des exemples de facteurs solubles de liaison à l'héparine de l'environnement interstitiel liant les syndécanes ou les glypicanes activant une signalisation cellulaire en aval comprennent le *fibroblast growth factor-2* (FGF2), le *hepatocyte growth factor* (HGF), le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et le *transforming growth factor- β* (TGF- β) (273). Les études de la chronologie d'expression et de la localisation des protéoglycanes évoqués plus haut en fonction de la maturité cellulaire ne sont toutefois pas totalement applicables au muscle dystrophique de par son caractère régénératif en continu qui sous-entend un éventail de fibres se situant à plusieurs stades de différenciation. Fait intéressant, certains protéoglycanes sont accrus et requis lors de la régénération du muscle squelettique mais également augmentés dans les muscles dystrophiques, plus particulièrement au sein de leurs cellules satellites (274,275). La fonction exacte de cette accumulation de protéoglycanes dans la physiopathologie de la DMD est en cours d'exploration et serait liée à des phénomènes contributeurs ou compensateurs de son évolution, selon le cas (276). Ainsi, leur régulation négative ou positive en ce qui à trait à leur abondance ou signalisation représente un champ d'intérêt pour la recherche de perspectives thérapeutiques car au-delà de leurs rôles énoncés plus hauts, leur présence dans l'espace interstitiel leur confère aussi une implication dans la gestion des cellules progénitrices de fibres musculaires, des cellules inflammatoires et des cellules fibrotiques, entre autres. Dans le contexte de nos travaux sur la DMD, la proximité spatiale et fonctionnelle des protéoglycanes à des récepteurs de facteurs de croissances extracellulaires couplée aux découvertes de liaison ou d'activation de l'OPG aux syndécanes et aux intégrines, protéines coopératives et synergiques (277,278), a dirigé notre intérêt sur la famille des intégrines qui pourraient médier une potentielle signalisation *outside-in* du FL-OPG-Fc.

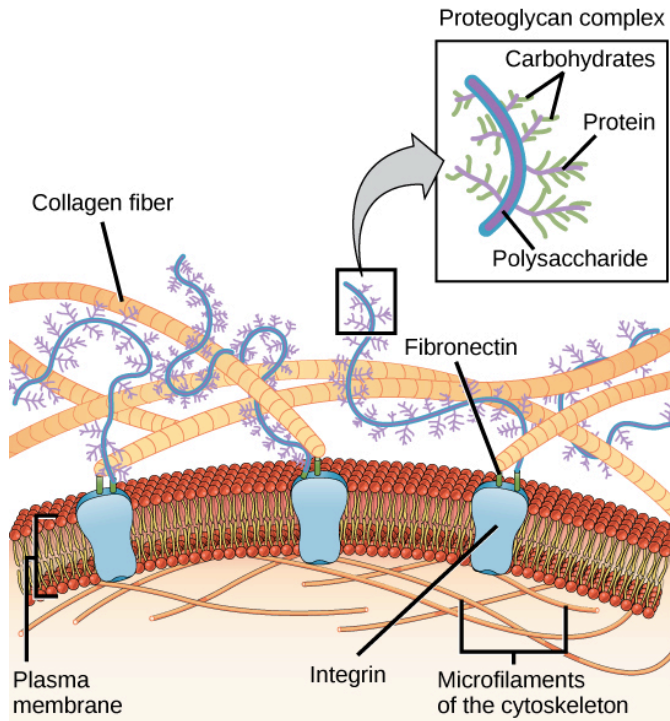


Figure 1.6 Représentation schématique des protéoglycanes, localisation dans la matrice extracellulaire et proximité avec les intégrines. Tirée de OpenStax Biology.

1.7.2 Les intégrines, rôles et signalisation en aval

Les intégrines sont une famille de récepteurs transmembranaires hétérodimériques constitués de combinaisons chaînes α et β , en plus des variants d'épissage des sous-chaînes. En synergie avec les syndécans, les intégrines sont un élément majeur de la machinerie cellulaire essentielle à l'intégration et la réponse aux informations environnementales physiques et chimiques (272). En contexte musculaire, la famille d'intégrines $\beta 1$ est impliquée dans la prolifération et la différenciation terminale des myoblastes en myotubes, et tout comme les syndécans, certaines isoformes sont exprimées spécifiquement selon les phases de différenciation (27). L'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ est majoritairement présente dans le muscle squelettique adulte. Elle est ancrée dans le cytosquelette au cœur du complexe costamérique intégrine-vinculin-talin- α -actinin, liant une multitude de protéines structurales dont laminine et fibronectine, contribuant à la morphologie cellulaire, à l'intégrité de la jonction neuromusculaire ainsi que de la jonction myotendineuse et au lien cytosquelette-matrice extracellulaire (27,279). Fait intéressant, la

protéines intégrine $\beta 1$ est fortement augmentée en début de régénération dans le muscle soléaire suite à un protocole de blessure par écrasement et dénervation (280). De plus, le fait que l'absence d'intégrine $\alpha 7\beta 1$ cause une forme de dystrophie musculaire et que la délétion de l'intégrine aggrave le phénotype dans la dystrophie musculaire et la surexpression de cette dernière améliore le phénotype dystrophique souligne son importance dans l'homéostasie musculaire (257–259). Au-delà des effets liés à leur présence ou absence en condition normales et dystrophiques, les intégrines possèdent des domaines de liaison à l'héparine/héparane sulfate sur leurs domaines extracellulaires leur permettant d'interagir avec une myriade de facteurs de croissance, chimiokines, protéines et récepteurs (284). Comme mentionné précédemment, l'activation directe des intégrines par l'OPG a été démontrée en ce qui concerne les cellules endothéliales et ovariennes avec entre autres le déclenchement de la signalisation FAK/Akt (263), mécanisme d'activation fortement inhibé pour les cellules endothéliales lors de l'utilisation d'anticorps bloquant les intégrines (262).

De manière générale, cette activation des intégrines induit la formation d'un *cluster* qui mûrira en une adhésion focale. Ce faisant, ils ont l'habileté de conduire leur signalisation *outside-in*, vers le cytosquelette et autres cibles (285). Les intégrines n'ont pas d'activité signalétique à proprement dit, ils dépendent de protéines adaptatrices enrichies au site d'adhésion focale dont la mieux décrite est *integrin-linked kinase* (ILK), qui, elle-même, possède un large interactome et joue des rôles dans l'arrangement de l'actine, la polarisation cellulaire, la migration, la prolifération, la survie cellulaire, le trafic des microtubules et l'adhésion cellule-cellule (286,287). Malgré son appellation, le rôle de kinase d'ILK médiant entre autres la phosphorylation de Akt est controversé et l'assise de ses fonctions aurait aussi lieu au sein de plusieurs interactions protéiques (285). En contexte musculaire, ILK est fortement exprimée à la jonction myotendineuse ainsi qu'au sein des costamères. Elle lie les intégrines au cytosquelette d'actine et joue un rôle dans la régénération musculaire suite au stress mécanique (288). La délétion de ILK muscle-spécifique souligne son importance avec le développement d'une dystrophie musculaire progressive, particulièrement à la jonction myotendineuse (289). Fait déterminant pour notre investigation mécanistique du FL-OPG-Fc, ILK peut médier la transduction de la force à titre de mécanorécepteur liant la contractilité du muscle cardiaque au RS via une modulation de la fonction de SERCA2a/*phospholamban* (PLN) par CaMKII (290). Dans le même ordre d'idée, la thérapie génique d'ILK améliore le phénotype et la fonction

cardiaque dans un modèle porcin d'infarctus du myocarde, bénéfique contractile similaire à celui de la surexpression de SERCA-2a selon les conclusions des auteurs (291). Une autre évidence de connexion signalétique avec le RS et la gestion calcique est l'influence des intégrines sur l'homéostasie calcique qui gouverne la tonicité vasculaire, lorsque des peptides de liaison aux intégrines de type arg-gly-asp/RGD peuvent induire une réponse calcique cytosolique partiellement dépendante de ryanodine dans les cellules musculaires lisses vasculaires (292). Plusieurs ligands extracellulaires peuvent activer la signalisation *outside-in* des intégrines, parmi eux, la glycoprotéine vitronectine peut lier $\alpha5\beta3$ via son domaine de liaison à l'héparine (293). Par ailleurs, l'activation du récepteur muscarinique M3 par l'intégrine serait dépendante de l'héparine elle-même dans le cas du processus de relaxation vasculaire (294), tandis que l'héparine modulerait directement l'intégrine $\alpha2\beta3$ dans les cellules plaquettaires (295). Ces multiples évidences se rejoignent vers l'hypothèse qu'un ligand extracellulaire contenant un domaine de liaison à l'héparine puisse activer les intégrines et produire un effet sur les pompes SERCA médié par la voie FAK/ILK/Akt/CaMKII/PLN en contexte musculaire.

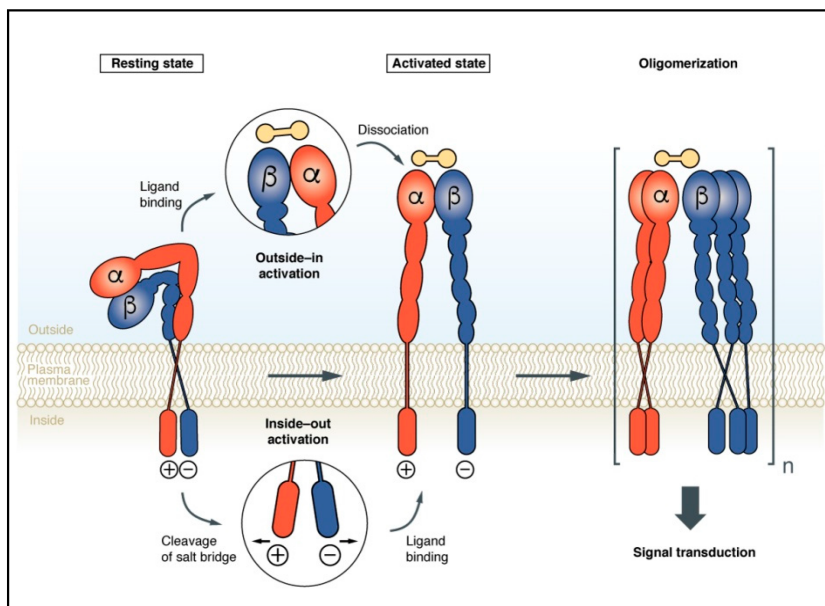


Figure 1.7 Illustration du mécanisme d'activation des intégrines *outside-in* et *inside-out*. Tirée de (296)

Plusieurs éléments font donc des intégrines une cible intéressante à inclure dans l'investigation mécanistique musculaire du FL-OPG-Fc. D'emblée, certains types d'intégrines sont retrouvés au sein du tissu musculaire, où elles peuvent influencer le processus de gestion calcique, la composition du cytosquelette et même le cours de la dystrophie musculaire. Par ailleurs, elles contiennent des domaines héparanes sulfates extracellulaires et leur activation par l'OPG est possible dans les cellules endothéliales et ovariennes. À la lumière du rationnel de la section 1.6, l'objectif du chapitre 4 est de **tester l'interaction potentielle hors-triade du FL-OPG-Fc directement sur les cellules musculaires, de vérifier l'état de la voie de signalisation en aval FAK/Akt/CaMKII/PLN/SERCA, de vérifier la fonctionnalité de ce mécanisme à l'aide d'un modèle de surcharge calcique cellulaire et finalement de tester pour la souris dystrophique la présence d'un effet bénéfique aigu en fonction de la potentielle interaction directe**. Ces travaux sont sous la forme d'un article scientifique en préparation pour une soumission dans le journal JCI et est retrouvé à la page 93.

1.8 – Objectifs et hypothèses

À la lumière de l'introduction précédente au chapitre 1, de l'état des connaissances actuelles de la littérature couverte sur le sujet et de celles de nos travaux préalables, le but de la présente thèse est de contribuer à l'avancement des connaissances en recherche préclinique sur la DMD, de passer en revue les évidences d'interactions moléculaires bi-directionnelles muscle-os dans la DMD et d'approfondir les notions fondamentales de la potentielle action biologique musculaire du FL-OPG-Fc. À titre de rappel pour amorcer la lecture des chapitres suivants, les objectifs et hypothèses sont les suivants.

L'objectif du chapitre 2 est de **contribuer à l'avancement des pratiques précliniques en DMD par le biais de notre caractérisation du modèle mdx/utrn+/- sur la fonction et la contractilité, en plus d'investiguer des paramètres discriminants de la souris dystrophique**. Notre hypothèse est que le modèle mdx/utrn+/- sera plus sévèrement affecté par rapport au modèle mdx/utrn+/+ à tous les âges testés et que la mdx sera constamment discriminée de la souris sauvage pour certains paramètres seulement.

L'objectif du chapitre 3 est **d'aborder la nature de la dégénérescence musculaire et osseuse conjointe de la DMD, d'intégrer les interactions moléculaires bi-directionnelles et les avenues thérapeutiques ayant le potentiel de traiter les deux tissus en simultanément, incluant l'approche de la voie RANK/RANKL/OPG.** Notre hypothèse avance que l'affection osseuse en DMD est importante et qu'il existe plusieurs évidences qui convergent vers la possibilité d'un dialogue moléculaire muscle-os dans cette pathologie.

L'objectif du chapitre 4 est de **tester l'interaction potentielle hors-triade du FL-OPG-Fc directement sur les cellules musculaires, de vérifier l'état de la voie de signalisation en aval FAK/Akt/CAMKII/SERCA/PLN, de vérifier la fonctionnalité de ce mécanisme à l'aide d'un modèle de surcharge calcique cellulaire et finalement de tester pour la mdx la présence d'un effet bénéfique aigu en fonction de la potentielle interaction directe.** Notre hypothèse propose que l'interaction potentielle prend la forme d'une association directe aux cellules musculaires via des protéoglycanes et de la matrice extracellulaire, que la signalisation en aval active la voie FAK/Akt/CaMKII/SERCA/PLN, peut protéger du dommage induit par la cardiotoxine et que le FL-OPG-Fc peut potentialiser la contractilité de muscles dystrophiques de manière aiguë grâce à cette interaction.

Chapitre 2 : L'haploinsuffisance en utrophine n'aggrave pas la performance fonctionnelle, la résistance aux contractions excentriques et la production de force des souris dystrophiques

Titre original de l'article

Utrophin haploinsufficiency does not worsen the functional performance, resistance to eccentric contractions and force production of dystrophic mice

Antoine Boulanger Piette ¹, Dounia Hamoudi ¹, Laetitia Marcadet ¹, Frédérique Kyomi Labelle ¹, Rares Ovidiu David ¹, Sabrina Bossé ¹, Anteneh Argaw ¹, Jérôme Frenette ^{1,2*}

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

2 - Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, Canada

Published in: PLoS One. 2018 Jun 7;13(6):e0198408

Copyright: © 2018 Boulanger Piette et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants to J. F. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, RGPIN 2016-05845), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, JNM-123675), Duchenne Alliance and Jesse's Journey. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: CSA, cross-sectional area; DIA, diaphragm; DMD, Duchenne muscular dystrophy; EDL, extensor digitorum longus; GM, gastrocnemius; L0, optimal length; P0, maximum absolute force; PCR, polymerase chain reaction; Pt, twitch force; sP0, maximum specific force; TA, tibialis anterior; WT, wild-type.

Résumé

Les muscles squelettiques de la souris mdx, à l'exception du diaphragme, ne subissent pas de dégénération progressive de par la présence de phénomènes compensatoires qui incluent la surexpression de protéines structurales. La souris mdx haploinsuffisante pour l'utrophine (mdx/utrn+/-), pourrait mieux récapituler la DMD. Le but de cette étude était de déterminer si la mdx/utrn+/- augmente la sévérité du phénotype mdx en caractérisant l'évolution de la maladie sur la fonction musculaire et la contractilité sur muscle isolé à 1, 2 et 5 mois d'âge. Les performances fonctionnelles de la mdx/utrn+/- ont montré qu'elle n'est pas plus affectée que la mdx basé sur les paramètres de la course sur tapis roulant décliné et la récupération subséquente mesurée par l'activité volontaire en espace ouvert. De plus, les propriétés contractiles et les contractions excentriques répétées sur les muscles EDL isolés ont révélé que la mdx/utrn+/- n'aggrave pas significativement la fonction des EDL dystrophiques.

Abstract

The lack of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy (DMD) compromises the integrity and function of muscle fibers. Skeletal muscles, except the diaphragm, do not undergo progressive degeneration in adult mdx mice due to compensatory mechanisms, including structural protein upregulation. New mouse models, including utrophin haploinsufficient mdx (mdx/utrn+/-) mice, may better recapitulate DMD. Our goal was to determine whether mdx/ utrn+/- worsens the mdx phenotype and to characterize the course of the disease on muscle function and contractility at 1, 2, and 5 months of age, which encompass all stages of development relevant to DMD therapy. The functional performances of mdx/utrn+/- mice showed that they are not more affected than mdx/utrn+/+ mice based on downhill treadmill running parameters and subsequent recovery measured by open-field voluntary activity. WT mice ran the entire distance (450 m) on the treadmill, with an additional 561 m during the 4 h of open-field while mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice completed, respectively, 236 m and 273 m on the treadmill and 341 m and 287 m during the open-field period. In addition, isolated ex vivo contractile properties and repeated eccentric contractions

showed that mdx/utrn+/- does not significantly worsen the function of dystrophic EDL muscles, which are mainly composed of fast-twitch fibers that are preferentially affected in DMD. Twitch, absolute tetanic, and specific tetanic forces were very similar in dystrophic EDL muscles from mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice at 1, 2, and 5 months of age. Five-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice lost roughly 50% of their force due to repeated eccentric contractions. Thus, histological, morphological, biochemical functional and contractile observations showed that utrophin haploinsufficiency has a very limited impact on mdx mice.

2.1 Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a lethal x-linked genetic disease caused by mutations in the dystrophin gene that result in the complete lack of dystrophin protein. The absence of dystrophin in the costameric dystroglycan complex compromises the anchoring of sarcomeres to the extracellular matrix (ECM). In addition, the weak attachment of the cytoskeleton to the sarcolemma and ECM leads to increased susceptibility to contraction-induced damage, particularly eccentric contractions of powerful fast-twitch fibers, causing repeated degeneration-regeneration cycles [1,2]. The loss of sarcolemmal integrity also gives rise to calcium influx, triggering proteolysis and proteasome activation. Necrosis and damage elicit a chronic inflammatory response where contractile tissues are replaced by fibrotic and adipose tissues. Patients eventually lose ambulation, and die due to cardiorespiratory failure. Despite continuous and major efforts, DMD is still treated using an outdated standard of care and represents an unmet need [3].

Several animal models have been developed to investigate novel therapeutic avenues and to decipher the pathophysiology of DMD. The most widely used is the mdx mouse, a

genetic model of DMD. The mdx mouse has a point mutation in exon 23 of the dystrophin gene, resulting in a lack of a functional dystrophin protein. Young mdx mice undergo acute phases of degeneration-regeneration shortly after weaning, with muscle necrosis and weakness peaking around 4-6 weeks of age [4-6]. Adult mdx mice appear clinically normal and their limb muscles do not recapitulate the progressive weakness, degeneration and fibrosis of DMD, limiting their use for long term treatment investigations and clinical studies [5,7,8]. Successful regeneration in adult mdx mice is most likely due to multiple compensatory mechanisms, including non-exhaustion of satellite cells, longer telomeres, and upregulation of other structural proteins.

The structural protein utrophin is a partial natural compensatory mechanism in mdx mice and DMD/Becker patients [9-13]. Since utrophin is homologous to dystrophin and since these two proteins may be functionally interchangeable at costamere sites [14], stabilizing the sarcolemma and preventing contraction-induced damage. Utrophin is also found at neuromuscular and myotendinous junctions and in sarcolemmal extrasynaptic regions of regenerating fibers in dystrophic muscles [15-17]. The utrophin levels are correlated with disease severity [10,11] and over expression of this protein seems to improve clinical outcome measures in Becker and DMD patients [15]. In addition, the onset of the disease in mdx mice corresponds to the downregulation of utrophin at the sarcolemma [18]. Interestingly, transgenic [14,19-23] or pharmacological approaches that induce high levels of endogenous utrophin upregulation [24-26] alleviate the dystrophic phenotype in mdx mice and possibly in human patients [27]. Based on the compensatory role of utrophin, dystrophin-utrophin haploinsufficient mdx/utrn^{+/-} and null mdx/utrn^{-/-} mice have been generated to better recapitulate the progressive degenerative processes of DMD [7,28]. Mdx/utrn^{+/-} and null mdx/utrn^{-/-} mice may thus be a useful translational tool for discovering and testing potential therapeutic approaches, particularly for chronic treatments.

Dystrophin-utrophin haploinsufficient mice have slightly shorter lifespans than mdx mice and display a moderate phenotype with select functional tests and histological experiments [29,30]. On the other hand, double-deficient mdx/utrn^{-/-} mice have a lower body weight, widespread muscular fibrosis and necrosis, a reduced lifespan, spinal deformity, joint contractures, and earlier symptoms of cardiomyopathy than their mdx/utrn^{+/+} and mdx/utrn^{+/-} counterparts [7,28,30-35]. Given the premature death and severity of the

symptoms in mdx/utrn^{-/-} mice, mdx/utrn^{+/-} mice may be a good model for evaluating the long-term efficacy of therapeutic interventions. The mdx/utrn^{+/-} has been validated as a potentially more useful model to test anti-inflammatory and anti-fibrotic therapeutic interventions [29,35-37]. However, the extent to which muscle function and physical performance are affected in mdx/utrn^{+/-} mice remain unclear due to the absence of comparative *ex vivo* muscle contractility data at multiple time-points, and limitations in the analysis of functional assay data [30,37]. Accordingly, the aim of the present study was to characterize the severity and course of the disease in the mdx/utrn^{+/-} mouse model by functional testing using *ex vivo* contractility, morphological, histological and biochemical investigations. We chose the fast-twitch dominant extensor digitorum longus (EDL) muscle because fast-twitch fibers are preferentially affected by muscular dystrophy and this muscle is suitable for *ex vivo* contractility experiments. Our findings show that utrophin haploinsufficiency in mdx mice has a limited impact at 1, 2, and 5 months of age in terms of *ex vivo* functional performance, EDL contractile properties and resistance to eccentric contractions.

2.2 Materials and methods

Animals

Male and female mdx breeding mice heterozygous for utrophin gene (mdx/utrn^{+/-}), derived from the initial dys^{-/-} and utrn^{-/-} models [38,39], were purchased from The Jackson Laboratory. Wild-type mdx/utrn^{+/+} littermates were used for experiments and background controls. Mice were screened for the desired genotype by polymerase chain reaction (PCR). Wild-type (C57BL/10J; WT) mice were purchased from the Jackson Laboratory and were bred at our specific pathogen-free (SPF) animal facility. Food and water were provided *ad libitum*. At the end of the different experimental procedures, the mice were euthanized under anesthesia by cervical dislocation. All procedures were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee based on Canadian Council on Animal Care guidelines.

Genotyping

Genomic DNA was isolated from mouse tail tissue samples, and a fragment of the utrophin gene was amplified by PCR according to Jackson Laboratory genotyping protocol

Standard

PCR:

Utrntm/Kedalternate1(https://www2.jax.org/protocolsdb/f?p=116:5:0::NO:5:P5_MASTER_PROTOCOL_ID,P5_JRS_CODE:24119,014563). Mutant forward (5'-CGCTTCCTCGTGCTTTACGGTAT-3'), WT forward (5'-TGTCATTCTCTGAGGCCTTTC-3') and common reverse (5'-AAGATTTGCAGACCGGAAGA-3') primer sets were used to screen for mutant and WT utrophin alleles. The thermocycler conditions were as follows: 95°C for 30 s, and forty 30 s cycles at 93°C, 53°C for 1 min, and 68°C for 1 min, followed by 68°C for 5 min with Hot Start TAQ Polymerase (New England Biolabs). Genotyping data is presented in S1 Fig.

Treadmill exercise

Five-month-old wild-type (WT), mdx/utrn^{+/+}, and mdx/utrn^{+/-} mice were acclimatized with three sessions on a motorized treadmill at 6, 8, and 10 m/min for 5 min. On the day of the experiment, the mice ran downhill for 45 min on a motorized treadmill with a 14-degree slope at 10 m/min. They were observed continuously during the running protocol. Exhausted mice showing physical signs of discomfort were rested for 1 min before resuming the protocol. The running bout was discontinued after 3 stops. Following the 45-min downhill protocol, voluntary activity was measured using video tracking software in a 50 x 50 cm open field for 4 h [40]. One- to two-month-old mice are not recommended for the downhill treadmill test as they are generally unable to perform this stressful exercise.

Inverted grid grip duration test

This test was conducted using a 50 x 30-cm metallic framework with a 1-cm square grid and a 1.5-mm rod diameter placed 20 cm above a cushioned surface. Two separate sessions were used to acclimatize 1-, 2- and 5-month-old mice. On the day of the protocol, the mice subjected to the test until they could no longer hold on to the grid. The mice were continually observed to ensure that grip failure was due to exhaustion. In the case of voluntary abandonment, the test was repeated 1 h later. Data are expressed as holding impulse, a measure of sustained force: body weight (9.806×10^{-3} N/gram) x grip duration.

Grip strength test

The four-limb grip strength analysis was performed using a grip meter (Columbus Instruments). One-, 2-, and 5-month-old mice were placed on a grid that they grasped, before being pulled backwards at a controlled speed and angle until they could no longer

hold on to the grid. The test was repeated three times on three separate days, and the average of the maximal values was used to estimate strength normalized by body weight.

Isometric contractile properties

The mice were weighed, injected with buprenorphine (i.p. 0.1 mg/kg), and anesthetized with pentobarbital sodium (i.p. 50 mg/kg) 15 min later. EDL muscles were then carefully resected and were attached to an electrode and a force sensor (305B-LR dual-mode, Aurora Scientific Inc.) controlled by Dynamic Muscle Control Analysis unit and data acquisition software (Aurora Scientific Inc.). Unlike the diaphragm (DIA) muscle, EDL muscles are not progressively impaired in mdx adult mice, making them suitable for use as a more severe model of muscular dystrophy. During the contractile property experiments, the muscles were incubated at 25°C in oxygenated Krebs-Ringer solution supplemented with 2 mg/mL of glucose [41,42]. Once the optimal length (L₀) had been determined, the muscles were stimulated for 500 ms at 10, 20, 50, 80, 100, and 120 Hz to induce subtetanic and tetanic contractions and to determine the force-frequency curves. Twitch tension (P_t, g) and maximum tetanic tension (P₀, g) values were recorded and were analyzed using Dynamic Muscle Data Analysis software (Aurora Scientific Inc.). Muscle resistance to eccentric contractions was evaluated using 7 contractions at 150 Hz for 700 ms with a 1-min rest period between contractions. The eccentric contraction protocol consisted of 500-ms tetanic contractions at 150 Hz followed by muscle lengthening at 0.5 L₀/s for 200 ms. Force values were calculated as the percentage of the initial force produced. The length of the muscles was measured, the tendons were removed, and the muscles were weighed in order to calculate their specific force using the following formula: $sP_0 \text{ (N/cm}^2\text{)} = P_0 \text{ (g)} \times L_f \text{ (mm)} \times \text{muscle density (mg/mm}^3\text{)}/\text{muscle mass (mg)}$, where L_f is L₀ x 0.44 and muscle density is 1.062. Contralateral EDL muscles were embedded in OCT compound, frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C until used for the histological assays.

Histological assays

Transverse sections of EDL muscles (10 μm) were cut mid-belly (Leica Microsystems CM1850). Hematoxylin and eosin (H&E) staining (Sigma-Aldrich) was used to assess the cross-sectional areas (CSA) of the fibers as well as central nucleation. Five images of transversal sections per muscle were acquired at 200x magnification, which represents approximately 300 myofibers per muscle. To quantify the area of fibrotic aggregation, five

sections per muscle were stained with Masson's Trichrome and fibrosis was identified at 200x magnification. The sections were examined using an inverted microscope (Nikon, Canada) and were analyzed using ImageJ software version 1.49i (NIH, Bethesda, MD).

Collagen content

EDL muscles were weighed, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Collagen content was determined using a hydroxyproline assay adapted from Treat-NMD SOP DMD_M.1.2.006. Briefly, muscles were dried overnight at 56°C , weighed, and hydrolyzed for 3h in 0.2 ml of 6N hydrochloric acid at 130°C . Hydrolysates were mixed with 1 mL of distilled water 100 μL red methyl and 150 μL 2,5N NaOH for neutralization. Next, 200 μL of hydrolysate were mixed with 100 μL of 0,05 M chloramine-T in citrate buffer and oxidized at RT for 20 min. The samples were then mixed with 100 μL of perchloric acid for 5 min. Finally, 20% p-dimethylaminobenzaldehyde was added and incubated for 45 min at 60°C . Quantification was determined by extinction measurement of the resulting solution at 560 nm. A standard curve 0-6,000 μM L-hydroxyproline (Sigma) was included in each assay. Results are reported in micrograms of hydroxyproline per milligrams of wet tissue weight.

Creatine kinase activity

Serum creatine kinase (CK) activity was quantified using the enzyme-coupled assay reagent from Fisher Scientific (Pointe Scientific Creatine Kinase CK10), according to manufacturer's instructions and the procedure from Treat NMD_M.2.2.001. Serum samples were analyzed in duplicate using an infinite F200 plate reader (TECAN), Data are expressed as units per liter (U/L).

Western blot for model validation

Snap-frozen EDL muscles were homogenized in RIPA lysis buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). 30 μg of protein homogenates were electrophoretically separated on 4/ 15% gels (Bio-Rad) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad), blocked in 5% skim milk, and incubated overnight at 4°C with anti-utrophin primary antibody 1/500 (Santa Cruz Biotechnology). The membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase- conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). Protein bands were revealed using the ECL-Plus chemiluminescent detection system (Perkin-Elmer) and were normalized for loading using Gelcode Blue Stain reagent (Thermo Scientific). ImageQuant LAS 4000 biomolecular

imager was used to detect a chemiluminescent signal and analyzed using Quantity One software (version 4.6.6; Bio-Rad). Representative utrophin blot is presented in S1 Fig.

Statistical analyses

All values are expressed as means \pm SEM. The data were analyzed using a one-way ANOVA, or a two-way ANOVA for repeated eccentric contractions, followed by Tukey's test (InStat Graphpad). The levels of significance were set at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for comparisons between WT and mdx/utrn+/+ or mdx/utrn+/- mice. The level of significance was set at § $p < 0.05$ for comparisons between mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice.

2.3 Results

Mdx/utrn+/- and mdx/utrn+/+ mice display similar functional performances

To assess functional resistance to eccentric contractions and the associated post-stressful exercise short-term voluntary activity, 5-month-old mice were tested on a treadmill with a 14-degree decline at 10 m/min for 45 min. Once the treadmill exercise over, mice voluntary activity was monitored in an open-field using a video tracking system. The treadmill completion rate of mdx/utrn+/+ (25%) and mdx/utrn+/- (28%) mice was significantly lower than that of WT mice (100%) (Fig 1A). The time to first stop was 23.6 min for the mdx/utrn+/+ mice ($p < 0.05$) and 25.8 min for the mdx/utrn+/- mice ($p < 0.05$) while the WT mice never stopped (Fig 1B). The total running distance was proportionally lower for the mdx/utrn+/+ mice (236 m) ($p < 0.05$) and the mdx/utrn+/- mice (273 m) ($p < 0.05$) compared to WT mice (450 m, i.e., the maximum distance) (Fig 1C). For the open-field activity, the distances travelled 1 h and 4 h post-treadmill exercise were significantly lower for the mdx/utrn+/+ mice (87 and 340 m, respectively, $p < 0.05$) and the mdx/utrn+/- mice (84 and 287 m, respectively, $p < 0.05$) than for the WT mice (180 and 561 m, respectively) (Fig 1D and 1E). There were no differences between the groups in terms of the maximum speed reached, an indicator of power, during the 4 h open-field observation (mdx/utrn+/+: 1.6 m/s; mdx/utrn+/-: 1.5 m/s; and WT: 1.4 m/s) (Fig 1F). The inverted grid grip test was used to characterize muscular endurance. The grip test performances of the 1-month-old mdx/utrn+/+ (7.6 N*s, $p < 0.05$) and mdx/utrn+/- (1.9 N*s, $p < 0.05$) mice were significantly lower than that of the WT mice (40.4 N*s) (Fig 1G). Since the 5-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice weighed significantly more than the WT mice, we normalized grip

strength to body weight ($p < 0.05$) (Table 1). The four limb grip strength performances of the 1-month old mdx/utrn+/+ (5.9 g/g, $p < 0.05$) and mdx/utrn+/- (5.5 g/g, $p < 0.05$) mice were significantly lower than that of the WT mice (8.6 g/g) (Fig 1H). The four limb grip strength performances of the 5-month-old mdx/utrn+/+ (5.8 g/g, $p < 0.05$) and mdx/utrn+/- (6.1 g/g, $p < 0.05$) mice were also significantly lower than that of the WT mice (8.0 g/g) (Fig 1H). Overall, utrophin haploinsufficiency in mdx mice did not induce a more severe time-related deterioration of functional tasks relative to mdx/utrn+/+ mice.

Utrophin haploinsufficiency has a mild effect on ex vivo EDL muscle contractility and has no impact on resistance to eccentric contractions

To further investigate the effect of utrophin haploinsufficiency, we assessed the *ex vivo* contractile properties, the gold standard for testing isolated skeletal muscle function, of the three groups of mice. The twitch (Fig 2A) and absolute tetanic (Fig 2B) forces of the EDL muscles of the mdx/utrn+/+ mice (35-47% and 29-26% decrement, respectively) and the mdx/utrn+/- mice (32-43% and 41-35% decrement, respectively) were significantly lower than those of the WT type mice at 1 and 2 months of age ($p < 0.05$). The twitch and absolute tetanic forces of dystrophic EDL muscles of mdx/utrn+/+ mice and mdx/utrn+/- mice at 1, 2, and 5 months of age were very similar (Fig 2A and 2B). In addition, the maximum specific forces of 1-, 2-, and 5-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice were significantly lower than that of WT mice ($p < 0.05$). The maximum specific force of 2-month-old mdx/utrn+/- mice (10.3 N/cm²) was lower than that of 2-month-old mdx/utrn+/+ mice (12.7 N/cm²) and this difference was not statistically significant (Fig 2C). The force-frequency curves of EDL muscles from 1-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice were much lower than that of WT mice, indicating a marked decrease in force production (Fig 2D). However, the force-frequency curves also indicated that the force production of dystrophic EDL muscles is partially recovered at 2 months of age (Fig 2E) and is fully recovered at 5 months of age in the two dystrophic mouse strains (Fig 2F). Dystrophic muscles are vulnerable to *ex vivo* eccentric contractions, which account for as much as 50% of the loss of force in 5-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice (Fig 2G-2I). Therefore, the levels of utrophin expression in the mdx/utrn+/- mice seem sufficient to prevent any additional loss of force following repetitive eccentric contractions.

Utrophin haploinsufficiency has limited effects on selected histological, morphological and biochemical features of dystrophic EDL muscles

We next analyzed the effect of utrophin haploinsufficiency on the histological and morphological features of dystrophic EDL muscles. The CSAs of myofibers from 1-, 2-, and 5-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice were the same, and were not significantly different from those of WT mice (Fig 3B). We then assessed the number of centrally nucleated myofibers as an index of muscle degeneration and regeneration. When compared to WT mice, the number of centro-nucleated myofibers increased by 24% in mdx/utrn+/+ mice and by 40% in mdx/utrn+/- mice. While the number of centro-nucleated fibers in mdx/utrn+/- mice was significantly different from the number in mdx/utrn+/+ mice at 1 month of age ($p < 0.05$), no differences were seen at 2 and 5 months (Fig 3C). Furthermore, there were no differences in the fibrotic areas in the three groups of mice at 5 months of age (Fig 3D), as confirmed by whole muscle collagen content determined using the hydroxyproline assay (Fig 3E). Finally, we quantified serum CK level as an indirect marker of muscle damage [43]. At 5 months, CK concentration increased equally but very significantly by respectively 21,5 and 23,5-fold in mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- relative to WT mice (Fig 3F).

2.4 Discussion

The development of new therapeutic approaches for DMD requires robust and reliable animal models, aiming at improving muscle integrity and resistance to eccentric contraction-induced muscle damage. Mdx/utrn+/- mice have been proposed as a more severe and representative model of DMD. However, there is currently no consensus on the severity and underlying *ex vivo* and *in vivo* muscle functions in mdx/utrn+/- mice. Extensive functional, contractile, and histomorphological analyses are thus required to confirm the superiority of this dystrophic mouse model.

The downhill running protocol induces severe muscle damage and is a reliable approach for measuring the vulnerability of dystrophic muscles [44]. We showed that downhill running performance is severely impaired and post-treadmill activity is markedly reduced in both mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice, which is consistent with the structural role assigned to dystrophin [1]. These results validate the use of the downhill treadmill protocol for adult mdx mouse studies. In addition, the voluntary activities of the mdx/utrn+/+, mdx/utrn+/-, and WT mice that did not perform the running protocol was similar (data not shown), ruling out inherent variations that may influence the outcome. The functional

performances observed in the open-field assay paralleled the reverse grid holding impulse test and the four-limb grip strength test in the mdx/utrn^{+/+} and mdx/utrn^{+/-} mice. These results were also in agreement with the normalized forelimb grip strength values reported in the literature for 1- to 4-month old mdx/utrn^{+/+} and mdx/utrn^{+/-} mice [30]. Nonetheless, conflicting results have been reported in other specific experimental conditions. For example, the grip duration of mdx/utrn^{+/-} mice (1 to 3 months of age) has been reported to be shorter than that of mdx/utrn^{+/+} mice [37], while the time spent hanging during the two and four limbs hanging tests have been reported to be shorter with mdx/utrn^{+/-} mice (1 to 4 months of age) [30]. These discrepancies could possibly be due to differences in body weight between the two strains. In the present study, the normalized holding impulse and grip strength values for the mdx/utrn^{+/+} and mdx/utrn^{+/-} mice at certain ages were the same as those for the WT mice, questioning the sensitivity and precision of these tests for genotype-phenotype evaluations, particularly in these two mouse models where skeletal muscles are not equally affected and compensatory mechanisms may take place throughout disease evolution [1]. Nevertheless, our results suggest that the level of utrophin in skeletal muscles from mdx/utrn^{+/-} mice is sufficient to generate comparable functional performances and to provide similar resistance to eccentric contractions to mdx/utrn^{+/+} mice.

To further investigate potential differences in muscle functions between mdx/utrn^{+/+} and mdx/utrn^{+/-} mice, we studied *ex vivo* contractile properties of fast-twitch EDL muscles. Utrophin haploinsufficiency had a very limited impact on a number of contractile parameters at all tested ages. At 1 month of age, the mdx/utrn^{+/+} and mdx/utrn^{+/-} mice produced the same levels of twitch, absolute and specific maximal forces, with similar resistance to repeated eccentric contractions, all of which were, as expected, largely inferior to the values for WT mice. The differences between WT, mdx/utrn^{+/+}, and mdx/utrn^{+/-} mice in terms of absolute and specific tetanic force production were not surprising since it is well documented that mdx mice undergo the most important and severe peak of muscle degeneration immediately after weaning. However, utrophin haploinsufficiency in mdx mice did not exacerbate the loss of force following eccentric contractions. Muscular dystrophy in terms of twitch and absolute maximum forces and functional performances in both phenotypes partially subsided at 2 months of age. However, the maximal specific force of mdx/utrn^{+/-} mice tended to be slightly and transiently lower than that of mdx/utrn^{+/+} mice ($p=0.06$) at 2 months of age, and the gain

in muscle mass was highly effective for maintaining absolute force at 5 months of age in both mdx/utrn^{+/+} and mdx/utrn^{+/-} mice [45]. A previous study showed that mice doubly-deficient in dystrophin and utrophin are very vulnerable to eccentric contractions [46]. Resistance to *ex vivo* eccentric contractions was significantly impaired in dystrophic mice. EDL muscles from mdx/utrn^{+/-} and mdx/utrn^{+/+} mice were equally vulnerable to lengthening contractions clearly demonstrating the similarity between the two dystrophic mice. To further confirm our functional and contractile results, we performed histological experiments. We found that the average CSA of myofibers, which include hypertrophied and small degenerating/regenerating myofibers, remain relatively stable in the WT, mdx/utrn^{+/+}, and mdx/utrn^{+/-} mice. The number of centrally nucleated myofibers was significantly higher in the EDL muscles of 1-month-old mdx/utrn^{+/-} mice than in the EDL muscles of mdx/utrn^{+/+} mice, suggesting that mdx/utrn^{+/-} mice may have a more profound and earlier cycle of degeneration-regeneration. This histological difference did not affect EDL contractile properties. We also observed a similar level of fibrosis in 1-, 2-, and 5-month-old mdx/utrn^{+/-}, mdx/utrn^{+/+}, and WT mice, suggesting that the gain in muscle mass of dystrophic EDL muscles is most likely associated with edema and fat cell accumulation. There is a lack of consensus on fibrosis in limb skeletal muscles. For example, fibrosis in the gastrocnemius of mdx/utrn^{+/-} mice has been reported to be higher at 2 months of age but not at 10 months of age. On the other hand, no fibrosis has been observed in the quadriceps of mdx/utrn^{+/-} mice at 3 or 4 months of age but an increase has been observed at 6 months of age [29,30,35]. Furthermore, no differences in fibrotic/necrotic tissue has been observed in the tibialis anterior or triceps of mdx/utrn^{+/-} mice at 4 months of age [30]. Overall, the loss of contractile function seems to occur earlier than histological changes in dystrophic mice.

2.5 Conclusion

Our findings that utrophin haploinsufficiency does not worsen the functional performance of mdx mice and the force production of EDL muscles suggest that the monoallelic expression level of utrophin is sufficient in mdx/utrn^{+/-} mice to prevent further deterioration of the muscle. Accordingly, previous works have shown that low level expression of dystrophin in the severe mdx/utrn^{-/-} mouse model protects dystrophic muscles and may provide a vital benefit [47,48]. Mdx mice remain a cost-efficient model for drug discovery in particular for testing *ex vivo* contractile properties and resistance to eccentric contractions,

specifically during the first peak of muscle degeneration at 4-5-weeks of age, or following downhill eccentric contraction protocol during adulthood. Overall our results indicate that EDL muscles are equally compromised between 1 and 5 months of age in mdx and mdx/utrn+/- mice.

2.6 Acknowledgments

This work was supported by grants to J.F. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC, RGPIN 2016±05845), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, JNM-123675), Duchenne Alliance and Jesse's Journey.

2.7 Authors contribution

Conceptualization: Jérôme Frenette.

Data curation: Antoine Boulanger Piette, Dounia Hamoudi, Laetitia Marcadet, Frédérique Kyomi Labelle, Rares Ovidiu David, Sabrina Bossé, Anteneh Argaw.

Formal analysis: Antoine Boulanger Piette.

Funding acquisition: Jérôme Frenette.

Methodology: Antoine Boulanger Piette.

Project administration: Jérôme Frenette.

Resources: Sabrina Bossé, Anteneh Argaw, Jérôme Frenette.

Supervision: Anteneh Argaw, Jérôme Frenette.

Validation: Antoine Boulanger Piette.

Writing - original draft: Antoine Boulanger Piette.

Writing - review & editing: Dounia Hamoudi, Sabrina Bossé, Anteneh Argaw, Jérôme Frenette.

2.8 References

1. Moens P, Baatsen PH, Maréchal G. Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil.* 1993; 14: 446-451. PMID:7693747
2. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 3710-3714. PMID:8475120
3. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 2007; 36: 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016> PMID:17162189
4. Cullen MJ, Jaros E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. Comparison with Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl).* 1988; 77: 69-81.

5. Carnwath JW, Shotton DM. Muscular dystrophy in the mdx mouse: histopathology of the soleus and extensor digitorum longus muscles. *J Neurol Sci.* 1987; 80: 39-54. PMID:3612180
6. DiMario JX, Uzman A, Strohman RC. Fiber regeneration is not persistent in dystrophic (MDX) mouse skeletal muscle. *Dev Biol.* 1991; 148: 314-321. PMID:1936568
7. Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, et al. Utrophin dystrophin deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1997; 90: 717-727. PMID:9288751
8. Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature.* 1991; 352:536-539. <https://doi.org/10.1038/352536a0> PMID:1865908
9. De la Porte S, Morin S, Koenig J. Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice. *Int Rev Cytol.* 1999; 191: 99-148. PMID:10343393
10. Kleopa KA, Drousiotou A, Mavrikiou E, Ormiston A, Kyriakides T. Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2006; 15: 1623-1628. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl083> PMID:16595608
11. Janghra N, Morgan JE, Sewry CA, Wilson FX, Davies KE, Muntoni F, et al. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150818> PMID:26974331
12. Rybakova IN, Patel JR, Davies KE, Yurchenco PD, Ervasti JM. Utrophin binds laterally along actin filaments and can couple costameric actin with sarcolemma when overexpressed in dystrophin-deficient muscle. *Mol Biol Cell.* 2002; 13:1512-1521. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-09-0446> PMID:12006649
13. 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.
14. Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JI, Davies KE. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature.* 1996; 384: 349-353. <https://doi.org/10.1038/384349a0> PMID:8934518
15. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002; 82: 291-329. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2001> PMID:11917091
16. Sewry CA, Nowak KJ, Ehmsen JT, Davies KE. A and B utrophin in human muscle and sarcolemmal Autrophin associated with tumours. *Neuromuscul Disord NMD.* 2005; 15: 779-785. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.08.002> PMID:16198105
17. Helliwell TR, Man NT, Morris GE, Davies KE. The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord NMD.* 1992; 2: 177-184. PMID:1483043
18. Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, Chelly J, Tomé FM, Fardeau M, et al. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord NMD.* 1991; 1: 185-194. PMID:1822793
19. Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med.* 1998; 4: 1441-1444. <https://doi.org/10.1038/4033> PMID:9846586
20. Rafael JA, Tinsley JM, Potter AC, Deconinck AE, Davies KE. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet.* 1998; 19: 79-82. <https://doi.org/10.1038/ng0598-79> PMID:9590295
21. Perkins KJ, Burton EA, Davies KE. The role of basal and myogenic factors in the transcriptional activation of utrophin promoter A: implications for therapeutic up-regulation in Duchenne muscular dystrophy. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 4843-4850. PMID:11726694
22. Squire S, Raymackers JM, Vandebrouck C, Potter A, Tinsley J, Fisher R, et al. Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet.* 2002; 11: 3333-3344. PMID:12471059
23. Deconinck N, Tinsley J, De Backer F, Fisher R, Kahn D, Phelps S, et al. Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat Med.* 1997; 3:1216-1221. PMID:9359695
24. Krag TOB, Bogdanovich S, Jensen CJ, Fischer MD, Hansen-Schwartz J, Javazon EH, et al.

Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:13856-13860. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405972101> PMID:15365169

25. Péladeau C, Ahmed A, Amirouche A, Crawford Parks TE, Bronicki LM, Ljubic V, et al. Combinatorial therapeutic activation with heparin and AICAR stimulates additive effects on utrophin A expression in dystrophic muscles. *Hum Mol Genet*. 2016; 25: 24-43. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv444> PMID:26494902

26. Amirouche A, Tadesse H, Lunde JA, Bélanger G, Côté J, Jasmin BJ. Activation of p38 signaling increases utrophin A expression in skeletal muscle via the RNA-binding protein KSRP and inhibition of AU-rich element-mediated mRNA decay: implications for novel DMD therapeutics. *Hum Mol Genet*. 2013; 22: 3093-3111. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt165> PMID:23575223

27. Tinsley J, Robinson N, Davies KE. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-arylbenzoxazole utrophin modulator, following single- and multiple-dose administration to healthy male adult volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2015; 55: 698-707. <https://doi.org/10.1002/jcph.468> PMID:25651188

28. Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997;90: 729-738. PMID: 9288752

29. Zhou L, Rafael-Fortney JA, Huang P, Zhao XS, Cheng G, Zhou X, et al. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci*. 2008; 264: 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.08.029> PMID:17889902

30. van Putten M, Kumar D, Hulsker M, Hoogaars WMH, Plomp JJ, van Opstal A, et al. Comparison of skeletal muscle pathology and motor function of dystrophin and utrophin deficient mouse strains. *Neuromuscul Disord NMD*. 2012; 22: 406-417. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.10.011> PMID:22284942

31. Connolly AM, Keeling RM, Mehta S, Pestronk A, Sanes JR. Three mouse models of muscular dystrophy: the natural history of strength and fatigue in dystrophin-, dystrophin/utrophin-, and laminin alpha2-deficient mice. *Neuromuscul Disord NMD*. 2001; 11: 703-712. PMID:11595512

32. Pant M, Sopariwala DH, Bal NC, Lowe J, Delfin DA, Rafael-Fortney J, et al. Metabolic dysfunction and altered mitochondrial dynamics in the utrophin-dystrophin deficient mouse model of duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2015; 10: e0123875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123875> PMID:25859846

33. Collins CA, Morgan JE. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol*. 2003; 84: 165-172. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2003.00354.x> PMID:14632630

34. Isaac C, Wright A, Usas A, Li H, Tang Y, Mu X, et al. Dystrophin and utrophin double knockout dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2013; 31: 343-349. <https://doi.org/10.1002/jor.22236> PMID:23097179

35. Gutpell KM, Hrinivich WT, Hoffman LM. Skeletal muscle fibrosis in the mdx/utrn^{+/-} mouse validates its suitability as a murine model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*. 2015; 10: e0117306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117306> PMID:25607927

36. Huang P, Cheng G, Lu H, Aronica M, Ransohoff RM, Zhou L. Impaired respiratory function in mdx and mdx/utrn (+/-) mice. *Muscle Nerve*. 2011; 43: 263-267. <https://doi.org/10.1002/mus.21848> PMID:21254093

37. McDonald AA, Hebert SL, Kunz MD, Ralles SJ, McLoon LK. Disease course in mdx:utrophin^{+/-} mice: comparison of three mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Physiol Rep*. 2015; 3. <https://doi.org/10.14814/phy2.12391> PMID:25921779

38. Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; 81: 1189-1192. PMID:6583703

39. Deconinck AE, Potter AC, Tinsley JM, Wood SJ, Vater R, Young C, et al. Postsynaptic abnormalities at the neuromuscular junctions of utrophin-deficient mice. *J Cell Biol*. 1997; 136: 883-894. PMID:9049253

40. 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 JoVE*. 2014; 51785. <https://doi.org/10.3791/51785> PMID: 25286313

41. Segal SS, Faulkner JA. Temperature-dependent physiological stability of rat skeletal muscle in vitro. *Am J Physiol*. 1985; 248: C265-270. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1985.248.3.C265>

PMID:3976876

42. Dufresne SS, Dumont NA, Bouchard P, Lavergne É, Penninger JM, Frenette J. Osteoprotegerin protects against muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 2015; 185: 920-926.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.006> PMID:25708645

43. Spurney CF, Gordish-Dressman H, Guerron AD, Sali A, Pandey GS, Rawat R, et al. Preclinical drug trials in the mdx mouse: assessment of reliable and sensitive outcome measures. *Muscle Nerve.* 2009;39: 591-602. <https://doi.org/10.1002/mus.21211> PMID:19260102

44. Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, De Luca A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis.* 2008; 31: 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.03.008> PMID:18499465

45. Lynch GS, Hinkle RT, Chamberlain JS, Brooks SV, Faulkner JA. Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *J Physiol.* 2001; 535: 591-600.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00591.x> PMID:11533147

46. Call JA, Ervasti JM, Lowe DA. TAT- μ Utrophin mitigates the pathophysiology of dystrophin and utrophin double-knockout mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2011; 111: 200-205.

<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00248.2011> PMID:21565990

47. Li D, Yue Y, Duan D. Marginal level dystrophin expression improves clinical outcome in a strain of dystrophin/utrophin double knockout mice. *PloS One.* 2010; 5: e15286.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015286> PMID:21187970

48. van Putten M, Hulsker M, Young C, Nadarajah VD, Heemskerk H, van der Weerd L, et al. Low dystrophin levels increase survival and improve muscle pathology and function in dystrophin/utrophin doubleknockout mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2013; 27: 2484-2495. <https://doi.org/10.1096/fj.12-224170> PMID:23460734

2.9 Figures. tables and legends

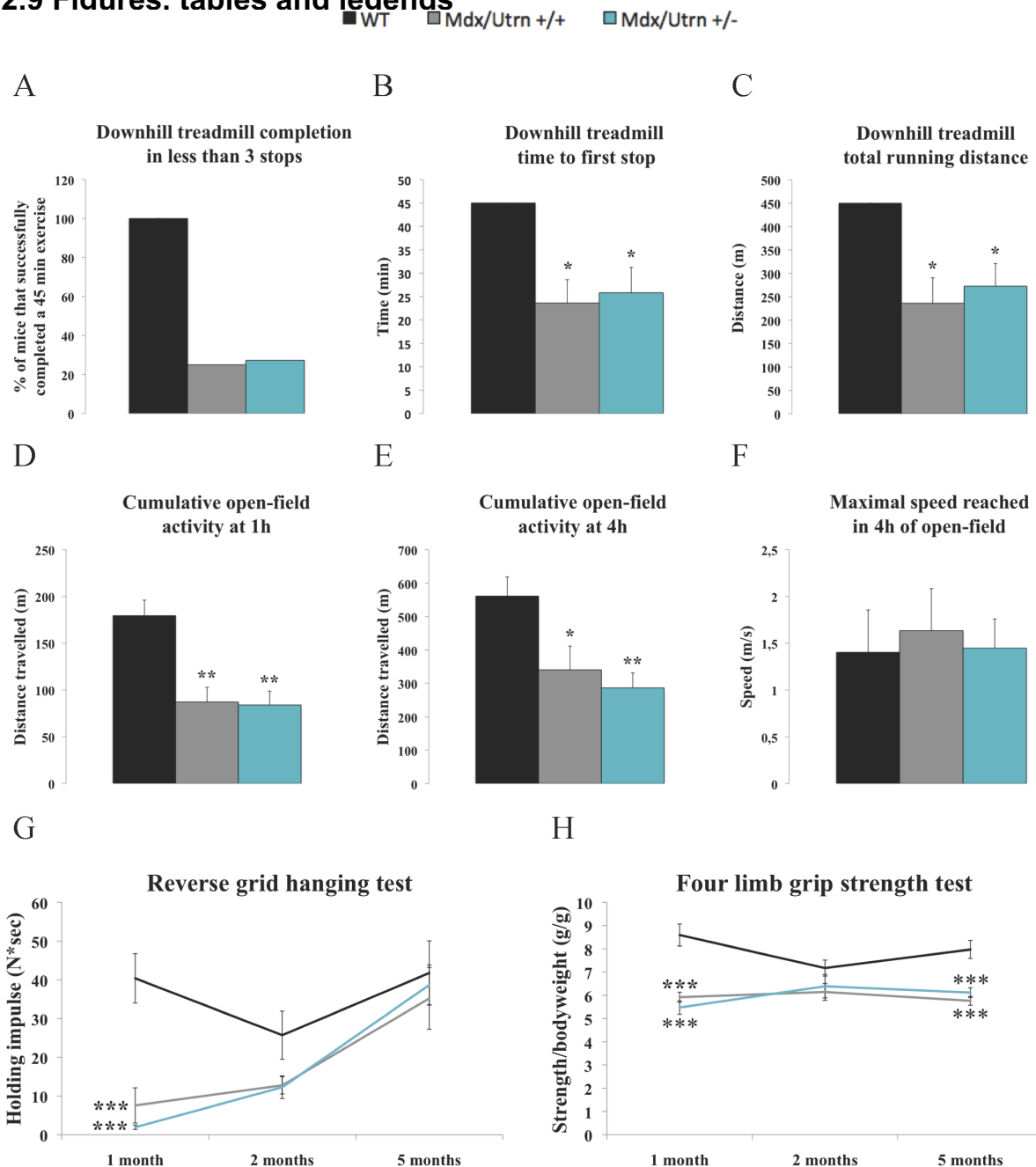


Fig 2.1 Functional performances of wild-type, mdx/utrn +/+, and mdx/utrn +/- mice. Five-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice have a significantly lower treadmill completion rate (A), time to first stop (B), total running distance (C), distance travelled at 1 h post-treadmill exercise (D,) and distance travelled at 4h post-treadmill exercise (E) than WT mice. The maximum speed reached by the three experimental groups was not significantly different during the 4 h openfield observation period (F). Hanging test performance was significantly lower in 1-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice (G). Four limb grip strength performance was also significantly lower in 1- and 5-month-old

mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- (H). Overall, utrophin haploinsufficiency in mdx mice did not induce a time-related deterioration of functional tasks relative to mdx/utrn+/+ mice. Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for comparisons between WT and mdx/utrn+/+ or mdx/utrn+/- mice; § $p < 0.05$ for comparisons between mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice; analysis of variance using Tukey's post hoc test. $n = 6-9$.

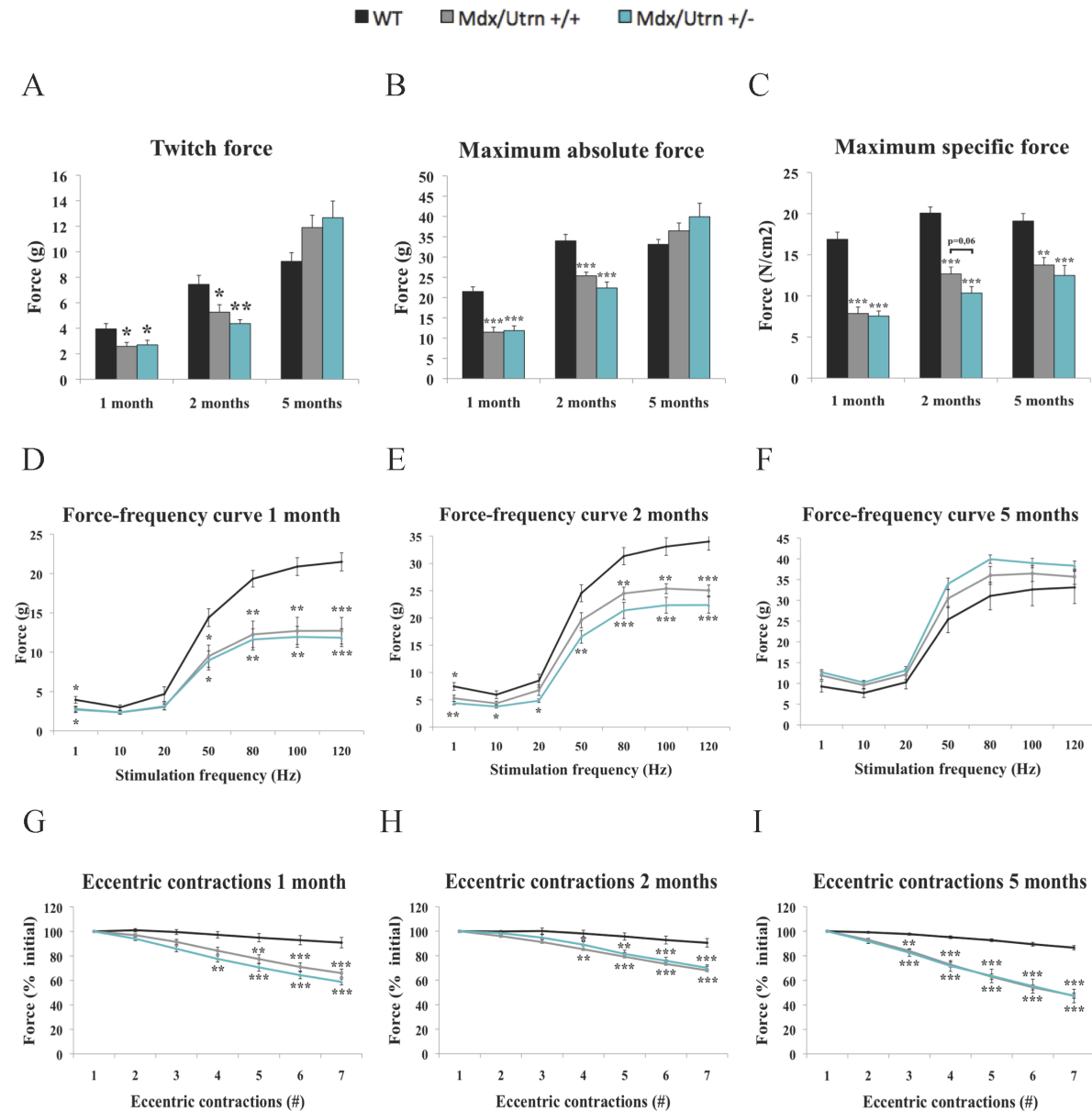


Fig 2.2 Ex vivo contractile properties and resistance to seven eccentric contractions of extensor digitorum longus muscles from wild-type, mdx/utrn+/+, and mdx/utrn+/- mice. The twitch (A) and absolute tetanic (B) forces of EDL muscles are significantly lower at 1 and 2 months of age in mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice compared to WT mice. In addition, the maximum specific force is significantly lower at 1, 2, and 5 months of age in mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice compared to WT mice. A tendency for the maximum

specific force to be lower in mdx/utrn+/- mice than in mdx/utrn+/+ mice can be seen at 2 months of age ($p = 0.06$). The force frequency curves of the EDL muscles show that there is a marked decrease in force production at 1 month of age in mdx/utrn+/+ and mdx utrn+/- mice, which is in agreement with the maximum absolute force results (D). The force frequency curves show that there is a progressive recovery of dystrophic EDL muscles at 2 months of age (E) and a full recovery at 5 months of age in mdx/utrn+/+ and mdx utrn+/- mice (F). All dystrophic muscles at all ages are vulnerable to *ex vivo* eccentric contractions (G,H,I). The contractile properties and the eccentric contraction results show that utrophin haploinsufficiency does not worsen the function of fast-twitch dystrophic EDL muscles, which is consistent with the functional performance results. Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for comparisons between WT and mdx/utrn+/+ or mdx/utrn+/- mice; § $p < 0.05$ for comparisons between mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice; analysis of variance with Tukey's post hoc test. n=6-12.

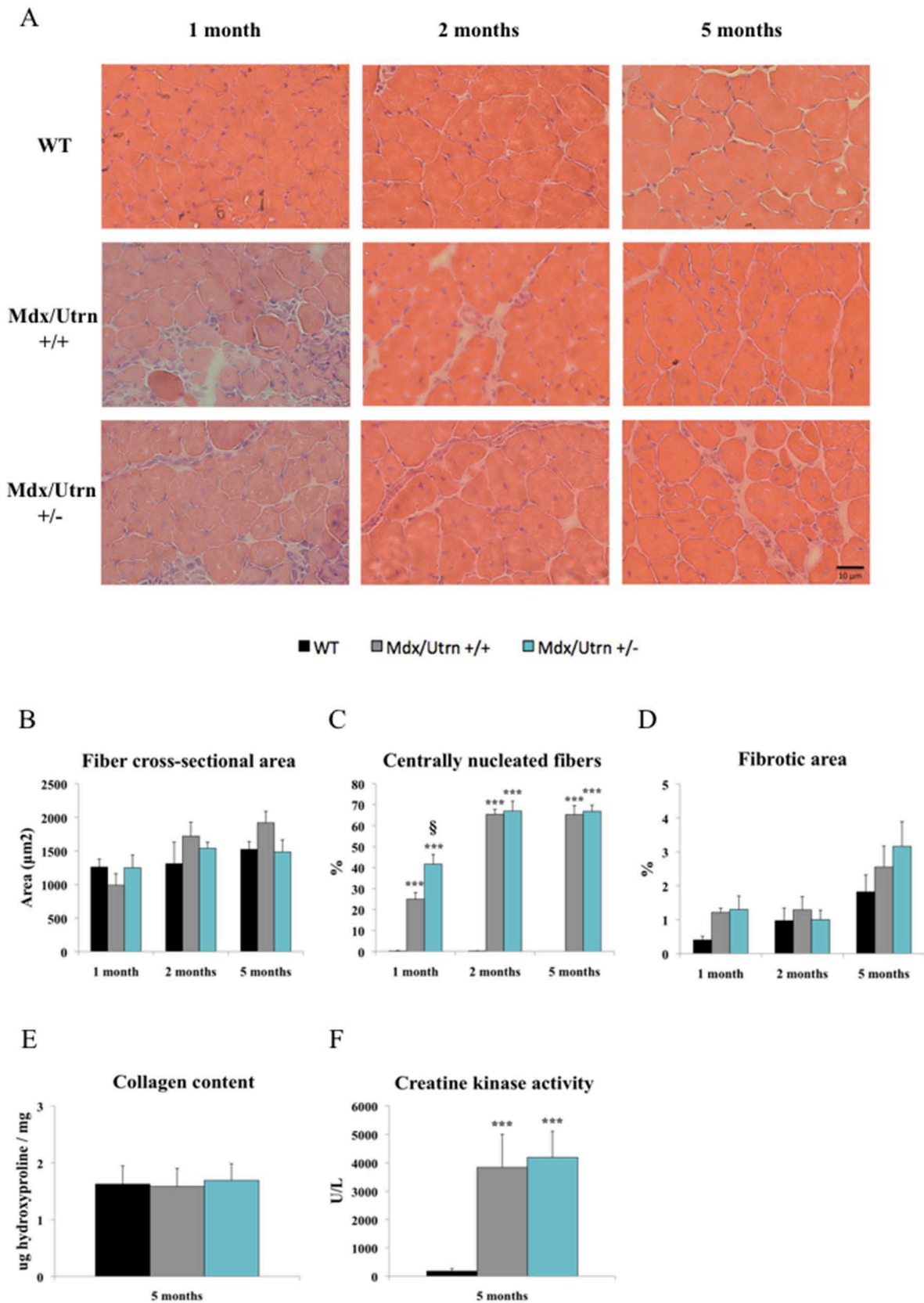
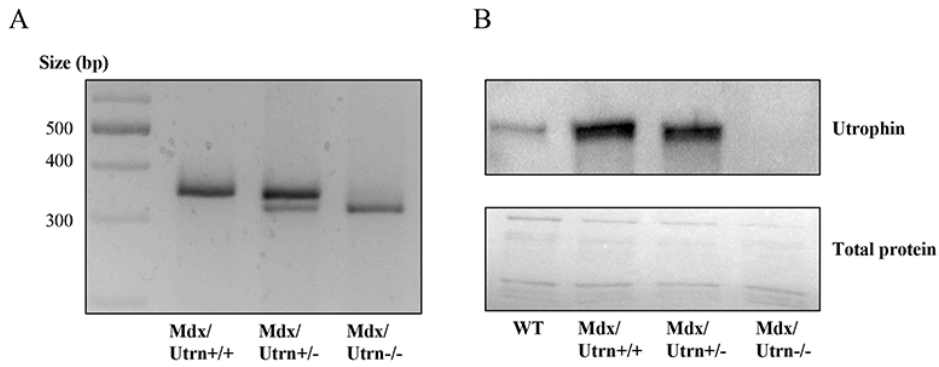


Fig 2.3 Histological, morphological and biochemical features of wild-type,

mdx/utrn+/+, and mdx/utrn+/- mice. H&E staining of EDL muscle sections from WT, mdx/utrn+/+, and mdx/utrn+/- mice at 1, 2, and 5 months of age (A). Fiber cross-sectional area measurements of EDL muscles show no significant fiber hypertrophy in mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice compared to WT mice (B) while the number of centrally nucleated fibers is significantly higher in mdx/utrn+/- mice at 1 month of age (C). Non-significant changes in the extent of fibrosis can be seen in any of the muscles tested at all ages using the fibrotic area calculation (D) or the whole muscle collagen content based on hydroxyproline content measurements at 5 months (E). Non-significant differences in the activity of creatine kinase were found between dystrophic mice at 5 months (F). Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for comparisons between WT and mdx/utrn+/+ or mdx/utrn+/- mice; § $p < 0.05$ for comparisons between mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice; analysis of variance with Tukey's post hoc test. n=4-9.

	1 Month			2 Months			5 Months		
	WT	Mdx/ Utrn+/+	Mdx/ Utrn+/-	WT	Mdx/ Utrn+/+	Mdx/ Utrn+/-	WT	Mdx/ Utrn+/+	Mdx/ Utrn+/-
Body weight (g)	18,63 \pm 0,32	19,25 \pm 0,53	18,38 \pm 1,07	24,54 \pm 0,67	25,88 \pm 0,64	26,63 \pm 0,65	31,00 \pm 0,78	34,21 \pm 0,79 **	34,00 \pm 0,49 *
EDL mass (mg)	6,39 \pm 0,19	6,99 \pm 0,31	7,69 \pm 0,42 *	9,87 \pm 0,30	11,36 \pm 0,58	12,20 \pm 0,81 *	9,78 \pm 0,42	15,58 \pm 0,93 ***	18,51 \pm 0,95 *** §
EDL mass/ body weight	0,34 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	0,42 \pm 0,01 ***§	0,41 \pm 0,01	0,44 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02	0,45 \pm 0,02 ***	0,54 \pm 0,03 *** §
EDL I0 (mm)	10,66 \pm 0,24	10,17 \pm 0,13	10,16 \pm 0,18	12,34 \pm 0,29	11,92 \pm 0,34	11,79 \pm 0,41	12,68 \pm 0,24	13,31 \pm 0,15	13,15 \pm 0,10

Table 2.1 Body weight and morphological characteristics of EDL muscles from wild-type, mdx/utrn+/+, and mdx/utrn+/- mice at 1, 2, and 5 months of age. EDL muscle mass is significantly higher in 1- and 2-month-old mdx/utrn+/- mice than in WT mice. The EDL mass/bodyweight ratio of 1-month-old mdx/utrn+/- mice is significantly higher than the ratios of 1-month-old mdx/utrn+/+ and WT mice. Five-month-old mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice have significantly higher bodyweights, EDL masses, and EDL mass/bodyweight ratios than WT mice. Five-month-old mdx/utrn+/- mice have a significantly higher EDL mass and mass/bodyweight ratio than mdx/utrn+/+ mice. Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ for comparisons between WT and mdx/utrn+/+ or mdx/utrn+/- mice § $p < 0.05$ for comparisons between mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- mice; analysis of variance, with Tukey's post hoc test. n=6-14.



Supporting information

S1 Fig. Representative genotyping data and utrophin protein level in EDL muscles of wild type, mdx/utrn+/+, mdx/utrn+/- and mdx/utrn-/- mice. PCR-based genotyping confirmation of utrophin alleles in mdx/utrn+/+, mdx/utrn+/- mice (A). Western blotting shows that utrophin protein level is increased in EDL muscles from mdx/utrn+/+ and mdx/utrn+/- compared to WT, and decreased in mdx/utrn+/- compared to mdx/utrn+/+ (B). As expected, utrophin is absent in mdx/utrn-/- EDL muscles. (TIFF)

**Chapitre 3 : Cibler l'unité muscle-os, faire d'une pierre
deux coups dans le traitement de la dystrophie
musculaire de Duchenne**

Titre original de l'article

Targeting the Muscle-Bone Unit: Filling Two Needs with One Deed in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy.

Antoine Boulanger Piette¹, Dounia Hamoudi¹, Laetitia Marcadet¹, Françoise Morin¹, Anteneh Argaw¹, Leanne Ward² & Jérôme Frenette^{1,3}

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

2 - Division of Endocrinology and Metabolism, Children's Hospital of Eastern Ontario (CHEO), University of Ottawa, Ottawa, ON K1H 8L1, Canada

3 - Département de Réadaptation, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, QC G1V 0A6, Canada

Published in : Current Osteoporosis Reports, Muscle and Bone, September 2018, 16(5):1-13. DOI: 10.1007/s11914-018-0468-2

Keywords : Duchenne muscular dystrophy, Muscle-bone, Crosstalk, Myokine, Osteokine, Osteoprotegerin

Résumé

La dysfonction et dégénération musculaire progressive dans la DMD est accompagnée d'une faible densité minérale et d'une fragilité osseuse. Les glucocorticoïdes, la norme de soins pour les patients vivant avec la DMD, augmentent le risque d'ostéoporose. Cette revue met l'accent sur la cohésion mutuelle et les sentiers signalétiques communs aux muscles et aux os dans la DMD. Les interactions muscle-os impliquent des ostéokines dérivées du tissu osseux, des myokines dérivées du tissu musculaire et des cytokines de double origine qui déclenchent de la signalisation menant à l'inflammation, la fibrose ou la synthèse/dégradation protéique. La triade RANK/RANKL/OPG inclut le récepteur-activateur de NF- κ B (RANK), son ligand (RANKL) et l'ostéoprotégérine (OPG), régulateurs du remodelage de la matrice osseuse et contributeur de la physiopathologie de la DMD. Cette revue discute des interactions muscle-os qui pourraient éventuellement mener au développement de drogues multifonctionnelles efficaces à traiter simultanément les problèmes musculaires et osseux dans la DMD.

Abstract

Purpose of Review : In Duchenne muscular dystrophy (DMD), the progressive skeletal and cardiac muscle dysfunction and degeneration is accompanied by low bone mineral density and bone fragility. Glucocorticoids, which remain the standard of care for patients with DMD, increase the risk of developing osteoporosis. The scope of this review emphasizes the mutual cohesion and common signaling pathways between bone and skeletal muscle in DMD. **Recent Findings :** The muscle-bone interactions involve bone-derived osteokines, muscle-derived myokines, and dual-origin cytokines that trigger common signaling pathways leading to fibrosis, inflammation, or protein synthesis/degradation. In particular, the triad RANK/RANKL/OPG including receptor activator of NF- κ B (RANK), its ligand (RANKL), along with osteoprotegerin (OPG), regulates bone matrix modeling and remodeling pathways and contributes to muscle pathophysiology in DMD. **Summary :** This review discusses the importance of the muscle bone unit in DMD and covers recent research aimed at determining the muscle-bone interactions that may eventually lead to the development of multifunctional and effective drugs for treating muscle and bone disorders regardless of the underlying genetic mutations in DMD.

3.1 Introduction

Skeletal muscle and bone form a large functional unit that enables locomotion and that contributes to metabolism, homeostasis, and thermogenesis [1, 2]. This muscle-bone unit adapts in synchrony during development and also during periods of modified mechanical loading such as exercise or situations of disuse or disease-like microgravity, long-duration bed rest, aging, spinal cord injury, critical illness, and neuromuscular diseases [3–7]. Duchenne muscular dystrophy (DMD) is one of the best examples of synchronicity where muscle degeneration/atrophy and bone loss occur in concert throughout the progression of the disease [8, 9]. Beyond the mechanostat theory, cumulative evidence also supports the existence of bi-directional muscle-bone molecular interactions [10–13]. Muscle and bone cytokines contribute to lifelong paracrine crosstalk while the underlying biological processes involve common signaling pathways [11–13].

3.2 Muscle and Skeletal Decline in DMD: the Scope of the Problem

DMD is a rare X-linked recessive disorder that occurs in 1:5000 live male births and is caused by loss-of-function mutations in the dystrophin gene [14, 15]. The absence of dystrophin in the cytoskeleton of skeletal muscle cells causes architectural fragility and sarcolemmal permeability, leading to chronic inflammation, fibrosis, and progressive skeletal and cardiac muscle deterioration [16]. Children with DMD generally display clinical signs of muscle weakness or motor dysfunction by 3–5 years of age, are wheelchair-bound by 12–15 years of age, and manifest cardiorespiratory failure in their late 20s or early 30s [17–22]. Patients with DMD also present with a high prevalence of fractures with a poor prognosis for recovery in the absence of osteoporosis therapy [8]. While long-term glucocorticoids (GCs), the standard of care for patients with DMD, prolong ambulation, cardiorespiratory function, and life expectancy, they are a key risk factor for reduced bone mineral density (BMD) and fractures due to their potent osteotoxicity [23–29]. Studies have shown that 20 to 60% of patients with DMD present low-trauma extremity fractures, while up to 30% have symptomatic vertebral fractures [8, 30–32]. The true prevalence of vertebral fractures is likely higher than this, since spine fractures are frequently asymptomatic and will go undetected in the absence of a routine spine imaging monitoring program [28, 33–35]. While vertebral fractures have been observed to occur on average 2 years following GC initiation, they have been reported as early as 6 months after the start of GC therapy [27]. In patients with DMD, untreated vertebral fractures are linked to

chronic back pain and spine deformity, while leg fractures can cause premature, irreversible loss of ambulation and challenges in daily care [27, 32]. To date, osteoporosis management in pediatric DMD is based on standard-of-care principles that are similar to those applied to all chronic pediatric illnesses. Treatment with an intravenous bisphosphonate such as pamidronate or zoledronic acid (preferred over oral bisphosphonate therapy) is reserved for patients with clinically significant bone fragility that is detected in early, as opposed to advanced, stages of development [36, 37]. The main objectives of osteoporosis therapy instituted at the earliest signs of bone fragility include resolution of back pain, stabilization of vertebral fractures, prevention of new vertebral and non-vertebral fractures, and increases in BMD Z-scores [38].

The importance of treating early signs of vertebral fractures in DMD is highlighted by the fact that prevalent vertebral fractures predict new vertebral fractures at subsequent time points, even when the initial vertebral fractures are mild or asymptomatic, a phenomenon known as the vertebral fracture cascade [39]. The importance of bone health in DMD children has also been underscored by a recent study showing that early treatment of osteoporosis may improve survival in DMD [40]. At the present time, there have been no studies which have been undertaken to assess the safety and efficacy of first fracture prevention in DMD; therefore, the current approach is in line with secondary prevention—to identify and treat early instead of late signs of bone fragility, including timely identification of vertebral fractures through periodic spine imaging [37, 41].

3.3 Muscle-Bone Interactions in Muscular Dystrophy

Our understanding of the mechanisms underlying dystrophic muscle and bone interactions originate predominantly from studies in mdx mice, a well-established DMD model. Seven week-old dystrophic mdx mice present an acute onset of muscle weakness associated with a 20% decrease in bone biomechanical properties compared to wild-type mice [42, 43]. Moreover, dystrophin-utrophin double-knockout mice, a more severe phenotype than the mdx mouse, exhibit muscle degeneration, spinal deformity, cardiomyopathy, a reduced capacity for bone healing, and spontaneous heterotopic ossification in the hindlimb muscles [44]. Nakagaki et al. found that 21-day-old mdx mice present changes in the mechanical and biochemical properties of bone prior to the appearance of significant muscle fiber degeneration, suggesting that the inflammatory environment of dystrophic

muscles (release of growth factors, interleukins, or other pro-inflammatory cytokines) may contribute to the uncoupling of osteoclastic and osteoblastic activity, eventually leading to osteopenia and osteoporosis [45, 46]. Nevertheless, not enough studies have been carried out to reach definitive conclusions on how muscle-bone interactions and muscle-derived molecules (myokines) and bone-derived molecules (osteokines) influence the course of muscular dystrophy.

3.4 Myokines and Their Effects on Bone Tissue in DMD

Myokines are interleukins, growth factors, or peptides released by skeletal muscles that may influence remote tissues such as bone (Fig. 1). Interleukin-6 (IL-6), which is often classified as a pro-inflammatory cytokine, is a crucial mediator of bone homeostasis and an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy [47, 48]. It is secreted by muscle and bone and is present at significant levels in patients with DMD and mdx mice compared with age-matched healthy controls [46, 49–51]. It has been shown that IL-6 contributes to GC- and rheumatoid arthritis-induced osteoporosis in mice [52, 53]. Rufo et al. demonstrated that wildtype calvarial bone cultures maintained *ex vivo* that are supplemented with 10% sera from mdx mice have increased osteoclast and bone resorption parameters that are rescued by an IL-6 antibody treatment [46]. Tocilizumab, a monoclonal antibody directed against the IL-6 receptor (IL-6R), is a potentially valuable therapeutic strategy for counteracting necrosis and the consequences of chronic inflammation in muscular dystrophy [53, 54]. It has been shown that IL-6R blockade results in decreased muscle damage, improved muscle fiber regeneration, increased muscle fiber diameter, and reduced fibrosis, while some mice exhibit an improvement in the kyphosis index [54]. Interestingly, IL-6 is significantly downregulated in the muscles of 24-week-old mdx mice with a mild muscle wasting phenotype, unlike in younger 4-week-old mice that overexpress IL-6 during the most severe peak of muscle degeneration and regeneration [51].

Consistent evidence has also shown that IL-6 has an anti-inflammatory effect and may be involved in mediating the beneficial health effects of exercise by increasing the levels of interleukin-10 (IL-10), an anti-inflammatory cytokine [55–57]. IL-10 plays a central role in regulating the switch of muscle macrophages from the pro-inflammatory M1 to the anti-inflammatory M2 phenotype in injured muscle *in vivo*, a transition that is necessary for

normal muscle growth and regeneration [58]. Levels of IL-10 and its receptor are higher in dystrophic muscles during the acute onset of the pathology and during muscle regeneration. In addition, the ablation of IL-10 expression in mdx mice (IL-10 $-/-$ mdx) increases muscle damage in vivo and reduces muscle strength in mice with chronic inflammation and severe cardiorespiratory dysfunction [59, 60]. However, in vitro treatments of isolated mdx macrophages with IL-10 reduce the activation of the M1 phenotype and promote a shift toward the M2c phenotype [59]. Interestingly, IL-10 $-/-$ mice develop the hallmarks of osteoporosis associated with a reduced expression of osteoblast and osteocyte markers [61–63]. Moreover, in vitro bone cells treated with IL-10 exhibit an upregulation of osteoprotegerin (OPG) expression associated with a downregulation of the expression of the receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) [64]. The strategy of inhibiting osteoporosis and enhancing the switch to the M2 anti-inflammatory phenotype in isolated mdx macrophages may be beneficial for the treatment of DMD.

Furthermore, interleukin-15 (IL-15) is another cytokine that is currently considered a myokine due to the abundant expression of IL-15 mRNA in skeletal muscle [65]. IL-15 induces muscle hypertrophy and protein synthesis in vitro, and IL-15 treatments partially inhibit skeletal muscle wasting in models of cancer cachexia and sepsis [66–68]. It is well established that IL-15 has a stimulatory function on osteoclast differentiation but can also decrease the number of both osteoclasts and osteoblasts in bone marrow cell cultures [69–71]. Interestingly, the release of IL-15 into the circulation by skeletal muscle tissue can modulate remote tissues and increase bone mineral content in vivo [72]. In terms of DMD, the administration of IL-15 improves the pathophysiology of dystrophic muscle, reducing fibrosis and collagen levels in the diaphragmatic muscles of mdx mice. However, its effect on bone health remains to be determined in the context of muscular dystrophy [73]. In addition, levels of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-17 (IL-17) and interleukin-1 (IL-1), which play key roles in bone homeostasis, have been shown to be elevated in dystrophic muscles, suggesting that other muscle-bone interactions may be in play [74–78]. Further investigations are needed to decipher the role of these ILs in DMD and the suitability of an approach based on IL modulation to treat muscle-bone disorders.

In addition to ILs, transforming growth factor β (TGF- β), a pleiotropic cytokine, plays an important role in muscle inflammation and fibrosis associated with DMD. It has been shown that TGF- β is activated in patients with DMD and mdx mice and induces

progressive fibrosis and that treatment with a neutralizing antibody directed against TGF- β 1 improves respiratory function and functional performance and decreases fibrosis and serum creatine kinase (CK) levels in mdx mice [79–82]. TGF- β also plays an important role in postnatal bone homeostasis. The release of TGF- β from the bone matrix under pathological conditions contributes to muscle weakness by increasing the oxidization of skeletal muscle proteins [83, 84]. Halofuginone, a collagen synthesis inhibitor, is a novel anti-fibrotic agent that prevents estrogen deficiency-induced osteoporosis [85]. In muscle diseases, halofuginone prevents the age-dependent increase in collagen synthesis in the diaphragm (Dia) muscle and the late outcome of dysferlin knockout mice and improves the cardiac muscle function of mdx mice [86, 87]. In addition, activin and myostatin are multifunctional growth factors belonging to the TGF- β superfamily. Activin/myostatin pathway antagonism may serve as a new therapeutic approach for countering muscle wasting and bone degeneration in disease. Myostatin null mice have approximately twice the skeletal muscle mass and a greater bone mineral content than wild-type mice [88]. Moreover, treatment with a soluble myostatin decoy receptor (ActRIIB-Fc) increases both muscle and bone mass in a mouse model of osteogenesis imperfecta [89]. A recent study showed that the systemic inhibition of the activin/myostatin pathway in mdx mice increases muscle mass, bone volume, and the trabecular number [90]. Nevertheless, it is not known whether the increase in bone volume following activin/myostatin inhibition is a direct effect or whether it occurs indirectly through an increase in muscle mass. However, recent evidence suggests that activin receptor signaling directly and negatively regulates bone mass by osteoblasts. Indeed, primary osteoblasts express activin signaling components, and the conditional knockout of the activin IIA receptor (ActRIIA) in osteoblasts increases the femoral trabecular bone volume in mice [91]. It has also been shown that soluble ActRIIA-Fc, which binds to circulating ligands such as activin A, decreases bone resorption and increases bone formation in monkeys and postmenopausal women [92]. Since myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and muscle mass and that there is a GC response element in the myostatin promoter, it is thus doubly important to discuss activin/myostatin in the context of GC-treated patients with DMD [93].

In addition to soluble ActRIIA-Fc, follistatin has emerged as a myostatin antagonist that can increase muscle mass and strength and is considered part of the muscle-bone crosstalk [10, 94]. It is a modulator of bone metabolism and development, possibly acting via activin and myostatin signaling [95]. Recent evidence has confirmed that follistatin has

a positive effect on regulating muscle and bone wasting associated with microgravity [94, 96]. In skeletal muscle, follistatin has a positive effect on muscle mass via myostatin and myostatin independent pathways, increasing muscle mass and enhancing regeneration following injury [97–99]. Interestingly, in dystrophic preclinical and clinical investigations, follistatin gene therapy reduced fibrosis and central nucleation, increased strength, and improved ambulation [100–102]. It is thus clear that myokines contribute to the regulation of bone and muscle mass and that investigating the mechanisms involved in the positive association between bone and muscle is important in the context of muscular dystrophy.

3.5 Osteokines and Their Effects on Muscle Tissue in DMD

Like muscle cells, bone cells release osteokines (Fig. 1) such as osteopontin (OPN), which is a well-known inhibitor of bone mineralization [103]. OPN is also expressed by inflammatory cells such as macrophages, and its expression increases significantly during inflammation [104]. Higher serum OPN levels are associated with low BMD in postmenopausal women and are significantly correlated with the phenotypic severity of dystrophic dogs [105, 106]. Interestingly, OPN promotes fibrosis and is the most highly upregulated transcript in dystrophic muscles [107, 108]. The ablation of OPN switches dystrophic macrophages toward a pro-regenerative phenotype, leading to reduced serum CK levels and improved muscle mass and strength based on the results of long-term functional testing [109]. However, the effects of OPN ablation on the bone quality of mdx mice have not been investigated.

Additionally, the canonical Wnt/ β -catenin pathway, which interacts with TGF- β , plays a pivotal role in regulating bone homeostasis, myogenesis, and postnatal muscle regeneration [110, 111]. Specifically, Wnt/ β -catenin signaling decreases osteoclast differentiation by stimulating the production and secretion of OPG [112]. TGF- β 1 stimulates myofibroblast differentiation and the fibrogenic features of satellite cells via the canonical Wnt pathway, potentially increasing fibrosis in dystrophic muscles [113]. However, treating mdx mice with Wnt7a efficiently induces satellite cell expansion and myofiber hypertrophy and improves the specific force of the extensor digitorum longus (EDL) muscle [114]. Interestingly, transplanting Wnt3a-pretreated mesenchymal stem cells (MSCs) into mdx mice results in long-term improvement in the dystrophic phenotype and restores dystrophin expression in muscles [115]. Sclerostin, which is mainly produced by

osteocytes, inhibits the Wnt/ β -catenin pathway. The sclerostin antibody (romosozumab) is currently under clinical investigation for the treatment of osteoporosis [116]. With respect to skeletal muscle, pharmacological inhibition of sclerostin does not rescue muscle mass loss in models of spinal cord injury and reduced mechanical loading [117, 118]. In contrast, Wnt signaling is also antagonized by the senescence-related protein Klotho [119]. Epigenetic silencing of Klotho, a co-receptor for fetal growth factor 23 (FGF23), occurs at the onset of pathology in the mdx mouse model of muscular dystrophy [120]. Consistently, Klotho expression is 80% lower in dystrophic muscle tissues from humans and mice during the first peak of muscle degeneration [120, 121]. In vivo, transgene expression of the klotho gene in mdx mice reduces TGF- β 1 expression and fibrosis in older mice, improves function, and greatly increases the pool of muscle-resident stem cells required for regeneration [120]. Klotho is also a potent regulator of bone formation and bone mass. Klotho deletion in osteocytes leads to a marked increase in bone formation, while the overexpression of Klotho in cultured osteoblastic cells inhibits mineralization and osteogenic activity [122]. Further investigations are thus needed to verify how wnt/ β -catenin pathway signaling may mediate muscle-bone crosstalk in DMD.

In concert with cytokines and growth factors, it is well documented that insulin growth factor-1 (IGF-1), a hormone secreted by skeletal muscle and bone tissues, is a crucial factor for the development of the musculoskeletal system [123]. IGF-1 therapy is a useful approach for treating osteoporosis and fractures due to its ability to increase bone mineral density and bone formation [124, 125]. In preclinical studies using mdx mice, IGF-1 treatments improved excitation-contraction coupling, reduced fibrosis, and increased force and fatigue resistance [126–129]. It has also been recently shown that IGF-1 enhances the anti-fibrotic effects of losartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker clinically investigated in DMD that antagonizes TGF- β signaling [130, 131], and increases locomotor function in merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A [132]. IGF-1 has been tested in clinical studies for various pathologies, and an open-label trial for patients with myotonic dystrophy type 1 showed that IGF-1 increases lean body mass and improves metabolism, but does not increase muscle strength or function [133, 134]. Similarly, a 6-month trial with IGF-1 in patients with DMD treated with GCs showed that it increased height velocity but had no effect on motor functional outcomes [135]. It remains to be seen how IGF-1 therapy could change the clinical landscape of DMD beyond stature management.

3.6 Treating the Bone-Muscle Complex with Single or Combined Drugs in DMD

Bisphosphonates such as pamidronate and zoledronic acid are a family of drugs used to increase bone mineral density and prevent fractures. These molecules bind specifically to calcium and remain sequestered in bone mineral, with a half-life of over 10 years. They inhibit osteoclast activity and osteoclastogenesis. Six-week-old mdx mice treated with pamidronate for 8 weeks displayed increased grip strength, improved muscle histology, and markedly reduced the levels of serum CK, a clinical marker for tissue damage [136]. The lack of effect in the Dia muscle suggests that pamidronate may act via a paracrine effect of adjacent bone tissues. Pamidronate also improves the cortical bone architecture and strength of femurs, increasing their resistance to fractures in mdx dystrophic mice [136]. Other experiments have confirmed that intravenous pamidronate protects against cortical bone loss in mdx femurs during prednisone treatment [137], as is currently a recommended treatment (along with other intravenous bisphosphonate agents) for bone protection in patients with DMD [37, 41]. Another clinical study showed that a combined treatment with steroids and bisphosphonates significantly increased the lifespan of patients with DMD compared to patients on steroids alone [40]. However, conventional steroid therapy is non-specific and acts on muscles and secondary sexual organs without discrimination and is hepatotoxic. A more targeted approach using non-steroidal androgen receptor (AR) modulators is currently being explored. The AR modulator GTx-026 increases muscle strength and muscle mass, improves cardiopulmonary functions, and reduces fibrosis [138]. AR agonists have a positive effect on growing bones [139, 140]. These results highlight the importance of androgens and a novel, potentially beneficial therapeutic approach using androgen receptor agonists. In addition, selective estrogen receptor modulators such as tamoxifen and raloxifene can be used to treat dystroglycanopathy, a different form of muscular dystrophy, giving additional support for the use of selective steroids for the treatment of muscular dystrophy [141].

Nitric oxide (NO) is another key biological messenger involved in vasodilation and various biological processes. NO is also important for muscle function and integrity and is impaired in dystrophin-deficient mice and humans. NO impairment causes vascular dysfunction and ischemic muscle damage [142–144]. A new therapeutic approach modulates the nitric

oxide-cyclic guanosine monophosphate (NO-cGMP) signaling pathway in muscular dystrophy. The inhibition of phosphodiesterase type 5 (PDE5) prolongs the half-life of cGMP and induces an angiogenic response [145]. Treating mdx mice with sildenafil or tadalafil, two PDE5 inhibitors, significantly reduces muscle damage, fibrosis, and weakness with no effect on fatigue resistance [146]. Sildenafil also acts on the expression of the pro-fibrotic and pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α) [146]. A study involving ten patients with DMD treated with sildenafil or tadalafil showed that sildenafil reduces ischemia and normalizes blood flow in dystrophic skeletal muscle during exercise that is dampened in boys with DMD [147], while tadalafil delays cardiomyopathy in dogs with muscular dystrophy [148]. Several animal studies have reported the positive effects of tadalafil and sildenafil on bone healing following fractures [149, 150]. Tadalafil was tested in a phase 3 randomized placebo-controlled 48-week trial in patients with DMD but the treatment did not delay the loss of ambulatory ability [151]. However, tadalafil and sildenafil have positive effects on skeletal muscle and bone and can prevent the adverse effects of bisphosphonate treatments in animal models [152]. Additional studies are required to determine whether this treatment can improve the health of patients with DMD and slow the progression of the disease.

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) is a key transcriptional factor that plays a central role in muscle degeneration, muscle atrophy, and osteolysis [153–155]. Targeting the NF- κ B pathway is thus a potential avenue for managing the muscle-bone complex in DMD. Vamorolone (VBP15) is a new glucocorticoid-derived molecule that has been optimized to inhibit NF- κ B. In vitro, VBP15 protects muscle cells against damage and stimulates membrane repair, while in dystrophic mdx mice, it enhances strength, improves the phenotype, and limits GC-related adverse effects [156]. Unlike GCs, VBP 15 maintains bone growth and density and reduces heart fibrosis in dystrophic mice [156]. Recent first-in-human phase I clinical trials in healthy adults indicated that ascending doses of vamorolone are well tolerated, as supported by bone and metabolic and immune biomarkers studies [157]. Edasalonexent (CAT-1004), another NF- κ B inhibitor, improves the activity, muscle mass, and function of dystrophic mice while reducing fibrosis and cardiac dysfunction [158]. A recent phase II clinical trial showed that edasalonexent reduces muscle edema and circulating CK levels and significantly improves functional performance [159]. The inhibition of NF- κ B is thus an important and promising target for the treatment of DMD.

3.7 RANK/RANKL/OPG and Muscular Dystrophy

Our most recent publications also support the hypothesis that the muscle-bone unit may be treatable with a single drug in DMD. The discovery of receptor activator of NF- κ B (RANK) and the RANK/RANKL/OPG triad, which is part of the TNF superfamily, was a major breakthrough in bone biology 20 years ago [160]. RANKL is secreted by osteoblasts while RANK, its receptor, is located on pre-osteoclastic cells. The RANKL/RANK interaction induces the formation of multinucleated mature osteoclasts, ultimately leading to bone resorption and remodeling [161]. The third contributor, OPG, is also produced by osteoblasts and binds to RANKL, inhibiting the RANKL/RANK interaction and subsequent osteoclastogenesis [162]. The fact that OPG-null mice suffer from osteoporosis and that the overexpression of OPG or the injection of high doses of exogenous OPG induce osteopetrosis-like changes highlights the physiological relevance of OPG [163–165]. OPG also serves as a decoy receptor for the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and increases cell survival by blocking the pro-apoptotic effects of the RANKL/RANK interaction [166]. OPG is thus a very efficient anti-resorptive and anti-apoptotic agent.

Additionally, RANK, RANKL, and OPG mRNAs are present in skeletal muscle, and RANKL/OPG proteins are found in the myoplasm [167–169]. We showed that RANK is expressed in sarcolemmal membranes and may thus potentially interact with bone-derived RANKL [170]. In addition, we showed that fully differentiated myotubes secrete OPG, supporting bi-directional signaling between bone and muscle [171]. In osteoclasts, the RANKL/RANK interaction activates the Ca^{2+} -dependent and TNF receptor-associated factor (TRAF) TRAF/NF- κ B signaling pathways, which are dysregulated in DMD [158, 160, 172–178].

Using muscle-specific RANK receptor deletion, we showed that muscle RANK is a regulator of Ca^{2+} storage and sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity and function in fast-twitch EDL skeletal muscles [170]. Furthermore, muscle-specific RANK deletion has inotropic effects in denervated EDL muscles, increasing the maximum specific force production while inducing slight muscle atrophy [170]. As the RANK/RANKL pathway is important in Ca^{2+} regulation, and as mdx dystrophic mice present a

dysregulation of Ca^{2+} homeostasis, we treated dystrophic mice with full-length OPG linked to an Fc fragment (FL-OPG-Fc), the natural inhibitor of RANKL. We showed that the FL-OPG-Fc treatment greatly reduces the inflammation, restores the integrity, and improves the function of dystrophic EDL muscles during the first and most important phase of muscle degeneration [171]. FL-OPG-Fc also significantly improves the function of slow-twitch soleus (Sol) and Dia dystrophic muscles, albeit to a lesser extent [171]. Interestingly, FL-OPG-Fc does not enhance the force of healthy wild-type skeletal muscles, suggesting that, like muscle-specific RANK deletion, an underlying pathology or dysfunction is required to exert its beneficial effect [170, 171].

We next dissected out the contribution of RANK/RANKL/OPG in dystrophic muscles using genetic and pharmacological approaches and showed that RANK mRNA levels are fivefold higher in dystrophic EDL muscles. A recent study showed that the levels of several members of the TNF receptor family are significantly elevated in mdx mice serum, including the RANK protein, suggesting that it may be involved in muscular dystrophy [179, 180]. To examine the involvement of RANK in dystrophic skeletal muscle, we generated mdx mice with a muscle-specific RANK deletion. The deletion of muscle RANK significantly improves the force of dystrophic EDL muscles but has no protective effects against eccentric contraction induced muscle dysfunction. These data indicate that the RANK/RANKL/OPG pathway may play a role in dystrophic muscle pathophysiology.

Alternatively, daily FL-OPG-Fc injections for 10 days increase the maximal specific force of dystrophic EDL muscles, markedly protect against eccentric contraction-induced muscle dysfunction *ex vivo*, and significantly improve functional performance on an eccentric downhill treadmill and on traveling distance post-exercise [179]. Since OPG serves as a soluble receptor for RANKL and as a decoy receptor for TRAIL, we treated mdx mice with anti-RANKL and anti-TRAIL antibodies and showed that they significantly increase the force of dystrophic EDL muscles, but to a much lesser extent than FL-OPG-Fc [179]. Truncated OPG-Fc, which only contains RANKL domains, produced modest but significant gains of force, suggesting that RANK-independent mechanisms are also in play [179]. In dystrophic muscles, SERCA overexpression reduces susceptibility to eccentric contraction-induced muscle damage, while intrinsic laryngeal muscles that overexpress SERCA are spared from muscular dystrophy [181, 182]. In mdx muscles, an FL-OPG-Fc treatment, but not muscle-specific RANK deletion, almost completely restores SERCA

activity, providing evidence that FL-OPG-Fc may rescue Ca^{2+} cycling/homeostasis through a SERCA-dependent mechanism [179]. To confirm that FL-OPG-Fc also acts independently of the RANK/RANKL pathway, mdx mice with a muscle-specific RANK deletion were treated with FL-OPG-Fc and exhibited a significant gain in force, indicating that the effect of FL-OPG-Fc is in part independent of the RANKL/RANK interaction [179]. Investigations are currently underway to understand the RANKL-independent mechanisms of action of FL-OPG-Fc. Since FL-OPG-Fc may protect skeletal muscles and bones simultaneously, it may be a promising therapeutic candidate alone or in combination with the current standard of care for DMD. Although anti-RANKL does not protect against eccentric contractions, our data point to a role for RANK/RANKL in muscular dystrophy. Thus, denosumab, an anti-RANKL antibody that is already prescribed for osteoporosis, GC-induced osteoporosis, and bone metastases, may be of benefit for patients with DMD [183], as shown in a recent case report where 18 months of denosumab therapy improved lumbar bone mineral density and bone turnover markers in a GC-treated boy with DMD [184].

3.8 Conclusion

In addition to muscle dysfunctions, low bone mineral density and bone fragility have been documented in various muscular dystrophies, including DMD, with debilitating comorbidities [5, 19, 36, 185, 186]. The bone weakness observed in DMD is partly caused by the decline in locomotion, the chronic use of GCs, and the changes in muscle-bone bi-directional molecular interactions highlighted in the present review. These muscle-bone crosstalks involve bone-derived osteokines, muscle-derived myokines, and dual-origin cytokines that act on common signaling pathways, including inflammation, fibrosis, catabolism, anabolism, angiogenesis, and calcium homeostasis. Given the delays in developing genetic approaches to restore dystrophin expression and function, strategies to target common signaling pathways involved in muscle and bone diseases are an important short-term approach for treating DMD. These novel drugs can be explored on their own, to target the dystrophinopathy with the goal to also provide benefit to bone, or as a complementary adjunct to muscle-targeted therapies in order to counteract the negative effects of GCs on bone. Lastly, further investigations are obviously needed to validate muscle-bone interactions and to focus on crosstalk-based approaches that can protect both bone and skeletal muscle, with the ultimate goal of improving quality of life, and life

expectancy in DMD.

Funding Information : This work was supported by the Ryan's Quest foundation, Jesse's Journey, and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

Conflict of Interest : Leanne Ward reports participating in clinical trials with AMGEN. Jérôme Frenette has a patent issued (20180064810). Laetitia Marcadet, Anteneh Argaw, Antoine Boulanger Piette, Françoise Morin, and Dounia Hamoudi declare no conflict of interest.

Human and Animal Rights and Informed Consent : This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

Abbreviations : ActRIIA, activin IIA receptor; ActRIIB-Fc, soluble myostatin decoy receptor; AR, androgen receptor; BMD, bone mineral density; CK, creatine kinase; DMD, Duchenne muscular dystrophy; EDL, extensor digitorum longus; FGF-23, fibroblast growth factor 23; FL-OPG-Fc, full-length osteoprotegerin linked to a Fc fragment; GC (s), glucocorticoid (s); IGF-1, insulin growth factor 1; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; IL-6R, interleukin-6 receptor; IL-10, interleukin-10; IL-10 ^{-/-} mdx, ablation of IL-10 expression in mdx mice; IL-15, interleukin-15; IL-17, interleukin-17; MSCs, mesenchymal stem cells; NO, nitric oxide; NO-cGMP, nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate; OPG, osteoprotegerin; OPN, osteopontin; PDE-5, phosphodiesterase type 5; RANK, receptor activator of NF- κ B; RANKL, receptor activator of NF- κ B ligand; SERCA, sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; Sol, soleus; TGF- β , transforming growth factor β ; TNF- α , tumor necrosis factor α ; TRAF, TNF receptor-associated factor; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; VBP15, vamorolone

3.9 References

- Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as: • Of importance
1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 2015;96:183–95. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>.
 2. Florencio-Silva R, Sasso da Silva GR, 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. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>. *Curr Osteoporos Rep*
 3. Hamrick MW, Ding K-H, Pennington C, Chao YJ, Wu Y-D, Howard B, et al. Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone.* 2006;39:845–53. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.04.011>.

4. Owen HC, Vanhees I, Gunst J, Van Cromphaut S, Van den Berghe G. Critical illness-induced bone loss is related to deficient autophagy and histone hypomethylation. *Intensive Care Med Exp*. 2015;3:52. <https://doi.org/10.1186/s40635-015-0052-3>.
5. Ness K, Apkon SD. Bone health in children with neuromuscular disorders. *J Pediatr Rehabil Med*. 2014;7:133–42. <https://doi.org/10.3233/PRM-140282>.
6. Russo CR. The effects of exercise on bone. Basic concepts and implications for the prevention of fractures. *Clin Cases Miner Bone Metab Off J Ital Soc Osteoporos Miner Metab Skelet Dis*. 2009;6:223–8.
7. McKay H, Smith E. Winning the battle against childhood physical inactivity: the key to bone strength? *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2008;23:980–5. <https://doi.org/10.1359/jbmr.080306>.
8. McDonald DGM, Kinali M, Gallagher AC, Mercuri E, Muntoni F, Roper H, et al. Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 2002;44:695–8.
9. Joyce NC, Hache LP, Clemens PR. Bone health and associated metabolic complications in neuromuscular diseases. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2012;23:773–99. <https://doi.org/10.1016/j.pmr.2012.08.005>.
10. Maurel DB, Jähn K, Lara-Castillo N. Muscle-bone crosstalk: emerging opportunities for novel therapeutic approaches to treat musculoskeletal pathologies. *Biomedicine*. 2017;5 <https://doi.org/10.3390/biomedicine5040062>.
11. Brotto M, Johnson ML. Endocrine crosstalk between muscle and bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2014;12:135–41. <https://doi.org/10.1007/s11914-014-0209-0>.
12. Karsenty G, Mera P. Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle. *Bone* 2017; <https://doi.org/10.1016/j.bone.2017.04.006>.
13. Brotto M, Bonewald L. Bone and muscle: interactions beyond mechanical. *Bone*. 2015;80:109–14. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.010>.
14. Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscul Disord NMD*. 1991;1:19–29.
15. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987;51:919–28.
16. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol*. 2007;36:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016>.
17. Ciafaloni E, Fox DJ, Pandya S, Westfield CP, Puzhankara S, Romitti PA, et al. Delayed diagnosis in duchenne muscular dystrophy: data from the muscular dystrophy surveillance, tracking, and research network (MD STARnet). *J Pediatr*. 2009;155:380–5. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.02.007>.
18. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 2010;9:77–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6).
19. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol*. 2010;9:177–89. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70272-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70272-8).
20. Connolly AM, Florence JM, Craddock MM, Malkus EC, Schierbecker JR, Siener CA, et al. Motor and cognitive assessment of infants and young boys with Duchenne muscular dystrophy: results from the Muscular Dystrophy Association DMD Clinical Research Network. *Neuromuscul Disord NMD*. 2013;23:529–39. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.04.005>.
21. Bello L, Gordish-Dressman H, Morgenroth LP, Henricson EK, Duong T, Hoffman EP, et al. Prednisone/prednisolone and deflazacort regimens in the CINRG Duchenne natural history study. *Neurology*. 2015;85:1048–55. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001950>.
22. McDonald CM, Abresch RT, Carter GT, Fowler WM, Johnson ER, Kilmer DD, et al. Profiles of neuromuscular diseases. Duchenne muscular dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil*. 1995;74:S70–92.
23. BiggarWD, Politano L, Harris VA, Passamano L, Vajsar J, Alman B, et al. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul Disord NMD*. 2004;14:476–82. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.05.001>.
24. BiggarWD, Harris VA, Eliasoph L, Alman B. Long-term benefits of deflazacort treatment for boys

- with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul Disord* NMD. 2006;16: 249–55. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.01.010>.
25. Biggar WD, Gingras M, Fehlings DL, Harris VA, Steele CA. Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr*. 2001;138:45–50. <https://doi.org/10.1067/mpd.2001.109601>.
26. Tian C, Wong BL, Hornung L, Khoury JC, Miller L, Bange J, et al. Bone health measures in glucocorticoid-treated ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* NMD. 2016;26:760–7. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.08.011>.
27. Ma J, McMillan HJ, Karagüzel G, Goodin C, Wasson J, Matzinger MA, et al. The time to and determinants of first fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2017;28:597–608. <https://doi.org/10.1007/s00198-016-3774-5>.
28. LeBlanc CMA, Ma J, Taljaard M, Roth J, Scuccimarri R, Miettunen P, et al. Incident vertebral fractures and risk factors in the first three years following glucocorticoid initiation among pediatric patients with rheumatic disorders. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2015;30:1667–75. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2511>.
29. Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur AY. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016; CD003725. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003725.pub4>
30. van Staa TP, Leufkens HGM, Cooper C. The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2002;13:777–87. <https://doi.org/10.1007/s001980200108>.
31. King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, Matkovic V, Landoll J, Hoyle C, et al. Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2007;68:1607–13. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260974.41514.83>.
32. Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*. 2000;20:71–4.
33. Alos N, Grant RM, Ramsay T, Halton J, Cummings EA, Miettunen PM, et al. High incidence of vertebral fractures in children with acute lymphoblastic leukemia 12 months after the initiation of therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012;30:2760–7. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.40.4830>.
34. Cummings EA, Ma J, Fernandez CV, Halton J, Alos N, Miettunen PM, et al. Incident vertebral fractures in children with leukemia during the four years following diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100:3408–17. <https://doi.org/10.1210/JC.2015-2176>.
35. Rodd C, Lang B, Ramsay T, Alos N, Huber AM, Cabral DA, et al. Incident vertebral fractures among children with rheumatic disorders 12 months after glucocorticoid initiation: a national observational study. *Arthritis Care Res*. 2012;64:122–31. <https://doi.org/10.1002/acr.20589>.
36. Ward LM, Konji VN, Ma J. The management of osteoporosis in children. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2016;27:2147–79. <https://doi.org/10.1007/s00198-016-3515-9>.
37. • Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Alman BA, Apkon SD, Blackwell A, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol*. 2018;17:347–61. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30025-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30025-5). The current standard of care is to identify and treat early, rather than late, signs of bone fragility with the use of intravenous bisphosphonate therapy, which is preferred over oral agents. Given the high frequency of low-trauma fractures in DMD, clinical trials designed to prevent first-ever fractures in DMD are now warranted.
38. Sbrocchi AM, Rauch F, Jacob P, McCormick A, McMillan HJ, Matzinger MA, et al. 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;23:2703–11. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-1911-3>.
39. Christiansen BA, Bouxsein ML. Biomechanics of vertebral fractures and the vertebral fracture cascade. *Curr Osteoporos Rep*. 2010;8:198–204. <https://doi.org/10.1007/s11914-010-0031-2>.
40. Gordon KE, Dooley JM, Sheppard KM, MacSween J, Esser MJ. Impact of bisphosphonates on survival for patients with Duchenne muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2011;127:e353–8. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-1666>.
41. Ward LM, Hadjiyannakis S, McMillan HJ, Weber DR. Diagnosis and management of

osteoporosis in glucocorticoid-treated duchenne Muscular dystrophy. *Pediatrics*. 2018.

42. Novotny SA, Warren GL, Lin AS, Guldborg RE, Baltgalvis KA, Lowe DA. Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. *Neuromuscul Disord NMD*. 2011;21:183–93. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.12.002>.

43. Reed P, Bloch RJ. Postnatal changes in sarcolemmal organization in the mdx mouse. *Neuromuscul Disord NMD*. 2005;15:552–61. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2005.03.007>.

44. Isaac C, Wright A, Usas A, Li H, Tang Y, Mu X, et al. Dystrophin and utrophin “double knockout” dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2013;31:343–9. <https://doi.org/10.1002/jor.22236>.

45. Nakagaki WR, Bertran CA, Matsumura CY, Santo-Neto H, Camilli JA. Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of mdx mice. *Bone*. 2011;48:372–9. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.09.011>.

46. Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, et al. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011;26:1891–903. <https://doi.org/10.1002/jbmr.410>.

47. Blanchard F, Duplomb L, Baud’huin M, Brounais B. The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20:19–28. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.11.004>.

48. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab*. 2008;7:33–44. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.011>.

49. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol Baltim Md*. 1950–1990;145:3297–303.

50. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double edged sword? *FEBS J*. 2013;280:4131–48. <https://doi.org/10.1111/febs.12338>.

51. Pelosi L, Berardinelli MG, Forcina L, Spelta E, Rizzuto E, Nicoletti C, et al. Increased levels of interleukin-6 exacerbate the dystrophic phenotype in mdx mice. *Hum Mol Genet*. 2015;24:6041–53. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv323>.

52. Li X, Zhou Z-Y, Zhang Y-Y, Yang H-L. IL-6 contributes to the defective osteogenesis of bone marrow stromal cells from the vertebral body of the glucocorticoid-induced osteoporotic mouse. *PLoS One*. 2016;11:e0154677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154677>.

53. Edwards CJ, Williams E. The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2010;21:1287–93. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1192-7>.

54. Wada E, Tanihata J, Iwamura A, Takeda S, Hayashi YK, Matsuda R. Treatment with the anti-IL-6 receptor antibody attenuates muscular dystrophy via promoting skeletal muscle regeneration in dystrophin-/utrophin-deficient mice. *Skelet Muscle*. 2017;7:23. <https://doi.org/10.1186/s13395-017-0140-z>. Treatment with an anti-IL-6 receptor antibody attenuates muscular dystrophy and promotes skeletal muscle regeneration in dystrophin/utrophin-deficient mice.

55. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Møller K, Pedersen BK. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285:E433–7. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00074.2003>.

56. Przybyla B, Gurley C, Harvey JF, Bearden E, Kortebein P, Evans WJ, 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. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.12.007>.

57. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md*. 1985.2005;98:1154–62. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00164.2004>.

58. Deng B, Wehling-Henricks M, Villalta SA, Wang Y, Tidball JG. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J Immunol Baltim Md*. 1950.2012;189:3669–80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103180>.

59. Villalta SA, Rinaldi C, Deng B, Liu G, Fedor B, Tidball JG. Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum Mol Genet*. 2011;20:790–805. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq523>.

60. Nitahara-Kasahara Y, Hayashita-Kinoh H, Chiyo T, Nishiyama A, Okada H, Takeda S, et al. Dystrophic mdx mice develop severe cardiac and respiratory dysfunction following genetic ablation

- of the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Hum Mol Genet.* 2014;23:3990–4000.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddu113>.
61. Al-Rasheed A, Scheerens H, Srivastava AK, Rennick DM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: late onset. *J Periodontol Res.* 2004;39:194–8.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00724.x>.
62. Dresner-Pollak R, Gelb N, Rachmilewitz D, Karmeli F, Weinreb M. Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology.* 2004;127:792–801.
63. Claudino M, Garlet TP, Cardoso CRB, de Assis GF, Taga R, Cunha FQ, et al. Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. *Eur J Oral Sci.* 2010;118:19–28.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00706.x>.
64. Liu D, Yao S, Wise GE. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:42–9.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00283.x>.
65. Huang P-L, Hou M-S, Wang S-W, Chang C-L, Liou Y-H, Liao NS. Skeletal muscle interleukin 15 promotes CD8(+) T-cell function and autoimmune myositis. *Skelet Muscle.* 2015;5:33.
<https://doi.org/10.1186/s13395-015-0058-2>.
66. Kim HC, Cho H-Y, Hah Y-S. Role of IL-15 in Sepsis-induced skeletal muscle atrophy and proteolysis. *Tuberc Respir Dis.* 2012;73:312–9. <https://doi.org/10.4046/trd.2012.73.6.312>.
67. Quinn LS, Anderson BG, Drivdahl RH, Alvarez B, Argilés JM. Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: implications for treatment of muscle wasting disorders. *Exp Cell Res.* 2002;280:55–63.
68. Carbó N, López-Soriano J, Costelli P, Busquets S, Alvarez B, Baccino FM, et al. Interleukin-15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats. *Br J Cancer.* 2000;83:526–31.
<https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1299>.
69. Takeda H, Kikuchi T, Soboku K, Okabe I, Mizutani H, Mitani A, et al. Effect of IL-15 and natural killer cells on osteoclasts and osteoblasts in a mouse coculture. *Inflammation.* 2014;37:657–69.
<https://doi.org/10.1007/s10753-013-9782-0>.
70. Iseme RA, Mcevoy M, Kelly B, Agnew L, Walker FR, Attia J. Is osteoporosis an autoimmune mediated disorder? *Bone Rep.* 2017;7:121–31. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2017.10.003>.
71. Ogata Y, Kukita A, Kukita T, Komine M, Miyahara A, Miyazaki S, et al. A novel role of IL-15 in the development of osteoclasts: inability to replace its activity with IL-2. *J Immunol Baltim Md.* 1950.1999;162:2754–60.
72. Quinn LS, Anderson BG, Strait-Bodey L, Stroud AM, Argilés JM. Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296:E191–202.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.90506.2008>.
73. Harcourt LJ, Holmes AG, Gregorevic P, Schertzer JD, Stupka N, Plant DR, et al. Interleukin-15 administration improves diaphragm muscle pathology and function in dystrophic mdx mice. *Am J Pathol.* 2005;166:1131–41. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62333-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62333-4).
74. De Paepe B, De Bleecker JL. Cytokines and chemokines as regulators of skeletal muscle inflammation: presenting the case of Duchenne muscular dystrophy. *Mediat Inflamm.* 2013;2013:540370. <https://doi.org/10.1155/2013/540370>.
75. Lee Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. *BMB Rep.* 2013;46:479–83.
76. Lee Y-M, Fujikado N, Manaka H, Yasuda H, Iwakura Y. IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions. *Int Immunol.* 2010;22:805–16.
<https://doi.org/10.1093/intimm/dxq431>.
77. De Pasquale L, D'Amico A, Verardo M, Petrini S, Bertini E, De Benedetti F. Increased muscle expression of interleukin-17 in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2012;78:1309–14.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182518302>.
78. Cruz-Guzmán ODR, Rodríguez-Cruz M, Escobar Cedillo RE. Systemic inflammation in Duchenne muscular dystrophy: association with muscle function and nutritional status. *Biomed Res Int.* 2015;2015:891972. <https://doi.org/10.1155/2015/891972>.
79. Nelson CA, Hunter RB, Quigley LA, Girgenrath S, Weber WD, McCullough JA, et al. Inhibiting TGF- β activity improves respiratory function in mdx mice. *Am J Pathol.* 2011;178:2611–21.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.024>.

80. Chen Y-W, Nagaraju K, Bakay M, McIntyre O, Rawat R, Shi R, et al. Early onset of inflammation and later involvement of TGF beta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2005;65:826–34. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000173836.09176.c4>.
81. Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, Ferro P, Oliva L, Arnoldi E, et al. Immunomodulation of TGF-beta 1 in mdx mouse inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: implications for antifibrotic therapy. *J Neuroimmunol*. 2006;175:77–86. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.03.005>.
82. Ceco E, McNally EM. Modifying muscular dystrophy through transforming growth factor-β. *FEBS J*. 2013;280:4198–209. <https://doi.org/10.1111/febs.12266>.
83. Wu M, Chen G, Li Y-P. TGF-β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*. 2016;4:16009. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.9>.
84. Waning DL, Mohammad KS, Reiken S, Xie W, Andersson DC, John S, et al. Excess TGF-β mediates muscle weakness associated with bonemetastases in mice. *NatMed*. 2015;21:1262–71. <https://doi.org/10.1038/nm.3961>.
85. Deselm CJ, Zou W, Teitelbaum SL. Halofuginone prevents estrogen-deficient osteoporosis in mice. *J Cell Biochem*. 2012;113:3086–92. <https://doi.org/10.1002/jcb.24185>.
86. Halevy O, Genin O, Barzilai-Tutsch H, Pima Y, Levi O, Moshe I, et al. Inhibition of muscle fibrosis and improvement of muscle histopathology in dysferlin knock-out mice treated with halofuginone. *Histol Histopathol*. 2013;28:211–26. <https://doi.org/10.14670/HH-28.211>.
87. Turgeman T, Hagai Y, Huebner K, Jassal DS, Anderson JE, Genin O, et al. Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul Disord NMD*. 2008;18:857–68. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2008.06.386>.
88. Hamrick MW. Increased bone mineral density in the femora of GDF8 knockout mice. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2003;272:388–91. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10044>.
89. DiGirolamo DJ, Singhal V, Chang X, Lee S-J, Germain-Lee EL. Administration of soluble activin receptor 2B increases bone and muscle mass in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Bone Res*. 2015;3:14042. <https://doi.org/10.1038/boneres.2014.42>.
90. Puolakainen T, Ma H, Kainulainen H, Pasternack A, Rantalainen T, Ritvos O, et al. Treatment with soluble activin type IIB-receptor improves bone mass and strength in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18:20. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1366-3>.
91. Goh BC, Singhal V, Herrera AJ, Tomlinson RE, Kim S, Faugere M-C, et al. Activin receptor type 2A (ACVR2A) functions directly in osteoblasts as a negative regulator of bone mass. *J Biol Chem*. 2017;292:13809–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.782128>.
92. Lotinun S, Pearsall RS, Horne WC, Baron R. Activin receptor signaling: a potential therapeutic target for osteoporosis. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5:195–204.
93. Dankbar B, Fennen M, Brunert D, Hayer S, Frank S, Wehmeyer C, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nat Med*. 2015;21:1085–90. <https://doi.org/10.1038/nm.3917>.
94. Kaji H. Effects of myokines on bone. *BoneKEy Rep*. 2016;5:826. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2016.48>. *Curr Osteoporos Rep*
95. Gajos-Michniewicz A, Piastowska AW, Russell JA, Ochedalski T. Follistatin as a potent regulator of bone metabolism. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 2010;15: 563–74. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2010.495786>.
96. Kawao N, Morita H, Obata K, Tatsumi K, Kaji H. Role of follistatin in muscle and bone alterations induced by gravity change in mice. *J Cell Physiol*. 2018;233:1191–201. <https://doi.org/10.1002/jcp.25986>.
97. Yaden BC, Croy JE, Wang Y, Wilson JM, Datta-Mannan A, Shetler P, et al. Follistatin: a novel therapeutic for the improvement of muscle regeneration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;349:355–71. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.211169>.
98. Zheng H, Qiao C, Tang R, Li J, Bulaklak K, Huang Z, et al. Follistatin N terminus differentially regulates muscle size and fat in vivo. *Exp Mol Med*. 2017;49:e377.

<https://doi.org/10.1038/emm.2017.135>.

99. Winbanks CE, Weeks KL, Thomson RE, Sepulveda PV, Beyer C, Qian H, et al. Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin. *J Cell Biol.* 2012;197:997–1008. <https://doi.org/10.1083/jcb.201109091>.
100. Mendell JR, Sahenk Z, Malik V, Gomez AM, Flanigan KM, Lowes LP, et al. A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for Becker muscular dystrophy. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2015;23:192–201. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.200>.
101. Al-Zaidy SA, Sahenk Z, Rodino-Klapac LR, Kaspar B, Mendell JR. Follistatin gene therapy improves ambulation in Becker muscular dystrophy. *J Neuromuscul Dis.* 2015;2:185–92. <https://doi.org/10.3233/JND-150083>.
102. Haidet AM, Rizo L, Handy C, Umapathi P, Eagle A, Shilling C, et al. Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:4318–22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709144105>.
103. Shapses SA, Cifuentes M, Spevak L, Chowdhury H, Brittingham J, Boskey AL, et al. Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency. *Calcif Tissue Int.* 2003;73:86–92.
104. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal.* 2009;3:311–22. <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0068-0>.
105. Cho E-H, Cho K-H, Lee HA, Kim S-W. High serum osteopontin levels are associated with low bone mineral density in postmenopausal women. *J Korean Med Sci.* 2013;28:1496–9. <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.10.1496>.
106. Kuraoka M, Kimura E, Nagata T, Okada T, Aoki Y, Tachimori H, et al. Serum osteopontin as a novel biomarker for muscle regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 2016;186:1302–12. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.01.002>.
107. Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- β . *J Clin Invest.* 2009;119:1583–94. <https://doi.org/10.1172/JCI37662>.
108. Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, Rao JS, Merriam AP, Richmonds CR, et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2002;11:263–72.
109. Capote J, Kramerova I, Martinez L, Vetrone S, Barton ER, Sweeney HL, et al. Osteopontin ablation ameliorates muscular dystrophy by shifting macrophages to a pro-regenerative phenotype. *J Cell Biol.* 2016;213:275–88. <https://doi.org/10.1083/jcb.201510086>. Ablation of osteopontin shifts macrophages from a pro-inflammatory to a pro-regenerative phenotype and improves the muscle strength and functional performance of dystrophic mice.
110. Rudnicki MA, Williams BO. Wnt signaling in bone and muscle. *Bone.* 2015;80:60–6. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.02.009>.
111. Zhong Z, Ethen NJ, Williams BO. WNT signaling in bone development and homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2014;3:489–500. <https://doi.org/10.1002/wdev.159>.
112. Glass DA, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005;8:751–64. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.02.017>.
113. Vallée A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallée J-N. Interactions between TGF- β 1, canonical WNT/ β -catenin pathway and PPAR γ in radiation-induced fibrosis. *Oncotarget.* 2017;8:90579–604. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21234>.
114. von Maltzahn J, Renaud J-M, Parise G, Rudnicki MA. Wnt7a treatment ameliorates muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:20614–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215765109>.
115. Shang Y-C, Wang S-H, Xiong F, Peng F-N, Liu Z-S, Geng J, et al. Activation of Wnt3a signaling promotes myogenic differentiation of mesenchymal stem cells in mdx mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2016;37:873–81. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.38>.
116. McClung MR. Sclerostin antibodies in osteoporosis: latest evidence and therapeutic potential. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2017;9:263–70. <https://doi.org/10.1177/1759720X17726744>.
117. Phillips EG, Beggs LA, Ye F, Conover CF, Beck DT, Otzel DM, et al. Effects of pharmacologic sclerostin inhibition or testosterone administration on soleus muscle atrophy in rodents after spinal cord injury. *PLoS One.* 2018;13:e0194440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194440>.
118. Spatz JM, Ellman R, Cloutier AM, Louis L, van Vliet M, Suva LJ, et al. Sclerostin antibody

- inhibits skeletal deterioration due to reduced mechanical loading. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2013;28:865–74. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1807>.
119. Tang X, Wang Y, Fan Z, Ji G, Wang M, Lin J, et al. Klotho: a tumor suppressor and modulator of the Wnt/ β -catenin pathway in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 2016;96:197–205. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.86>.
120. Wehling-Henricks M, Li Z, Lindsey C, Wang Y, Welc SS, Ramos JN, et al. Klotho gene silencing promotes pathology in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2016;25:2465–82. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw111>.
121. Wehling-Henricks M, Welc SS, Samengo G, Rinaldi C, Lindsey C, Wang Y, et al. Macrophages escape Klotho gene silencing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy and promote muscle growth and increase satellite cell numbers through a Klotho-mediated pathway. *Hum Mol Genet.* 2018;27:14–29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx380>.
- Macrophage-derived Klotho, a potent regulator of bone formation and bone mass, can promote muscle regeneration and the expansion of muscle stem cells, increasing muscle fiber growth in dystrophic muscle.
122. Komaba H, Kaludjerovic J, Hu DZ, Nagano K, Amano K, Ide N, et al. Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. *Kidney Int.* 2017;92:599–611. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.02.014>.
123. Velloso CP. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol.* 2008;154:557–68. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.153>.
124. Lindsey RC, Mohan S. Skeletal effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 therapy. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;432:44–55. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.017>.
125. Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on bone metabolism and Osteoporosis. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:235060. <https://doi.org/10.1155/2014/235060>.
126. Patel K, Macharia R, Amthor H. Molecular mechanisms involving IGF-1 and myostatin to induce muscle hypertrophy as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol Myopathies Cardiomyopathies Off J Mediterr Soc Myol.* 2005;24:230–41.
127. Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol.* 2002;157:137–48. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108071>.
128. Schertzer JD, van der Poel C, Shavlakadze T, Grounds MD, Lynch GS. Muscle-specific overexpression of IGF-I improves E-C coupling in skeletal muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am J Phys Cell Phys.* 2008;294:C161–8. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00399.2007>.
129. Gregorevic P, Plant DR, Leeding KS, Bach LA, Lynch GS. Improved contractile function of the mdx dystrophic mouse diaphragm muscle after insulin-like growth factor-I administration. *Am J Pathol.* 2002;161:2263–72. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64502-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64502-6).
130. Burks TN, Cohn RD. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle.* 2011;1:19. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-19>.
131. Guiraud S, Davies KE. Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Pharmacol.* 2017;34:36–48. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.04.002>.
132. Accorsi A, Kumar A, Rhee Y, Miller A, Girgenrath M. IGF-1/GH axis enhances losartan treatment in Lama2-related muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2016;25:4624–34. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw291>.
133. Heatwole CR, Eichinger KJ, Friedman DI, Hilbert JE, Jackson CE, Logigian EL, et al. Open-label trial of recombinant human insulin-like growth factor 1/recombinant human insulin-like growth factor binding protein 3 in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol.* 2011;68:37–44. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.227>.
134. Scully MA, Pandya S, Moxley RT. Review of phase II and phase III clinical trials for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs.* 2013;1:33–46. <https://doi.org/10.1517/21678707.2013.746939>.
135. Rutter MM, Collins J, Backeljauw PF, Horn P, Taylor MD, Hu SY, et al. P.11.15 Recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) therapy in Duchenne muscular dystrophy (DMD): a 6-month prospective randomized controlled trial. *Neuromuscul Disord.* 2013;23:803. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.06.576>.
136. Yoon S-H, Sugamori KS, Grynopas MD, Mitchell J. Positive effects of bisphosphonates on bone and muscle in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD.*

- 2016;26:73–84. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.09.015>.
137. Yoon S-H, Chen J, Grynepas MD, Mitchell J. Prophylactic pamidronate partially protects from glucocorticoid-induced bone loss in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Bone*. 2016;90:168–80. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.015>.
138. Ponnusamy S, Sullivan RD, You D, Zafar N, He Yang C, Thiyagarajan T, et al. Androgen receptor agonists increase lean mass, improve cardiopulmonary functions and extend survival in preclinical models of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2017;26:2526–40. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx150>.
139. Kearbey JD, Gao W, Fisher SJ, Wu D, Miller DD, Dalton JT. Effects of selective androgen receptor modulator (SARM) treatment in osteopenic female rats. *Pharm Res*. 2009;26:2471–7. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9962-7>.
140. Kearbey JD, GaoW, Narayanan R, Fisher SJ,Wu D,Miller DD, et al. Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) treatment prevents bone loss and reduces body fat in ovariectomized rats. *PharmRes*. 2007;24:328–35. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9152-9>.
141. Wu B, Shah SN, Lu P, Bollinger LE, Blaeser A, Sparks S, et al. Long-term treatment of Tamoxifen and Raloxifene alleviates dystrophic phenotype and enhances muscle functions of FKRP dystroglycanopathy. *Am J Pathol*. 2018;188:1069–80. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.12.011>.
142. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1995;82:743–52.
143. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*. 1994;372:546–8. <https://doi.org/10.1038/372546a0>.
144. Reid MB. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand*. 1998;162:401–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1998.0303f.x>.
145. Ennen JP, Verma M, Asakura A. Vascular-targeted therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle*. 2013;3:9. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-3-9>.
146. Percival JM, Whitehead NP, Adams ME, Adamo CM, Beavo JA, Froehner SC. Sildenafil reduces respiratory muscle weakness and fibrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J Pathol*. 2012;228:77–87. <https://doi.org/10.1002/path.4054>.
147. NelsonMD, Rader F, Tang X, Tavyev J, Nelson SF,MiceliMC, et al. PDE5 inhibition alleviates functional muscle ischemia in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2014;82:2085–91. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000498>.
148. Hammers DW, Sleeper MM, Forbes SC, Shima A, Walter GA, Sweeney HL. Tadalafil treatment delays the onset of cardiomyopathy in Dystrophin-deficient hearts. *J Am Heart Assoc*. 2016;5 <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003911>.
149. Tođral G, Arikan M, Korkusuz P, Hesar RH, Ekşiođlu MF. Positive effect of tadalafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on fracture healing in rat femur. *Eklemler Hast Ve Cerrahisi Jt Dis Relat Surg*. 2015;26:137–44.
150. Histing T, Marciniak K, Scheuer C, Garcia P, Holstein JH, Klein M, et al. Sildenafil accelerates fracture healing in mice. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2011;29:867–73. <https://doi.org/10.1002/jor.21324>.
151. Victor RG, Sweeney HL, Finkel R, McDonald CM, Byrne B, Eagle M, et al. A phase 3 randomized placebo-controlled trial of tadalafil for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 2017;89:1811–20. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000004570>.
152. Bereket C, Sener I, Cakir-Özkan N, Önger ME, Polat AV. Beneficial therapeutic effects of sildenafil on bone healing in animals treated with bisphosphonate. *Niger J Clin Pract*. 2018;21:217–24. https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_172_16.
153. Abu-Amer Y. NF-κB signaling and bone resorption. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2013;24:2377–86. <https://doi.org/10.1007/s00198-013-2313-x>.
154. Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med Berl Ger*. 2008;86:1113–26. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0373-8>.
155. Jackman RW, Cornwell EW, Wu C-L, Kandarian SC. Nuclear factor-κB signalling and

- transcriptional regulation in skeletal muscle atrophy. *Exp Physiol*. 2013;98:19–24. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.063321>.
156. Heier CR, Damsker JM, Yu Q, Dillingham BC, Huynh T, Van der Meulen JH, et al. VBP15, a novel anti-inflammatory and membrane-stabilizer, improves muscular dystrophy without side effects. *EMBO Mol Med*. 2013;5:1569–85. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302621>.
157. Hoffman EP, Riddle V, Siegler MA, Dickerson D, Backonja M, Kramer WG, et al. Phase 1 trial of vamorolone, a first-in-class steroid, shows improvements in side effects via biomarkers bridged to clinical outcomes. *Steroids*. 2018;134:43–52. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.02.010>.
158. Hammers DW, Sleeper MM, Forbes SC, Coker CC, Jirousek MR, Zimmer M, et al. Disease-modifying effects of orally bioavailable NF- κ B inhibitors in dystrophin-deficient muscle. *JCI Insight*. 2016;1:e90341. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.90341>.
159. Donovan JM, Zimmer M, Offman E, Grant T, Jirousek M. A novel NF- κ B inhibitor, edasalonexent (CAT-1004), in development as a disease-modifying treatment for patients with duchenne muscular dystrophy: phase 1 safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics in adult subjects. *J Clin Pharmacol*. 2017;57:627–39. <https://doi.org/10.1002/jcph.842>.
160. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423:337–42. <https://doi.org/10.1038/nature01658>.
161. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93:165–76.
162. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89:309–19.
163. 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. <https://doi.org/10.1038/pr.2012.118>.
164. Wu Y, Liu J, Guo H, Luo Q, Yu Z, Liao E, et al. Establishment of OPG transgenic mice and the effect of OPG on bone microarchitecture. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:125932. <https://doi.org/10.1155/2013/125932>.
165. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12:1260–8.
166. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Lamoureux F, Ruiz-Velasco C, Maillason M, et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24:401–9. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.06.001>.
167. Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am J Pathol*. 2003;163:2021–31.
168. Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1143:123–50. <https://doi.org/10.1196/annals.1443.016>.
169. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390:175–9. <https://doi.org/10.1038/36593>.
170. 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; ajpcell.00285.2015. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00285.2015>
171. Dufresne SS, Dumont NA, Bouchard P, Lavergne É, Penninger JM, Frenette J. Osteoprotegerin protects against muscular dystrophy. *Am J Pathol*. 2015;185:920–6. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.006>.
172. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999;145:527–38.
173. Hwang S-Y, Putney JW. Calcium signaling in osteoclasts. *Biochim Biophys Acta*. 1813;2011:979–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.11.002>.
174. Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PML, Carathers M, et al. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2007;117:889–901. <https://doi.org/10.1172/JCI30556>.
175. 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;23:1492–505. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt536>.
176. DurhamWJ, Arbogast S, Gerken E, Li Y-P, Reid MB. Progressive nuclear factor-kappaB activation resistant to inhibition by contraction and curcumin inmdxmice. *Muscle Nerve.* 2006;34:298–303. <https://doi.org/10.1002/mus.20579>.
177. Messina S, Bitto A, Aguenouz M, Minutoli L, Monici MC, Altavilla D, et al. Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp Neurol.* 2006;198:234–41. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.11.021>.
178. Reay DP, Yang M, Watchko JF, Daood M, O'Day TL, Rehman KK, et al. Systemic delivery of NEMO binding domain/IKK γ inhibitory peptide to young mdx mice improves dystrophic skeletal muscle histopathology. *Neurobiol Dis.* 2011;43:598–608. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.05.008>.
179. Dufresne SS, Boulanger-Piette A, Bossé S, Argaw A, Hamoudi D, Marcadet L, et al. Genetic deletion of muscle RANK or selective inhibition of RANKL is not as effective as full-length OPG-fc in mitigating muscular dystrophy. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6:31. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0533-1>. Osteoprotegerin, a protagonist of the RANK/RANKL/OPG bone triad, can mitigate muscular dystrophy in mdx mice more effectively than anti-RANKL or muscle-specific RANK deletion.
180. Guiraud S, Edwards B, Squire SE, Babbs A, Shah N, Berg A, et al. Identification of serum protein biomarkers for utrophin based DMD therapy. *Sci Rep.* 2017;7:43697. <https://doi.org/10.1038/srep43697>.
181. 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;35:349–53. <https://doi.org/10.1002/mus.20697>.
182. 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. <https://doi.org/10.1172/JCI43844>.
183. Zaheer S, LeBoff M, Lewiecki EM. Denosumab for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2015;11:461–70. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1000860>.
184. Kumaki D, Nakamura Y, Sakai N, Kosho T, Nakamura A, Hirabayashi S, et al. Efficacy of denosumab for glucocorticoidinduced osteoporosis in an adolescent patient with Duchenne muscular dystrophy: a case report. *JBJS Case Connect* 2018; <https://doi.org/10.2106/JBJS.CC.17.00190>.
185. Chagarlamudi H, Corbett A, Stoll M, Bibat G, Grosmann C, Matichak Stock C, et al. Bone health in facioscapulohumeral muscular dystrophy: a cross-sectional study. *Muscle Nerve.* 2017;56:1108–13. <https://doi.org/10.1002/mus.25619>.
186. Danckworth F, Karabul N, Posa A, Hanisch F. Risk factors for osteoporosis, falls and fractures in hereditary myopathies and sporadic inclusion bodymyositis - a cross sectional survey. *MolGenet Metab Rep.* 2014;1:85–97. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2013.12.005>.

3.10 Figures, tables and legends

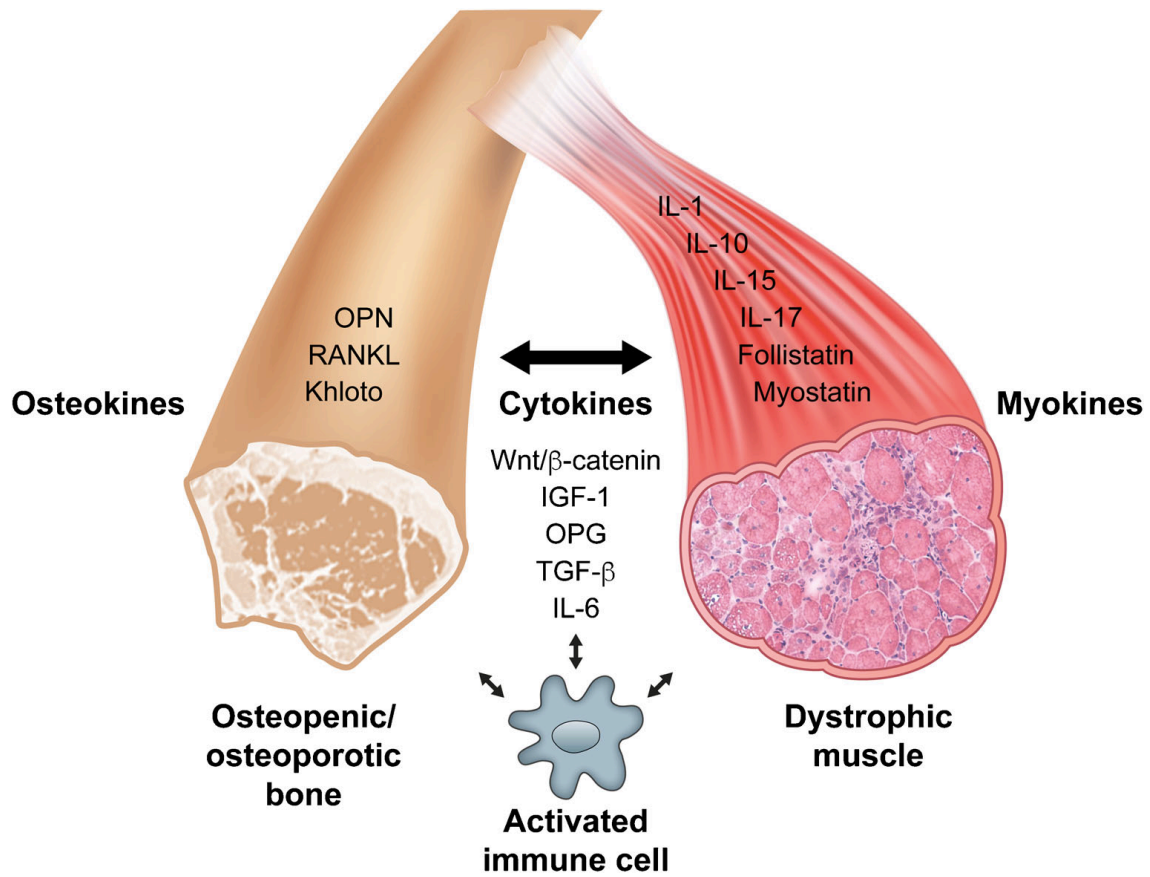


Fig. 3.1 Myokines, osteokines, and dual-origin cytokines involved in Duchenne muscular dystrophy.

**Chapitre 4 : L'ostéoprotégérine pleine longueur se lie aux
cellules musculaires via son domaine de liaison à
l'héparine et augmente rapidement la force de muscles
EDL dystrophiques**

Titre original de l'article

Full-length osteoprotegerin binds to myofibers via its heparin-binding domain and increases rapidly the force of dystrophic EDL muscles

Manuscript in preparation for submission in The Journal of Clinical Investigation

Authors' full names

Antoine Boulanger Piette¹, Laetitia Marcadet¹, Zineb Bouredji¹, Dounia Hamoudi¹, Anteneh Argaw¹ and Jérôme Frenette^{1,2}

Authors' affiliations

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

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

Résumé

La dégénérescence musculaire et la fragilité osseuse peuvent survenir conjointement, comprendre des dialogues moléculaires muscle-os et agir sur des sentiers signalétiques communs, incluant RANK/RANKL/OPG. L'action indépendante de RANKL/RANKL du FL-OPG-Fc sur les muscles dystrophiques est toutefois inconnue. Dans l'os et d'autres tissus, l'OPG peut exercer des rôles biologiques via des interactions cellulaires directes. Nous montrons ici que le FL-OPG-Fc se lie aux myotubes par son domaine de liaison à l'héparine, qu'il active des effecteurs en aval des intégrines FAK/Akt/CaMKII, qu'il module la phosphorylation de phospholamban, régulateur clé de SERCA et qu'il mitige la libération de créatine kinase dans un modèle de dommage induit par une surcharge calcique. *In vivo*, le FL-OPG-Fc peut atteindre et lier les muscles dystrophiques en l'absence de l'interaction RANKL/RANK et engendrer une hausse aiguë des forces tétaniques dans les muscles EDL dystrophiques, augmentant la capacité contractile.

Abstract

Muscle degeneration and bone fragility occur concurrently and comprise bidirectional muscle-bone molecular crosstalk and common signaling pathways, including RANK/RANKL/OPG. We have previously shown that muscle-specific RANK deletion improves dystrophic EDL muscles function but that 10 d full-length OPG-Fc (FL-OPG-Fc) treatment confers superior and distinct improvements. The RANK/RANKL-independent actions of FL-OPG-Fc on dystrophic muscles are still unexplained. In bone and other tissues, OPG can exert biological roles via direct cellular interactions. We show that FL-OPG-Fc binds to C2C12 and DMD muscle cells through its heparin-binding domain, activates downstream effectors of integrins FAK/Akt/CaMKII, modulates the phosphorylation of phospholamban, key regulator of SERCA pumps and mitigates CK release in a model of Ca^{2+} overload-induced damage. *In vivo*, FL-OPG-Fc can reach and bind to dystrophic muscles in the absence of RANK/RANKL interaction and yield an acute enhancement of tetanic forces in dystrophic EDL muscles, increasing contractile capacity. This out of the triad and direct action of OPG via its heparin-binding domain represents a new axis of muscle-bone molecular interactions able to influence muscle signaling, dystrophic muscle function and conceivably, other muscular biological processes.

4.1 Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an orphan X-linked recessive disease resulting from loss-of-function mutations in the dystrophin gene. The absence of the structural protein dystrophin within the muscle cytoskeleton causes architectural fragility, vulnerability to contraction-induced damage, sarcolemmal permeability to macromolecules, persisting elevation of intracellular calcium levels, reactive oxygen species (ROS) leading to progressive weakness, necrosis, inflammation, fibrosis and ultimately to progressive skeletal and cardiac muscles deterioration¹. Before the loss of contractile tissue and replacement by connective tissue, there is an inherent muscle weakness in patients living with DMD. Magnetic resonance imaging observations showed that the loss of muscle force production outpaced the loss of muscle mass, i.e. muscle contractile area^{2,3}. This incapacity for dystrophic muscles to properly contract is in part associated with disrupted excitation-contraction coupling (ECC) steps such as compromised sarcolemmal excitability, reduced Ca²⁺ release from internal stores and inefficient myofilament cross-bridges⁴⁻¹¹ or release of ROS¹². Thus, correcting the impairment of ECC should rapidly be translated into gains of force production in dystrophic muscles.

Muscle degeneration and bone fragility occur in tandem in DMD and several other diseases and conditions, implying bidirectional crosstalks and common signaling pathways between bone and muscle¹³⁻¹⁵. The receptor-activator of nuclear factor κ B (RANK), the receptor-activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), and osteoprotegerin (OPG) are key members of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily that govern bone remodelling¹⁶. The RANKL/RANK interaction on pre-osteoclastic cells leads to bone resorption while OPG is a decoy receptor for RANKL inhibiting osteoclastogenesis^{17,18}. Our working hypothesis is that the well-characterized RANK/RANKL/OPG signaling pathway in the context of bone homeostasis and disease is also important in the initiation and progression of muscle diseases such as DMD. In skeletal muscle, we found that RANK mRNA is highly expressed in dystrophic muscles from mdx mouse, relative to healthy muscles¹⁹. On the other hand, muscle-specific RANK deletion in dystrophic mice (mdx-RANK-mKO) significantly improved, *ex vivo*, the *extensor digitorum longus* (EDL) muscles' maximal specific force (sP0) during the first and most important phase of muscle degeneration, but without protective effect against eccentric contractions-induced dysfunction¹⁹. In comparison, a 10 d treatment with full-length OPG fused to a Fc fragment (FL-OPG-Fc) was superior to muscle-specific RANK deletion in terms of improvement in force

production of dystrophic EDL muscles, reduced eccentric contractions-induced dysfunction and increased maximal SERCA activity^{19,20}. Consistent with these findings, truncated OPG-Fc which only contains RANKL domains (TR-OPG-Fc) produced significant but modest gains in force, suggesting the presence of RANK/RANKL-independent mechanisms by which FL-OPG-Fc induces its effects on dystrophic muscles¹⁹. However, the molecular mechanisms by which FL-OPG-Fc produces its effects on dystrophic muscles remain unknown.

Structurally, the OPG protein contains four TNFR-like domains (RANKL domains), two death domains (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL domains), and a highly basic heparin-binding domain²¹. Each of these 7 domains have biologically significant functions in bone, vascular, immune and tumoral cells²². For example, OPG promotes cell survival via its decoy receptor for TRAIL or stimulates cell proliferation and migration via its heparin-binding domain through a variety of heparan sulfate proteoglycans (HSP) and glycosaminoglycans chains (GAG)-containing proteins²²⁻²⁷, in particular syndecans which work alongside integrins and other ECM proteins such as laminin^{27,32-35}. Besides, laminins possess chain-specific heparin-binding domains that can bind to several growth factors and influence biological processes, possibly in collaboration with its integrins receptors^{31,32}. Interestingly, augmenting integrin- β 1 activity with monoclonal antibody enhances regeneration and function of dystrophic muscles in mdx mice³³. In addition, the integrin-linked kinase (ILK), a mechano-receptor enzyme associated with the cytoplasmic domain of integrins, mediates force transduction in cardiomyocytes through calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) / SERCA / phospholamban (PLN) modulation³⁴. Based on these recent observations, we hypothesized that FL-OPG-Fc interacts directly with HS/GAG-containing proteins via its heparin-binding domain, activates integrins signaling, modulates SERCA/PLN and exerts an acute RANK/RANKL-independent beneficial effect on dystrophic EDL muscle function. In this study, we show that FL-OPG-Fc binds directly to myofibers *in vitro* and *in vivo* via its heparin-binding domain, activates integrin downstream signaling such as focal adhesion kinase (FAK)/ protein kinase B (Akt)/CamKII and modulates PLN. Next, we show that FL-OPG-Fc treatment mitigates creatine kinase release in a model of Ca²⁺ overload-induced damage *in vitro* and a single injection of FL-OPG-Fc significantly increases the contractile capacity of dystrophic EDL muscles after 24h. Together, these data show that the heparin domain of OPG is essential for its interaction with muscle cells *in vitro* and *in vivo* which

activates downstream signaling pathway known to prevent muscle injury and enhance muscle function.

4.2 Materials and methods

Animals : All procedures were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee based on Canadian Council on Animal Care guidelines. Wild-type (WT)(C57BL/10ScSnJ), mdx (C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J) and OPG^{-/-} (Tnfrsf11btm1Eac OPG^{-/-}) mice were obtained from The Jackson Laboratory (USA). Mdx-RANK-mKO mice were generated and screened for genotype as previously described¹⁹. All animals were bred at our specific pathogen-free animal facility. At 34 days of age, mdx mice were injected i.p. with FL-OPG-Fc [1 mg/kg] (R&D systems), equimolar dose of Fc-fragment (Cedarlane), equimolar dose of TR-OPG-Fc (Syd Labs) or equivolume of vehicle (PBS). Twenty-four hours later, the EDL muscles were isolated from mice under anesthesia/analgesia and muscle dissected for contractile property measurements *ex vivo*. Mice were euthanized by cervical dislocation. Treatment administration was blinded and contractile properties were assessed by two “blinded” investigators. For OPG binding assay, animals were first injected with FL-OPG-Fc 1 mg/kg or equi-volume of vehicle (PBS) and EDL muscles were dissected under anesthesia/analgesia 6 h later, embedded in tissue freezing medium, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

Serum OPG measurement : At 34 days of age, mdx mice were injected i.p. with FL-OPG-Fc [1 mg/kg] or equi-volume vehicle (PBS). Blood was withdrawn at baseline, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 6 h and OPG content measured in serum with a commercial OPG ELISA kit (R&D Systems).

Cell culture : C2C12 myoblasts (ATCC, Manassas, VA) proliferated in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (HyClone) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; HyClone) and 1% antibiotic-antimycotic (Life Technologies) in a 5% CO₂ and 37°C incubator. Myoblasts derived from DMD patients proliferated in MB-1 medium supplemented with 40 ng/mL of bFGF and 15% FBS. When myoblasts reached 90% confluence, medium was substituted by high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1% equine donor serum (Fisher) supplemented with 1% antibiotic-antimycotic and 1% ITS (Sigma) for 5 days to induce differentiation into myotubes. Mature myotubes

were then exposed to FL-OPG-Fc [100 ng/ml], equimolar TR-OPG-Fc, equimolar triple mutant OPG AAQ, equimolar quadruple mutant OPG AAAH, or equi-volume of vehicle (PBS). The triple mutant is mutated on K241A/R242A/R243Q and the quadruple mutant on R366A/K367A/R370A/R379A, process as previously described³⁵. For binding challenges, myotubes were treated with heparinase III 50 mIU/ml (Sigma) for 12h before FL-OPG-Fc or washed with PBS with heparin 100 ng/ml (Sigma) following FL-OPG-Fc.

Western blot (WB) : Following FL-OPG/FL-OPG-Fc/TR-OPG-Fc treatments, myotubes were washed 4 times in PBS then homogenized in RIPA lysis buffer containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Protein homogenates were separated by gel electrophoresis (Bio-Rad) and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad), blocked in 5% skim milk, and incubated overnight at 4°C with primary antibodies against OPG (R&D systems AF459), FAK (Cell Signaling 3285S), pFAK-tyr397 (Cell Signaling 3283S), Akt (Cell Signaling 9272S), pAkt-ser473 (Cell Signaling 9271S), CaMKII (Abcam ab52476), pCaMKII-thr286 (Abcam ab32678), SERCA1 (Abcam ab92666), SERCA2 (Abcam ab91032), PLB (Cell Signaling 14562S), pPLB-thr17 (Santa Cruz sc-17024) or pPLB-ser16 (Abcam ab15000). The membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology). Protein bands were revealed using the ECL-Plus chemiluminescent detection system (Perkin-Elmer) and were normalized for total protein loading using Gelcode Blue Stain reagent (Thermo Scientific). ImageQuant LAS 4000 biomolecular imager was used to detect a chemiluminescent signal and analyzed using Quantity One software (version 4.6.6; Bio-Rad).

Isometric contractile properties : The mice were administrated buprenorphine for analgesia [i.p. 0.1 mg/kg], and sodium pentobarbital for anesthesia [i.p. 50 mg/kg]. EDL muscles were carefully dissected and attached to an electrode and a force sensor (305B-LR dual-mode, Aurora Scientific Inc.) controlled by Dynamic Muscle Control Analysis unit and data acquisition software (Aurora Scientific Inc.). EDL muscles were incubated at 25°C in oxygenated Krebs-Ringer solution with [2 mg/mL] of added glucose. Once the optimal length (L₀) had been determined, the muscles were stimulated for 500 ms at 1, 10, 20, 35, 50, 80, 100, 120 and 150 Hz to induce subtetanic and tetanic contractions and to determine the force-frequency curves. Twitch force (P_t, g) and maximal absolute force (P₀, g) values were recorded and analyzed using Dynamic Muscle Data Analysis software

(Aurora Scientific Inc.). EDL muscles' resistance to eccentric contractions-induced dysfunction was tested using 7 tetanic contractions at 150 Hz for 500 ms followed by muscle lengthening at 0.5 L0/s for 200 ms with a 1-min rest period between contractions. The length of the muscles was measured, the tendons were removed, and the muscles were weighed to calculate their sP0 using the following formula: $sP0 \text{ (N/cm}^2\text{)} = P0 \text{ (g)} \times Lf \text{ (mm)} \times \text{muscle density (mg/mm}^3\text{)}/\text{muscle mass (mg)}$, Lf is $L0 \times 0.44$ and muscle density is 1.062.

Immunofluorescence and staining : For EDL bundles immunofluorescence, fresh EDL muscles were mechanically separated with micro-forceps under binocular magnification and exposed to FL-OPG-Fc [100 ng/ml], equimolar dose of TR-OPG-Fc or equi-volume of vehicle (PBS) for 1h at 37°C in Krebs-Ringer solution with [2 mg/mL] of added glucose. For OCT-embedded EDL muscles, transverse sections (10 µm) were cut mid-belly (Leica Microsystems CM1850). Myotubes, EDL bundles and EDL sections were washed 4 times with PBS, fixed 20 min with 4% PFA, blocked for 2h in 2% BSA-PBS and exposed to primary antibodies against OPG (R&D systems AF459) and laminin (Sigma L9393) for 2h. Samples were washed 4 times with PBS, then secondary anti-goat Alexa Fluor 594 or anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen) was added for 2 h then washed 4 times with PBS and finally samples were mounted with DAPI gel (SouthernBiotech) before examination under an Axio imager M2 microscope with Zen software (Zeiss, Germany).

Model of Ca²⁺ overload-induced damage : Myotubes were treated with FL-OPG-Fc [100 ng/ml], equimolar dose of TR-OPG-Fc or equi-volume of vehicle (PBS). After 24h, media was removed and replaced with media containing 1 µM cardiotoxin (*Naja pallida*, Latoxan) for 1h. The media was then collected and analyzed for creatine kinase activity, as an indicator of muscle leakage and damage, with a commercial kit (Point Scientific) while the cells were lysed with RIPA buffer to normalize for total protein content with pierce-BCA protein assay kit (Thermo Fischer). All of the experiment was conducted in a 5% CO₂ and 37°C incubator.

Statistical analyses : All values are expressed as means ± SEM. The data were analyzed using a one-way ANOVA, a one-way ANOVA for paired WB/CTX data or a two-way ANOVA for repeated eccentric contractions, followed by Tukey's test, and F-test was used for linear regression analysis (Prism 6, Graphpad). The levels of significance were

set at # $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ for comparisons between PBS-treated cells/mice and compounds-treated cells/mice.

4.3 Results

FL-OPG binds to C2C12 and DMD myotubes through its heparin-binding domain

C2C12 myotubes were exposed to FL-OPG-Fc [100 ng/ml], equimolar dose of TR-OPG-Fc or equi-volume of PBS and immunohistofluorescence (IHF) on non-permeabilized cells showed retention of the FL-OPG-Fc around myotubes, but not TR-OPG-Fc (Fig. 1A). To confirm these results, FL-OPG-Fc [100 ng/ml] treated myotubes for 15, 30, 60 and 120 min were washed, lysed and OPG content quantified by WB. OPG levels increased steadily over a 2h period in FL-OPG-Fc-treated myotubes (Fig. 1B). Since FL-OPG-Fc possesses a heparin-binding domain, we next tested whether heparinase III, which cleaves HSP as a primary substrate, would diminish FL-OPG-Fc binding. Heparinase treatment for 12h reduced OPG levels by 46% relative to PBS treated myotubes, suggesting that HSP is important for FL-OPG-Fc binding (Fig. 1C; *** $p < 0.001$). Accordingly, heparin-containing PBS wash after FL-OPG-Fc treatment significantly reduced OPG levels at the cell surface by 58% relative to PBS wash (Fig. 1C; *** $p < 0.001$). We also co-incubated FL-OPG-Fc with heparin for 1h before cell treatment, which almost completely abrogated FL-OPG-Fc's interaction with myotubes (Fig. 1C; *** $p < 0.001$). Consistent with the IHF results, WB experiments showed that TR-OPG-Fc does not bind to myotubes, suggesting that the heparin-binding domain is essential for FL-OPG-Fc binding (Fig. 1C; *** $p < 0.001$). To further confirm the role of the heparin-binding domain in FL-OPG-Fc interaction with myotubes, we compared the binding capacity of full-length OPG (FL-OPG) with three amino acids substitutions in its TRAIL-binding domain D5 to FL-OPG with four substitutions in its heparin-binding domain D7, both without an Fc fragment (Fig. 1D). WB experiments confirmed that the mutant in the TRAIL-binding domain of FL-OPG (D5) binds to myotubes while OPG-Fc with substitutions in the heparin-binding domain (D7) loses its binding capacity, showing that the latter is responsible for OPG's binding to myotubes (Fig. 1E). Finally, WB results showed that FL-OPG binds to myotubes from patients with DMD and that the heparin-binding domain is essential for this interaction (Fig. 1F).

FL-OPG-Fc colocalizes with cell surface laminin, activates FAK/Akt/CaMKII, increases PLN phosphorylation and reduces Ca²⁺ overload-induced damage in C2C12 myotubes

Because FL-OPG-Fc can bind muscle cells through its heparin-binding domain, we next verified whether it can colocalize with cell surface proteins. IHF results showed that surface-bound FL-OPG-Fc colocalized with laminin, a ligand for integrins which are known to be activated by OPG^{29,30}(Fig. 2A). Next, we verified whether FL-OPG modulates the activity of integrin effectors. We show that FL-OPG-Fc significantly increased the phosphorylation of FAK on Tyr397 (+46% at 120 min, **p*<0.05), Akt on Ser473 (+27% at 120 min, **p*<0.05) and CaMKII on Thr286 (+38% at 15 min, **p*<0.05) when compared to PBS (Fig. 2B). Then, we tested the influence of FL-OPG-Fc on SERCA expression and on the phosphorylation of its modulator PLN. SERCA-1a and SERCA-2a levels were not significantly altered by FL-OPG-Fc but PLN phosphorylation was increased on Thr17 (+187% at 30 min) and Ser16 sites (+36% at 120 min) Fig. 2C-D; **p*<0.05), while total PLN remained unchanged. Ultimately, to test the functional impact of FL-OPG-Fc, we used an *in vitro* model of Ca²⁺ overload-induced damage with cardiotoxin and show that prior FL-OPG-Fc treatment, but not TR-OPG-Fc, mitigated creatine kinase release (-21%), a marker of sarcolemmal integrity and cell necrosis, (Fig. 2E). In this model, FL-OPG-Fc binding-dependent mechanism was counteracted by coincubation with ILK inhibitor QLT0267 or SERCA inhibitor thapsigargin in the last hour before the cardiotoxin challenge (Fig. 2E).

FL-OPG-Fc binds to dystrophic EDL muscles lacking muscle-specific RANK

To rule out potential endogenous OPG signal, EDL muscles isolated from OPG^{-/-} mice showed that FL-OPG-Fc, but not TR-OPG-Fc, also bind *in vitro* to bundles of fully differentiated myofibers (Fig. 3A). Next, we injected i.p. FL-OPG-Fc to investigate whether it interacts with EDL muscle *in vivo*. FL-OPG-Fc did reach and bind to EDL sarcolemma less than 6 h following injection in OPG^{-/-} mice (Fig. 3B). Lastly, to exclude the possibility that FL-OPG-Fc forms a RANK/RANKL/OPG tertiary complex and to ensure that FL-OPG-Fc binds to myofibers in the absence of RANKL/RANK interaction, mdx-RANK-mKO mice were injected FL-OPG-Fc. The IHF results show that FL-OPG-Fc binds to the sarcolemma of EDL muscles independently of muscle RANK or dystrophin (Fig. 3C).

A single FL-OPG-Fc injection increases dystrophic EDL muscles absolute and specific maximal tetanic forces

Since circulating FL-OPG-Fc peaks 30 min following injection (Fig. S1), binds to muscle fibers in less than 6 h and that previous work showed that prolonged treatment increases muscle function³⁶, we tested the acute effects of FL-OPG-Fc by measuring *ex vivo* contractile properties of dystrophic EDL muscles 24h after a single injection. We found that FL-OPG-Fc did not influence twitch force but increased by 5.2 g (+31%) the maximal absolute force (P0: 21,80 g, *** $p < 0.001$) and by 3,6 N/cm² (+30%) the maximal specific force of dystrophic EDL muscles (sP0: 15,27 N/cm², *** $p < 0.001$) compared to PBS-treated mdx (Fig. 4A-C). As expected, this single FL-OPG-Fc treatment did not influence bodyweight, muscle mass and muscle optimal length (Table 1). Also, equimolar doses of Fc-fragment treatment did not increase the maximal absolute or specific forces of dystrophic EDL muscles when compared to PBS-treated mdx mice (Figs. 4B-C). Similarly, TR-OPG-Fc did not produce any significant gain in force of dystrophic EDL muscles (Fig. 4B-C). Furthermore, force-frequency curve analysis revealed that FL-OPG-Fc exclusively increased dystrophic EDL muscles force between 80 and 150 Hz stimulation frequencies (** $p < 0.01$), corresponding to tetanic contractions (Fig. 4D). In addition, the dystrophic EDL muscles' twitch-to-tetanus ratio (Pt/P0), is rescued and comparable to WT values in FL-OPG-Fc treated mice (* $p < 0.05$) (Table 1), suggesting a change in SR Ca²⁺ release and/or myofilament Ca²⁺ sensitivity. In accordance, the P0 maximal rate of force development (dP/dT) was steepened by 28,0% (* $p < 0.05$) and time to peak tension (TPT) was shortened by 14,3% (# $p = 0.08$) with FL-OPG-Fc compared to PBS-treated mice (Table 1). Moreover, to estimate the influence of FL-OPG-Fc on contractile capacity, we plotted the absolute force (P0; g) as a function of the calculated cross-sectional area (cCSA; muscle mass/L0*0,44*1,06). EDL muscles from WT mice had a P0-cCSA coefficient of determination (R²) of 0,40, indicating that P0 is moderately predicted by cCSA (Fig. 4E ; * $p < 0.05$). Dystrophic EDL muscles failed to reproduce that relationship with a R²=0,01 (Fig. 4E ; $p = 0.77$), showing their contractile incapacity. FL-OPG-Fc restored muscle quality as indicated by a higher P0-cCSA coefficient R²=0,50 (* $p < 0.05$) in dystrophic EDL muscles (Fig. 4E). Because FL-OPG-Fc enhanced dystrophic EDL muscles' contractility, we examined the underlying integrity 24h following a single FL-OPG-Fc injection by assessing dystrophic EDL muscle's resistance to repeated eccentric contraction-induced dysfunction. A single injection of FL-OPG-Fc slightly but significantly improved EDL muscle resistance to force loss during eccentric contractions when compared to PBS-treated mdx while TR-

OPG-Fc and Fc-fragment had no effects (Fig. 4F). At the 7th and final eccentric contraction, maximal tetanic force loss was 5,5% of the initial force for WT, 59,8% for PBS-treated mdx and 48,4% for FL-OPG-Fc-treated mdx, an absolute 11,4% of recovery (Fig. 4F; * $p < 0.05$).

4.4 Discussion

The modulation of signalling pathways common to myokines, osteokines and cytokines originating from bone and muscle represents an innovative multifunctional approach to target the muscle-bone unit in DMD¹³⁻¹⁵. Our previous work demonstrated that the RANK/RANKL/OPG pathway, responsible for bone remodeling, affects skeletal muscle and a 10 d FL-OPG-Fc treatment improves dystrophic muscle function better than muscle-specific RANK deletion, suggesting a RANK/RANKL independent action of OPG. Here, we demonstrate that FL-OPG-Fc binds to myofibers through its heparin-binding domain, induces the phosphorylation of key regulator of SERCA and rapidly increases dystrophic EDL muscle force.

The binding of OPG through its heparin-binding domain has been observed, notably to surface HSPGs on multiple myeloma cells³⁷. Accordingly, we report the capacity of FL-OPG-Fc to bind directly to muscle cells through its heparin-binding domain. As observed in osteoblasts³⁸ and myeloma cells²³, FL-OPG-Fc binding was sensitive to heparinase treatment which depletes cell surface HSPG and the addition of exogenous heparin partially removed the interaction. Furthermore, FL-OPG-Fc-heparin coincubation significantly reduced OPG binding which was completely abrogated by the deletion of OPG-Fc's heparin-binding domain. Moreover, the results we obtained using mutated FL-OPG in which amino acids considered essential for HSPG binding have been substituted, confirmed the importance of the heparin-binding domain for muscle interaction and corroborated the HS-binding sites previously mapped³⁵. Since OPG-integrin interaction induces proliferation of endothelial cells and attenuates apoptosis through the activation of FAK and Akt in ovarian cancer cells^{29,30} and given that HSPGs cooperate with integrins to regulate cellular events³⁹, we next investigated downstream effectors of the FL-OPG-Fc-HSPGs interaction. FL-OPG-Fc treatment rapidly activated FAK, a key mediator of integrin signaling, and Akt, a downstream target of signal transduction^{40,41}. FL-OPG-Fc also activated CaMKII, a serine/threonine specific protein kinase necessary for Ca²⁺ homeostasis via ILK/PLN/SERCA modulation in cardiomyocytes³⁴. In these cardiac cells,

ILK activated SERCA-2a/PLN through CaMKII and raised Ca^{2+} firing rate directly related to increased SR Ca^{2+} -uptake and loading³⁴. On the other hand, in diabetic cardiomyopathy, PLN phosphorylation by CaMK is decreased and accompanied with impaired cardiac performance and reduced SR Ca^{2+} -uptake⁴². In our study PLN phosphorylation is increased by FL-OPG-Fc treatment concomitantly with CamKII activation, therefore suggesting a disinhibition of SERCA and enhanced SR Ca^{2+} -uptake and loading. A 10 d FL-OPG-Fc treatment enhanced SERCA maximal activity in dystrophic EDL muscles¹⁹. Here, to test FL-OPG-Fc effect on Ca^{2+} handling, we used a model of Ca^{2+} -overload induced damage with the assumption that FL-OPG-Fc would reduce myotube damage and leakage. We found that FL-OPG-Fc mitigates CK release, an indicator of sarcolemma integrity, which was reversed with ILK or SERCA inhibitors, supporting downstream effectors discovered above. Thus, the binding capacity of OPG goes beyond the regulation of its bioavailability and is not limited to cancer cells as it can bind to muscle cells in culture to induce similar signalling pathways (FAK/Akt/CaMKII/PLN/SERCA) that can trigger important changes in the function of failing hearts or dystrophic muscles⁴³⁻⁴⁸.

Beyond these experiments on cultured muscle cells, we also showed that native OPG and exogenous FL-OPG-Fc can reach and associate with dystrophic EDL muscles lacking RANK receptor, ruling out once again potential RANK/RANKL/OPG tertiary complex⁴⁹ and putting forward an off-triad muscle-bone molecular interaction. We demonstrate that a single injection of FL-OPG-Fc potentiates both the P0 and the sP0 of dystrophic EDL muscles during tetanic contractions with sustained Ca^{2+} release, suggesting that calcium loading and/or release from SR is improved with FL-OPG-Fc treatment. Interestingly, myofibrillar Ca^{2+} sensitizers that slow the unbinding-rate of Ca^{2+} from troponin increase force exclusively at sub-tetanic contractions and delay relaxation⁵⁰. In the present study, FL-OPG-Fc does not seem to affect troponin sensitivity to Ca^{2+} because there was not a significant increase in P0 and sP0 during sub-tetanic contractions, reinforcing our sustained Ca^{2+} release hypothesis as it is impaired in dystrophic muscles^{6,7,51}. Moreover, the reestablishment of kinetic properties of TPT, dP/dT and -dP/dT of P0 from FL-OPG-Fc treated dystrophic EDL muscles further support the notion of sustained Ca^{2+} release and increased SR Ca^{2+} -loading. The inefficacy of TR-OPG-Fc or the Fc fragment to improve these parameters is indicative of a direct effect of FL-OPG-Fc on dystrophic muscles. In terms of the P0 gain, the P0-cCSA relationship showed that young dystrophic EDL muscles are not capable to produce maximal P0 and the same impairment is seen in

muscles from patients living with DMD³, underpinning the concept that the P0-cCSA plot reflects muscle quality and that at early stage of the disease intact or regenerating dystrophic myofibers display compromised ECC, altered SR Ca²⁺ release and defective sarcomere cross-bridge cycling, causing weakness^{6,8,11,52-55}. Indeed, a substantial percentage of the muscle force loss during repetitive eccentric contractions is most likely due to altered permeability, excitability, Ca²⁺ release and Ca²⁺ sensitivity of myofibers⁵⁶⁻⁶¹. Recent work shows that dystrophic muscle exhibit minimal force loss when the interval between contractions is increased from 3 to 30 min and that ROS contributes markedly to eccentric force loss¹². On the other hand, our *in vitro* findings demonstrate that FL-OPG-Fc activates FAK/Akt/CaMKII/PLN, an important pathway sufficient to improve dystrophic muscles. For example, β 1-integrin-activating antibody enhances regeneration and force production of dystrophic muscles also activates FAK *in vitro*³³ and α 7 β 1-integrin-mediated alleviation of muscular dystrophy in mdx/utrn^{-/-} is in part due to the activation of ILK and Akt⁶². In another study, Akt activation in mdx improved muscle function⁴⁴, prevented the force drop following eccentric contractions and induced upregulation of genes codings for proteins associated with Z-disks, costameres and anti-oxidant function⁶³. Moreover, improvement of SERCA function in muscular dystrophies reduced muscle damage, increased muscle function and decreased force deficit after eccentric injury^{46,47,64,65}. Thus, our results show that muscle dysfunction is an earlier event, different than muscle wasting, which can be ameliorated rapidly possibly through FAK/Akt/CaMKII/PLN/SERCA activation without any changes in contractile content or structural integrity at Z-disks, costameres or myotendinous junction.

4.5 Conclusion

In the present study, we showed that FL-OPG-Fc binds directly to muscle cells through its heparin-binding domain, activates downstream effectors of integrins and modulates calcium-handling proteins. Also, we discovered that FL-OPG-Fc, but not TR-OPG-Fc, increases force production by mechanisms not fully understood in dystrophic EDL muscles. We speculate that the acute force gains with FL-OPG-Fc treatment may involve ECC components that are disrupted in dystrophic muscle fibers. Interestingly, it has also been shown that a bone-released cytokine could influence muscle contractility with the case of TGF- β that led to RYR oxidation and decreased Ca²⁺ release in cancer-associated muscle weakness⁶⁶. Rapid delivery of Ca²⁺ to the myoplasm during ECC, particularly

important in fast-twitch fibers⁶⁷, is a mechanism that may speed the force development (dP/dt) and contribute to the ability to generate higher power during cross-bridging events activation by maintaining high levels of Ca²⁺ binding to troponin⁶⁸. In conclusion, this work gives additional credence to the notion that muscle and bone share common signaling pathways and bi-directional molecular crosstalk.

4.6 Abbreviations

Akt : protein kinase B

cCSA : calculated cross-sectional area

CNF : centrally nucleated fibers

CSA : mean fiber cross-sectional area

DMD : Duchenne muscular Dystrophy

dP/dt : maximal rate of force development

-dP/dT : maximal rate of relaxation

ECC : excitation-contraction coupling

EDL : *extensor digitorum longus*

FDB : *flexor digitorum brevis*

FL-OPG-Fc : full-length OPG fused to a Fc fragment

GAG : glycosaminoglycans

HS : heparan sulfate

HSPG : heparan sulfate proteoglycans

IHF : immunohistofluorescence

ILK : integrin-linked kinase

L0 : optimal length

Mdx : dystrophin-deficient mouse model of DMD

Mdx-RANK-mKO : mdx mice with muscle-specific RANK deletion

OPG : osteoprotegerin

P0 : maximal absolute force

PLN : phospholamban

Pt : twitch force

Pt/P0 : twitch-to-tetanus ratio

R² : determination coefficient

RANK : receptor-activator of nuclear factor κB

RANKL : receptor-activator of nuclear factor κ B ligand
ROS: reactive oxygen species
SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase
sP0 : specific maximal force
SR : sarcoplasmic reticulum
TNF : tumor necrosis factor
TPT : time to peak tension
TRAIL : tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TR-OPG-Fc : truncated OPG-Fc
VEGF : vascular endothelial growth factor
WB : western blot
WT : wild-type

4.7 Acknowledgements

We thank Benjamin Duchêne and Pr Jacques P. Tremblay for the DMD myotubes, Pr Ding Xu for providing the triple/quadruple mutant OPG proteins and Pr Shoukat Dedhar for providing the ILK inhibitor QLT0267.

4.8 Funding

This work was supported by grants to Jérôme Frenette from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Duchenne Alliance and Jesse's Journey.

4.9 Authors contributions

JF and ABP conceived the project and its design; ABP, SB, AA, DH, LM and ZB performed experiments and data analysis; JF, ABP and AA wrote the manuscript; and all authors checked for scientific content and contributed to the final drafting of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

4.10 References

1. Deconinck, N. & Dan, B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr. Neurol.* 36, 1–7 (2007).
2. Akima, H. et al. Relationships of thigh muscle contractile and non-contractile tissue with function, strength, and age in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* NMD 22, 16–25 (2012).
3. Wokke, B. H. et al. Quantitative MRI and strength measurements in the assessment of muscle quality in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* NMD 24, 409–416 (2014).
4. Goldstein, J. A. & McNally, E. M. Mechanisms of muscle weakness in muscular dystrophy. *J. Gen. Physiol.* 136, 29–34 (2010).

5. Hollingworth, S., Marshall, M. W. & Robson, E. Excitation contraction coupling in normal and mdx mice. *Muscle Nerve* 13, 16–20 (1990).
6. 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).
7. Woods, C. E., Novo, D., DiFranco, M. & Vergara, J. L. The action potential-evoked sarcoplasmic reticulum calcium release is impaired in mdx mouse muscle fibres. *J. Physiol.* 557,59–75 (2004).
8. 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).
9. Godt, R. E. Calcium-activated tension of skinned muscle fibers of the frog. Dependence on magnesium adenosine triphosphate concentration. *J. Gen. Physiol.* 63, 722–739 (1974).
10. Fink, R. H., Stephenson, D. G. & Williams, D. A. Physiological properties of skinned fibres from normal and dystrophic (Duchenne) human muscle activated by Ca²⁺ and Sr²⁺. *J. Physiol.* 420, 337–353 (1990).
11. Plant, D. R. & Lynch, G. S. Depolarization-induced contraction and SR function in mechanically skinned muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285,C522-528 (2003).
12. Olthoff, J. T. et al. Loss of peroxiredoxin-2 exacerbates eccentric contraction-induced force loss in dystrophin-deficient muscle. *Nat. Commun.* 9, (2018).
13. Boulanger Piette, A. et al. Targeting the Muscle-Bone Unit: Filling Two Needs with One Deed in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr. Osteoporos. Rep.* 16, 541–553 (2018).
14. Maurel, D. B., Jähn, K. & Lara-Castillo, N. Muscle-Bone Crosstalk: Emerging Opportunities for Novel Therapeutic Approaches to Treat Musculoskeletal Pathologies. *Biomedicines* 5, (2017).
15. Zhou, S. et al. Altered bone-regulating myokine expression in skeletal muscle Of Duchenne muscular dystrophy mouse models. *Muscle Nerve* 58, 573–582 (2018).
16. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337–342 (2003).
17. Simonet, W. S. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309–319 (1997).
18. Lacey, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165–176 (1998).
19. Dufresne, S. S. et al. Genetic deletion of muscle RANK or selective inhibition of RANKL is not as effective as full-length OPG-fc in mitigating muscular dystrophy. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 31 (2018).
20. Dufresne, S. S. et al. Osteoprotegerin protects against muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* 185, 920–926 (2015).
21. 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. *Struct. Lond. Engl.* 1993 20, 1971–1982 (2012).
22. Baud'huin, M. et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 24, 401–409 (2013).
23. Standal, T. et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 100, 3002–3007 (2002).
24. Neville-Webbe, H. L. et al. Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Res. Treat.* 86, 269–279 (2004).
25. Holen, I., Croucher, P. I., Hamdy, F. C. & Eaton, C. L. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 62, 1619–1623 (2002).
26. Shipman, C. M. & Croucher, P. I. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res.* 63, 912–916 (2003).
27. Emery, J. G. et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 273, 14363–14367 (1998).
28. Mosheimer, B. A. et al. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2964–2971 (2005).

29. 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).
30. Kobayashi-Sakamoto, M., Isogai, E., Hirose, K. & Chiba, I. Role of alphav integrin in osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvasc. Res.* 76, 139–144 (2008).
31. Ishihara, J. et al. Laminin heparin-binding peptides bind to several growth factors and enhance diabetic wound healing. *Nat. Commun.* 9, 2163 (2018).
32. Belkin, A. M. & Stepp, M. A. Integrins as receptors for laminins. *Microsc. Res. Tech.* 51, 280–301 (2000).
33. Rozo, M., Li, L. & Fan, C.-M. Targeting β 1-integrin signaling enhances regeneration in aged and dystrophic muscle in mice. *Nat. Med.* 22, 889–896 (2016).
34. Traister, A. et al. Integrin-linked kinase mediates force transduction in cardiomyocytes by modulating SERCA2a/PLN function. *Nat. Commun.* 5, 4533 (2014).
35. Li, M., Yang, S. & Xu, D. Heparan Sulfate Regulates the Structure and Function of Osteoprotegerin in Osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.* 291, 24160–24171 (2016).
36. Dufresne, S. S. et al. Osteoprotegerin protects against muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* 185, 920–926 (2015).
37. Standal, T. et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 100, 3002–3007 (2002).
38. Nozawa, S. et al. Osteoblastic heparan sulfate regulates osteoprotegerin function and bone mass. *JCI Insight* 3, (2018).
39. Kim, S.-H., Turnbull, J. & Guimond, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 209, 139–151 (2011).
40. Graham, Z. A., Gallagher, P. M. & Cardozo, C. P. Focal adhesion kinase and its role in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 36, 305–315 (2015).
41. Wu, C. & Dedhar, S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J. Cell Biol.* 155, 505–510 (2001).
42. Vasanji, Z., Dhalla, N. S. & Netticadan, T. Increased inhibition of SERCA2 by phospholamban in the type I diabetic heart. *Mol. Cell. Biochem.* 261, 245–249 (2004).
43. Samarel, A. M. Focal adhesion signaling in heart failure. *Pflugers Arch.* 466, 1101–1111 (2014).
44. Kim, M. H. et al. Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1324–1338 (2011).
45. Lipskaia, L., Chemaly, E. R., Hadri, L., Lompre, A.-M. & Hajjar, R. J. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin. Biol. Ther.* 10, 29–41 (2010).
46. Goonasekera, S. A. et al. Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 121, 1044–1052 (2011).
47. 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).
48. Bhatnagar, S. & Kumar, A. Therapeutic targeting of signaling pathways in muscular dystrophy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 88, 155–166 (2010).
49. Théoleyre, S. et al. Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 460–467 (2006).
50. Hwee, D. T. et al. The Ca²⁺ sensitizer CK-2066260 increases myofibrillar Ca²⁺ sensitivity and submaximal force selectively in fast skeletal muscle. *J. Physiol.* 595, 1657–1670 (2017).
51. Hollingworth, S., Zeiger, U. & Baylor, S. M. Comparison of the myoplasmic calcium transient elicited by an action potential in intact fibres of mdx and normal mice. *J. Physiol.* 586, 5063–5075 (2008).
52. Coirault, C. et al. Myosin molecular motor dysfunction in dystrophic mouse diaphragm. *Am. J. Physiol.* 277, C1170–1176 (1999).
53. Guellich, A., Negroni, E., Decostre, V., Demoule, A. & Coirault, C. Altered cross-bridge properties in skeletal muscle dystrophies. *Front. Physiol.* 5, 393 (2014).

54. De Luca, A. et al. Alteration of excitation-contraction coupling mechanism in extensor digitorum longus muscle fibres of dystrophic mdx mouse and potential efficacy of taurine. *Br. J. Pharmacol.* **132**, 1047–1054 (2001).
55. Woods, C. E., Novo, D., DiFranco, M., Capote, J. & Vergara, J. L. Propagation in the transverse tubular system and voltage dependence of calcium release in normal and mdx mouse muscle fibres. *J. Physiol.* **568**, 867–880 (2005).
56. Roy, P. et al. Dystrophin restoration therapy improves both the reduced excitability and the force drop induced by lengthening contractions in dystrophic mdx skeletal muscle. *Skelet. Muscle* **6**, 23 (2016).
57. Warren, G. L. et al. Excitation failure in eccentric contraction-induced injury of mouse soleus muscle. *J. Physiol.* **468**, 487–499 (1993).
58. Warren, G. L., Hayes, D. A., Lowe, D. A. & Armstrong, R. B. Mechanical factors in the initiation of eccentric contraction-induced injury in rat soleus muscle. *J. Physiol.* **464**, 457–475
59. Blaauw, B. et al. Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **108**, 105–111 (2010).
60. Warren, G. L., Ingalls, C. P., Lowe, D. A. & Armstrong, R. B. What mechanisms contribute to the strength loss that occurs during and in the recovery from skeletal muscle injury? *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* **32**, 58–64 (2002).
61. Balnave, C. D. & Allen, D. G. Intracellular calcium and force in single mouse muscle fibres following repeated contractions with stretch. *J. Physiol.* **488 (Pt 1)**, 25–36 (1995).
62. Boppart, M. D., Burkin, D. J. & Kaufman, S. J. Activation of AKT signaling promotes cell growth and survival in $\alpha7\beta1$ integrin-mediated alleviation of muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1812**, 439–446 (2011).
63. Blaauw, B. et al. Akt activation prevents the force drop induced by eccentric contractions in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3686–3696 (2008).
64. Gehrig, S. M. et al. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature* **484**, 394–398 (2012).
65. Kennedy, T. L. et al. BGP-15 Improves Aspects of the Dystrophic Pathology in mdx and dko Mice with Differing Efficacies in Heart and Skeletal Muscle. *Am. J. Pathol.* **186**, 3246–3260 (2016).
66. Waning, D. L. et al. Excess TGF- β mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nat. Med.* **21**, 1262–1271 (2015).
67. Baylor, S. M. & Hollingworth, S. Intracellular calcium movements during excitation-contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* **139**, 261–272 (2012).
68. Moss, R. L., Lynch, T. L. & Fitzsimons, D. P. Acting on an impulse (or two): Advantages of high-frequency tetanic onset in skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **149**, 297–300 (2017).

4.11 Figures, tables and legends

Figure 1

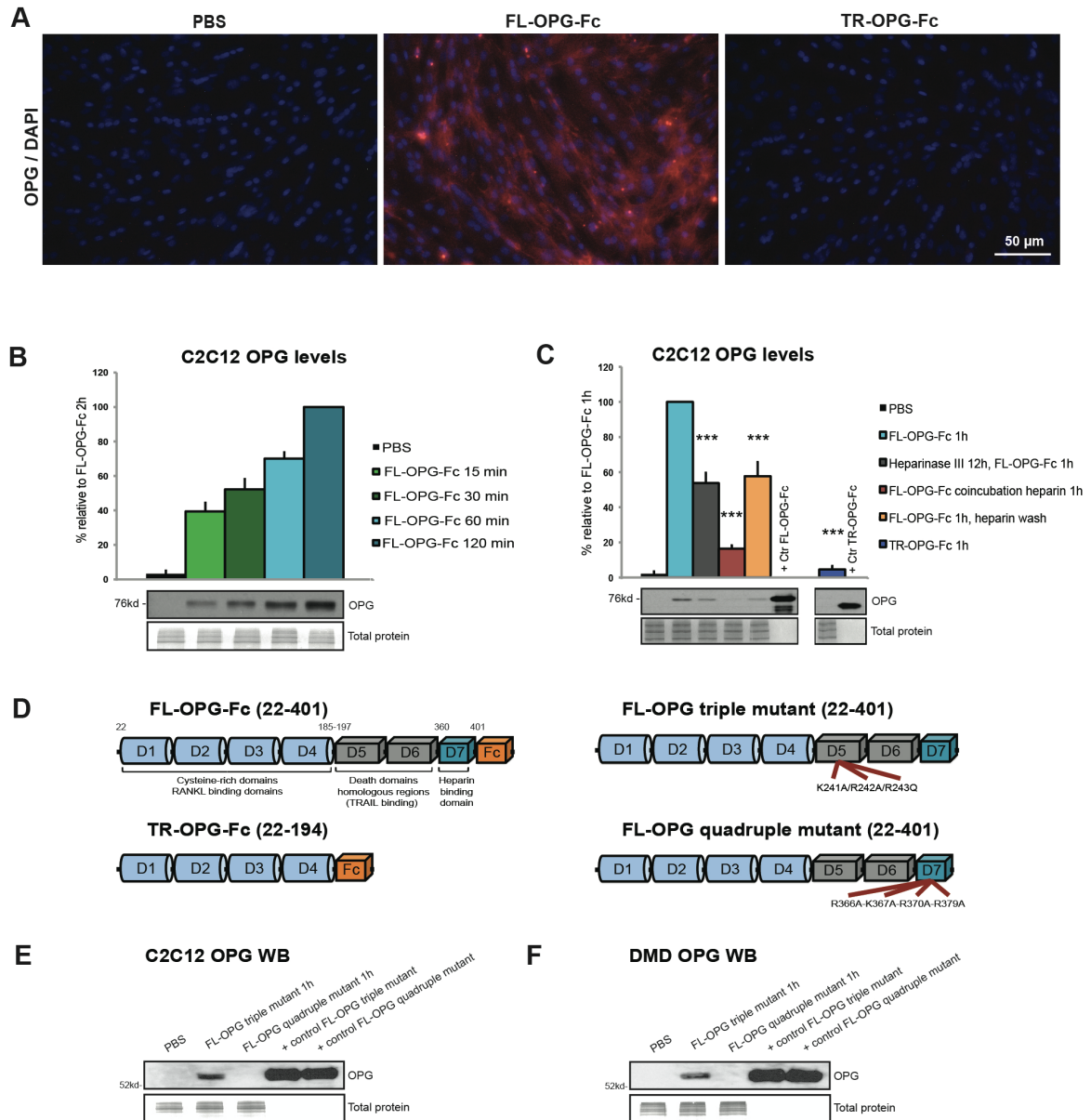


Figure 4.1 FL-OPG binds to myotubes through its heparin-binding domain. Immunofluorescence microscopy of non-permeabilized myotubes shows that FL-OPG-Fc

(red)[100 ng/ml] for 60 min, not TR-OPG-Fc, binds to C2C12 myotubes (A). C2C12 myotubes were exposed to FL-OPG-Fc [100 ng/ml] for 15, 30, 60 and 120 min, washed several times and OPG content determined by WB. OPG content increases in a time dependent manner (n=6)(B). Pre-treatment with heparinase III [50 mU/ml for 12h] or coincubation of FL-OPG-Fc with exogenous heparin [100 ng/ml for 1h] significantly reduce the affinity of FL-OPG-Fc [100 ng/ml for 60 min] to myotubes (n=4)(C). FL-OPG-Fc binding is also diminished by washing myotubes with heparin-containing PBS [10 µg/ml] (n=4)(C). TR-OPG-Fc does not bind to myotubes (n=4)(A-C). Schematic reconstitutions of the four OPG compounds (D). OPG WB shows that native FL-OPG triply mutated in the D5 TRAIL domain binds to C2C12 myotubes while native FL-OPG with quadruple mutations in the D7 heparin domain fails to bind to myotubes (E). The selective affinity of FL-OPG-Fc is also reproduced in isolated myotubes from a DMD patient (F). Mean ±SEM, significantly different from mdx PBS * p<0.05, ** p<0,01 and ***p<0,001.

Figure 2

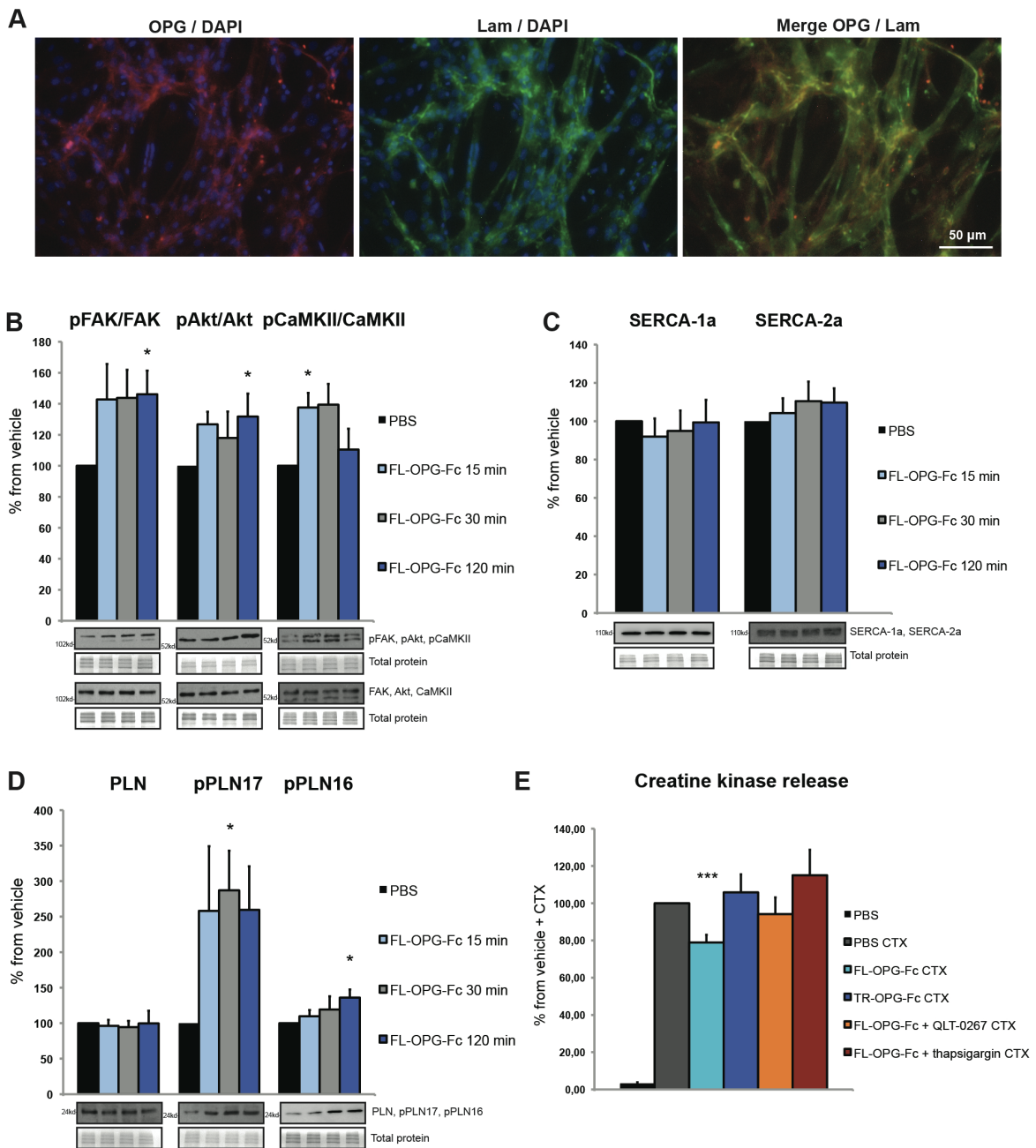


Figure 4.2 FL-OPG-Fc activates FAK/Akt/CaMKII, increases PLN phosphorylation and reduces Ca^{2+} overload-induced damage in myotubes. Double immunofluorescence shows that FL-OPG-Fc [100 ng/ml for 60 min] (red) and laminin

(green) colocalize at the ECM and around myotubes (yellow)(A). Myotubes exposed to FL-OPG-Fc [100 ng/ml] for 15, 30 and 120 min increases phosphorylation ratios of FAK on Tyr397, Akt on Ser473 and CamKII on Thr286 (n=5-7)(B). Myotubes treated with FL-OPG-Fc [100 ng/ml] for 15, 30 and 120 min have unchanged levels of SERCA-1 and SERCA-2a (n=6-8)(C). However, the phosphorylation of PLN on Ser16 and to a larger extent on Thr17, which disinhibits SERCA activity, increased at 30-120 min following FL-OPG-Fc stimulation (n=6-7)(D). In a model of cardiotoxin induced cytosolic Ca^{2+} overload, preventive treatments with FL-OPG-Fc [100 ng/ml] for 24h reduce CK release in the culture media while TR-OPG-Fc treatment failed to diminish CK release following cardiotoxin challenge. CK release was normalized for total protein content (n=8-14)(E). The ILK inhibitor QLT-0267 [1 μ M] or SERCA inhibitor thapsigargin [1 μ M] reversed the effect of FL-OPG-Fc on the CK release, reaching values not different from PBS (n=4)(E). Mean \pm SEM, significantly different from mdx PBS * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$.

Figure 3

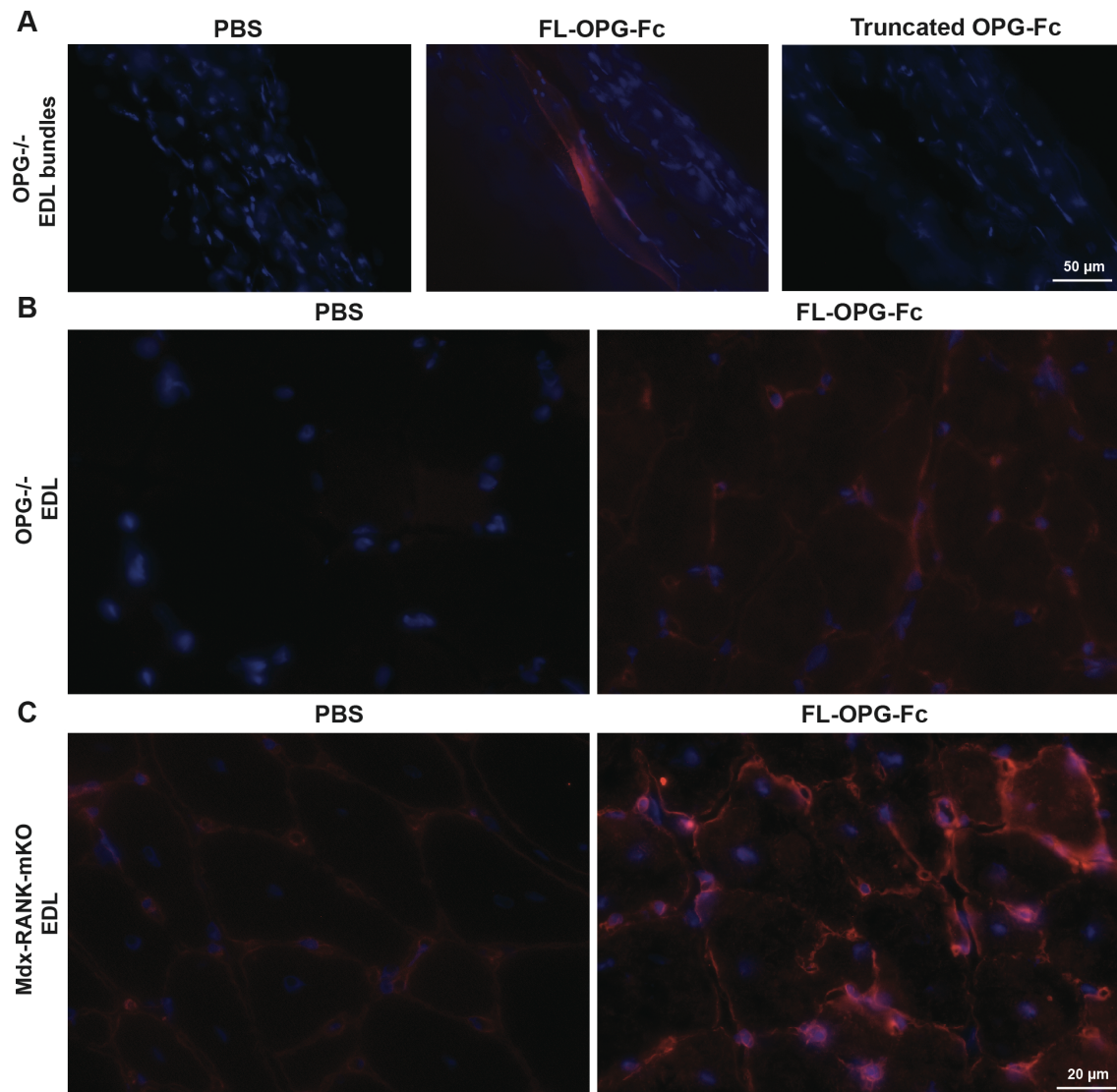


Figure 4.3 FL-OPG-Fc binds to dystrophic EDL muscles. Immunofluorescence microscopy shows that FL-OPG-Fc [100 ng/ml for 60 min], not equimolar dose of TR-OPG-Fc, binds to EDL bundles from *OPG*^{-/-} mice *ex vivo* (A). Six hours following i.p.

administration, FL-OPG-Fc [1 mg/kg] binds to EDL myofibers in OPG^{-/-} mice (B). Native OPG and exogenous FL-OPG-Fc are also localized at the sarcolemma of EDL myofibers from mdx-RANK-KO mice (C), indicating that FL-OPG-Fc can bind to muscle cells independently of RANK/RANKL.

Figure 4

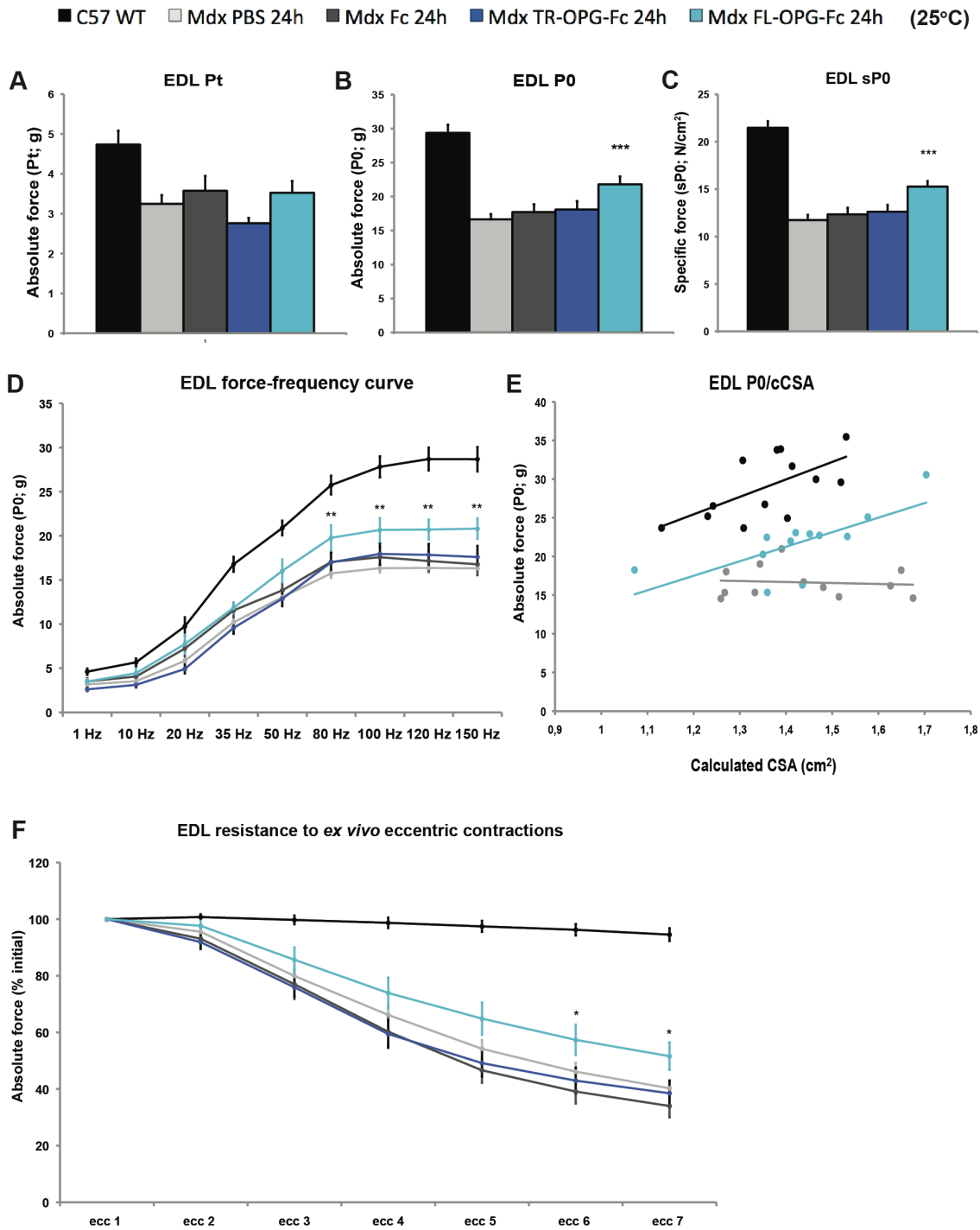


Figure 4.4 A single FL-OPG-Fc injection increases dystrophic EDL tetanic forces. *Ex vivo* contractile properties of isolated EDL muscles from mdx mice at 25°C show that FL-OPG-Fc [1 mg/kg] increases maximal absolute and specific tetanic forces 24h following a

single injection, while equimolar dose of TR-OPG-Fc or Fc fragment had not effect (n=8-12)(A-C). Force-frequency curve specifies that FL-OPG-Fc selectively increases tetanic contractions forces (80-150Hz)(D). The relationship between maximal absolute force and EDL cross-sectional area (CSA) shows compromised contractile capacity in PBS-treated dystrophic muscles but the correlation between force and muscle area is restored in FL-OPG-Fc treated dystrophic muscles (n=12)(E). Dystrophic EDL muscles resistance to repeated *ex vivo* eccentric contractions is significantly improved by FL-OPG-Fc (n=8-12)(F). Mean \pm SEM, significantly different from mdx PBS * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$.

Figure 5

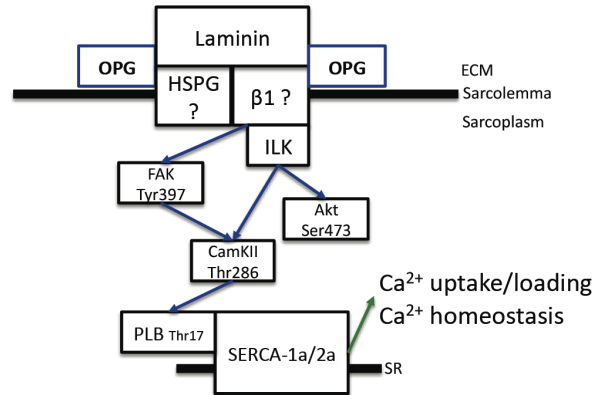


Figure S1

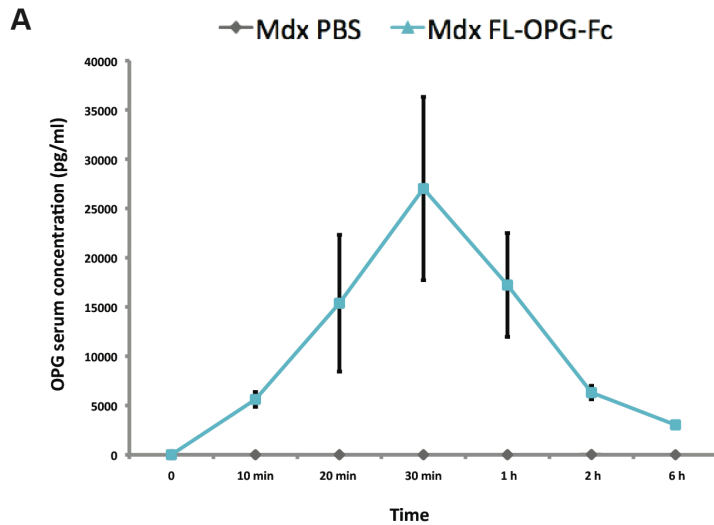


Figure 4.5 Schematic and hypothetical binding and action of FL-OPG-Fc on muscle cells. Model showing binding of OPG to muscle cells through laminin and HSPG and/or integrin-β1, relaying signal directly to FAK and indirectly to CaMKII and Akt on sites known

to be phosphorylated by ILK, the adaptor kinase of integrins. Then, CamKII phosphorylates PLN on Thr17, relieving its inhibition on SERCA pumps, increasing Ca^{2+} uptake and improving Ca^{2+} homeostasis.

Figure 4.S1 OPG peaks in serum 30 min following FL-OPG-Fc injection. At 34 days of age, mdx mice were injected i.p. with FL-OPG-Fc [1 mg/kg] or equi-volume vehicle (PBS). OPG concentration was measured in serum at 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 6 h by ELISA.

	C57 WT	Mdx PBS	Mdx FL-OPG-Fc
Body weight (g)	21,3±0,4	22,3±0,6	22,0±0,5
EDL muscle wet weight (mg)	7,4±0,2	7,5±0,3	7,6±0,3
EDL optimal length (L0; mm)	11,5±0,2	11,1±0,2	11,5±0,2
Pt time-to-peak tension (TPT; ms)	24,1±0,7	24,8±1,2	26,1±2,3
Pt max rate force development (dP/dt; g/s)	406,4±28,9	287,3±13,7	311,5±20,3
Pt relaxation time (RT; ms)	21,2±1,9	18,8±1,3	21,0±1,6
Twitch-to-tetanus ratio (Pt/P0)	0,16±0,01	0,19±0,01	0,15±0,01*
P0 time-to-peak tension (TPT; ms)	252,1±13,0	283,7±19,8	243,1±10,6#
P0 max rate force development (dP/dt; g/s)	478,9±28,6	241,2±8,3	308,6±25,4*
P0 relaxation time (RT; ms)	153,4±17,3	149,3±10,6	144,7±7,76
P0 max rate of relaxation (-dP/dt ; g/s)	889,8±49,9	509,5±49,9	650,2±47,4*

Table 4.1 Morphology and contractile properties of EDL muscles. Mean ±SEM n=12, significantly different from mdx PBS #p<0.10,* p<0.05.

Chapitre 5 : Conclusion

Les multiples approches pharmacologiques et génétiques novatrices qui sont développées pour la DMD, incluant ou non au tissu osseux, devraient être issues d'investigations précliniques sur des modèles à haute valeur prédictive. La présente thèse visait un avancement des connaissances dans les pratiques précliniques en DMD par l'identification de variables discriminantes de la mdx par rapport à la WT, puis la caractérisation du nouveau modèle mdx/utrn+/- . Par la suite, parce que la DMD comprend une dégénérescence simultanée des muscles et des os, nous avons recensé les convergences récentes au sujet des interactions moléculaires leur étant reliées dans un ouvrage destiné à mettre à jour la communauté scientifique. Directement dans cette thématique, nos travaux spécifiques à la voie RANK/RANKL/OPG présentés dans la thèse sont une investigation biologique fondamentale amenant un avancement dans les projets du laboratoire mais dévoilant surtout une nouvelle interaction muscle-os. Les conclusions générales respectives de ces articles seront maintenant présentées, accompagnées de nuances, limitations et perspectives.

5.1 - L'haploinsuffisance en utrophine n'affecte pas la fonction musculaire de la mdx

Le chapitre 2 de la thèse partait du principe que le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour la DMD nécessite des modèles animaux fiables et robustes, visant l'amélioration de la fonction contractile, l'intégrité structurale, la résistance aux dommages induits par la contraction et donc l'arrêt du cercle pathophysiologique réciproque de dommages-inflammation. Néanmoins, volontairement ou involontairement, plusieurs études sont publiées sans préconiser l'utilisation de paramètres discriminants adressant ces visées. Pour faire face à ces lacunes, des entités de recherche en maladies neuromusculaires comme le réseau TREAT-NMD partagent des recommandations que nous tentions ici de renforcer et de compléter. De par les limitations apparentes de la mdx adulte sur certains paramètres, la lignée mdx/utrn+/- a été proposée comme un modèle plus sévère et plus représentatif de la DMD pour l'étude à long terme de modalités thérapeutiques. Cependant, il n'y a actuellement aucun consensus sur sa sévérité et les caractéristiques de sa fonction musculaire *in vivo* et *ex vivo*. Des analyses fonctionnelles, contractiles et histomorphologiques poussées étaient donc requises pour confirmer la dite

supériorité de ce modèle et ainsi avancer une recommandation le concernant. Initialement, l'hypothèse en lien avec caractérisation du modèle mdx/utrn+/- dans notre laboratoire était par le fait même dédiée à la validation de son utilisation pour des projets de traitement à long terme avec le FL-OPG-Fc, l'anti-RANKL et des combinaisons pharmacologiques.

Premier protocole fonctionnel utilisé dans notre étude, la course sur tapis roulant décliné induit une dysfonction et un dommage musculaire important et est une approche pour mesurer la vulnérabilité fonctionnelle et structurale des muscles dystrophiques (165). Une limitation de ce protocole est que le transfert des résultats du tapis vers un muscle isolé en particulier est spéculatif étant donné la biomécanique de course affectant différemment certains groupes musculaires. Nous avons montré que la performance de cette course est sévèrement compromise et que l'activité post-tapis est particulièrement réduite tant pour les mdx/utrn+/+ que les mdx/utrn+/-, ce qui est cohérent avec le rôle structural assigné à la dystrophine mais ne discrimine pas les lignées mdx entre elles (297). Nos résultats valident néanmoins l'utilisation du protocole de course sur tapis décliné pour les études sur les mdx adultes. De plus, l'activité volontaire de base des mdx/utrn+/+, mdx/utrn+/- et WT qui n'ont pas subi le protocole sur tapis était similaire, éliminant de possibles variations intrinsèques cognitives ou physiques qui auraient pu influencer le résultat post-tapis. Les performances fonctionnelles égales observées sur le tapis et l'activité subséquente ont été corroborées dans la capacité de suspension sur grille inversée ainsi que dans le test de force de préhension des 4 pattes sur jauge de force dans les mdx/utrn+/+ et mdx/utrn+/- . Ces résultats sont aussi en accord avec la force de préhension normalisée sur le poids rapportée comme égale dans la littérature pour les souris mdx/utrn+/+ et mdx/utrn+/- de 1 à 4 mois (156). Des résultats contradictoires ont toutefois été rapportés par d'autres équipes. Par exemple, la durée de préhension de la mdx/utrn+/- de 1 à 3 mois s'est révélée plus courte que celle de la mdx/utrn+/+ (164), ainsi que la durée de suspension pour le test à deux ou quatre pattes de 1 à 4 mois (156). Ces différences pourraient être potentiellement dues à des variations de poids de corps entre les deux lignées ou des subtilités techniques dans la prise de mesure. Dans notre étude, les capacités de suspension ou de préhension normalisées par le poids de corps pour la mdx/utrn+/+ ainsi que la mdx/utrn+/- à certains âges se sont avérées être les mêmes que pour les WT, questionnant la sensibilité et la précision de ces tests pour l'évaluation génotype-phénotype, particulièrement dans ces modèles mdx où les muscles ne sont pas tous également affectés par la maladie et où des mécanismes compensatoires prennent

place lors de son évolution (297). Nos résultats suggèrent donc que les niveaux d'utrophine dans les muscles EDL de mdx/utrn+/- sont suffisants pour générer des performances fonctionnelles similaires à la mdx/utrn+/+.

Étant donné les variables influençant les tests fonctionnels à l'échelle de l'animal entier telles que des composantes motivationnelles, cognitives, motrices ou biomécaniques, nous avons complété les propriétés contractiles *ex vivo* de l'EDL pour investiguer plus en détails la fonction musculaire. Globalement, l'haploinsuffisance en utrophine a eu un impact limité sur la majorité des paramètres contractiles, et ce, à tous les âges testés. Tel qu'attendu, ces valeurs ont été largement inférieures à celles des WT, validant l'utilisation de la mdx. Ces différences entre les WT et les mdx/utrn+/+ ou les mdx/utrn+/- en terme de production de force maximale absolue et spécifique ne sont pas surprenantes car il est documenté que la mdx vit sa plus importante phase de dégénération musculaire immédiatement après le sevrage. À 2 mois d'âge, la dystrophie musculaire en terme de performances fonctionnelles, de force de secousse et de force maximale absolue s'est partiellement dissipée et le gain de masse musculaire, communément appelé hypertrophie compensatoire, a été hautement efficace à maintenir la force maximale absolue à 5 mois dans les deux génotypes dystrophiques (298). L'objectif premier du modèle mdx/utrn+/- est de contrecarrer cette phase pour les études à long terme la traversant, afin d'éviter que la maladie s'améliore indépendamment du traitement. Par contre, nos résultats démontrent que la force maximale spécifique des mdx/utrn+/- n'a seulement eu qu'une tendance à être légèrement et transitoirement plus basse que celle de la mdx/utrn+/+ à 2 mois. Au-delà de la production de force, une étude précédente a montré que les souris mdx/utrn-/- sont très vulnérables aux contractions excentriques (299). La résistance aux contractions excentriques *ex vivo* des EDL dans notre étude était équivalente pour les mdx/utrn+/+ et les mdx/utrn+/-, démontrant la similarité structurale et contractile entre ces deux génotypes. Nos mesures biochimiques de l'activité de la créatine kinase en circulation à 5 mois ont corroboré à l'échelle systémique que la mdx/utrn+/+ et la mdx/utrn+/- souffriraient d'une perte d'intégrité équivalente liée au dommage encouru par cette structure dystrophique. Fait intéressant non-publié, les muscles de phénotype mixte/lent SOL, en contraste avec les muscles rapides EDL publiés, ont réagi de manière similaire pour toutes les variables, montrant que le phénotype musculaire n'est pas significativement affecté par l'haploinsuffisance en utrophine pour la mdx. Les fibres lentes

de la mdx profitent d'ailleurs d'une augmentation d'utrophine supérieure à celle retrouvée dans les fibres rapides, ce qui rend donc ce résultat relativement prévisible.

Pour confirmer nos résultats fonctionnels et contractiles et tenter de se comparer à certaines données de la littérature, nous avons ensuite utilisé des expériences histologiques. Nous avons trouvé que l'aire de surface moyenne des fibres musculaires, qui inclut des fibres hypertrophiées et des petites fibres en dégénération/régénération, demeure statistiquement stable entre les mdx/utrn+/+ et mdx/utrn+/- . Fait intéressant, le pourcentage de noyaux centraux en fonction du nombre de fibres musculaires était significativement plus élevé chez les EDL des mdx/utrn+/- que les mdx/utrn+/+ à 1 mois, suggérant un cycle de dégénération/régénération différé ou plus profond. La masse de l'EDL par rapport à la masse du corps est d'ailleurs plus élevée à ce moment pour les mdx/utrn+/-, possible œdème accrue accompagnant ce phénomène. Tel que discuté plus haut, cette différence histologique ne s'est toutefois pas transférée sur la contractilité, qui est d'ailleurs déjà très affectée à 1 mois pour la mdx/utrn+/+. Nous avons aussi observé une quantité de fibrose similaire à 1, 2 et 5 mois pour les WT, mdx/utrn+/+ et mdx/utrn+/-, suggérant que le gain de masse musculaire des EDL dystrophiques soit probablement associé à de l'œdème et que le processus fibrotique de la DMD n'est pas reproduit dans les pattes du modèle mdx. Il y a d'ailleurs un manque de consensus pour la présence de fibrose dans les muscles des pattes de ces deux lignées. En effet, la fibrose dans les muscles gastrocnémiens a été rapportée comme plus haute pour les mdx/utrn+/- à 2 mois mais pas à 10 mois. D'un autre côté, aucune fibrose n'a été observée dans les quadriceps de mdx/utrn+/- à 3 ou 4 mois mais une augmentation positive l'a été à 6 mois (161,163,300). D'autres travaux n'ont détecté aucune différence dans le tissu nécrotique/fibrotique des *tibialis anterior* ou des triceps de mdx/utrn+/- à 4 mois (156). En somme, à la lumière de cette hétérogénéité inter- et intra-études, la perte de fonction contractile des EDL semble survenir plus tôt que les changements histologiques dans les souris dystrophiques de nos expériences, suggérant une faiblesse du matériel contractile lui-même. Pour éclaircir cette notion temporelle, nous avons effectué les propriétés contractiles des muscles EDL des deux lignées à 8 mois. Les résultats préliminaires n'ont montré aucune différence de production de P0 ou sP0 ni de résistance aux contractions excentriques entre les lignées mdx, suggérant que les âges testés n'étaient pas une limite de notre étude, qui se concentrait d'ailleurs sur la nature pédiatrique/adolescente/adulte de la DMD. En complément, nos études contractiles non-publiées sur la mdx/utrn+/-

confirment qu'elles sont plus gravement touchées que la mdx/utrn+/+ pour tous les paramètres de production de force et de résistance aux contractions excentriques, soulignant le rôle de l'utrophine et la capacité de nos techniques à mesurer ces différences. Étant donné leur durée de vie limitée, les difficultés associées à leur reproduction et le potentiel translationnel réduit car les patients vivant avec la DMD expriment l'utrophine, la mdx/utrn-/- ne fait pas l'unanimité auprès de la communauté de recherche en DMD et c'est la mdx/utrn+/- qui a été mise de l'avant.

Notre découverte que l'haploinsuffisance en utrophine n'empire pas la performance fonctionnelle et les propriétés contractiles du muscle EDL des souris mdx suggère que son expression monoallélique est suffisante dans la mdx/utrn+/- pour prévenir une détérioration musculaire supplémentaire à l'absence de la dystrophine, soulignant la capacité structurale de cette protéine. Supportant cette notion de seuil protéique suffisant à conférer un bénéfice, des travaux précédents ont montré que de faibles niveaux de dystrophine chez la mdx/utrn-/- peuvent conférer une protection aux muscles dystrophiques et augmenter l'espérance de vie (301,302). Au final, les souris mdx demeurent un modèle économique pour la découverte de composés thérapeutiques, en particulier lorsque que les protocoles de propriétés contractiles, de résistance aux contractions excentriques *ex vivo* et de course sur tapis roulant décliné sont utilisés, et ce, spécifiquement durant la première phase aiguë de dégénération/régénération qui survient à 4-5 semaines d'âge. Cependant, les résultats hétérogènes observés au sein d'équipes de recherche de provenances multiples ont suggéré la présence de processus inflammatoires et fibrotiques plus importants pour la mdx/utrn+/- adulte. Ces résultats pourraient être en lien avec les conditions d'animalerie en ce qui a trait à l'asepsie des lieux, la nutrition, le nombre de croisements, etc. La lignée mdx/utrn+/- pourrait donc être utile pour l'étude de ces processus à long terme lorsque les conditions expérimentales le permettent. La contractilité *ex vivo* n'a généralement pas été caractérisée dans les articles supportant la mdx/utrn+/- comme un modèle plus grave au niveau fonctionnel et histologique. Il est donc difficile de spéculer sur les potentielles répercussions de ces processus sur la fonction musculaire isolée auprès des paramètres discriminants cités plus haut et de comparer nos données de manière critique. Une des rares publications utilisant les propriétés contractiles pour une investigation avec ce modèle a montré à 20 semaines une baisse de 60% pour le sP0 des muscles EDL des mdx/utrn+/- par rapport aux WT (303). Une étude subséquente du même groupe rapporte cependant une baisse

non significative du sP0 de l'EDL des mdx/utrn+/- à 10 semaines par rapport aux souris WT, ainsi qu'une baisse de sP0 de 40% à 20 semaines par rapport aux souris WT (304). Cette baisse est moins importante que celle de leur étude précédente mais cette fois plus fidèle à nos résultats, données hétérogènes rendant l'interprétation du statut réel de la lignée difficile, en plus du fait que ces études ne comportaient pas de mdx/utrn+/+. Finalement, des études comparatives non-publiées d'une équipe de l'Université de Sao Paulo (Thèse de Thais Borges Lessa) montrent des propriétés contractiles légèrement plus affectées à 2 mois mais égales à 6 mois pour les diaphragmes de souris mdx/utrn+/- par rapport aux mdx/utrn+/+, ce qui est cette fois en accord avec nos données.

Au-delà de la mdx/utrn+/- elle-même, cette lignée témoigne de l'importance de la notion chronologique de traitement pré-apparition vs intra-maladie pour la communauté de recherche sur la DMD. Cette distinction vise à traiter des populations de patients différentes et nécessite des modèles mieux adaptés à l'évolution de la maladie. Les nombreuses stratégies générées à cet effet, outre la manipulation de l'utrophine, incluent la mdx2cv-mdx5cv-mdx4cv/TRG2 à télomères courts, mdx52, mdx-myod-/-, mdx-dystrobrevin-/-, mdx- α 7integrin-/-, mdx-parvalbumin-/-, mdx-DBA/2J, mdx-Cmah-/- et autres, augmentant la complexité et la difficulté du choix de lignée (133,305). Ces dernières possèdent leurs avantages et limitations selon le budget, la chronologie de la pathologie, le mécanisme d'action ciblé ou l'étude spécifique des muscles des pattes ou cardio-respiratoires. À l'image de l'étude de l'électrophysiologie cardiaque qui nécessite plusieurs modèles animaux pour l'étude des divers courants ioniques présents chez l'humain, les paramètres de la DMD peuvent se retrouver dans plusieurs modèles. De plus, ces modèles doivent être considérés pour la solidité de leur caractérisation et leur compatibilité avec le phénotype ainsi que la génétique humaine. Devant cette étendue de manipulations génétiques qui ont par le fait même contribué à la compréhension de la pathophysiologie de la DMD, la mdx demeure un choix reconnu par la littérature et doté de paramètres discriminants de la WT. Les nouvelles technologies d'édition du génome permettent néanmoins la création de modèles dystrophiques chez le rat, le lapin, le chien et le porc (306). C'est donc vraisemblablement une démarche passant par un criblage à l'échelle cellulaire, une validation chez la souris puis un transfert chez un animal de plus grande taille qui augmentera la probabilité d'obtenir une stratégie efficace chez l'humain, et non pas le choix d'un seul et unique modèle mdx en particulier.

Les interactions muscle-os dans la DMD

Dans l'optique de développer ces stratégies efficaces pour la DMD, il a été observé qu'en plus des dysfonctions musculaires, une basse densité minérale ainsi qu'une fragilité osseuse ont été associées à plusieurs dystrophies musculaires et accompagnées de comorbidités handicapantes (307–311). La faiblesse osseuse observée dans la DMD est partiellement causée par la réduction de la locomotion, l'utilisation chronique de glucocorticoïdes et des changements dans des interactions moléculaires bi-directionnelles muscle-os soulignées dans l'article de revue joint dans la thèse. Cette notion d'organes sécrétoires est d'ailleurs supportée par des hypothèses et découvertes au sein de processus développementaux, de l'ostéogenèse imparfaite, la guérison de blessures musculosquelettiques, l'hypogravité, la sarcopénie et même dans la faiblesse musculaire liée au cancer ostéolytique (180,182,312–315). Les dialogues muscle-os de la DMD incluent des ostéokines, myokines et cytokines qui agissent sur des sentiers de signalisation communs impliqués entre autres dans l'inflammation, la fibrose, le catabolisme, l'anabolisme, l'angiogenèse et l'homéostasie du Ca^{2+} .

La nuance de ces affirmations réside en partie dans le fait que les approches expérimentales permettant de réellement discriminer l'apport mécanique de l'apport moléculaire, qui plus est de molécules isolées, constitue un défi important. De plus, au-delà des rôles individuels de ces molécules, l'environnement globalement pro-inflammatoire de la mdx peut brouiller leurs contributions respectives sur les deux tissus, en plus de faire intervenir plusieurs autres types cellulaires. Un agent pourrait donc avoir un rôle favorable sur un tissu et engendrer un effet positif indirect sur l'autre via une amélioration systémique sans pour autant parler d'une interaction moléculaire précise. L'étude du domaine s'en voit donc complexifiée. Une autre limitation liée à cette notion est que l'amélioration simultanée de l'os et du muscle par un agent n'est pas nécessairement synonyme qu'une interaction ou voie de signalisation commune est causale pour la DMD. Par exemple, le récepteur RANK est un récepteur en amont de la voie NF- κ B dans l'os et son inhibition systémique pourrait théoriquement profiter aux muscles dystrophiques en réduisant l'activation de NF- κ B globalement, et ce, sans que l'interaction RANKL/RANK ne soit délétère pour la fonction musculaire en soi ou

contributoire dans la DMD. Des investigations à ce sujet sont d'ailleurs en cours dans le laboratoire afin de savoir si la présence ou l'absence de membres de la triade peuvent causer des changements musculaires positifs ou négatifs. L'utilisation d'études génomiques puissantes, de lignées cellulaires isolées, d'anticorps monoclonaux, de techniques de quantification de la force musculaire, de lambeaux de tissus et de lignées transgéniques spécifiques à l'os ou au muscle ont contribué à solidifier ces hypothèses.

Les approches innovantes ciblant les molécules de ce dialogue peuvent être explorées individuellement, pour à la fois viser la dystrophinopathie et les bénéfices à l'os, ou à titre de complément aux soins musculaires pour contrer des effets négatifs sur l'os. L'article traite d'ailleurs de l'importance clinique de considérer la santé osseuse des patients DMD, tant pour leur capacité motrice que pour leur survie. Des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de valider des interactions muscle-os et de choisir des approches basées sur le dialogue muscle-os qui peuvent protéger à la fois le muscle et l'os, avec le but ultime d'améliorer la qualité et l'espérance de vie dans la DMD. L'article contient un résumé de nos travaux récents sur la voie RANK/RANKL/OPG dans la DMD, section terminant avec la question ouverte d'une action indépendante de la triade de l'OPG sur les cellules musculaires.

L'OPG peut interagir directement avec les cellules musculaires

Nos travaux antérieurs ont démontré que le traitement de 10 jours avec le FL-OPG-Fc améliorait la fonction musculaire mieux que la délétion spécifique de RANK musculaire dans les muscles EDL de souris dystrophiques. Aussi, l'augmentation de l'activité maximale de SERCA conférée par le FL-OPG-Fc ne fut pas corroborée par l'approche génétique, suggérant une action du FL-OPG-Fc indépendante de l'interaction RANKL/RANK. La liaison de l'OPG à des molécules autres que RANKL a été observée, notamment aux protéoglycanes héparanes sulfates sur les cellules de myélomes multiples (260). De manière similaire, nous rapportons la capacité du FL-OPG-Fc à se lier directement aux cellules musculaires par son domaine de liaison à l'héparine. Conformément à ce qui est vu sur les cellules de myélomes multiples ou les ostéoblastes (260,316), cette liaison fut sensible à l'action de l'héparinase qui déplete les héparanes sulfates de surface et à l'ajout d'héparine exogène suite au traitement avec le FL-OPG-Fc qui a partiellement délogé l'interaction. De plus, la co-incubation du FL-OPG-Fc avec de

l'héparine a significativement réduit la liaison, qui fut compromise totalement lorsque la protéine fut tronquée de son domaine de liaison à l'héparine. De plus, les résultats que nous avons obtenus en utilisant le FL-OPG muté dans les acides aminés considérés comme essentiels pour sa liaison aux héparanes sulfates d'ostéoblastes ont confirmé l'importance de son domaine de liaison à l'héparine et corroboré les acides aminés de cette liaison ciblés précédemment (258). Ces données sont conformes aux travaux sur les cellules de myélomes multiples montrant que le FL-OPG se lie aux cellules tandis qu'il est impossible pour un variant tronqué d'OPG ne contenant pas de domaine de liaison à l'héparine (317).

Parce que l'interaction OPG-intégrines induit la prolifération des cellules endothéliales et atténue l'apoptose par l'activation de FAK et Akt dans les cellules de cancer ovarien et du fait que les HSP coopèrent avec les intégrines pour réguler des processus cellulaires (262,263,272), nous avons investigué les effecteurs en aval de l'interaction du FL-OPG-Fc découverte précédemment. Le FL-OPG-Fc dans les cellules musculaires active rapidement FAK, un médiateur clé de la signalisation des intégrines, et Akt, une cible en aval de la transduction de ce signal (287,318). Le FL-OPG-Fc a aussi activé CaMKII dans notre étude, une kinase spécifique aux sérines/thréonines qui a été rapportée comme nécessaire à la gestion du Ca^{2+} par la modulation de ILK/PLN/SERCA dans les cardiomyocytes (290). Dans ces cellules cardiaques, ILK active PLN/SERCA-2a par l'entremise de CaMKII et augmente le taux de décharge calcique directement relié à la recapture et charge de Ca^{2+} du RS (290). À l'inverse, dans la cardiopathie diabétique, la phosphorylation de PLN par CaMKII est réduite et accompagne une performance cardiaque compromise et une recapture de Ca^{2+} du RS diminuée (319). Dans notre étude, la phosphorylation de PLN a été augmentée par FL-OPG-Fc de manière concomitante à l'activation de CamKII, suggérant une désinhibition de SERCA et une meilleure recapture et charge de Ca^{2+} du RS. Nos observations en culture de myotubes sont en accord avec le fait qu'à 10 jours de traitement de FL-OPG-Fc dans les muscles dystrophiques, l'activité de SERCA est augmentée (320). Pour tester l'effet du FL-OPG-Fc sur l'homéostasie calcique, nous avons par la suite utilisé un modèle cellulaire de dommage induit par la surcharge calcique avec l'hypothèse que le FL-OPG-Fc réduirait le dommage et la fuite de composantes intracellulaires. Nous avons trouvé que le FL-OPG-Fc peut réduire la libération de la créatine kinase, un indicateur d'intégrité sarcolemmale, un phénomène

partiellement renversé par l'inhibition d'ILK ou de SERCA, supportant les acteurs découverts plus haut.

La capacité de liaison de l'OPG n'est donc pas limitée aux cellules cancéreuses car le FL-OPG-Fc peut se lier aux cellules musculaires et induire des sentiers signalétiques (FAK/Akt/CaMKII/PLN) similaires à ce qui a été démontré comme pouvant déclencher d'importants changements fonctionnels en contexte d'insuffisance cardiaque ou de muscles dystrophiques (88,90,321–324). Aussi, nos résultats signalétiques montrent que la capacité de liaison du FL-OPG-Fc par son domaine de liaison à l'héparine n'est pas seulement utile pour réguler sa bioavaiabilité ou demi-vie en circulation (257). Cette notion de bioavaiabilité est soulignée par le fait que le TR-OPG a un effet supérieur au FL-OPG dans le traitement de la dégradation osseuse de l'ostéosarcome de manière indépendante de TRAIL car ce dernier peut être immobilisé et neutralisé par des GAGs du microenvironnement tumoral (256). Basé sur ces évidences, le FL-OPG aurait le potentiel théorique d'être immobilisé, internalisé et dégradé par les fibres musculaires dystrophiques en régénération sur lesquelles les HSPG sont particulièrement abondants (274–276), devenant un contributeur potentiel de la faiblesse osseuse, tel que vu dans le cas du myélome multiple (325). De ces connaissances émerge cependant un conflit entre la volonté d'atteindre positivement l'os et le muscle, le TR-OPG étant beaucoup plus efficace à traiter l'os que le FL-OPG, tandis que le FL-OPG peut atteindre directement le tissu musculaire mais est limité en ce qui a trait à sa protection de l'os de par son immobilisation sur les HSP/GAG ainsi que ses faibles propriétés pharmacocinétiques et spécificité tissulaire en découlant. Ces considérations sont importantes pour les perspectives thérapeutiques dessinées à partir d'études biologiques fondamentales comme celle-ci.

Au-delà de ces expériences sur des cellules musculaires en culture, nous avons également démontré que l'OPG natif et le FL-OPG-Fc peuvent atteindre et lier les muscles EDL dystrophiques délétés spécifiquement en RANK musculaire, mettant de côté un possible complexe tertiaire RANK/RANKL/OPG (255) et de l'avant une interaction moléculaire muscle-os tant au niveau physiologique que lorsque le FL-OPG-Fc est injecté. Nous avons ensuite exploité les connaissances issues des études de caractérisation du modèle mdx/utrn afin de choisir des indices discriminants de la fonction musculaire à 1 mois d'âge pour la mdx, notamment le P0, sP0 et la résistance aux contractions

excentriques en propriétés contractiles *ex vivo*. Dans le cadre de ces travaux, nous avons trouvé qu'une seule injection de FL-OPG-Fc potentialisait le P0 et le sP0 de muscles EDL dystrophiques, exclusivement dans les contractions téaniques correspondant à des contractions liées à une libération de Ca^{2+} soutenue. Cela suggère que le charge de Ca^{2+} du SR et/ou la libération de Ca^{2+} du SR serait augmentée avec le FL-OPG-Fc. Fait intéressant, les agents augmentant la sensibilité myofibrillaire au Ca^{2+} qui ralentissent la dissociation du Ca^{2+} de la troponine augmentent la force des fibres rapides spécifiquement dans les contractions sous-téaniques et ralentissent la relaxation (326). Dans notre étude, le FL-OPG-Fc ne semble pas affecter la sensibilité au Ca^{2+} de la troponine parce qu'on ne retrouve pas d'augmentation significative du P0 et sP0 durant les contractions sous-téaniques, renforçant l'hypothèse de la majoration de la charge et libération du Ca^{2+} du RS, qui sont compromises dans les muscles dystrophiques (102,104,105). L'absence de gains en contractilité pour les souris WT traitées au FL-OPG-Fc suggère que ces processus se doivent d'être compromis pour que le traitement apporte un bénéfice (194). De plus, le rétablissement du ratio Pt/P0 et des propriétés cinétiques du TPT, dP/dT et -dP/dT des P0 d'EDL dystrophiques traités au FL-OPG-Fc appuie cette potentiation de contractions téaniques. En lien avec cette découverte, l'inefficacité du TR-OPG-Fc ou du fragment Fc seul à augmenter ces paramètres supporte un effet lié à la capacité de liaison du FL-OPG-Fc.

En terme de gain du P0, la relation P0-cCSA a montré que, en comparaison avec la WT, les EDL dystrophiques de 35 jours n'étaient pas capable de produire un P0 maximal. Ce problème est également observé pour les muscles de patients vivant avec la DMD (95), renforçant la notion que la relation P0-cCSA reflète la qualité musculaire. Même avant la disparition progressive du tissu musculaire dans des stades avancés de la maladie, les fibres dystrophiques intactes ou en régénération montrent un couplage EC compromis, une libération de Ca^{2+} diminuée et des sarcomères défectueux, engendrant de la faiblesse (102,103,107,111,327–329). Au-delà des dommages structuraux, un pourcentage substantiel des pertes de force associées aux contractions excentriques répétées est dû à des changements de perméabilité ionique, d'excitabilité, de libération du Ca^{2+} et de sensibilité au Ca^{2+} des myofibrilles contractées et étirées (128,330–334). Des travaux récents montrent que les muscles dystrophiques ont une perte de force minime lorsque l'intervalle entre les contractions excentriques est prolongé de 3 à 30 minutes, et que les espèces oxygénées réactives contribuent à cette perte de force (335). D'après les auteurs,

la perte de force associée aux contractions excentriques pourrait être un coupe-circuit adaptatif permettant aux muscles dystrophiques de se protéger contre des dommages importants, philosophie cohérente avec nos travaux montrant que le tissu contractile dystrophique aurait en réalité une force supérieure rapidement potentialisable par l'activation de certaines voies.

Nos résultats *in vitro* démontrent que le FL-OPG-Fc active FAK/Akt/CaMKII/PLN, voie comportant des sentiers importants pouvant améliorer la fonction musculaire ou les pertes de force chez les muscles dystrophiques. Par exemple, un anticorps activateur des β 1-intégrines qui augmente la régénération et la production de force active également FAK *in vitro* (336) et une amélioration de la dystrophie musculaire médiée par l' α 7 β 1 intégrine dans les mdx/utrn^{-/-} est en partie due à l'activation de ILK et Akt (337). Dans d'autres travaux, l'activation de Akt dans la mdx améliore la fonction musculaire, prévient la perte de force associée aux contractions excentriques et influence positivement la régulation de gènes codant pour des protéines des disques Z, des costamères et des systèmes anti-oxydants (322,338). De plus, l'amélioration de la fonction des pompes SERCA dans les dystrophies musculaires réduit le dommage, augmente la fonction et diminue le déficit de force suite aux dommages excentriques (87,88,90,339). Nos résultats montrent donc que la dysfonction musculaire est un événement précoce, différent de la perte de tissu contractile, qui peut être amélioré rapidement possiblement via l'activation de FAK/Akt/CaMKII/PLN/SERCA, et ce, avec ou sans changements dans le contenu contractile ou l'intégrité structurale.

Au-delà du contexte de notre article, nous spéculons donc que le gain de force associé au FL-OPG-Fc 24h pourrait impliquer des composantes du couplage EC qui sont compromises dans les muscles dystrophiques. La libération de Ca²⁺ est rapide et large dans le myoplasme durant ce couplage, particulièrement chez les fibres rapides (340), et serait un mécanisme qui pourrait accélérer le dP/dT et contribuer à générer une force plus grande durant la formation des ponts-croisés en maintenant des hauts niveaux de Ca²⁺ liés à la troponine (341). Cette hypothèse est toutefois difficile à conjuguer avec la voie montrée *in vitro* et nos résultats précédents se soldant par une activité de SERCA potentiellement augmentée, qui diminuerait théoriquement cette période de contact du Ca²⁺ lié à la troponine par une recapture intensifiée par le RS. Il est à noter que l'activité maximale de SERCA est mesurée dans des conditions expérimentales optimales et ne

réflète pas nécessairement son activité lors de la résolution de contractions tétaniques *in vivo*. Comme en témoignent les muscles EDL de souris WT qui possèdent à la fois un haut sP0 et une activité de SERCA supérieure à celle des mdx, d'autres mécanismes sont probablement impliqués dans le processus de recapture, stockage et libération du Ca^{2+} menant à une augmentation de la force tétanique. L'hypothèse de l'amélioration de l'homéostasie calcique du FL-OPG-Fc à long terme et les processus de l'augmentation de la force tétanique à court terme pourraient donc être la somme de mécanismes dépendants et indépendants. Aussi, il n'est pas clair si cette activité enzymatique augmentée fait partie de phénomènes précoces ou est un effet secondaire de l'amélioration globale de l'intégrité musculaire dans l'installation de cette protection dotée d'une composante potentiellement directe. En lien avec nos travaux muscle-os, il a été découvert que le TGF- β sécrété par l'os en contexte oncologique de métastases osseuses pouvait influencer la contractilité du muscle squelettique via l'oxydation de RYR et la diminution de la libération calcique associée (342). Dans ces travaux, l'effet de TGF- β fut médié par la NADPH oxydase 4, une source de stress oxydatif importante affectant plusieurs protéines musculaires (342). Devant la nature muscle-os de cette interaction et l'effet sur le statut redox, il n'est pas impossible que le FL-OPG-Fc pourrait engendrer un effet indirect inverse favorisant la performance de RYR et la libération du Ca^{2+} soutenue.

Dans le microenvironnement des fibres musculaires dystrophiques, les leucocytes infiltrés représentent un source de facteurs oxidants importante qui pourrait contribuer au stress oxydatif global de la dystrophie musculaire puis compromettre le couplage EC (61,73,74). L'étude de l'abondance et activité des leucocytes est actuellement en cours dans le laboratoire pour tenter d'expliquer le gain de force attribuable au FL-OPG-Fc après une seule injection. Le domaine de liaison à l'héparine de l'OPG possède d'ailleurs un rôle ambivalent dans la chimiotaxie des monocytes via syndécan-1 (259). L'étude suggère que l'OPG interagirait avec les protéoglycanes des monocytes et aurait une action chimioattractante lorsque seul ou inhibitrice de l'action chimioattractante de certaines chimiokines lorsque pré-incubé avec les monocytes (259). Les hypothèses des auteurs comprennent la possibilité que le haut gradient de l'OPG circulant prévienne l'activation et la migration des monocytes ou macrophages vers des sites d'inflammation chronique et qu'il prévienne l'attraction de cellules myéloïdes précurseurs d'ostéoclastes à des lieux de dégradation osseuse pro-inflammatoire (259). En contrepartie, d'autres travaux ont montré une promotion marquée de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales par l'OPG

et que ce comportement pro-adhésif était médié par son domaine de liaison à l'héparine, phénomène potentiellement délétère lors de conditions pathologiques cardiovasculaires ou métaboliques qui comprennent des hauts niveaux d'OPG circulant (343). Ces données s'ajoutent à la controverse sur le rôle des niveaux variables d'OPG circulant dans la santé vasculaire et laissent entrevoir une perspective de modulation hors-triade de l'inflammation dans la DMD, en plus de souligner le fait que les dialogues muscle-os puissent inclure des cellules médiatrices telles que les leucocytes.

De par la complexité de l'investigation, les difficultés techniques des expériences animales leur étant reliées, la nouveauté du sujet et la période temporelle définie qu'est le doctorat, les études de ce chapitre comportent plusieurs questions ouvertes. Outre le volet inflammatoire décrit plus haut, des expériences sont actuellement en cours à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire, particulièrement pour tenter de renforcer la compréhension de la signalisation cellulaire et d'identifier l'origine du gain de force relié au FL-OPG-Fc 24h. Au niveau cellulaire, bien que le FL-OPG-Fc risque de pouvoir s'associer à plusieurs HSP/GAG, nous effectuons des immunoprécipitations et de la colocalisation en immunofluorescence pour confirmer certaines cibles d'intérêt comme les intégrines $\beta 1$, en plus d'envisager l'utilisation de siRNA lui étant dirigé. Toujours au niveau cellulaire, une collaboration en cours à Genève étudie présentement par imagerie calcique sur fibres de FDB isolées de mdx l'effet du traitement aigu au FL-OPG-Fc sur l'ampleur de la libération de Ca^{2+} évoquée par stimulation chimique ou électrique. Ces travaux sont étroitement liés à une autre collaboration à Indianapolis qui caractérise actuellement RYR dans les muscle EDL dystrophiques traités au FL-OPG-Fc en ce qui a trait à son abondance, couplage avec FKBP12 et son état post-traductionnel d'oxydation, nitrosylation et glutathionylation. Ces informations permettront de part et d'autre de mieux comprendre le mécanisme de génération de la force lié à nos hypothèses de libération du Ca^{2+} majorée suite au traitement FL-OPG-Fc 24h, potentiellement via RYR. Chez l'animal, l'utilisation d'anticorps bloquants et d'inhibiteurs de différents acteurs de la voie tel qu'ILK est planifiée et devrait apporter des renseignements sur la transférabilité des découvertes cellulaires à l'échelle animale. Aussi, parce que nos sentiers de signalisation laissent sous-entendre que l'activité de SERCA serait contributive à une meilleure homéostasie calcique et un meilleur stockage dans le RS, des myotubes et muscles EDL dystrophiques traités à court terme avec le FL-OPG-Fc seront promptement envoyés à Waterloo pour l'évaluation de leur activité de SERCA maximale. Ces volets de l'étude ont l'objectif de consolider l'article

en préparation dans la thèse mais constitueront également de nouveaux projets qui se grefferont au programme de recherche de notre laboratoire.

Brièvement, plusieurs directions futures découlent de ce champ de recherche nouveau. Premièrement, l'ajout de nos connaissances à la littérature en ce qui concerne la capacité de l'OPG à se lier directement aux cellules musculaires ouvre la porte à plusieurs autres actions hors de la triade pour quelconque type cellulaire qui expose des HSP/GAG à sa surface. Hormis les cibles habituelles tumorales, endothéliales et osseuses, cela comprend des particules virales, bactéries, cellules satellites, neuronales, rétinales, nerveuses, reproductives, inflammatoires et autres. C'est donc une grande quantité de phénomènes physiologiques ou pathologiques en lien avec de multiples organes qui pourraient être influencés par l'OPG. Dans la même veine, nos découvertes à propos de cette liaison constituent un tissu de plus à considérer lors du choix d'utilisation d'un variant de l'OPG, que ce soit le FL-OPG, le TR-OPG ou l'anti-RANKL. Deuxièmement, la voie de signalisation explorée dans nos travaux n'est probablement pas la seule directement influencée par le FL-OPG-Fc car il pourrait potentiellement affecter des sentiers musculaires en lien avec le développement, l'adhésion cellulaire, la régénération, la différenciation et autres processus qui méritent investigation. Notre nouveau projet sur l'effet du FL-OPG-Fc sur la récupération de la force et de l'intégrité structurale suite à une blessure musculaire est un exemple de projet qui pourrait comprendre ces aspects. Aussi, nos expériences en cours sur un modèle de souris délétée pour l'OPG nous permettront de comprendre le phénotype des muscles squelettiques en l'absence de cette interaction directe de l'OPG. Troisièmement, vu la nature de la voie explorée et sa pertinence dans l'homéostasie et la fonction des cellules cardiaques, plusieurs investigations au laboratoire sont dirigées vers la compréhension de ce mécanisme par rapport au cœur dystrophique, un domaine d'étude de plus en plus sollicité par les fondations oeuvrant en DMD. Finalement, nos résultats sur la potentialisation des contractions téaniques de muscles dystrophiques par le FL-OPG-Fc nous a permis de mieux comprendre la nature même de la faiblesse musculaire de la DMD et potentiellement, pouvoir les transposer à d'autres conditions qui incluent une faiblesse contractile.

Globalement, la présente thèse apporte un avancement dans les connaissances sur les pratiques précliniques en DMD puis sur la caractérisation du nouveau modèle mdx/utrn+/- . Nos travaux mettent ensuite à jour les convergences récentes au sujet des interactions

moléculaires reliées aux muscles et aux os dans la DMD. Puis, au cœur de cette thématique, notre investigation biologique fondamentale approfondit la compréhension actuelle de l'action de l'OPG dans le muscle squelettique, particulièrement dystrophique. Parce que toute thèse apporte plus de questions que de réponses, les découvertes de notre équipe de recherche, de nos collaborateurs et de laboratoires indépendants placeront sans doute leurs morceaux dans le casse-tête RANK/RANKL/OPG musculaire dans un avenir rapproché.

Bibliographie

1. Ryder S, Leadley RM, Armstrong N, Westwood M, de Kock S, Butt T, et al. The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J Rare Dis.* 2017 26;12(1):79.
2. Landfeldt E, Lindgren P, Bell CF, Schmitt C, Guglieri M, Straub V, et al. The burden of Duchenne muscular dystrophy: an international, cross-sectional study. *Neurology.* 2014 Aug 5;83(6):529–36.
3. Proctor DN, O'Brien PC, Atkinson EJ, Nair KS. Comparison of techniques to estimate total body skeletal muscle mass in people of different age groups. *Am J Physiol.* 1999 Sep;277(3 Pt 1):E489-495.
4. Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 2015 Mar;96(3):183–95.
5. Hood DA, Irrcher I, Ljubic V, Joseph A-M. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J Exp Biol.* 2006 Jun;209(Pt 12):2265–75.
6. Matsakas A, Patel K. Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. *Histol Histopathol.* 2009;24(5):611–29.
7. Flück M, Hoppeler H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;146:159–216.
8. Flück M. Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol.* 2006 Jun;209(Pt 12):2239–48.
9. Pedersen BK, Akerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2007 Sep;103(3):1093–8.
10. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol.* 2011 Jan 15;214(Pt 2):337–46.
11. Hamrick MW. The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle-bone crosstalk. *BoneKey Rep.* 2012;1:60.
12. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Apr 3;8(8):457–65.
13. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech.* 2013 Jan;6(1):25–39.
14. Evans WJ. Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr.* 2010 Apr;91(4):1123S–1127S.
15. Franco-Obregón A, Lansman JB. Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J Physiol.* 1994 Dec 1;481 (Pt 2):299–309.
16. Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Aug 1;3(8):a003947.
17. Goodman BE. Channels active in the excitability of nerves and skeletal muscles across the neuromuscular junction: basic function and pathophysiology. *Adv Physiol Educ.* 2008 Jun;32(2):127–35.

18. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1):23–67.
19. Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):209–38.
20. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2001 Aug;91(2):534–51.
21. Eržen I, Janáček J, Kubínová L. Characterization of the capillary network in skeletal muscles from 3D data. *Physiol Res.* 2011;60(1):1–13.
22. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010 May;298(5):R1173–1187.
23. Stromer MH. The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. *Histol Histopathol.* 1998 Jan;13(1):283–91.
24. Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol.* 2017 Jun 18;7(3):891–944.
25. Campbell KP, Stull JT. Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):12599–600.
26. Ervasti JM. Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):13591–4.
27. Mayer U. Integrins: redundant or important players in skeletal muscle? *J Biol Chem.* 2003 Apr 25;278(17):14587–90.
28. Capetanaki Y, Bloch RJ, Kouloumenta A, Mavroidis M, Psarras S. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles. *Exp Cell Res.* 2007 Jun 10;313(10):2063–76.
29. Masedunskas A, Appaduray M, Gunning PW, Hardeman EC. Lighting up microtubule cytoskeleton dynamics in skeletal muscle. *IntraVital.* 2014 Jan;3(1):e29293.
30. Boudriau S, Vincent M, Côté CH, Rogers PA. Cytoskeletal structure of skeletal muscle: identification of an intricate exosarcomeric microtubule lattice in slow- and fast-twitch muscle fibers. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* 1993 Jul;41(7):1013–21.
31. Rahimov F, Kunkel LM. The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 2013 May 13;201(4):499–510.
32. Block BA, Imagawa T, Campbell KP, Franzini-Armstrong C. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1988 Dec;107(6 Pt 2):2587–600.
33. Rebbeck RT, Karunasekara Y, Board PG, Beard NA, Casarotto MG, Dulhunty AF. Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners? *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Mar;48:28–38.
34. Goonasekera SA, Davis J, Kwong JQ, Accornero F, Wei-LaPierre L, Sargent MA, et al. Enhanced Ca²⁺ influx from STIM1-Orai1 induces muscle pathology in mouse models of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2014 Jul 15;23(14):3706–15.
35. Novák P, Soukup T. Calsequestrin distribution, structure and function, its role in normal and pathological situations and the effect of thyroid hormones. *Physiol Res.* 2011;60(3):439–52.
36. Wei L, Gallant EM, Dulhunty AF, Beard NA. Junctin and triadin each activate skeletal ryanodine receptors but junctin alone mediates functional interactions with calsequestrin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Nov;41(11):2214–24.
37. Franzini-Armstrong C, Protasi F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev.* 1997 Jul;77(3):699–729.
38. Melzer W, Herrmann-Frank A, Lüttgau HC. The role of Ca²⁺ ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim Biophys Acta.* 1995 May 8;1241(1):59–116.
39. Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 2000 Apr;80(2):853–924.
40. Robert V, De Giorgi F, Massimino ML, Cantini M, Pozzan T. Direct monitoring of the calcium concentration in the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum of skeletal muscle myotubes. *J Biol Chem.* 1998 Nov 13;273(46):30372–8.
41. Pozzan T, Rizzuto R. High tide of calcium in mitochondria. *Nat Cell Biol.* 2000 Feb;2(2):E25–27.

42. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 2011 Oct;91(4):1447–531.
43. Cheng AJ, Andersson DC, Lanner JT. Can't live with or without it: calcium and its role in Duchenne muscular dystrophy-induced muscle weakness. Focus on "SERCA1 overexpression minimizes skeletal muscle damage in dystrophic mouse models." *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015 May 1;308(9):C697-698.
44. Agrawal A, Suryakumar G, Rathor R. Role of defective Ca²⁺ signaling in skeletal muscle weakness: Pharmacological implications. *J Cell Commun Signal.* 2018 Jul 7;
45. Bartoli M, Richard I. Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Oct;37(10):2115–33.
46. Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci.* 2008 Apr;86(14 Suppl):E19-35.
47. Schwartz LM. Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle. *Cell Death Differ.* 2008 Jul;15(7):1163–9.
48. Deconinck N, Dan B. Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 2007 Jan;36(1):1–7.
49. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):291–329.
50. Pasternak C, Wong S, Elson EL. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol.* 1995 Feb;128(3):355–61.
51. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3710–4.
52. De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M, et al. Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Dis.* 2012;3:e418.
53. Moens P, Baatsen PH, Maréchal G. Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil.* 1993 Aug;14(4):446–51.
54. Zanou N, Iwata Y, Schakman O, Lebacqz J, Wakabayashi S, Gailly P. Essential role of TRPV2 ion channel in the sensitivity of dystrophic muscle to eccentric contractions. *FEBS Lett.* 2009 Nov 19;583(22):3600–4.
55. Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1988 Feb 26;52(4):503–13.
56. Tidball JG, Welc SS, Wehling-Henricks M. Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies. *Compr Physiol.* 2018 Sep 14;8(4):1313–56.
57. 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 Jan 15;562(Pt 2):367–80.
58. Viola HM, Davies SMK, Filipovska A, Hool LC. L-type Ca²⁺ channel contributes to alterations in mitochondrial calcium handling in the mdx ventricular myocyte. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Mar 15;304(6):H767-775.
59. Mallouk N, Jacquemond V, Allard B. Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 25;97(9):4950–5.
60. Gillis JM. Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. *Acta Physiol Scand.* 1996 Mar;156(3):397–406.
61. Whitehead NP, Yeung EW, Allen DG. Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006 Jul;33(7):657–62.
62. Burr AR, Molkentin JD. Genetic evidence in the mouse solidifies the calcium hypothesis of myofiber death in muscular dystrophy. *Cell Death Differ.* 2015 Sep;22(9):1402–12.
63. DiFranco M, Woods CE, Capote J, Vergara JL. Dystrophic skeletal muscle fibers display alterations at the level of calcium microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 23;105(38):14698–703.
64. Burr AR, Millay DP, Goonasekera SA, Park KH, Sargent MA, Collins J, et al. Na⁺ dysregulation coupled with Ca²⁺ entry through NCX1 promotes muscular dystrophy in mice. *Mol Cell Biol.* 2014 Jun;34(11):1991–2002.

65. López JR, Briceño LE, Sánchez V, Horvart D. Myoplasmic (Ca²⁺) in Duchenne muscular dystrophy patients. *Acta Científica Venez.* 1987;38(4):503–4.
66. Allen DG, Gervasio OL, Yeung EW, Whitehead NP. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010 Feb;88(2):83–91.
67. Turner PR, Westwood T, Regen CM, Steinhardt RA. Increased protein degradation results from elevated free calcium levels found in muscle from mdx mice. *Nature.* 1988 Oct 20;335(6192):735–8.
68. Bakker AJ, Head SI, Williams DA, Stephenson DG. Ca²⁺ levels in myotubes grown from the skeletal muscle of dystrophic (mdx) and normal mice. *J Physiol.* 1993 Jan;460:1–13.
69. Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem.* 1995 May 5;270(18):10909–14.
70. 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 Jun;183(1–2):87–96.
71. Millay DP, Sargent MA, Osinska H, Baines CP, Barton ER, Vuagniaux G, et al. Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat Med.* 2008 Apr;14(4):442–7.
72. Petrof BJ, Shrager JB, Stedman HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3710–4.
73. Ragusa RJ, Chow CK, Porter JD. Oxidative stress as a potential pathogenic mechanism in an animal model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD.* 1997 Sep;7(6–7):379–86.
74. Espinosa A, Henríquez-Olguín C, Jaimovich E. Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease. *Cell Calcium.* 2016 Mar 3;
75. Shkryl VM, Martins AS, Ullrich ND, Nowycky MC, Niggli E, Shirokova N. Reciprocal amplification of ROS and Ca²⁺ signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflüg Arch Eur J Physiol.* 2009 Sep;458(5):915–28.
76. Gailly P. New aspects of calcium signaling in skeletal muscle cells: implications in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Nov 4;1600(1–2):38–44.
77. Ruegg UT, Gillis JM. Calcium homeostasis in dystrophic muscle. *Trends Pharmacol Sci.* 1999 Sep;20(9):351–2.
78. Mokri B, Engel AG. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology.* 1975 Dec;25(12):1111–20.
79. Cea LA, Puebla C, Cisterna BA, Escamilla R, Vargas AA, Frank M, et al. Fast skeletal myofibers of mdx mouse, model of Duchenne muscular dystrophy, express connexin hemichannels that lead to apoptosis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2016 Jan 23;
80. Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, Debaix H, Gailly P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol.* 2002 Sep 16;158(6):1089–96.
81. Vandebrouck A, Ducret T, Basset O, Sebillé S, Raymond G, Ruegg U, et al. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2006 Jan;20(1):136–8.
82. 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 Jul;299(1):C42–50.
83. Cully TR, Launikonis BS. Leaky ryanodine receptors delay the activation of store overload-induced Ca²⁺ release, a mechanism underlying malignant hyperthermia-like events in dystrophic muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016 Apr 15;310(8):C673–680.
84. Altamirano F, López JR, Henríquez C, Molinski T, Allen PD, Jaimovich E. Increased resting intracellular calcium modulates NF- κ B-dependent inducible nitric-oxide synthase gene expression in dystrophic mdx skeletal myotubes. *J Biol Chem.* 2012 Jun 15;287(25):20876–87.
85. Millay DP, Goonasekera SA, Sargent MA, Maillet M, Aronow BJ, Molkenin JD. Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. 2009 Nov 10;106(45):19023–8.
86. Lacruz RS, Feske S. Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Nov;1356:45–79.
 87. Gehrig SM, van der Poel C, Sayer TA, Schertzer JD, Henstridge DC, Church JE, et al. Hsp72 preserves muscle function and slows progression of severe muscular dystrophy. *Nature.* 2012 Apr 4;484(7394):394–8.
 88. 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 Mar;121(3):1044–52.
 89. Millay DP, Maillet M, Roche JA, Sargent MA, McNally EM, Bloch RJ, et al. Genetic manipulation of dysferlin expression in skeletal muscle: novel insights into muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 2009 Nov;175(5):1817–23.
 90. Mázala DAG, Pratt SJP, Chen D, Molckentin JD, Lovering RM, Chin ER. SERCA1 overexpression minimizes skeletal muscle damage in dystrophic mouse models. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015 01;308(9):C699-709.
 91. 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 May;39(5):609–15.
 92. Khurana TS, Prendergast RA, Alameddine HS, Tomé FM, Fardeau M, Arahata K, et al. Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne’s muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. *J Exp Med.* 1995 Aug 1;182(2):467–75.
 93. Spencer MJ, Mellgren RL. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Hum Mol Genet.* 2002 Oct 1;11(21):2645–55.
 94. Peter AK, Cheng H, Ross RS, Knowlton KU, Chen J. The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle. *Prog Pediatr Cardiol.* 2011 May;31(2):83–8.
 95. Wokke BH, van den Bergen JC, Versluis MJ, Niks EH, Milles J, Webb AG, et al. Quantitative MRI and strength measurements in the assessment of muscle quality in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD.* 2014 May;24(5):409–16.
 96. Akima H, Lott D, Senesac C, Deol J, Germain S, Arpan I, et al. Relationships of thigh muscle contractile and non-contractile tissue with function, strength, and age in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD.* 2012 Jan;22(1):16–25.
 97. Chan S, Head SI, Morley JW. Branched fibers in dystrophic mdx muscle are associated with a loss of force following lengthening contractions. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Sep;293(3):C985-992.
 98. Fitts RH, McDonald KS, Schluter JM. The determinants of skeletal muscle force and power: their adaptability with changes in activity pattern. *J Biomech.* 1991;24 Suppl 1:111–22.
 99. Goldstein JA, McNally EM. Mechanisms of muscle weakness in muscular dystrophy. *J Gen Physiol.* 2010 Jul;136(1):29–34.
 100. Pratt SJP, Shah SB, Ward CW, Inacio MP, Stains JP, Lovering RM. Effects of in vivo injury on the neuromuscular junction in healthy and dystrophic muscles. *J Physiol.* 2013 15;591(2):559–70.
 101. Hollingworth S, Marshall MW, Robson E. Excitation contraction coupling in normal and mdx mice. *Muscle Nerve.* 1990 Jan;13(1):16–20.
 102. Capote J, DiFranco M, Vergara JL. Excitation-contraction coupling alterations in mdx and utrophin/dystrophin double knockout mice: a comparative study. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 May;298(5):C1077-1086.
 103. 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 Nov 1;568(Pt 3):867–80.
 104. 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 May 15;557(Pt 1):59–75.
 105. Hollingworth S, Zeiger U, Baylor SM. Comparison of the myoplasmic calcium transient elicited by an action potential in intact fibres of mdx and normal mice. *J Physiol.* 2008 Nov 1;586(21):5063–75.
 106. Friedrich O, Both M, Gillis JM, Chamberlain JS, Fink RHA. Mini-dystrophin restores L-type

- calcium currents in skeletal muscle of transgenic mdx mice. *J Physiol*. 2004 Feb 15;555(Pt 1):251–65.
107. Lovering RM, Michaelson L, Ward CW. Malformed mdx myofibers have normal cytoskeletal architecture yet altered EC coupling and stress-induced Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Sep;297(3):C571-580.
108. Godt RE. Calcium-activated tension of skinned muscle fibers of the frog. Dependence on magnesium adenosine triphosphate concentration. *J Gen Physiol*. 1974 Jun;63(6):722–39.
109. Fink RH, Stephenson DG, Williams DA. Physiological properties of skinned fibres from normal and dystrophic (Duchenne) human muscle activated by Ca²⁺ and Sr²⁺. *J Physiol*. 1990 Jan;420:337–53.
110. Schertzer JD, van der Poel C, Shavlakadze T, Grounds MD, Lynch GS. Muscle-specific overexpression of IGF-I improves E-C coupling in skeletal muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Jan;294(1):C161-168.
111. Plant DR, Lynch GS. Depolarization-induced contraction and SR function in mechanically skinned muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Sep;285(3):C522-528.
112. Plant DR, Lynch GS. Depolarization-induced contraction and SR function in mechanically skinned muscle fibers from dystrophic mdx mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Sep;285(3):C522-528.
113. Hernández-Ochoa EO, Pratt SJP, Lovering RM, Schneider MF. Critical Role of Intracellular RyR1 Calcium Release Channels in Skeletal Muscle Function and Disease. *Front Physiol*. 2015;6:420.
114. Doran P, Dowling P, Lohan J, McDonnell K, Poetsch S, Ohlendieck K. Subproteomics analysis of Ca⁺-binding proteins demonstrates decreased calsequestrin expression in dystrophic mouse skeletal muscle. *Eur J Biochem*. 2004 Oct;271(19):3943–52.
115. Culligan K, Banville N, Dowling P, Ohlendieck K. Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2002 Feb;92(2):435–45.
116. Dowling P, Doran P, Ohlendieck K. Drastic reduction of sarcalumenin in Dp427 (dystrophin of 427 kDa)-deficient fibres indicates that abnormal calcium handling plays a key role in muscular dystrophy. *Biochem J*. 2004 Apr 15;379(Pt 2):479–88.
117. Cully TR, Edwards JN, Friedrich O, Stephenson DG, Murphy RM, Launikonis BS. Changes in plasma membrane Ca-ATPase and stromal interacting molecule 1 expression levels for Ca(2+) signaling in dystrophic mdx mouse muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Sep 1;303(5):C567-576.
118. Zhao X, Moloughney JG, Zhang S, Komazaki S, Weisleder N. Orai1 mediates exacerbated Ca(2+) entry in dystrophic skeletal muscle. *PLoS One*. 2012;7(11):e49862.
119. Morel J-L, Rakotoarisoa L, Jeyakumar LH, Fleischer S, Mironneau C, Mironneau J. Decreased expression of ryanodine receptors alters calcium-induced calcium release mechanism in mdx duodenal myocytes. *J Biol Chem*. 2004 May 14;279(20):21287–93.
120. Williams IA, Allen DG. Intracellular calcium handling in ventricular myocytes from mdx mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Feb;292(2):H846-855.
121. Robert V, Massimino ML, Tosello V, Marsault R, Cantini M, Sorrentino V, et al. Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):4647–51.
122. Mázala DAG, Grange RW, Chin ER. The role of proteases in excitation-contraction coupling failure in muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015 Jan 1;308(1):C33-40.
123. Gommans IMP, Vlaskovska MHM, de Haan A, van Engelen BGM. Calcium regulation and muscle disease. *J Muscle Res Cell Motil*. 2002;23(1):59–63.
124. Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev*. 2000 Jul;80(3):1215–65.
125. Head SI. Membrane potential, resting calcium and calcium transients in isolated muscle fibres from normal and dystrophic mice. *J Physiol*. 1993 Sep;469:11–9.
126. Collet C, Allard B, Tourneur Y, Jacquemond V. Intracellular calcium signals measured with indo-1 in isolated skeletal muscle fibres from control and mdx mice. *J Physiol*. 1999 Oct 15;520 Pt 2:417–29.

127. Hernández-Ochoa EO, Pratt SJP, Garcia-Pelagio KP, Schneider MF, Lovering RM. Disruption of action potential and calcium signaling properties in malformed myofibers from dystrophin-deficient mice. *Physiol Rep*. 2015;3(4).
128. Roy P, Rau F, Ochala J, Messéant J, Fraysse B, Lainé J, et al. Dystrophin restoration therapy improves both the reduced excitability and the force drop induced by lengthening contractions in dystrophic mdx skeletal muscle. *Skelet Muscle*. 2016;6:23.
129. Bates G, Sigurdardottir S, Kachmar L, Zitouni NB, Benedetti A, Petrof BJ, et al. Molecular, cellular, and muscle strip mechanics of the mdx mouse diaphragm. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 May 1;304(9):C873-880.
130. 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(1):119-49.
131. Willmann R, De Luca A, Benatar M, Grounds M, Dubach J, Raymackers J-M, et al. Enhancing translation: guidelines for standard pre-clinical experiments in mdx mice. *Neuromuscul Disord NMD*. 2012 Jan;22(1):43-9.
132. van Putten M, Aartsma-Rus A, Grounds MD, Kornegay JN, Mayhew A, Gillingwater TH, et al. Update on Standard Operating Procedures in Preclinical Research for DMD and SMA Report of TREAT-NMD Alliance Workshop, Schiphol Airport, 26 April 2015, The Netherlands. *J Neuromuscul Dis*. 2018;5(1):29-34.
133. Willmann R, Possekel S, Dubach-Powell J, Meier T, Ruegg MA. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD*. 2009 Apr;19(4):241-9.
134. McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech*. 2015 Mar;8(3):195-213.
135. Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR. Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):729-38.
136. Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med*. 1998 Dec;4(12):1441-4.
137. Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JI, Davies KE. Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature*. 1996 Nov 28;384(6607):349-53.
138. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 2002 Apr;82(2):291-329.
139. Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, et al. Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature*. 1992 Dec;360(6404):591-3.
140. Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2007 Feb;1772(2):108-17.
141. Sewry CA, Nowak KJ, Ehmsen JT, Davies KE. A and B utrophin in human muscle and sarcolemmal A-utrophin associated with tumours. *Neuromuscul Disord NMD*. 2005 Nov;15(11):779-85.
142. Helliwell TR, Man NT, Morris GE, Davies KE. The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord NMD*. 1992;2(3):177-84.
143. Kleopa KA, Drosiotou A, Mavrikiou E, Ormiston A, Kyriakides T. Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2006 May 15;15(10):1623-8.
144. Janghra N, Morgan JE, Sewry CA, Wilson FX, Davies KE, Muntoni F, et al. 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(3):e0150818.
145. Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, Chelly J, Tomé FM, Fardeau M, et al. Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord NMD*. 1991;1(3):185-94.
146. Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, et al. Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med*. 1998 Dec;4(12):1441-4.
147. Rafael JA, Tinsley JM, Potter AC, Deconinck AE, Davies KE. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat Genet*. 1998

May;19(1):79–82.

148. Perkins KJ, Burton EA, Davies KE. The role of basal and myogenic factors in the transcriptional activation of utrophin promoter A: implications for therapeutic up-regulation in Duchenne muscular dystrophy. *Nucleic Acids Res.* 2001 Dec 1;29(23):4843–50.
149. Squire S, Raymackers JM, Vandebrouck C, Potter A, Tinsley J, Fisher R, et al. Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system. *Hum Mol Genet.* 2002 Dec 15;11(26):3333–44.
150. Deconinck N, Tinsley J, De Backer F, Fisher R, Kahn D, Phelps S, et al. Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat Med.* 1997 Nov;3(11):1216–21.
151. Krag TOB, Bogdanovich S, Jensen CJ, Fischer MD, Hansen-Schwartz J, Javazon EH, et al. Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 21;101(38):13856–60.
152. Péladeau C, Ahmed A, Amirouche A, Crawford Parks TE, Bronicki LM, Ljubicic V, et al. Combinatorial therapeutic activation with heparin and AICAR stimulates additive effects on utrophin A expression in dystrophic muscles. *Hum Mol Genet.* 2016 Jan 1;25(1):24–43.
153. Amirouche A, Tadesse H, Lunde JA, Bélanger G, Côté J, Jasmin BJ. Activation of p38 signaling increases utrophin A expression in skeletal muscle via the RNA-binding protein KSRP and inhibition of AU-rich element-mediated mRNA decay: implications for novel DMD therapeutics. *Hum Mol Genet.* 2013 Aug 1;22(15):3093–111.
154. Tinsley J, Robinson N, Davies KE. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-arylbenzoxazole utrophin modulator, following single- and multiple-dose administration to healthy male adult volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2015 Jun;55(6):698–707.
155. Gramolini AO, Bélanger G, Thompson JM, Chakkalakal JV, Jasmin BJ. Increased expression of utrophin in a slow vs. a fast muscle involves posttranscriptional events. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Oct;281(4):C1300–1309.
156. van Putten M, Kumar D, Hulsker M, Hoogaars WMH, Plomp JJ, van Opstal A, et al. Comparison of skeletal muscle pathology and motor function of dystrophin and utrophin deficient mouse strains. *Neuromuscul Disord NMD.* 2012 May;22(5):406–17.
157. Fairclough RJ, Wood MJ, Davies KE. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat Rev Genet.* 2013;14(6):373–8.
158. Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, et al. Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell.* 1997 Aug 22;90(4):717–27.
159. Collins CA, Morgan JE. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol.* 2003 Aug;84(4):165–72.
160. Isaac C, Wright A, Usas A, Li H, Tang Y, Mu X, et al. Dystrophin and utrophin “double knockout” dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2013 Mar;31(3):343–9.
161. Zhou L, Rafael-Fortney JA, Huang P, Zhao XS, Cheng G, Zhou X, et al. Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J Neurol Sci.* 2008 Jan 15;264(1–2):106–11.
162. Huang P, Cheng G, Lu H, Aronica M, Ransohoff RM, Zhou L. Impaired respiratory function in mdx and mdx/utrn(+/-) mice. *Muscle Nerve.* 2011 Feb;43(2):263–7.
163. Gutzell KM, Hrinivich WT, Hoffman LM. Skeletal muscle fibrosis in the mdx/utrn+/- mouse validates its suitability as a murine model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One.* 2015;10(1):e0117306.
164. McDonald AA, Hebert SL, Kunz MD, Ralles SJ, McLoon LK. Disease course in mdx:utrophin+/- mice: comparison of three mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Physiol Rep.* 2015 Apr;3(4).
165. Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, De Luca A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis.* 2008 Jul;31(1):1–19.
166. Karasik D, Kiel DP. Evidence for pleiotropic factors in genetics of the musculoskeletal system. *Bone.* 2010 May;46(5):1226–37.
167. Warner SE, Sanford DA, Becker BA, Bain SD, Srinivasan S, Gross TS. Botox induced

- muscle paralysis rapidly degrades bone. *Bone*. 2006 Feb;38(2):257–64.
168. Bonewald LF, Kiel DP, Clemens TL, Esser K, Orwoll ES, O’Keefe RJ, et al. Forum on bone and skeletal muscle interactions: summary of the proceedings of an ASBMR workshop. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2013 Sep;28(9):1857–65.
169. DiGirolamo DJ, Kiel DP, Esser KA. Bone and skeletal muscle: neighbors with close ties. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2013 Jul;28(7):1509–18.
170. Sharir A, Stern T, Rot C, Shahar R, Zelzer E. Muscle force regulates bone shaping for optimal load-bearing capacity during embryogenesis. *Dev Camb Engl*. 2011 Aug;138(15):3247–59.
171. Zhou J, Yi J, Bonewald L. Muscle-Bone Crosstalk in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2015 Oct;13(5):274–9.
172. Rufo A, Del Fattore A, Capulli M, Carvello F, De Pasquale L, Ferrari S, et al. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2011 Aug;26(8):1891–903.
173. McDonald DGM, Kinali M, Gallagher AC, Mercuri E, Muntoni F, Roper H, et al. Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*. 2002 Oct;44(10):695–8.
174. Larson CM, Henderson RC. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Orthop*. 2000 Feb;20(1):71–4.
175. Bianchi ML, Mazzanti A, Galbiati E, Saraifoger S, Dubini A, Cornelio F, et al. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2003 Sep;14(9):761–7.
176. Tian C, Wong BL, Hornung L, Khoury JC, Miller L, Bange J, et al. Bone health measures in glucocorticoid-treated ambulatory boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD*. 2016;26(11):760–7.
177. Ma J, McMillan HJ, Karagüzel G, Goodin C, Wasson J, Matzinger MA, et al. The time to and determinants of first fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2017;28(2):597–608.
178. Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur AY. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 May 5;(5):CD003725.
179. Morgenroth VH, Hache LP, Clemens PR. Insights into bone health in Duchenne muscular dystrophy. *BoneKEy Rep [Internet]*. 2012 Feb 1 [cited 2016 May 19];1. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/bonekey.2012.5>
180. Maurel DB, Jähn K, Lara-Castillo N. Muscle-Bone Crosstalk: Emerging Opportunities for Novel Therapeutic Approaches to Treat Musculoskeletal Pathologies. *Biomedicines*. 2017 Oct 24;5(4).
181. Boulanger Piette A, Hamoudi D, Marcadet L, Morin F, Argaw A, Ward L, et al. Targeting the Muscle-Bone Unit: Filling Two Needs with One Deed in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr Osteoporos Rep*. 2018 Oct;16(5):541–53.
182. Brotto M, Bonewald L. Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. *Bone*. 2015 Nov;80:109–14.
183. Brotto M, Johnson ML. Endocrine crosstalk between muscle and bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2014 Jun;12(2):135–41.
184. Hamrick MW, Shi X, Zhang W, Pennington C, Thakore H, Haque M, et al. Loss of myostatin (GDF8) function increases osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells but the osteogenic effect is ablated with unloading. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1544–53.
185. Deckers MM, Karperien M, van der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CW. Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2000 May;141(5):1667–74.
186. Li S-H, Guo D-Z, Li B, Yin H-B, Li J-K, Xiang J-M, et al. The stimulatory effect of insulin-like growth factor-1 on the proliferation, differentiation, and mineralisation of osteoblastic cells from Holstein cattle. *Vet J Lond Engl 1997*. 2009 Mar;179(3):430–6.
187. Solomon AM, Bouloux PMG. Modifying muscle mass - the endocrine perspective. *J Endocrinol*. 2006 Nov;191(2):349–60.
188. Nowlan NC, Bourdon C, Dumas G, Tajbakhsh S, Prendergast PJ, Murphy P. Developing bones are differentially affected by compromised skeletal muscle formation. *Bone*. 2010 May;46(5):1275–85.

189. Zhou S, Qian B, Wang L, Zhang C, Hogan MV, Li H. Altered bone-regulating myokine expression in skeletal muscle Of Duchenne muscular dystrophy mouse models. *Muscle Nerve*. 2018 Oct;58(4):573–82.
190. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009 Mar;2(1):56–64.
191. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1:S1.
192. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):139–46.
193. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):337–42.
194. Dufresne SS, Dumont NA, Bouchard P, Lavergne É, Penninger JM, Frenette J. Osteoprotegerin protects against muscular dystrophy. *Am J Pathol*. 2015 Apr;185(4):920–6.
195. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999 Jan 28;397(6717):315–23.
196. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309–19.
197. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998 May 1;12(9):1260–8.
198. 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 Nov;72(5):495–501.
199. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol*. 2014;5:511.
200. 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(5):401–19.
201. Bernardi S, Fabris B, Thomas M, Toffoli B, Tikellis C, Candido R, et al. Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Aug 25;394(1–2):13–20.
202. Tisato V, Secchiero P, Rimondi E, Giancesini S, Menegatti E, Casciano F, et al. GM-CSF exhibits anti-inflammatory activity on endothelial cells derived from chronic venous disease patients. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:561689.
203. Nahidi L, Leach ST, Lemberg DA, Day AS. Osteoprotegerin exerts its pro-inflammatory effects through nuclear factor- κ B activation. *Dig Dis Sci*. 2013 Nov;58(11):3144–55.
204. Juffer P, Jaspers RT, Klein-Nulend J, Bakker AD. Mechanically loaded myotubes affect osteoclast formation. *Calcif Tissue Int*. 2014 Mar;94(3):319–26.
205. 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 Jan 28;ajpcell.00285.2015.
206. 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(6):777–82.
207. Ziegler S, Niessner A, Richter B, Wirth S, Billensteiner E, Woloszczuk W, et al. Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Metabolism*. 2005 Jul;54(7):935–8.
208. Rutti S, Dusaulcy R, Hansen JS, Howald C, Dermitzakis ET, Pedersen BK, et al. Angiogenin and Osteoprotegerin are type II muscle specific myokines protecting pancreatic beta-cells against proinflammatory cytokines. *Sci Rep*. 2018 Jul 3;8(1):10072.
209. Qin W, Sun L, Cao J, Peng Y, Collier L, Wu Y, et al. The central nervous system (CNS)-independent anti-bone-resorptive activity of muscle contraction and the underlying molecular and cellular signatures. *J Biol Chem*. 2013 May 10;288(19):13511–21.
210. Aliprantis AO, Stolina M, Kostenuik PJ, Poliachik SL, Warner SE, Bain SD, et al. Transient muscle paralysis degrades bone via rapid osteoclastogenesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp*

Biol. 2012 Mar;26(3):1110–8.

211. Lee SW, Han S-I, Kim H-H, 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 Jul 31;35(4):371–6.
212. Kumar A, Bhatnagar S, Paul PK. TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012 May;15(3):233–9.
213. Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle.* 2011 Jan 24;1(1):4.
214. Paul PK, Bhatnagar S, Mishra V, Srivastava S, Darnay BG, Choi Y, et al. The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol Cell Biol.* 2012 Apr;32(7):1248–59.
215. Paul PK, Kumar A. TRAF6 coordinates the activation of autophagy and ubiquitin-proteasome systems in atrophying skeletal muscle. *Autophagy.* 2011 May;7(5):555–6.
216. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh B-C, Lidov HGW, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell.* 2004 Oct 15;119(2):285–98.
217. Sun H, Gong Y, Qiu J, Chen Y, Ding F, Zhao Q. TRAF6 inhibition rescues dexamethasone-induced muscle atrophy. *Int J Mol Sci.* 2014 Jun 20;15(6):11126–41.
218. Dufresne SS, Boulanger-Piette A, Bossé S, Argaw A, Hamoudi D, Marcadet L, et al. Genetic deletion of muscle RANK or selective inhibition of RANKL is not as effective as full-length OPG-fc in mitigating muscular dystrophy. *Acta Neuropathol Commun.* 2018 Apr 24;6(1):31.
219. 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 Mar 15;23(6):1492–505.
220. Hindi SM, Kumar A. TRAF6 regulates satellite stem cell self-renewal and function during regenerative myogenesis. *J Clin Invest.* 2016 Jan;126(1):151–68.
221. Kolodziejczyk SM, Walsh GS, Balazsi K, Seale P, Sandoz J, Hierlihy AM, et al. Activation of JNK1 contributes to dystrophic muscle pathogenesis. *Curr Biol CB.* 2001 Aug 21;11(16):1278–82.
222. Monici MC, Aguenouz M, Mazzeo A, Messina C, Vita G. Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2003 Mar 25;60(6):993–7.
223. Acharyya S, Villalta SA, Bakkar N, Bupha-Intr T, Janssen PML, Carathers M, et al. Interplay of IKK/NF-kappaB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 2007 Apr;117(4):889–901.
224. Dogra C, Srivastava DS, Kumar A. Protein-DNA array-based identification of transcription factor activities differentially regulated in skeletal muscle of normal and dystrophin-deficient mdx mice. *Mol Cell Biochem.* 2008 May;312(1–2):17–24.
225. Durham WJ, Arbogast S, Gerken E, Li Y-P, Reid MB. Progressive nuclear factor-kappaB activation resistant to inhibition by contraction and curcumin in mdx mice. *Muscle Nerve.* 2006 Sep;34(3):298–303.
226. Singh R, Millman G, Turin E, Polisiakiewicz L, Lee B, Gatti F, et al. Increases in nuclear p65 activation in dystrophic skeletal muscle are secondary to increases in the cellular expression of p65 and are not solely produced by increases in IkappaB-alpha kinase activity. *J Neurol Sci.* 2009 Oct 15;285(1–2):159–71.
227. Hnia K, Gayraud J, Hugon G, Ramonatxo M, De La Porte S, Matecki S, et al. L-arginine decreases inflammation and modulates the nuclear factor-kappaB/matrix metalloproteinase cascade in mdx muscle fibers. *Am J Pathol.* 2008 Jun;172(6):1509–19.
228. Kumar A, Boriek AM. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003 Mar;17(3):386–96.
229. Porreca E, Guglielmi MD, Uncini A, Di Gregorio P, Angelini A, Di Febbo C, et al. Haemostatic abnormalities, cardiac involvement and serum tumor necrosis factor levels in X-linked dystrophic patients. *Thromb Haemost.* 1999 Apr;81(4):543–6.
230. Porter JD, Khanna S, Kaminski HJ, Rao JS, Merriam AP, Richmonds CR, et al. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 2002 Feb 1;11(3):263–72.
231. Kapinus LN, Rukosuev VS, Baranov VN, Shirliuk TA, Nanaev AK. [Study of human and mouse amyloid fibrils in vitro]. *Zdravookhr Kirg.* 1977 Feb;(1):18–20.

232. Siegel AL, Bledsoe C, Lavin J, Gatti F, Berge J, Millman G, et al. Treatment with inhibitors of the NF-kappaB pathway improves whole body tension development in the mdx mouse. *Neuromuscul Disord NMD*. 2009 Feb;19(2):131–9.
233. Pan Y, Chen C, Shen Y, Zhu C-H, Wang G, Wang X-C, et al. Curcumin alleviates dystrophic muscle pathology in mdx mice. *Mol Cells*. 2008 Jun 30;25(4):531–7.
234. Tang Y, Reay DP, Salay MN, Mi MY, Clemens PR, Guttridge DC, et al. Inhibition of the IKK/NF- κ B pathway by AAV gene transfer improves muscle regeneration in older mdx mice. *Gene Ther*. 2010 Dec;17(12):1476–83.
235. Messina S, Bitto A, Aguenouz M 'hammed, Minutoli L, Monici MC, Altavilla D, et al. Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice. *Exp Neurol*. 2006 Mar;198(1):234–41.
236. Lefkowitz SS, Lefkowitz DL, Kethley J. Treatment of facioscapulohumeral muscular dystrophy with Denosumab. *Am J Case Rep*. 2012;13:66–8.
237. Yamaguchi K, Kinoshita M, Goto M, Kobayashi F, Tsuda E, Morinaga T, et al. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem*. 1998 Feb 27;273(9):5117–23.
238. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocr Rev*. 2008 Apr;29(2):155–92.
239. Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, et al. Immunological Characterization of Circulating Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis Inhibitory Factor: Increased Serum Concentrations in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 1999 Apr 1;14(4):518–27.
240. Furuya D, Kaneko R, Yagihashi A, Endoh T, Yajima T, Kobayashi D, et al. Immuno-PCR assay for homodimeric osteoprotegerin. *Clin Chem*. 2001 Aug;47(8):1475–7.
241. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F, Heymann D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Dec;15(6):457–75.
242. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. Functional Dissection of Osteoprotegerin and Its Interaction with Receptor Activator of NF- κ B Ligand. *J Biol Chem*. 2005 Dec 16;280(50):41155–64.
243. Zauli G, Melloni E, Capitani S, Secchiero P. Role of full-length osteoprotegerin in tumor cell biology. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2009 Mar;66(5):841–51.
244. Strohl WR. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs*. 2015 Aug;29(4):215–39.
245. Unverdorben F, Richter F, Hutt M, Seifert O, Malinge P, Fischer N, et al. Pharmacokinetic properties of IgG and various Fc fusion proteins in mice. *mAbs*. 2016 Jan 2;8(1):120–8.
246. Kobayashi-Sakamoto M, Tamai R, Kiyoura Y. Beyond bone remodeling—emerging functions of osteoprotegerin in host defense and microbial infection. *Integr Mol Med [Internet]*. 2015 [cited 2018 Nov 9];2(6). Available from: <http://oatext.com/Beyond-bone-remodeling-emerging-functions-of-osteoprotegerin-in-host-defense-and-microbial-infection.php>
247. Dufresne SS, Boulanger-Piette A, Bossé S, Argaw A, Hamoudi D, Marcadet L, et al. Genetic deletion of muscle RANK or selective inhibition of RANKL is not as effective as full-length OPG-fc in mitigating muscular dystrophy. *Acta Neuropathol Commun*. 2018 Apr 24;6(1):31.
248. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Lamoureux F, Ruiz-Velasco C, Maillason M, et al. Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Oct;24(5):401–9.
249. Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 1998 Jun 5;273(23):14363–7.
250. Shipman CM, Croucher PI. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res*. 2003 Mar 1;63(5):912–6.
251. Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2002 Mar 15;62(6):1619–23.
252. Neville-Webbe HL, Cross NA, Eaton CL, Nyambo R, Evans CA, Coleman RE, et al. Osteoprotegerin (OPG) produced by bone marrow stromal cells protects breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Aug;86(3):269–79.

253. Lamoureux F, Richard P, Wittrant Y, Battaglia S, Pilet P, Trichet V, et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* 2007 Aug 1;67(15):7308–18.
254. Heymann D. Anti-RANKL therapy for bone tumours: Basic, pre-clinical and clinical evidences. *J Bone Oncol.* 2012 Jun;1(1):2–11.
255. Théoleyre S, Kwan Tat S, Vusio P, Blanchard F, Gallagher J, Ricard-Blum S, et al. Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Aug 25;347(2):460–7.
256. Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, Vidal A, et al. Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer Res.* 2009 Jan 15;69(2):526–36.
257. Irie A, Takami M, Kubo H, Sekino-Suzuki N, Kasahara K, Sanai Y. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. *Bone.* 2007 Aug;41(2):165–74.
258. Li M, Yang S, Xu D. Heparan Sulfate Regulates the Structure and Function of Osteoprotegerin in Osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2016 Nov 11;291(46):24160–71.
259. Mosheimer BA, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani AM, Sturn DH, Patsch JR, et al. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):2964–71.
260. Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood.* 2002 Oct 15;100(8):3002–7.
261. Benslimane-Ahmim Z, Poirier F, Delomenie C, Lokajczyk A, Grelac F, Galy-Fauroux I, et al. Mechanistic study of the proangiogenic effect of osteoprotegerin. *Angiogenesis.* 2013 Jul;16(3):575–93.
262. Kobayashi-Sakamoto M, Isogai E, Hirose K, Chiba I. Role of alphav integrin in osteoprotegerin-induced endothelial cell migration and proliferation. *Microvasc Res.* 2008 Nov;76(3):139–44.
263. 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(1):82.
264. Zannettino ACW, Holding CA, Diamond P, Atkins GJ, Kostakis P, Farrugia A, et al. Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol.* 2005 Aug;204(2):714–23.
265. Zhang QC, Petrey D, Garzón JI, Deng L, Honig B. PrePPI: a structure-informed database of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D828-833.
266. Negroni E, Henault E, Chevalier F, Gilbert-Sirieix M, Van Kuppevelt TH, Papy-Garcia D, et al. Glycosaminoglycan modifications in Duchenne muscular dystrophy: specific remodeling of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2014 Aug;73(8):789–97.
267. Friedl A, Chang Z, Tierney A, Rapraeger AC. Differential binding of fibroblast growth factor-2 and -7 to basement membrane heparan sulfate: comparison of normal and abnormal human tissues. *Am J Pathol.* 1997 Apr;150(4):1443–55.
268. Handel TM, Johnson Z, Crown SE, Lau EK, Proudfoot AE. Regulation of protein function by glycosaminoglycans--as exemplified by chemokines. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:385–410.
269. Zhang L. Glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis and GAG-binding proteins. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2010;93:1–17.
270. Casar JC, Cabello-Verrugio C, Olguin H, Aldunate R, Inestrosa NC, Brandan E. Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. *J Cell Sci.* 2004 Jan 1;117(Pt 1):73–84.
271. Perrimon N, Bernfield M. Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature.* 2000 Apr 13;404(6779):725–8.
272. 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 May;209(2):139–51.
273. Velleman SG, Shin J, Li X, Song Y. Review: The skeletal muscle extracellular matrix: Possible roles in the regulation of muscle development and growth. *Can J Anim Sci.* 2012 Mar;92(1):1–10.

274. Casar JC, Cabello-Verrugio C, Olguin H, Aldunate R, Inestrosa NC, Brandan E. Heparan sulfate proteoglycans are increased during skeletal muscle regeneration: requirement of syndecan-3 for successful fiber formation. *J Cell Sci.* 2004 Jan 1;117(Pt 1):73–84.
275. Brandan E. Proteoglycans in skeletal muscle. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol.* 1994 Sep;27(9):2109–16.
276. Carmen L, Maria V, Morales-Medina JC, Vallelunga A, Palmieri B, Iannitti T. Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in Duchenne muscular dystrophy. *Glycobiology.* 2018 Jun 19;
277. Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Dec;8(12):957–69.
278. Roper JA, Williamson RC, Bass MD. Syndecan and integrin interactomes: large complexes in small spaces. *Curr Opin Struct Biol.* 2012 Oct;22(5):583–90.
279. Burkin DJ, Kaufman SJ. The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res.* 1999 Apr;296(1):183–90.
280. Przewoźniak M, Czaplicka I, Czerwińska AM, Markowska-Zagrajek A, Moraczewski J, Stremińska W, et al. Adhesion proteins—an impact on skeletal myoblast differentiation. *PLoS One.* 2013;8(5):e61760.
281. Doe JA, Wuebbles RD, Allred ET, Rooney JE, Elorza M, Burkin DJ. Transgenic overexpression of the 7 integrin reduces muscle pathology and improves viability in the dyW mouse model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A. *J Cell Sci.* 2011 Jul 1;124(13):2287–97.
282. Mayer U, Saher G, Fässler R, Bornemann A, Echtermeyer F, von der Mark H, et al. Absence of integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1997 Nov;17(3):318–23.
283. Rooney JE. Severe muscular dystrophy in mice that lack dystrophin and 7 integrin. *J Cell Sci.* 2006 May 9;119(11):2185–95.
284. Ballut L, Sapay N, Chautard E, Imberty A, Ricard-Blum S. Mapping of heparin/heparan sulfate binding sites on $\alpha\beta3$ integrin by molecular docking. *J Mol Recognit JMR.* 2013 Feb;26(2):76–85.
285. Widmaier M, Rognoni E, Radovanac K, Azimifar SB, Fassler R. Integrin-linked kinase at a glance. *J Cell Sci.* 2012 Apr 15;125(8):1839–43.
286. Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jan;7(1):20–31.
287. Wu C, Dedhar S. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol.* 2001 Nov 12;155(4):505–10.
288. Wang H-V, Chang L-W, Brixius K, Wickström SA, Montanez E, Thievensen I, et al. Integrin-linked kinase stabilizes myotendinous junctions and protects muscle from stress-induced damage. *J Cell Biol.* 2008 Mar 10;180(5):1037–49.
289. Gheyara AL, Vallejo-Illarramendi A, Zang K, Mei L, St-Arnaud R, Dedhar S, et al. Deletion of integrin-linked kinase from skeletal muscles of mice resembles muscular dystrophy due to alpha 7 beta 1-integrin deficiency. *Am J Pathol.* 2007 Dec;171(6):1966–77.
290. Traister A, Li M, Aafaqi S, Lu M, Arab S, Radisic M, et al. Integrin-linked kinase mediates force transduction in cardiomyocytes by modulating SERCA2a/PLN function. *Nat Commun.* 2014 Sep 11;5:4533.
291. Lu W, Xie J, Gu R, Xu B. Expression of integrin-linked kinase improves cardiac function in a swine model of myocardial infarction. *Exp Ther Med.* 2017 May;13(5):1868–74.
292. Umesh A, Thompson MA, Chini EN, Yip K-P, Sham JSK. Integrin Ligands Mobilize Ca^{2+} from Ryanodine Receptor-gated Stores and Lysosome-related Acidic Organelles in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem.* 2006 Nov 10;281(45):34312–23.
293. Maile LA, Aday AW, Busby WH, Sanghani R, Veluvolu U, Clemmons DR. Modulation of integrin antagonist signaling by ligand binding of the heparin-binding domain of vitronectin to the $\alpha\beta3$ integrin. *J Cell Biochem.* 2008 Oct 1;105(2):437–46.
294. Paredes-Gamero EJ, Medeiros VP, Farias EHC, Justo GZ, Trindade ES, Andrade-Lopes AL, et al. Heparin Induces Rat Aorta Relaxation via Integrin-Dependent Activation of Muscarinic M3 Receptors. *Hypertension.* 2010 Oct 1;56(4):713–21.

295. Sobel M, Fish WR, Toma N, Luo S, Bird K, Mori K, et al. Heparin modulates integrin function in human platelets. *J Vasc Surg*. 2001 Mar;33(3):587–2A.
296. Nieberler M, Reuning U, Reichart F, Notni J, Wester H-J, Schwaiger M, et al. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers*. 2017 Sep 4;9(12):116.
297. Moens P, Baatsen PH, Maréchal G. Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J Muscle Res Cell Motil*. 1993 Aug;14(4):446–51.
298. Lynch GS, Hinkle RT, Chamberlain JS, Brooks SV, Faulkner JA. Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *J Physiol*. 2001 Sep 1;535(Pt 2):591–600.
299. Call JA, Ervasti JM, Lowe DA. TAT- μ Utrophin mitigates the pathophysiology of dystrophin and utrophin double-knockout mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2011 Jul;111(1):200–5.
300. van Putten M, Kumar D, Hulsker M, Hoogaars WMH, Plomp JJ, van Opstal A, et al. Comparison of skeletal muscle pathology and motor function of dystrophin and utrophin deficient mouse strains. *Neuromuscul Disord* 2012 May;22(5):406–17.
301. Li D, Yue Y, Duan D. Marginal level dystrophin expression improves clinical outcome in a strain of dystrophin/utrophin double knockout mice. *PLoS One*. 2010 Dec 20;5(12):e15286.
302. van Putten M, Hulsker M, Young C, Nadarajah VD, Heemskerk H, van der Weerd L, et al. Low dystrophin levels increase survival and improve muscle pathology and function in dystrophin/utrophin double-knockout mice. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2013 Jun;27(6):2484–95.
303. Rafael-Fortney JA, Chimanji NS, Schill KE, Martin CD, Murray JD, Ganguly R, et al. Early treatment with lisinopril and spironolactone preserves cardiac and skeletal muscle in Duchenne muscular dystrophy mice. *Circulation*. 2011 Aug 2;124(5):582–8.
304. Lowe J, Wodarczyk AJ, Floyd KT, Rastogi N, Schultz EJ, Swager SA, et al. The Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Lisinopril Improves Muscle Histopathology but not Contractile Function in a Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(3):257–68.
305. Yucel N, Chang AC, Day JW, Rosenthal N, Blau HM. Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it. *NPJ Regen Med*. 2018;3:4.
306. Wells DJ. Tracking progress: an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Dis Model Mech*. 2018 13;11(6).
307. Ness K, Apkon SD. Bone health in children with neuromuscular disorders. *J Pediatr Rehabil Med*. 2014;7(2):133–42.
308. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 2010 Jan;9(1):77–93.
309. Ward LM, Konji VN, Ma J. The management of osteoporosis in children. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. 2016;27(7):2147–79.
310. Chagarlamudi H, Corbett A, Stoll M, Bibat G, Grosman C, Matichak Stock C, et al. Bone health in facioscapulohumeral muscular dystrophy: A cross-sectional study. *Muscle Nerve*. 2017 Dec;56(6):1108–13.
311. Danckworth F, Karabul N, Posa A, Hanisch F. Risk factors for osteoporosis, falls and fractures in hereditary myopathies and sporadic inclusion body myositis - A cross sectional survey. *Mol Genet Metab Rep*. 2014;1:85–97.
312. Regan JN, Waning DL, Guise TA. Skeletal muscle Ca(2+) mishandling: Another effect of bone-to-muscle signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 2016 Jan;49:24–9.
313. Davis KM, Griffin KS, Chu TG, Wenke JC, Corona BT, McKinley TO, et al. Muscle-bone interactions during fracture healing. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2015 Mar;15(1):1–9.
314. Laurent MR, Dubois V, Claessens F, Verschueren SMP, Vanderschueren D, Gielen E, et al. Muscle-bone interactions: From experimental models to the clinic? A critical update. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 05;432:14–36.
315. Veilleux L-N, Rauch F. Muscle-Bone Interactions in Pediatric Bone Diseases. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(5):425–32.
316. Nozawa S, Inubushi T, Irie F, Takigami I, Matsumoto K, Shimizu K, et al. Osteoblastic heparan sulfate regulates osteoprotegerin function and bone mass. *JCI Insight*. 2018 Feb 8;3(3).
317. Magne Børset, Oyvind Hjertner, Shmuel Yaccoby, Joshua Epstein, Ralph D. Sanderson. Syndecan-1 is targeted to the uropods of polarized myeloma cells where it promotes adhesion and

- sequesters heparin-binding proteins. *Blood*. 2000;
318. Graham ZA, Gallagher PM, Cardozo CP. Focal adhesion kinase and its role in skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2015 Oct;36(4–5):305–15.
319. VasANJI Z, Dhalla NS, Netticadan T. Increased inhibition of SERCA2 by phospholamban in the type I diabetic heart. *Mol Cell Biochem*. 2004 Jun;261(1–2):245–9.
320. Dufresne SS, Boulanger-Piette A, Bossé S, Argaw A, Hamoudi D, Marcadet L, et al. Genetic deletion of muscle RANK or selective inhibition of RANKL is not as effective as full-length OPG-fc in mitigating muscular dystrophy. *Acta Neuropathol Commun*. 2018 Apr 24;6(1):31.
321. Samarel AM. Focal adhesion signaling in heart failure. *Pflugers Arch*. 2014 Jun;466(6):1101–11.
322. Kim MH, Kay DI, Rudra RT, Chen BM, Hsu N, Izumiya Y, et al. Myogenic Akt signaling attenuates muscular degeneration, promotes myofiber regeneration and improves muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet*. 2011 Apr 1;20(7):1324–38.
323. Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre A-M, Hajjar RJ. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 Jan;10(1):29–41.
324. Bhatnagar S, Kumar A. Therapeutic targeting of signaling pathways in muscular dystrophy. *J Mol Med Berl Ger*. 2010 Feb;88(2):155–66.
325. Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):3002–7.
326. Hwee DT, Cheng AJ, Hartman JJ, Hinken AC, Lee K, Durham N, et al. The Ca²⁺ sensitizer CK-2066260 increases myofibrillar Ca²⁺ sensitivity and submaximal force selectively in fast skeletal muscle. *J Physiol*. 2017 01;595(5):1657–70.
327. Coirault C, Lambert F, Marchand-Adam S, Attal P, Chemla D, Lecarpentier Y. Myosin molecular motor dysfunction in dystrophic mouse diaphragm. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277(6 Pt 1):C1170-1176.
328. Guellich A, Negroni E, Decostre V, Demoule A, Coirault C. Altered cross-bridge properties in skeletal muscle dystrophies. *Front Physiol*. 2014;5:393.
329. De Luca A, Pierno S, Liantonio A, Cetrone M, Camerino C, Simonetti S, et al. Alteration of excitation-contraction coupling mechanism in extensor digitorum longus muscle fibres of dystrophic mdx mouse and potential efficacy of taurine. *Br J Pharmacol*. 2001 Mar;132(5):1047–54.
330. Warren GL, Lowe DA, Hayes DA, Karwoski CJ, Prior BM, Armstrong RB. Excitation failure in eccentric contraction-induced injury of mouse soleus muscle. *J Physiol*. 1993 Aug;468:487–99.
331. Warren GL, Hayes DA, Lowe DA, Armstrong RB. Mechanical factors in the initiation of eccentric contraction-induced injury in rat soleus muscle. *J Physiol*. 1993 May;464:457–75.
332. Blaauw B, Agatea L, Toniolo L, Canato M, Quarta M, Dyar KA, et al. Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2010 Jan;108(1):105–11.
333. Warren GL, Ingalls CP, Lowe DA, Armstrong RB. What mechanisms contribute to the strength loss that occurs during and in the recovery from skeletal muscle injury? *J Orthop Sports Phys Ther*. 2002 Feb;32(2):58–64.
334. Balnave CD, Allen DG. Intracellular calcium and force in single mouse muscle fibres following repeated contractions with stretch. *J Physiol*. 1995 Oct 1;488 (Pt 1):25–36.
335. Olthoff JT, Lindsay A, Abo-Zahrah R, Baltgalvis KA, Patrino X, Belanto JJ, et al. Loss of peroxiredoxin-2 exacerbates eccentric contraction-induced force loss in dystrophin-deficient muscle. *Nat Commun [Internet]*. 2018 Dec [cited 2018 Dec 8];9(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-07639-3>
336. Rozo M, Li L, Fan C-M. Targeting β 1-integrin signaling enhances regeneration in aged and dystrophic muscle in mice. *Nat Med*. 2016 Aug;22(8):889–96.
337. Boppart MD, Burkin DJ, Kaufman SJ. Activation of AKT signaling promotes cell growth and survival in α 7 β 1 integrin-mediated alleviation of muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 2011 Apr;1812(4):439–46.
338. Blaauw B, Mammucari C, Toniolo L, Agatea L, Abraham R, Sandri M, et al. Akt activation prevents the force drop induced by eccentric contractions in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Hum Mol Genet*. 2008 Dec 1;17(23):3686–96.
339. Kennedy TL, Swiderski K, Murphy KT, Gehrig SM, Curl CL, Chandramouli C, et al. BGP-15 Improves Aspects of the Dystrophic Pathology in mdx and dko Mice with Differing Efficacies in

- Heart and Skeletal Muscle. *Am J Pathol*. 2016 Dec;186(12):3246–60.
340. Baylor SM, Hollingworth S. Intracellular calcium movements during excitation-contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *J Gen Physiol*. 2012 Apr;139(4):261–72.
341. Moss RL, Lynch TL, Fitzsimons DP. Acting on an impulse (or two): Advantages of high-frequency tetanic onset in skeletal muscle. *J Gen Physiol*. 2017 Mar 6;149(3):297–300.
342. Waning DL, Mohammad KS, Reiken S, Xie W, Andersson DC, John S, et al. Excess TGF- β mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nat Med*. 2015 Nov;21(11):1262–71.
343. Zauli G, Corallini F, Bossi F, Fischetti F, Durigutto P, Celeghini C, et al. Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo. *Blood*. 2007 Mar 15;110(2):536–43.