



Implication de la voie RANK/RANKL/OPG dans la physiopathologie musculaire et potentiel thérapeutique de l'anti-RANKL pour la dystrophie musculaire de Duchenne

Thèse

Dounia Hamoudi

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

Québec, Canada

© Dounia Hamoudi, 2021



**Implication de la voie RANK/RANKL/OPG dans la
physiopathologie musculaire et potentiel thérapeutique de
l'anti-RANKL pour la dystrophie musculaire de Duchenne**

Thèse

Dounia Hamoudi

Sous la direction de :

Dr. Jérôme Frenette, directeur de recherche

Résumé de la thèse

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique neuromusculaire provoquée par des mutations du gène codant pour la dystrophine situé sur le chromosome Xp21. L'absence de cette protéine membranaire engendre une dégénérescence progressive des cellules, une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire, des dommages oxydatifs, inflammatoires et ultimement une fibrose musculaire. Les patients souffrent également de plusieurs autres anomalies dont les plus importantes sont la cardiomyopathie et l'ostéoporose. Il n'y a actuellement aucune stratégie curative pour la DMD. Les corticostéroïdes sont prescrits pour prolonger la mobilité et l'espérance de vie, mais sont associés à une ostéotoxicité élevée. Bien qu'il existe une association entre l'ostéoporose et la dégénérescence musculaire, nous avons été les premiers à étudier le rôle du récepteur-activateur du facteur nucléaire kB (RANK), son ligand RANKL et du récepteur soluble ostéoprotégérine (OPG), principaux régulateurs du remodelage osseux, dans le contexte des maladies musculaires. Nos travaux antérieurs montrent que les myotubes différenciés sécrètent l'OPG, expriment le récepteur RANK à leurs surfaces et dans le contexte de DMD l'expression de l'ARNm de RANK est 4 fois plus élevée dans les muscles de souris dystrophiques comparativement aux muscles sains. L'objectif de la présente thèse vise à exploiter cette voie afin de comprendre le mécanisme d'action de ces cytokines sur la physiopathologie musculaire et d'établir une stratégie thérapeutique pour la DMD en traitement unique ou combinée aux glucocorticoïdes. Dans un premier temps, nous avons investigué l'impact de la neutralisation systémique à long terme de RANKL sur l'intégrité et la fonction musculaire et osseuse dans un modèle sévère de dystrophie déficient en dystrophine/haploinsuffisant en utrophine. Ensuite, nous avons étudié les rôles physiopathologiques de l'OPG sur les tissus musculaires en caractérisant la fonction musculaire de souris déficientes en OPG. Finalement, nous avons débuté une étude sur l'effet de neutralisation systémique de RANKL sur l'ostéoporose associée à un traitement au deflazacort, un glucocorticoïde prescrit pour la DMD. Ainsi nous avons démontré que le traitement à long terme à l'anti-RANKL améliore la fonction et l'intégrité musculaire et osseuse chez les souris dystrophiques et protège contre l'ostéoporose induite par les

glucocorticoïdes. À l'opposé, l'absence d'OPG induit, possiblement via RANKL, une faiblesse osseuse et musculaire et une atrophie sélective des fibres musculaires les plus puissantes. Ces avancées repoussent les connaissances au sujet de la voie RANK/RANKL/OPG au sein de la communication muscle-os et appuient l'anti-RANKL comme perspective thérapeutique chez les patients atteints de la DMD.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a genetic neuromuscular disorder caused by mutations in the gene encoding dystrophin located on chromosome Xp21. The absence of this membrane protein results in a rise in intracellular calcium concentration, oxidative and inflammatory damage, progressive cell degeneration and ultimately muscle fibrosis. Patients also suffer from several other anomalies, of which cardiomyopathy and osteoporosis are the most debilitating. There is currently no cure for DMD. Corticosteroids are prescribed to prolong mobility and life expectancy but are associated with high osteotoxicity. Although there is an association between osteoporosis and muscle degeneration, we were the first to study the receptor activator of nuclear factor NF- κ B (RANK), its ligand RANKL and the soluble decoy receptor osteoprotegerin (OPG), key regulators of osteoclast differentiation and bone remodeling, in the context of muscle disease. Our previous work showed that differentiated myotubes secrete OPG, express the RANK receptor on their surfaces and in the context of DMD the expression of RANK mRNA is 4 times higher in dystrophic muscles compared to healthy muscles. The aim of this thesis is therefore to exploit this pathway to understand the mechanism of action of these cytokines on muscle pathophysiology and to establish a therapeutic strategy for DMD as a single treatment or in combination with glucocorticoids. We first investigated the impact of long-term systemic neutralization of RANKL on muscle and bone integrity and function in the severe dystrophin-utrophin haploinsufficient model. Next, we studied the pathophysiological roles of OPG on muscle tissue by characterizing muscle function in OPG-deficient mice. Finally, we initiated a study to investigate whether systemic neutralization of RANKL protects against glucocorticoid deflazacort-induced osteoporosis. Thus, we have demonstrated that long-term treatment with anti-RANKL improves muscle and bone function and integrity in dystrophic mice and protects against glucocorticoid-induced osteoporosis. In contrast, the absence of OPG induces, possibly via RANKL, bone and muscle weakness, and selective atrophy of the strongest muscle fibers. These data further our understanding about the RANK/RANKL/OPG pathway in muscle-to-bone communication and support anti-RANKL as a therapeutic perspective for DMD patients.

Table des matières

Résumé de la thèse	ii
Abstract.....	iv
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations, sigles, acronymes.....	xi
Épigraphe.....	xii
Remerciements	xiii
Avant-propos	xvi
Introduction.....	1
1. Problématique	1
2. Le muscle squelettique dans un contexte physiologique	4
2.1. De la structure générale à l'ultrastructure du muscle squelettique	4
2.1. La contraction musculaire, de la stimulation à la génération de force.....	8
2.2. Le phénotype des fibres musculaires	9
2.3. Atrophie et hypertrophie du muscle squelettique	12
3. Le muscle squelettique dans un contexte pathologique.....	14
3.1. La dystrophie musculaire de Duchenne.....	14
3.2. Caractéristiques moléculaires et cellulaires du DMD.....	17
3.2.1. Perméabilité aux macromolécules	17
3.2.2. Inflammation chronique, fibrose et nécrose cellulaire.....	19
3.2.3. La régénération musculaire.....	22
3.3. Les modèles murins les plus utilisés pour mimer la pathologie de DMD	24
4. La dysfonction synchrone os-muscle dans la DMD	27
4.1. Le remodelage et la régulation de la densité osseuse	27
4.1.1. La physiologie osseuse	27
4.1.2. La voie OPG/RANK/RANKL dans l'os.....	29
4.2. La communication entre le muscle squelettique et l'os dans la DMD	31
4.3. OPG/RANK/RANKL dans le muscle et la DMD.....	34
4.4. La norme de soin pour la DMD	36
Objectifs et hypothèses	40
Chapitre 1 : Cibler l'unité muscle-os, faire d'une pierre deux coups dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne	43
Résumé	45

Abstract	46
1.1. Introduction.....	47
1.2. Muscle and Skeletal Decline in DMD: The Scope of the Problem	47
1.3. Muscle-Bone Interactions in Muscular Dystrophy	48
1.4. Myokines and Their Effects on Bone Tissue in DMD	49
1.5. Osteokines and Their Effects on Muscle Tissue in DMD	52
1.6. Treating the Bone-Muscle Complex with Single or Combined Drugs in DMD ..	54
1.7. RANK/RANKL/OPG and Muscular Dystrophy	56
1.8. Conclusion	59
1.9. References.....	61
1.10. Figures and Legends	74
Chapitre 2 : Un traitement à l’anti-RANKL réduit l'inflammation et le dysfonctionnement musculaire et renforce les os chez les souris dystrophiques	75
Résumé	77
Abstract	78
2.1. Introduction.....	79
2.2. Results.....	81
2.3. Discussion.....	85
2.4. Materials and Methods.....	88
2.5. Acknowledgements.....	93
2.6. References.....	93
2.7. Figures, Legends and tables.....	96
Chapitre 3 : La faiblesse et l’atrophie musculaire sélective chez des souris déficientes en ostéoprotégérine	106
Résumé	108
Abstract	109
3.1. Introduction.....	110
3.2. Results.....	112
3.3. Discussion.....	116
3.4. Materials and Methods.....	119
3.5. Acknowledgements.....	123
3.6. References.....	123
3.7. Figures, legends and tables	126

Discussion	136
Conclusion	148
Perspectives	149
Bibliographie	151
Annexe 1 : Le traitement anti-RANKL améliore la fonction musculaire et l'ostéoporose induite chez les souris mdx traitées aux glucocorticoïdes.	166
Résumé	168
Abstract	169
A1.1 Introduction	170
A1.2 Results	173
A1.3 Discussion	176
A1.4 Materials and Methods.....	179
A1.5 Acknowledgements.....	183
A1.6 References	183
A1.7 Figures, legends and tables	186

Liste des figures

Figure 1 : Structure et organisation générale du muscle squelettique. Tirée de (12).....	7
Figure 2: Les différents types de fibres musculaires squelettiques chez l’homme et la souris. Adaptée de (20).....	11
Figure 3: Vue d'ensemble des voies de signalisation régulant l'atrophie et l'hypertrophie du muscle squelettique. Tirée de (38).....	14
Figure 4: La dystrophine et le complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine (DGC) reliant le cytosquelette interne à la matrice externe. Tirée de (59).....	17
Figure 5: Séquence de la réponse inflammatoire précoce aux lésions des muscles squelettiques dystrophiques. Tirée de (83).	21
Figure 6: Nécrose du muscle squelettique dystrophique et événements cellulaires associés à la régénération subséquente. Adaptée de (98)	24
Figure 7: Remodelage osseux et ses voies moléculaires associées. Tirée de (137).....	29
Figure 8: Voies d’interactions moléculaires potentielles entre les os et les muscles. Tirée de (162).....	34

Figure 1. 1: Myokines, osteokines, and dual-origin cytokines involved in Duchenne muscular dystrophy.....	74
---	----

Figure 2. 1: RANK/RANKL expression is elevated in the microenvironment of dystrophic muscles.....	96
Figure 2. 2: The anti-RANKL treatment significantly improved the specific force of dystrophic muscles but failed to prevent the loss of specific force following 7 consecutive eccentric contractions.....	97
Figure 2. 3: The anti-RANKL treatment reduced the muscle damage observed in dystrophic EDL muscles.	98
Figure 2. 4: The anti-RANKL treatment reduced inflammation in dystrophic EDL muscles.	99
Figure 2. 5: The anti-RANKL treatment reduced satellite cell activation and promoted a more effective reconstitution of muscle fiber size.....	101

Figure 3. 1: Opg ^{-/-} mice travelled shorter distances and were weaker than WT mice at 5 months of age.....	127
Figure 3. 2: Ex vivo contractile properties of fast and slow-twitch muscles from Opg ^{-/-} and WT mice.....	128
Figure 3. 3: OPG deficiency impacted extensor digitorum longus myofiber morphology and phenotype.....	130
Figure 3. 4: The anti-RANKL treatment significantly improves muscle function and restores the mechanical properties of bone in Opg ^{-/-} mice.	132
Figure 3. 5: RANKL induced myotube atrophy in vitro.....	133

Figure A1. 1: The anti-RANKL and deflazacort treatments significantly improved muscle function in vivo and ex vivo without any synergetic effects of the combined treatment. ...	186
Figure A1. 2: Anti-RANKL and deflazacort or co-treatment significantly improved muscle integrity to the same extent but did not have the same effect on muscle regeneration.....	188

Figure A1. 3: Anti-RANKL and DFZ treatments significantly reduced neutrophil cell infiltration without any additive effect with the combined treatments189

Figure A1. 4: Anti-RANKL treatment significantly increased bone stiffness and counteracted Deflazacort bone-side effects in mdx mice.190

Liste des tableaux

Table 2. 1: Contractile properties of EDL and Sol muscles.	103
Table 2. 2: Dry and wet muscle mass of EDL and Sol muscles from anti-RANKL-treated <i>mdx/utrn</i> ^{+/-} mice.	104
Table 2. 3: The mechanical properties of tibial and femoral bones.	105
Table 3. 1: Body mass and morphological characteristics of extensor digitorum longus and soleus muscles at 1, 3, and 5 months of age.	134
Table 3. 2: Morphological and contractile properties of EDL muscles.	135
Table A1. 1: Morphological and contractile properties of EDL and Sol muscles.	191
Table A1. 2: Body mass and morphological characteristics of extensor digitorum longus and soleus muscles.	192

Liste des abréviations, sigles, acronymes

ADP	Adénosine diphosphate
Arg1	Arginase 1
ATP	Adénosine triphosphate
CATK	Cathepsine K
DFZ	Deflazacort
DGC	<i>Dystrophin-glycoprotein complex</i>
DHPR	<i>Dihydropyridine receptor</i>
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
ECC	Excitation-contraction coupling
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
FAP	Progéniteurs fibro-adipogéniques
FL-OPG-Fc	<i>Full-length osteoprotegerin fused to immunoglobulin fragment complex</i>
FOXO	<i>Forkhead box</i>
GC	Glucocorticoïdes
HSPG	Protéoglycanes héparine sulfates
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
MAFbx	<i>Muscle Atrophy F-box</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
MEC	Matrice extracellulaire
MPO	Myéloperoxydase
MuRF-1	<i>Muscle Ring Finger-1</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
OPG	Osteoprotegerin
OPG-Fc	<i>Osteoprotegerin fused to immunoglobulin fragment complex</i>
Pax-7	<i>Paired box-7</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-kB</i>
RANKL	<i>Receptor activator of NF-kB ligand</i>
RS	Réticulum sarcoplasmique
RYR	<i>Ryanodine receptor</i>
SERCA	<i>Sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase</i>
SOCE	<i>Store-operated calcium entry</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>
TRAP	Phosphatase acide résistante au tartrate
TR-OPG-Fc	<i>Truncated osteoprotegerin fused to immunoglobulin fragment complex</i>
TRPC	<i>Transient receptor potential-canonical</i>

Épigraphe

« Sans la curiosité de l'esprit, que serions-nous ? Telle est la beauté et la noblesse de la science, un désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles »

Marie Curie 1933

Remerciements

Comme le dit si bien Albert Einstein « La vie, c'est comme une bicyclette, il faut avancer pour ne pas perdre l'équilibre ». Pour ne pas perdre notre équilibre, il faut être curieux et avancer dans la vie et développer nos capacités d'apprentissage pour atteindre nos rêves. C'est pour cette raison que j'ai quitté l'Europe pour venir au Québec en automne 2016. Cette aventure humaine et scientifique fut possible, agréable et enrichissante grâce au soutien de nombreuses personnes qui ont été présentes de près ou de loin. Premièrement, je vais adresser mes remerciements et ma gratitude vers mon directeur de recherche, le professeur Jérôme Frenette, qui m'a fait confiance et m'a accueilli dans son laboratoire. J'ai trouvé en vous un mentor, une personne qui a su me guider dans l'acquisition de mes compétences, la maturation de mon esprit scientifique, le développement de mon sens critique et la capacité de synthèse d'un problème complexe. Je tiens à souligner qu'au-delà de votre générosité scientifique votre éthique et rigueur professionnelle, vous êtes doté de plusieurs qualités humaines et relationnelles. Ainsi, s'achève cette expérience, rendue possible grâce à vous, je vous remercie infiniment.

Deuxièmement, je tiens à remercier le professeur Claude H. Côté qui a accepté volontiers d'être membre du comité d'évaluation de mon examen de doctorat ainsi que de mon mémoire de thèse. Je vous remercie pour votre support, vos conseils et suggestions. J'aimerais également diriger mes remerciements vers le professeur Denis R. Joannis qui a également fait partie du comité d'évaluation de mon examen de doctorat et a accepté d'être membre du jury de ma thèse.

Selon la maxime d'Aristote, « le tout est plus que la somme de ses parties » ou d'une manière simpliste, ensemble on peut aller plus loin. Mon travail ne serait possible sans un bon travail d'équipe. Je tiens donc à adresser mes remerciements au Dr Anteneh Argaw qui grâce à ses capacités pédagogiques, expertises et surtout sa rigueur scientifique a su m'apprendre et évoluer vers la meilleure version de moi-même. Anteneh, merci pour ton support constant et pour ton sens critique qui m'a permis de voir plus loin que le bout de

mon nez! Je garde de toi l'image d'un homme humble et travailleur d'une gentillesse sans égale.

Un grand merci également aux étudiants au doctorat (Dr. Antoine B Piette, Zineb Bouredji et Laetitia Marcadet) qui m'ont soutenue et aidé dans l'accomplissement de ce travail. Premièrement, je remercie Antoine qui a été présent pour moi durant les moments turbulents de ma thèse. Merci pour les différents conseils et idées de recherche qui m'ont permis d'avancer certains projets. J'ai beaucoup d'anecdotes te concernant, mais celle que je n'oublierai pas, c'est notre course derrière une souris échappée à l'animalerie du T, c'était une vraie frayeur pour moi à l'époque, mais maintenant, j'en rigole. Je remercie également Laetitia pour ta collaboration à mes différents projets de recherches et d'avoir partagé tes connaissances informatiques et techniques. Finalement, les deux dernières années de ma thèse n'auraient jamais été pareil sans toi Zineb, un ovni venu de Paris. Merci d'être toi et d'avoir apporté ta folie, ta curiosité ton anxiété, mais surtout ton ambition. Tu as su être là pour moi et me soutenir durant la dernière ligne droite de mon doctorat et tu m'as épaulé dans les moments de doutes et dans les péripéties qui ont rythmé ma thèse, sans oublier tes messages à minuit pour me poser des questions ou même faire une réflexion sur un sujet. Au-delà de cette relation de travail, nous avons développé une amitié sincère. Je te souhaite un bon succès dans ton doctorat, tu as tout ce qu'il faut pour réussir. J'aimerais également remercier les stagiaires (Louis Bénédicte, Rares Ovidiu, Frédérique) qui ont contribué aux expérimentations et ont apporté leur bonne humeur. Merci également à nos collaborateurs, employés de l'animalerie et membres de l'axe neurosciences. En dernier lieu, je me dois de remercier les organismes subventionnaires qui ont soutenu financièrement le laboratoire et un merci particulier à la Fondation du CHU de Québec pour m'avoir donné ma toute première bourse.

J'ai surmonté plusieurs obstacles qui me semblaient très difficiles et pour combattre ces épreuves, je devais me dire « ce qui ne me tue pas me rend plus forte ». Cette thèse ne serait pas aussi facile sans l'amour et le soutien indélébile de ma famille, ma belle famille et mes amies. Je dédie cette thèse à ma mère, Fatima, une femme au grand cœur. Merci de m'avoir poussé à faire des études et être la personne que je suis aujourd'hui. Je remercie

également mon père, Belkacem, mes frères (Rachid, Madjid, Nassim et Farid) et mes deux adorables sœurs (Farida et Malika). En témoignage de mon profond respect, mon grand amour et toute ma gratitude, pour tous les sacrifices que vous avez consentis, je vous dédis cette modeste thèse. Merci de m'avoir soutenue, aidée et encouragée à sortir de ma zone de confort et m'envoler vers d'autres horizons et de m'avoir inculqué des valeurs et des principes basés sur l'amour, le respect et la tolérance. Un immense merci à toi ma meilleure amie, Doudah d'avoir été là pour moi, de m'avoir écouté, épaulé et encouragé. Merci pour ton amitié sans faille, ton soutien et tes conseils. Un grand merci également à mes amies (Lisa, Katia, Souhila, Ghada, Ania, Manel et bien évidemment Zineb et Saran) vous m'avez donné l'énergie qui m'a permis de passer à travers ce doctorat, je vous aime. Je remercie également Marie loup, Justine et Marianne pour votre folie! Avec vous seront désormais attachés les souvenirs de nos grandes discussions et de bons moments de fun.

Pour clôturer cette longue page de remerciement, je tiens à adresser mes remerciements à mon cher mari Salim. Tu n'as pas été seulement mon amoureux, mais mon meilleur ami, quelqu'un qui m'écoute et me soutient énormément. Tu m'as donné beaucoup d'énergie et d'amour pour surpasser toutes les difficultés par lesquelles je suis passée. Malgré la distance, tu as su être présent pour toutes les étapes de mon doctorat. Tu m'as rendu le sourire plusieurs fois, quand les choses allaient mal. Tu es une personne unique et je suis chanceuse d'avoir eu la perle rare. Bientôt, on va se rejoindre pour ne jamais se quitter! Je t'aime.

Avant-propos

La présente thèse est composée d'un article de revue, de deux articles originaux publiés et d'un article en préparation dont les résultats préliminaires ont été présentés dans l'annexe 1. Les chapitres présentés dans cette thèse constituent des articles dont je suis première ou deuxième auteure tous publiés dans des revues scientifiques révisées par les pairs. Le premier chapitre est un article de revue sur la communication entre l'os et le muscle dans le contexte de la DMD publié en septembre 2018, dans le prestigieux périodique « *Current Osteoporosis Reports* » PMID: 30225627. Pour cet article de revue, je suis deuxième co-auteur et ma contribution fut dans la revue de la littérature et l'écriture d'une partie du premier jet des sous sections suivante : *Muscle-Bone Interactions in Muscular Dystrophy, Myokines and Their Effects on Bone Tissue in DMD, Osteokines and Their Effects on Muscle Tissue in DMD*. Cet article de revue a été co-écrit avec deux autres étudiants du laboratoire : Antoine Boulanger Piette et Laetitia Marcadet.

Le deuxième chapitre est un article original publié en 2019 à titre de premier auteur dans le « *Journal of Human Molecular Genetics* » PMID: 31179501. Cet article avait pour objectif de définir l'implication de RANKL dans le dysfonctionnement musculaire et osseux dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et l'impact de son inhibition systémique à l'aide d'un anticorps anti-RANKL. Le troisième chapitre comprend un article original publié en 2020 à titre de premier auteur dans le « *Journal of Human Molecular Genetics* » PMID: 31943048. Cet article avait pour objectif d'étudier le rôle physiologique de l'OPG sur la fonction et le phénotype des muscles à contraction rapide et lente chez la souris. Finalement, les données principales de mon dernier projet de recherche, encore incomplètes sont présentées dans la partie annexe 1 de cette thèse. Cet article avait pour objectif d'évaluer l'impact d'un traitement combiné à l'anti-RANKL et aux glucocorticoïdes sur la fonction musculaire et la dégradation osseuse dans le modèle de souris atteinte de la DMD. Grâce à une collaboration en cours avec le Dr. Colin Farquharson de l'Université d'Edinburgh en Ecosse nous pourrions investiguer de plus près les changements histomorphométriques, biochimiques et la microarchitecture osseuse après les traitements à l'anti-RANKL et aux glucocorticoïdes chez la souris atteinte de la DMD. Ma contribution dans la réalisation des travaux de recherches qui ont mené à ces trois articles originaux comprend la planification et

l'exécution des expérimentations, l'analyse et la collecte des données, l'écriture du premier jet des manuscrits, leurs soumissions et la révision pour les articles. La conception des projets, l'élaboration des objectifs, les étapes de rédaction et de révision ont été réalisées grâce à la grande contribution de mon directeur de recherche, le Dr. Jérôme Frenette et le professionnel de recherche le Dr Anteneh Argaw. Les différents coauteurs ont contribué à une partie des expérimentations et la collecte de données. Les articles publiés sont présentés dans leur forme originale sans modification.

En plus des articles présentés dans cette thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à d'autres projets de recherche qui ont conduit ou qui vont conduire à des publications comme coauteur. De ce fait, j'ai collaboré avec les membres de l'équipe de mon laboratoire de recherche afin de finaliser certains projets en liens avec la voie RANK/RANKL/OPG. En effet, je suis co-auteure sur deux articles originaux parus dans des grands journaux scientifiques « *Acta Neuropathologica Communications* » PMID: 29699580 et « *Plos One* » PMID: 29879154. Grâce à mon expertise dans les tests de fracture osseuses, j'ai été sollicité pour faire une collaboration avec le laboratoire du Dre Carreau qui travaille sur l'anémie de Fanconi. Une collaboration qui a donné lieu à une publication d'un article publié dans la revue « *J Bone Mineral Research* » PMID: 29989666 dont je suis également co-auteure. J'ai eu également l'opportunité de collaborer avec le laboratoire du Dr Luc Sabourin de l'Université d'Ottawa sur l'étude du rôle de la kinase Ste20-Like Kinase (SLK) dans la myogenèse chez les souris dystrophiques (*mdx*). Cette collaboration m'a permis d'être troisième auteur sur un article récemment publié dans le « *Journal of Molecular Cell Research* » PMID: 33259860.

Introduction

1. Problématique

Les dystrophies musculaires sont un groupe hétérogène de maladies neuromusculaires, marquées par une faiblesse musculaire progressive entraînant éventuellement une mort prématurée. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique neuromusculaire létale causée par l'absence de la dystrophine et survient presque exclusivement chez les garçons. La DMD est la forme de dystrophie musculaire la plus courante et la plus grave affectant jusqu'à 1 sur 5000 naissances vivantes dans le monde. Les patients atteints de DMD souffrent d'une dégénérescence musculaire progressive entraînant une perte de la marche indépendante à l'adolescence. Les patients DMD présentent également une prévalence élevée de fractures avec un mauvais pronostic de récupération en absence de traitements contre l'ostéoporose (1). Le décès survient suite à des complications respiratoires et cardiaques au début de la trentaine (2). En plus des impacts néfastes importants sur la qualité de vie des patients, la DMD impose un lourd fardeau économique aux familles des personnes touchées, ainsi qu'à la société dans son ensemble. En 2010, en Amérique du nord, il a été estimé qu'un patient dépense en moyenne 50 952 \$ par an, incluant les frais médicaux, non médicaux et indirects et génère un coût national annuel estimé à 787 millions de dollars (3). Il est intéressant de constater que le coût économique de la DMD augmente de façon spectaculaire avec la progression de la maladie jusqu'à 5,7 fois entre la phase ambulatoire précoce et la phase non ambulatoire (4).

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif contre la DMD. Au cours des deux dernières décennies, plusieurs approches thérapeutiques se sont concentrées sur les différentes étapes de la physiopathologie de DMD. Ces approches peuvent être largement divisées en celles ciblant la correction de la mutation et celles essayant de réduire les conséquences secondaires de l'absence de dystrophine. Bien que les nouvelles thérapies axées sur la correction de la mutation par la thérapie génique aient connu une avancée spectaculaire au cours des 15 dernières années, également dans le contexte de DMD, seul un

petit nombre de patients sont susceptibles de recevoir un traitement avec des médicaments spécifiques à une mutation. Par exemple, le saut d'exon, une approche ciblant les exons mutés avec des oligonucléotides antisens (AON) dans le but de produire une version plus courte mais fonctionnelle de la dystrophine, peut traiter 55 % des patients atteints de DMD. Les Eplirsén et golodirsén, deux AONs qui ont récemment été approuvés par la « *Food and Drug Administration* » (FDA) pour le traitement des patients DMD présentant des mutations dans les exons 51 et 53, respectivement. Des essais cliniques sont également en cours pour l'étude de l'efficacité et l'innocuité des thérapies dites de lecture « *Readthrough therapy* » qui utilisent certains médicaments ou produits chimiques pour induire sélectivement la lecture ribosomique de codons stop prématurés. Théoriquement, cette thérapie est applicable à toutes les mutations non-sens, qui représentent jusqu'à 10 % de tous les cas de DMD (5). Une autre stratégie émergente est l'édition de gènes médiée par CRISPR/Cas9 qui peut être combinée avec la thérapie cellulaire pour obtenir des effets thérapeutiques plus importants et permanents (6), (7). De plus, la transplantation de cellules myogéniques capables de produire une dystrophine fonctionnelle a également été explorée comme approche alternative (8). D'autres thérapies se reposent sur et l'augmentation des niveaux endogènes de l'homologue autosomique de la dystrophine, appelée utrophine (9). Les approches pharmacologiques incluant les traitements à l'aide d'agents anti-inflammatoires ciblant la voie NF- κ B, des anti-fibrotiques ou l'augmentation des niveaux de régénération musculaire via le blocage de la myostatine sont également au stade d'essai clinique ou en préclinique (10). Bien que l'administration chronique de glucocorticoïdes (GC), la norme de soins pour les patients atteints de DMD, prolonge l'ambulation, la fonction cardiorespiratoire et l'espérance de vie, ils sont associés à l'apparition de diverses complications secondaires y compris une ostéotoxicité élevée et une susceptibilité accrue aux fractures osseuses (11). Nos plus récents travaux soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'unité muscle-os peut être traitée avec un seul agent thérapeutique dans la DMD. En effet, le récepteur-activateur du facteur nucléaire κ B (RANK), son ligand RANKL et le récepteur soluble leurre ostéoprotégérine (OPG) sont les principaux régulateurs du remodelage osseux. Bien qu'il existe une association entre l'ostéoporose et la dégénérescence musculaire, nous avons été les premiers à étudier le rôle de la voie RANK/RANKL/OPG dans le contexte des maladies musculaires, dont la DMD. Nos travaux antérieurs ont montré que les myotubes différenciés secrètent l'OPG, expriment

le récepteur RANK à leurs surfaces et dans le contexte de DMD, l'expression de l'ARNm de RANK est 4 fois plus élevée dans les muscles de souris dystrophiques comparativement aux muscles sains. Compte tenu des nombreux obstacles et délais relatifs au développement d'approches génétiques pour restaurer l'expression d'une dystrophine fonctionnelle, les stratégies visant à cibler les voies de signalisation communes impliquées dans les maladies musculaires et osseuses sont une approche à court terme importante pour le traitement de la DMD.

Cette présente thèse contribue à l'avancement des connaissances sur la communication entre l'os et le muscle et plus précisément l'implication de la voie de signalisation cellulaire RANK/RANKL/OPG dans la DMD afin d'optimiser les traitements actuels et d'ouvrir de nouvelles avenues thérapeutiques. L'introduction de cette thèse permettra aux lecteurs de découvrir brièvement la structure et la physiologie du muscle squelettique.

2. Le muscle squelettique dans un contexte physiologique

2.1. De la structure générale à l'ultrastructure du muscle squelettique

Le muscle squelettique constitue approximativement 40% du poids corporel total, contient 50 à 75% du taux de protéines de l'organisme et représente 30 à 50% de l'ensemble du remodelage protéique total du corps humain. Sur le plan mécanique, la caractéristique principale du muscle squelettique est de transformer une énergie chimique sous forme d'ATP en énergie mécanique sous forme de contraction. Les muscles squelettiques assurent la locomotion, le maintien de la posture, la respiration et la thermogénèse. Ce tissu est fortement vascularisé favorisant l'apport d'énergie nécessaire pour la contraction musculaire. D'un point de vue métabolique, le muscle squelettique maintient le métabolisme énergétique de base servant de stockage pour des substrats importants tels que les acides aminés et les glucides. Le tissu musculaire squelettique est un organe très dynamique doté d'une structure bien organisée avec des caractéristiques fonctionnelles bien uniques telles que l'excitabilité, la contractilité, l'élasticité, l'extensibilité et la plasticité. En effet, chaque muscle est composé de plusieurs couches entourées de matrices extracellulaires (MEC) subdivisées en faisceaux musculaires, chaque faisceau étant lui-même constitué de quelques dizaines à plusieurs milliers de fibres musculaires (12). En effet, chaque fibre se trouve à l'intérieur d'une fine gaine de tissu conjonctif appelé endomysium. Plusieurs fibres et leurs endomysium sont placés côte à côte et forment un ensemble nommé faisceau et chaque faisceau est à son tour délimité par une gaine plus épaisse de tissu conjonctif, le périmysium. Les faisceaux sont regroupés dans un revêtement plus grossier composé de tissu conjonctif régulier, l'épimysium, qui enveloppe le muscle squelettique (**Figure 1**). Les fibres musculaires squelettiques sont enfermées dans une membrane basale riche en collagène de type IV, les protéoglycanes héparine sulfates (HSPG) et la laminine, qui jouent un rôle clé dans la transmission de la force aux trois couches externes de tissu conjonctif (13). Toutes ces enveloppes conjonctives constituent un ensemble continu incluant aussi les tendons qui relient les muscles aux os où elles assurent la transmission mécanique de la force. La MEC du muscle squelettique joue également un rôle important dans l'entretien et la réparation des fibres musculaires (14).

Une fibre musculaire unique représente une longue cellule cylindrique avec des dimensions approximatives de 10 à 100 μm de diamètre qui varient généralement selon le muscle et l'état d'entraînement. Pour répondre à la grande demande en synthèse protéique, les fibres musculaires possèdent de nombreux noyaux ovales situés juste au-dessous de la membrane plasmique, le sarcolemme. Le cytoplasme d'une fibre musculaire, appelé aussi sarcoplasme, est comparable au cytoplasme des autres cellules, mais en plus, il abrite des réserves importantes de glycogène et de myoglobine, une protéine qui se lie à l'oxygène. Les cellules musculaires contiennent également des organites telles que le réticulum sarcoplasmique (RS), réservoir de calcium (Ca^{2+}), relié aux tubules transverses (tubule T) sous forme de replis du sarcolemme enlaçant ainsi chaque myofibrille. Ces dernières sont présentes en grand nombre regroupé en parallèle et mesurent de 1 à 2 μm de diamètre. La taille d'un muscle est principalement déterminée par le nombre et la taille des fibres musculaires individuelles, bien que l'infiltration pathologique par les cellules inflammatoires, la graisse et le tissu conjonctif puisse modifier cette relation (12). Les fibres musculaires sont constituées d'alignements de plusieurs protéines dont, les myofilaments minces et épais arrangés en segments appelés sarcomères formant la plus petite unité contractile de la fibre musculaire. Les deux protéines du myofilament les plus abondants sont l'actine et la myosine, qui représentent environ 70 à 80% de la teneur totale en protéines d'une seule fibre. Les têtes de myosine ont un site de liaison qui permettent à celles-ci de se fixer aux actines des filaments minces lors de la contraction. Les myofibrilles sont connectées au sarcolemme le long des disques Z via des interactions avec des complexes protéiques subsarcolemmales appelés costamères. Chaque disque Z coupe en deux une bande I plus claire qui est partagée avec les sarcomères adjacents. Au centre du sarcomère se trouve une bande A dense composée de filaments épais, avec une zone H qui est coupée par la ligne M. Les filaments minces sont maintenus ensemble, dans un réseau latéral, au niveau du disque Z tandis que la bande M interconnecte les filaments épais. Ces structures transmettent les forces contractiles des sarcomères d'une myofibre à une autre, ce qui empêche les ruptures du sarcolemme en synchronisant la contraction des myofibres dans un muscle.

Tout au long du processus de la contraction, la machinerie contractile doit rester intimement liée à la membrane et à la MEC pour gérer le stress lié à la contraction. En effet,

le complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine (DGC) fournit un lien mécanique solide entre le cytosquelette intracellulaire et la MEC. Les composants connus du DGC comprennent la dystrophine, les sarcoglycanes, le dystroglycane, les dystrobrevines, les syntrophines, le sarcospane, la cavéoline-3 et la NO synthase, toutes se trouvent dans différentes combinaisons selon le type de muscle (15). L'absence partielle ou complète de l'une de ces protéines peut provoquer une fragilité du sarcolemme entraînant ainsi des dommages musculaires et subséquemment une dégénérescence et une faiblesse musculaire (15). Outre leur grande plasticité, les muscles squelettiques possèdent également une capacité régénératrice exceptionnelle. Cette capacité est régie par les seules cellules précurseurs myogéniques présentes au stade adulte du muscle squelettique, dites cellules satellites, localisées entre la fibre musculaire et la membrane basale. Les cellules satellites qui peuplent ces fibres sont coincées entre la lame basale et le plasmalemme et plus de 80% à 90% d'entre elles sont situées à seulement quelques micromètres d'un vaisseau sanguin (16). Ces cellules sont quiescentes dans un muscle sain, mais elles peuvent rapidement réintégrer le cycle cellulaire à la suite de blessures, stress mécanique ou un stimulus de croissance musculaire. Les cellules satellites activées migrent, prolifèrent, se différencient et fusionnent pour former des myofibres en régénération. Seul un sous-ensemble de cellules auto-renouvelées est capable de résister à la différenciation lors d'une lésion musculaire et reviendra au repos après l'achèvement de la régénération musculaire pour reconstituer le pool de cellules satellites et préparer le tissu suite à une blessure ultérieure (16).

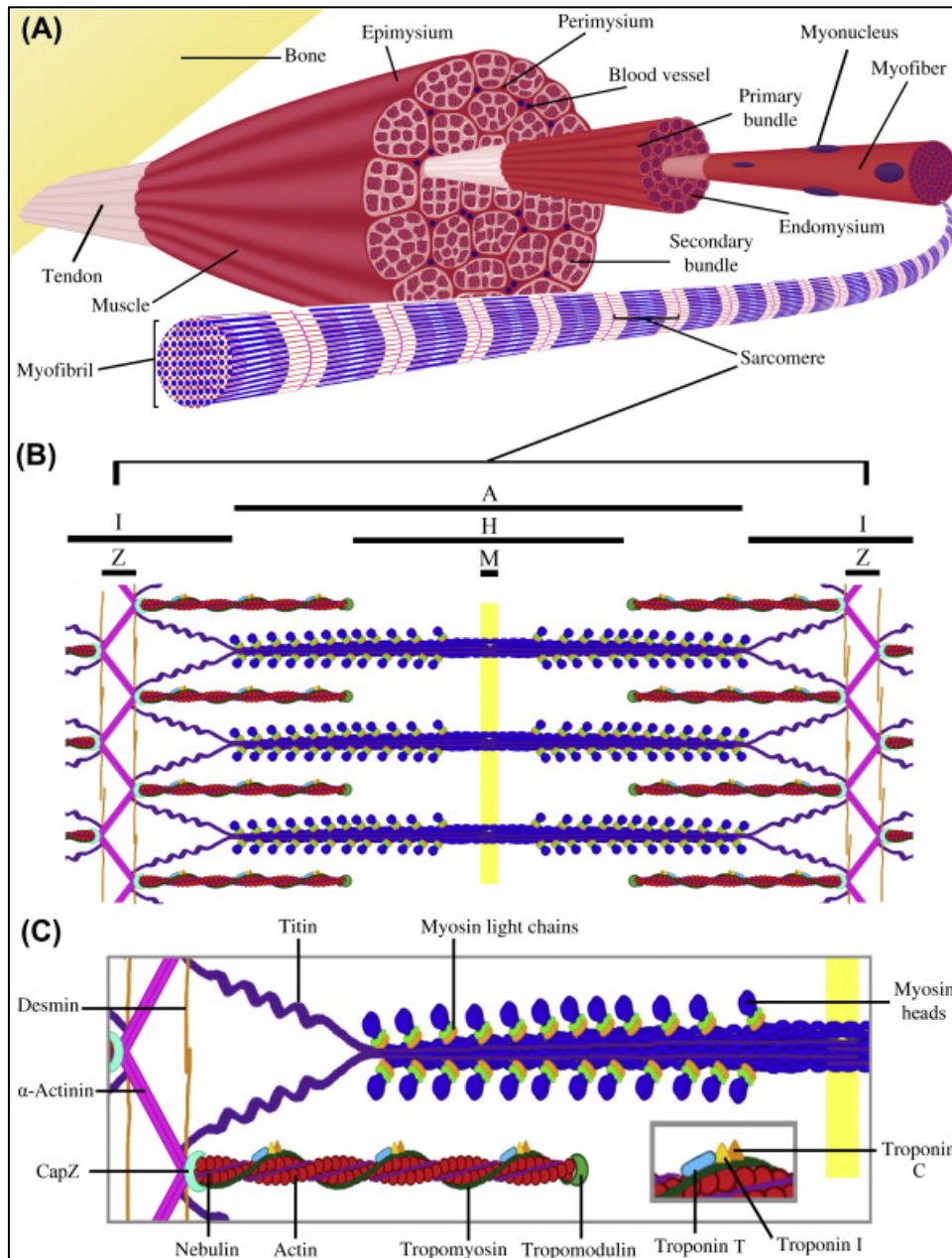


Figure 1 : Structure et organisation générale du muscle squelettique. Tirée de (12).

Structure transversale du muscle squelettique mettant en valeur la structure des fibres musculaires (A). Structure du sarcomère (B). Chevauchement de la myosine-actine avec les molécules associées (C).

2.1. La contraction musculaire, de la stimulation à la génération de force

Pour qu'une fibre musculaire squelettique se contracte, elle doit être stimulée par une terminaison nerveuse et propager le signal électrique ou potentiel d'action sur son sarcolemme. Ce phénomène électrique fait augmenter la concentration intracellulaire d'ions $[Ca^{2+}]_i$ provenant du réticulum sarcoplasmique. L'interaction entre l'actine et myosine devient ainsi possible pour la contraction musculaire. La séquence d'événements qui survient entre le signal électrique et la contraction est appelée couplage excitation-contraction (ECC). Plus précisément, les cellules musculaires sont stimulées par les neurones moteurs qui secrètent le neurotransmetteur acétylcholine (ACh), qui se lie à son récepteur sur le sarcolemme modifiant temporairement la perméabilité et engendrant une dépolarisation de la membrane due à l'ouverture des canaux à sodium (Na^+). Un potentiel d'action est ainsi propagé à mesure que la vague de dépolarisation locale s'étend aux autres régions du sarcolemme via le tubule T. Le potentiel d'action parvient aux triades formées d'un tubule T entouré de deux citernes terminales différentes du RS. Les récepteurs de la dihydropyridine (DHPR) sensibles au voltage localisé au niveau de la membrane des tubules T, changent ainsi leurs structures tridimensionnelles en réponse au potentiel d'action, déclenchent l'ouverture des récepteurs de la ryanodine (RYR) localisés à la membrane des citernes terminales du RS libérant ainsi de grandes quantités de Ca^{2+} dans le sarcoplasme. Une partie du Ca^{2+} libéré dans le sarcoplasme se lie ensuite à la troponine C (TnC) sur les myofilaments minces d'actine. Cela déclenche une série d'événements moléculaires qui déplacent la tropomyosine pour exposer le site actif. Avec les sites de liaison à la myosine exposée, chaque tête de myosine se lie à un site de liaison pour former un pont croisé avec la molécule d'actine. Pendant la formation du pont croisé, le phosphate inorganique (Pi) se détache, ce qui fait pivoter la tête de myosine engendrant une force motrice qui tire les myofilaments minces vers la ligne M du sarcomère. L'adénosine di-phosphate (ADP) se détache lors du pivotement de la tête de myosine. La force motrice fait glisser les myofilaments les uns sur les autres et le sarcomère se raccourcit. Une nouvelle molécule d'adénosine triphosphate (ATP) se lie à la tête de myosine, provoquant la libération de la myosine de la molécule d'actine et revient ainsi à sa position détendue. Chaque tête de myosine s'attache et se détache plusieurs fois dans les sarcomères de toutes les myofibrilles, d'où le raccourcissement de la cellule

musculaire. Le taux de Ca^{2+} cytoplasmique peut augmenter jusqu'à 20 μM , à partir d'une concentration au repos proche de 100 nM (17). Lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diminue et devient trop faible, la tropomyosine reprend sa forme et masque à nouveau les sites de liaison et la fibre musculaire se détend.

Le Ca^{2+} est initialement tamponné par la parvalbumine, une protéine cytoplasmique possédant une forte affinité pour le Ca^{2+} . Ce dernier est finalement éliminé du cytosol par l'action de la pompe « *sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase* » (SERCA), des mitochondries et des échangeurs sodium-calcium (NCX) qui se servent du gradient électrochimique du sodium pour exporter un ion calcium en échange de l'importation de trois ions sodium ce qui conduit à la relaxation musculaire (18). Par conséquent, la contraction et la relaxation sont des processus consommateurs d'énergie. Une contraction isotonique est ainsi engendrée lorsque la longueur du muscle change. Le raccourcissement d'un muscle est connu sous le nom de contraction concentrique. Les fibres musculaires peuvent également générer de la force lorsqu'elles s'allongent, ce type de contraction est appelé une contraction excentrique. Enfin, le muscle est également capable de se contracter sans changer sa longueur, ce que l'on appelle une contraction isométrique. Ce dernier processus est possible grâce à des composants élastiques en série avec les fibres musculaires contractiles.

2.2. Le phénotype des fibres musculaires

La génération de force dépend de la taille et de la composition en fibres du muscle squelettique. Le muscle squelettique est un tissu doté d'une grande flexibilité qui donne à l'organisme la possibilité d'utiliser le même muscle pour diverses tâches allant d'une activité continue à faible intensité aux mouvements rapides, rigoureux et de courte durée. Durant la première moitié du XIXe siècle, les muscles squelettiques étaient distingués en fonction de leurs couleurs rouge ou blanche et de leurs propriétés contractiles rapides ou lentes (19). Sur le plan phénotypique, les fibres lentes dites de type I sont très vascularisées et dotées d'une forte densité de mitochondries et de myoglobine, qui leur confèrent un aspect rouge. Ces fibres sont résistantes à la fatigue et possèdent une forte endurance en se basant principalement sur un métabolisme oxydatif comme source d'énergie. Les fibres de type I se trouvent plus abondamment chez les athlètes d'endurance. Par exemple, les marathoniens ont

une très grande proportion de fibres de type I dans les muscles des cuisses. De façon simpliste pour le moment, on pourrait dire que les fibres rapides dites de type II dépendent majoritairement d'un métabolisme glycolytique, possèdent moins de mitochondries et de myoglobine et ont tendance à être beaucoup plus grosses. En outre, comme leurs réserves de glycogène s'épuisent en peu de temps et qu'elles accumulent rapidement de l'acide lactique, ces cellules se fatiguent plus rapidement. Pour cette raison, une proportion plus élevée de fibres de type II peut être observée chez les athlètes d'élite de force et de puissance comme les sprinters et les haltérophiles. Sur le plan physiologique, la différence entre les muscles à contraction rapide et lente est basée sur des différences dans la cinétique calcique et le mécanisme ECC qui régulent les paramètres de base de la contraction. Les fibres rapides présentent des paramètres de contraction plus courts et une contraction rapide du sarcomère et une puissance mécanique plus élevée. Les fibres lentes se contractent beaucoup plus lentement, générant moins de puissance mécanique avec une moindre dépense énergétique.

En se basant sur des techniques histochimiques et moléculaires permettant plus précisément l'identification de la myosine ATPase (myosine adenosine triphosphate phosphohydrolase), des isoformes des chaînes lourdes de la myosine et des enzymes responsables du métabolisme énergétique du muscle, une nouvelle classification a mis la lumière sur l'existence de trois sous-types de fibres rapides chez les rongeurs et plusieurs espèces animales. Les fibres de type IIX/IIB basées sur un métabolisme glycolytique, fatigables et les fibres de type IIA qui ont un phénotype intermédiaire puisqu'elles possèdent à la fois un métabolisme oxydatif et glycolytique et elles sont par conséquent puissantes et résistantes à la fatigue (20) (**Figure 2**). Cependant, chez l'homme le type de fibre IIB n'est pas détectable, bien que le gène MYH4 correspondant soit présent dans le génome (21). Les muscles posturaux comme le soléaire (Sol), renferment une proportion élevée de fibres lentes de type I qui varient selon l'espèce étudiée, allant de 86-89% chez l'homme à 40-50% chez la souris (22), (23). Alors que le muscle extenseur des orteils (EDL), un muscle phasique, est presque exclusivement composé de fibres à contraction rapide avec une proportion de 52,7% de fibres rapides chez l'homme et 86% de type IIB, 7% de type IIX et 4% de type IIA chez la souris (23), (24).

Cette proportion est toutefois sujette au changement selon le bagage génétique de l'individu et les stimuli mécaniques et chimiques imposés au muscle. Ainsi, l'exercice physique, l'immobilisation, certaines maladies neuromusculaires ou des traitements chroniques aux glucocorticoïdes vont induire des changements de phénotype musculaire. Les fibres musculaires ont donc cette capacité de changer de phénotypes pour s'adapter aux différentes conditions. Par exemple, des diminutions de la charge mécanique due à l'immobilisation ou à l'alitement prolongé provoquent une atrophie significative de tous les types de fibres musculaires, en particulier des fibres de type I, accompagnée d'une conversion du type de fibres I vers des fibres de type II (20). Au contraire, il a été démontré que dans le cas des maladies neuromusculaires comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), les fibres de type II sont les premières fibres à dégénérer, alors que les fibres de type I sont affectées plus tardivement (25). D'autres exemples d'atrophie musculaire, tels que la cachexie cancéreuse, le vieillissement et les traitements aux glucocorticoïdes provoquent une atrophie sélective des fibres musculaires à contraction rapide de type II (en particulier IIx et IIb) avec un impact moindre ou absent sur les fibres de type I (20), (26),(27), (28), (29), (30).

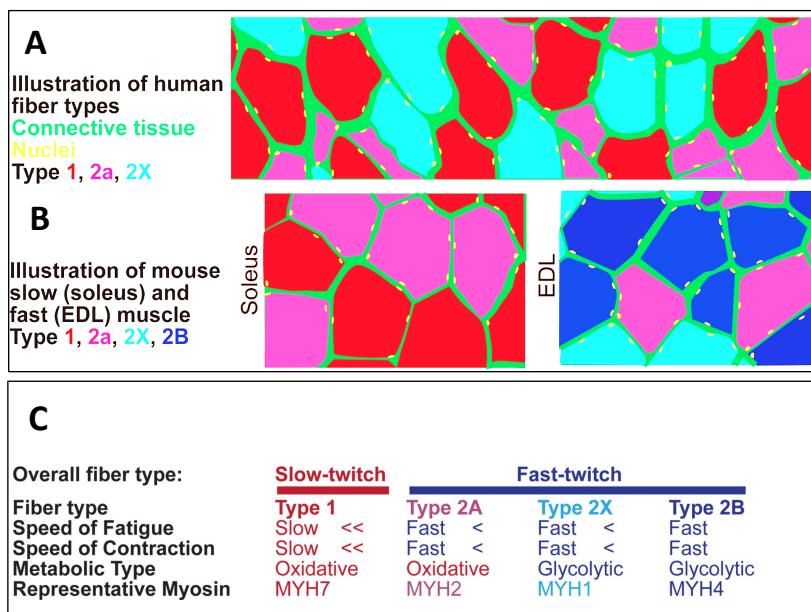


Figure 2: Les différents types de fibres musculaires squelettiques chez l'homme et la souris. Adaptée de (20).

Illustration d'une coupe transversale d'un muscle sain chez l'homme. Le tissu conjonctif (vert) interagit avec le complexe lié à la dystrophine via la lame basale. Les noyaux des fibres musculaires (jaune) se trouvent dans des positions périphériques. Différents types de fibres, y compris le type 1 (rouge), le type 2A (violet) et le type 2X (bleu clair), peuvent être retrouvés dans un seul muscle de mammifère (A). Illustration d'une coupe transversale du

muscle soleaire (Sol) à contraction lente et de l'extenseur des orteils (EDL) chez la souris. Un type de fibre rapide supplémentaire, 2B (bleu foncé) est retrouvé chez la souris (**B**). Propriétés clés des types de fibres, avec le code couleur mettant en évidence le passage progressif des fibres lentes aux fibres les plus rapides (**C**).

2.3. Atrophie et hypertrophie du muscle squelettique

Un équilibre dynamique entre le taux de synthèse et de dégradation des protéines contractiles maintient la santé de la fibre musculaire. Un déséquilibre entraîne des changements visibles dans la composition, l'apparence et les performances de la fibre musculaire. La croissance et l'hypertrophie musculaire surviennent au cours du développement ou en réponse à une surcharge mécanique ou à la suite d'une stimulation hormonale anabolique induite par exemple par la testostérone ou les β 2-agonistes. Cliniquement, l'hypertrophie est caractérisée à la fois par une augmentation du nombre de myofibrilles et de la taille de celles-ci. Les mécanismes et voies de signalisation régulant les processus anaboliques et cataboliques musculaires sont complexes. Ces voies intracellulaires sont contrôlées par un large éventail de facteurs extracellulaires, y compris les médiateurs inflammatoires, le stress oxydatif, les hormones circulantes, les facteurs nutritionnels et l'exercice physique (**Figure 3**). La voie de signalisation principale qui régule la masse musculaire et la synthèse des protéines est la voie de signalisation *insulin-like growth factor 1/protein kinase B/mammalian target of rapamycin* (IGF-1/Akt/mTOR) (31).

Lorsque l'équilibre synthèse/ dégradation s'oriente de plus en plus vers la dégradation des protéines en réponse à un stimulus, les muscles s'atrophient. L'atrophie musculaire survient suite à plusieurs conditions soit le vieillissement, la restriction alimentaire, le traitement chronique aux glucocorticoïdes et un certain nombre de maladies chroniques (32), (33). Ainsi, l'atrophie des muscles squelettiques se caractérise par une augmentation de la dégradation et une diminution de la synthèse protéique accompagnée d'une diminution du diamètre des fibres musculaires, de la production de force et de la résistance à la fatigue (34). La stimulation de la protéolyse lors de l'atrophie est provoquée en partie par l'activation de la voie ubiquitine-protéasome qui implique l'ajout d'ubiquitines à un substrat protéique qui engendre sa dégradation (35). Un certain nombre d'ubiquitines ligases spécifiques du muscle sont surexprimées dans les conditions d'atrophie musculaire, y compris atrogine-1 appelé

aussi *Muscle Atrophy F-box* (MAFbx) et *Muscle Ring Finger-1* (MuRF-1) (35), (36), (37). L'expression de ces deux régulateurs dans le muscle dépend de la translocation et de l'activité des facteurs de transcription *forkhead box* (FOXO) contrôlés positivement, entre autres, par la myostatine, une protéine appartenant à la famille du facteur transformant bêta (TGF β) et régulateur négatif de la croissance musculaire (38). En effet, la délétion de la myostatine chez la souris entraîne une augmentation accrue de la croissance musculaire (39). Le stress oxydatif et les cytokines pro-inflammatoires, y compris le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et l'interleukine 6 (IL-6) augmentent également l'expression des ligases MuRF-1 et atrogin-1 en passant par la voie p38MAPK et NF- κ B provoquant une atrophie musculaire (40), (10), (41). Les médiateurs en aval d'AKT sont également impliqués dans la diminution de l'expression des protéines impliquées dans l'atrophie musculaire en régulant négativement les facteurs de transcription FOXO (42). Dans certaines conditions pathologiques comme la DMD caractérisée aussi par une atrophie musculaire, certains muscles comme le *gastrocnemius* sont au contraire hypertrophiés. Bien que l'hypertrophie soit souvent associée au dépôt de graisse et de tissu conjonctif, ce qu'on appelle pseudohypertrophie, des études d'imagerie ont montrés une véritable hypertrophie chez certains individus (43). Dans ces conditions l'hypertrophie peut être bénéfiques sur la force absolue mais également néfastes en exacerbant les contractures et l'instabilité posturale.

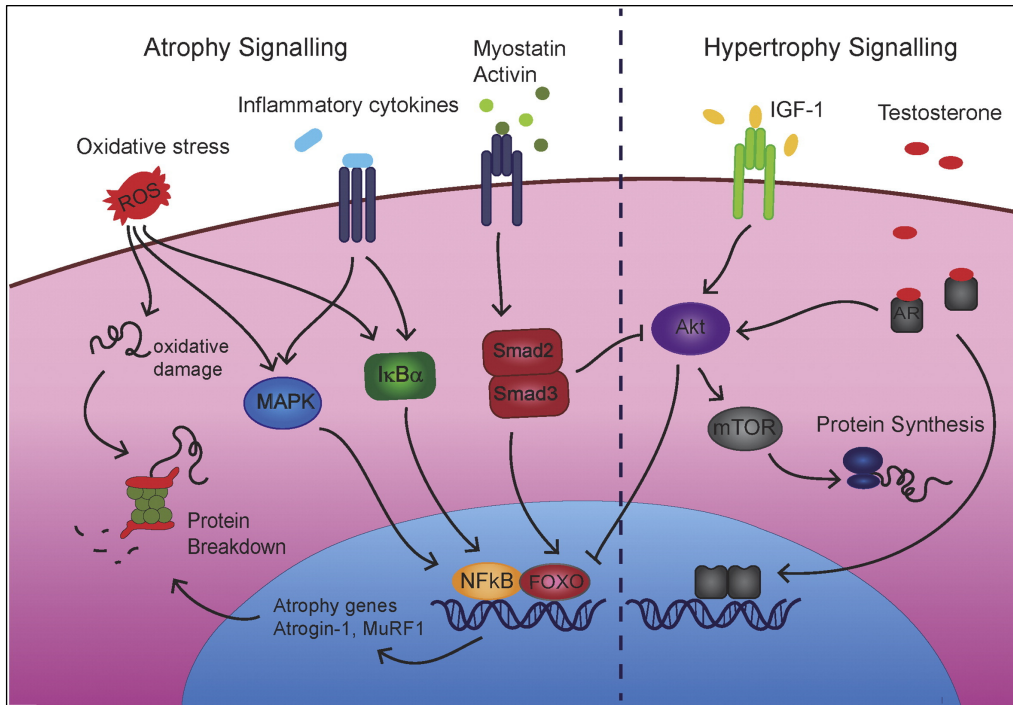


Figure 3: Vue d'ensemble des voies de signalisation régulant l'atrophie et l'hypertrophie du muscle squelettique. Tirée de (38)

Les mécanismes et les voies de signalisation régulant les processus anaboliques et cataboliques musculaires sont complexes. L'atrophie musculaire est en grande partie due à une dégradation des protéines musculaires via le système ubiquitine-protéasome. Ce processus est régulé par les médiateurs inflammatoires (MAPK, NFκB...), le stress oxydatif et les hormones circulantes comme la myostatine. La voie principale menant à la croissance musculaire (hypertrophie) passe par la voie IGF-1/Akt/mTOR qui peut être régulée par les hormones anaboliques comme la testostérone, favorisant la synthèse protéique.

3. Le muscle squelettique dans un contexte pathologique

3.1. La dystrophie musculaire de Duchenne

Les dystrophies musculaires représentent un groupe hétérogène de maladies neuromusculaires dégénératives qui entraînent une faiblesse progressive et une dégénérescence des muscles squelettiques. La DMD est la forme la plus courante et la plus grave des dystrophies musculaires affectant jusqu'à 1 sur 3 500 à 5 000 garçons nouveau nés dans le monde (44). Les garçons atteints de DMD ont souvent une pseudohypertrophie musculaire des muscles du mollet, mais la caractéristique principale est la faiblesse

musculaire des jambes qui touche progressivement les membres supérieurs et les muscles du tronc. Au fur et à mesure que la maladie progresse, les garçons développent des signes de Gower qui consistent à utiliser les bras pour soutenir les jambes pour se mettre debout à partir d'une position assise afin de surmonter la faiblesse de la ceinture pelvienne et des muscles paravertébraux (45). Des signes et des symptômes deviennent apparents et un diagnostic est établi vers 4 à 5 ans suivis d'une perte de la marche indépendante vers l'âge de 12 ans (46). Environ 3 à 4 ans après avoir perdu l'ambulation, 90% des garçons développent une scoliose causée par une faiblesse des muscles soutenant la colonne vertébrale, supérieure à 20 degrés nécessitant une intervention chirurgicale. La DMD est associée à des troubles neuro-développementaux comme en témoignent les anomalies cognitives et comportementales observées chez les patients. En effet, l'absence de dystrophine modifie la morphologie de la jonction neuromusculaire et des neurones chez le modèle murin de DMD (47). Les patients souffrent également de cardiomyopathie et d'ostéoporose (48), (49). Le décès survient suite à des complications respiratoires et cardiaques au début de la trentaine (2).

La DMD est causée par des mutations du gène DMD situé sur le chromosome X qui conduisent à une perte ou une expression tronquée et non fonctionnelle de la dystrophine dans les myofibrilles. Le gène de la dystrophine est le plus gros gène connu chez l'homme s'étendant sur plus de 2,4 millions de paires de bases. Ce qui correspond à environ 0,1% du génome humain total (50). La grande taille de ce gène contribue de manière significative à une susceptibilité accrue aux mutations spontanées. La dystrophine est une grosse protéine (427 kDa) localisée à la surface interne du sarcolemme, avec une abondance élevée aux costamères et aux jonctions myotendineuses, deux sites importants de la transmission de la force vers la MEC. Le gène DMD contient au moins sept promoteurs indépendants spécifiques du tissu et deux sites d'addition de signal poly-A, produisant plusieurs isoformes qui sont nommées en fonction de leur longueur et leurs modèles d'épissage. Ainsi, on retrouve les isoformes tissu-spécifique de la dystrophine, y compris la Dp427 pleine longueur dans les muscles squelettiques et cardiaques, Dp260 dans la rétine, Dp140 dans le cerveau et les reins, Dp116 dans les nerfs périphériques et la Dp71 qui est ubiquitaire (51). Les troubles cognitifs associés à la DMD sont en corrélation avec la perte des isoformes de la dystrophine

exprimées dans le système nerveux central, suggérant ainsi un rôle fonctionnel de ces isoformes sur les cellules nerveuses (52) .

Sur le plan structural, la dystrophine comprend quatre régions essentielles qui s'étendent de l'extrémité N-terminale affichant une activité de liaison à l'actine, à travers une très longue région centrale enroulée en spirale de 24 répétitions de type spectrine, vers un domaine riche en cystéine et un domaine enroulé en spirale C-terminal (53). Cette protéine relie le cytosquelette des fibres musculaires à la MEC via ses domaines amino-terminal et carboxy-terminal, respectivement, agissant comme un important stabilisateur et amortisseur de choc pour les fibres musculaires durant la contraction (54). En plus de sa fonction mécanique, le complexe dystrophine-glycoprotéines a également un rôle dans la communication cellulaire en agissant comme un complexe de signalisation transmembranaire (15), (55). Par exemple, la région centrale de la dystrophine ainsi que la protéine α -syntrophine interagissent avec l'oxyde nitrique synthase neuronal (nNOS), qui à son tour régule la vasodilatation pendant l'exercice pour augmenter le flux sanguin afin de fournir suffisamment d'oxygène et de nutriments aux cellules musculaires (56) (**Figure 4**).

L'absence de la dystrophine déstabilise le complexe glycoprotéique auquel elle est liée (57). L'architecture musculaire est ainsi modifiée engendrant une dégénérescence progressive des cellules touchant particulièrement les fibres glycolytiques rapides (type IIb), une perméabilité accrue aux macromolécules, une augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire, des dommages oxydatifs, une inflammation et ultimement une fibrose musculaire (25),(46),(58),(59). De plus, la perte complète de dystrophine dissocie le nNOS du sarcolemme, provoquant une ischémie fonctionnelle et une fatigue induite par l'exercice chez les patients atteints de la DMD (60), (61).

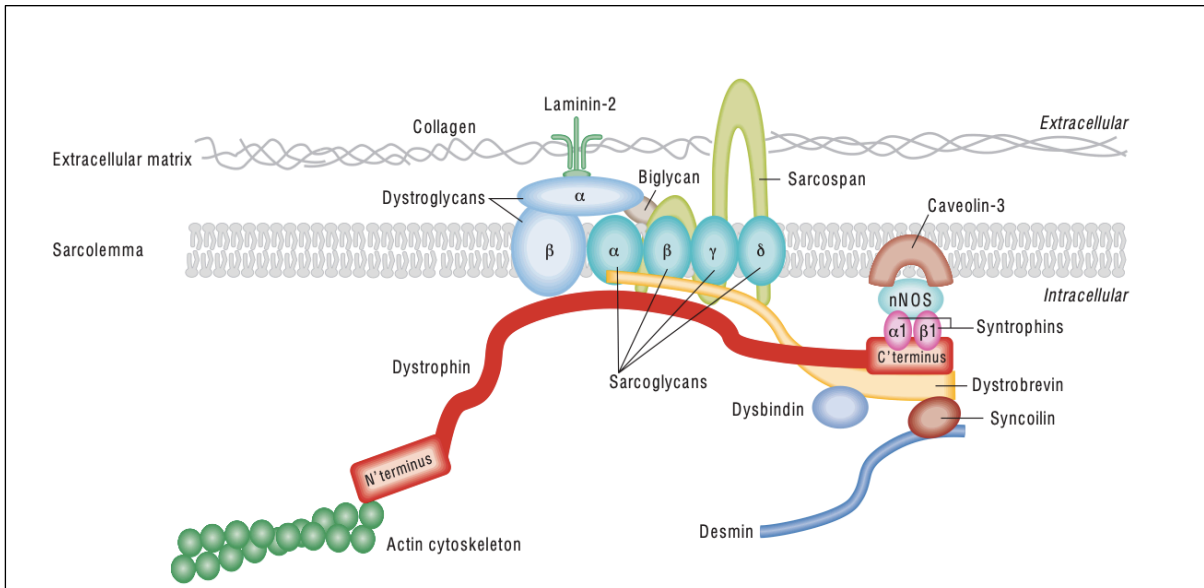


Figure 4: La dystrophine et le complexe des glycoprotéines associées à la dystrophine (DGC) reliant le cytosquelette interne à la matrice externe. Tirée de (59)

Les protéines associées à la dystrophine peuvent être divisées en trois groupes en fonction de leur localisation cellulaire : extracellulaire (α -dystroglycane) ; transmembranaire (β -dystroglycane, sarcoglycane, sarcospan); cytoplasmique (dystrophine, dystrobrevine, syntrophines, monoxyde d'azote synthase neuronal).

3.2.Caractéristiques moléculaires et cellulaires du DMD

3.2.1. Perméabilité aux macromolécules

La perturbation de la connexion cytosquelette-membrane-matrice rend la membrane musculaire fragile. Les micro-lésions membranaires provoquent une série de réponses cellulaires modifiant la perméabilité membranaire et l'activité de canaux ioniques perturbant ainsi l'homéostasie. La présence de concentrations élevées d'enzymes musculaires dans le sérum des patients a souvent été interprétée comme un indice de fragilité membranaire des muscles dystrophiques. La perturbation du sarcolemme provoque une fuite de protéines musculaires telles que l'isoforme musculaire de la créatine kinase (mCK) ou le lactate déshydrogénase (LDH) qui sont exprimés à l'intérieur des fibres musculaires squelettiques. Pour les individus sains, le niveau de ces enzymes peut être augmenté dans le sang après des séances d'exercices intenses en particulier lorsque ces exercices incluent des contractions

excentriques (62). Plusieurs myopathies héréditaires, y compris de nombreuses formes de dystrophie musculaire, sont également cliniquement caractérisées par des taux sériques élevés de CK, qui peuvent atteindre des valeurs 100-200 fois supérieures au niveau de base des individus sains (63), (45). De plus l'absorption de grandes protéines considérées comme biomarqueurs de lésions musculaires telles que l'albumine et des colorants vitaux comme le Procion orange et le bleu d'Evans dans les fibres musculaires non nécrotiques indique que les perturbations de la membrane sont suffisamment importantes pour permettre le passage transmembranaire de macromolécules (64), (65). De plus, l'absence de la dystrophine et la perturbation du DGC altèrent l'intégrité de la membrane musculaire et entraînent une augmentation de l'afflux d'ions tels que le Ca^{2+} et le Na^+ dans le muscle à travers le sarcolemme. La perturbation de l'homéostasie du calcium est considérée parmi les éléments primaires qui causent des dommages musculaires. Ainsi, il a été démontré que les muscles dystrophiques avaient une concentration intracellulaire de calcium $[\text{Ca}^{2+}]_i$ élevée au repos et une activité des canaux calciques augmentée et ce, avant même l'apparition des dommages musculaires (66). La perturbation de l'homéostasie calcique a souvent été attribuée, soit à une réduction du calcium emmagasinée dans le RS conséquent à une fuite du calcium des canaux RyR (45), (67) ou un défaut dans le mécanisme de recapture du calcium par les pompes ATP-asiqes SERCA dans les muscles dystrophiques (68), (69). De ce fait, il a été démontré que la surexpression de SERCA-1a chez des souris dystrophiques diminuait la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et restaurait l'intégrité musculaire (70). L'augmentation de la concentration du calcium pourrait aussi provenir de l'extérieur de la cellule à travers des canaux « *store-operated calcium entry* » (SOCE) et *transient receptor potential-canonical* (TRPC) qui accusent une activité augmentée dans les muscles dystrophiques (71), (72). La conséquence pathologique de l'augmentation des niveaux cytosoliques de calcium au-delà du seuil physiologique est l'activation des protéases dépendantes du calcium telles que les protéases à cystéine dépendantes du calcium (calpaïnes) et la surcharge calcique des mitochondries entraînant ainsi une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et une libération de facteurs pro-apoptiques et une peroxydation des lipides membranaires (73), (74). Il est important de noter que l'activation des calpaïnes par influx extracellulaire de Ca^{2+} conduit au clivage de la protéine transmembranaire dysferline, un médiateur crucial dans le processus de réparation des membranes intrinsèques cellulaires (75). Une augmentation pathologique

du Ca^{2+} cytosolique contribue également aux dommages membranaires via l'activation de la phospholipase A2 (76). L'absence de dystrophine modifie également le niveau d'expression, la distribution et les propriétés de l'isoforme musculaire des canaux Na^+ , Nav 1.4. Cela conduit à l'augmentation de la concentration de Na^+ sous le sarcolemme des cellules musculaires, ce qui est corrélée avec une augmentation de la mort cellulaire des fibres musculaires chez la souris *mdx* (77). De plus, une augmentation du Na^+ intracellulaire conduit, en partie, à l'œdème cellulaire (78). Ainsi, les thérapies capables de minimiser les dommages musculaires et le maintien de l'homéostasie intracellulaire du Ca^{2+} en empêchant l'afflux délétère des macromolécules sont cruciales pour le maintien de l'intégrité du muscle dystrophique.

3.2.2. Inflammation chronique, fibrose et nécrose cellulaire

Le processus nécrotique dans la DMD déclenche une réponse inflammatoire caractérisée par une infiltration leucocytaire chronique. En effet, chez les patients et les souris dystrophique, la formation de lésions musculaires est associée à une infiltration de cellules immunitaires qui est nettement différente des réponses inflammatoires spécifiques aux blessures musculaires aiguës. La réponse inflammatoire complexe comprend une réponse immunitaire cellulaire dans laquelle les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) favorisent l'apoptose musculaire par la libération de perforine dans le muscle dystrophique. Une réponse innée est également impliquée, dans laquelle les dommages musculaires sont causés en partie par l'invasion des neutrophiles et des mastocytes, ainsi qu'une augmentation de la cytolyse et la fibrose musculaire médiée par la libération de certaines protéines par les cellules éosinophiles (79). Par exemple, la déplétion des macrophages, des mastocytes, des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), des lymphocytes T auxiliaires (cellules Th) ou des neutrophiles chez des souris *mdx* réduit de manière significative l'étendue de la nécrose musculaire (80), (81), (82). Les neutrophiles envahissent rapidement le tissu endommagé et sécrètent l'enzyme myéloperoxydase (MPO) qui oxyde le chlorure en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour former le puissant oxydant antibactérien acide hypochloreux (HOCl). Les neutrophiles produisent également plusieurs cytokines pro-inflammatoires favorisant le recrutement des monocytes qui s'infiltrent dans le tissu pour une régénération

optimale (82). Bien qu'il y ait peu de mastocytes dans le muscle de souris non dystrophique, ils s'accumulent dans le tissu environ 8 h après la lésion, puis persistent dans le tissu endommagé (83). Les monocytes activés se différencient en macrophages qui, à leur tour, induisent la lyse des fibres musculaires endommagées (84). Les macrophages et les neutrophiles, bien qu'essentiels pour la régénération tissulaire dans le cas de blessures musculaires aiguës et stériles, sont souvent associées à des dommages collatéraux de tissus sains dans le cas du DMD. En effet, les macrophages pro-inflammatoires qui demeurent normalement actifs quelques jours à la suite d'une blessure aiguë sont présents de façon chronique dans les muscles dystrophiques. Ce qui limite leur changement de phénotype de pro-inflammatoire (M1) vers un profil anti-inflammatoire (M2), qui est l'acteur de la réparation musculaire (85), (86) (**Figure 5**).

Les muscles squelettiques dystrophiques présentent un état inflammatoire persistant avec une présence accrue de cellules inflammatoires mais également des taux élevés de diverses cytokines pro-inflammatoires. Les mastocytes résidents représentent une des sources majeures de trypases, IL-6 et TNF α cytokines pro-inflammatoires exprimées par une large gamme de cellules inflammatoires. Les niveaux de TNF- α sont augmentés dans les muscles des souris dystrophiques et des patients atteints de la DMD et son blocage systémique protège contre les dommages induits par les contractions excentriques chez les souris *mdx* (87), (88). Parmi ses effets pléiotropes, le TNF- α contribue à l'activation NF- κ B, une source majeure de l'inflammation chronique et la fibrose musculaire chez les patients et les souris dystrophiques. Le NF- κ B est impliqué à la fois dans les processus physiologiques (différenciation, croissance et métabolisme) et physiopathologiques (cachexie, atrophie et dystrophie) (89), (90),(91). Ce facteur est principalement retenu dans le cytoplasme par la liaison de ses différentes sous-unités à la protéine inhibitrice I κ B. L'activation de NF- κ B est étroitement régulée par le complexe I κ B kinase (IKK) composé de sous-unités catalytiques, IKK α et IKK β , et d'une sous-unité de régulation, IKK γ /NEMO qui engendrent la phosphorylation et l'ubiquitination de I κ B (91). En plus du mécanisme d'activation classique par dégradation de I κ B, des modifications post-traductionnelles des sous-unités p65 et p50 par phosphorylation, acétylation et ubiquitination contribuent également à l'activation de NF- κ B (92). La délétion spécifique de l'IKK β chez les souris *mdx* ou la délétion d'un allèle de la sous-unité p65 de NF- κ B augmente la régénération du muscle squelettique en limitant

la réponse inflammatoire et la fibrose (93), (94). De plus, les cellules inflammatoires qui infiltrent et persistent au site de nécrose de façon chronique sont source de facteurs de croissance tels que le TGF- β . En effet, dans les muscles de souris dystrophiques *mdx*, les macrophages sécrètent le TGF- β qui agit sur les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAP) qui augmentent ensuite la production de protéines de la matrice extracellulaire qui conduit à l'apparition éventuelle d'une fibrose (95), (96). De plus, l'augmentation progressive de la fibrose causée par des épisodes répétés de myonécrose et d'inflammation altère la myogenèse et la régénération des muscles dystrophiques, entraînant une perte sévère de tissus musculaires. Ainsi, les cellules inflammatoires, les différentes cytokines et les voies signalétique telles que le NF- κ B jouent un rôle important dans le processus de dégénérescence des muscles dystrophiques.

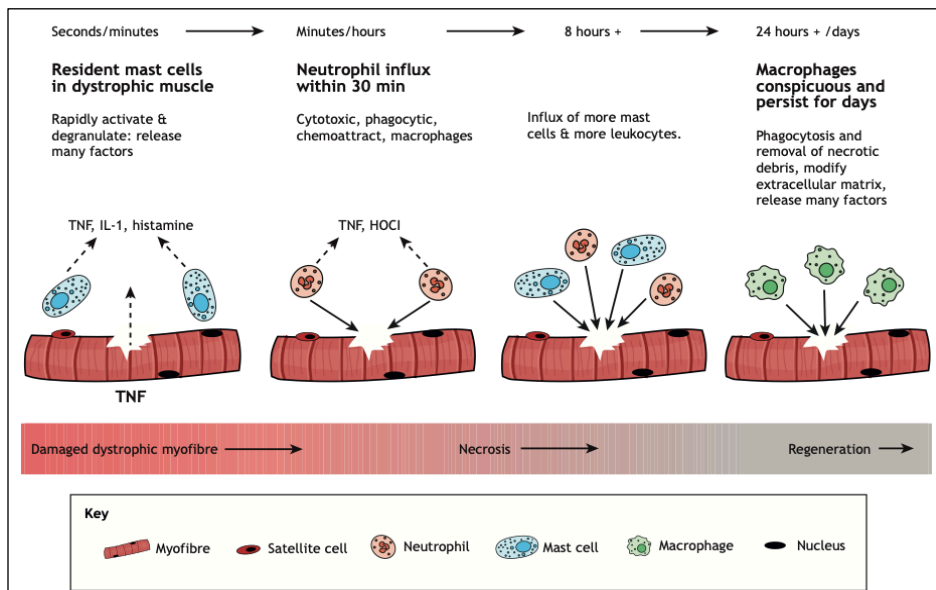


Figure 5: Séquence de la réponse inflammatoire précoce aux lésions des muscles squelettiques dystrophiques. Tirée de (83).

Les mastocytes résidents (élevés dans les muscles dystrophiques) secrètent des facteurs préformés et accumulés dans leurs granules comme le TNF- α , l'histamine, la tryptase et d'autres médiateurs pro-inflammatoires qui vont favoriser l'infiltration des neutrophiles sanguins. Les neutrophiles envahissent rapidement le tissu musculaire endommagé, où ils phagocytent les agents pathogènes et les débris cellulaires. Ils libèrent également des enzymes et des facteurs oxydants afin d'optimiser leur capacité de clairance du tissu lésé et promeuvent le recrutement des monocytes sanguins. Finalement, les monocytes se différencient en macrophages pro-inflammatoires qui demeurent normalement actifs quelques jours à la suite d'une blessure aiguë, sont présents de façon chronique dans les muscles dystrophiques. Cela limite leur changement de phénotype vers un profil anti-inflammatoire qui est l'acteur de la réparation musculaire.

3.2.3. La régénération musculaire

Un signe secondaire de la nécrose cellulaire est la régénération active des muscles pour remplacer ou réparer les fibres endommagées. Les différents facteurs sécrétés lors de la réparation musculaire et les différents macrophages jouent un rôle central dans la régulation de la régénération musculaire. En effet, pendant la régénération, les signaux paracrines entre les fibres nécrotiques, les macrophages infiltrants, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les FAP modulent l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites (97). Durant les premiers stades de l'inflammation, les cellules satellites quiescentes expriment le facteur de transcription spécifique Pax-7 (*Paired box-7*), se prolifèrent et s'activent par la suite en exprimant à la fois Pax-7, le facteur de transcription MyoD et/ou le facteur myogénique Myf5. Après la phase de prolifération, les myoblastes sortent du cycle cellulaire et se différencient en myocytes matures. Ce processus de différenciation s'accompagne d'une diminution de l'expression de Pax7 et de Myf5, et d'une augmentation des taux de myogénine MyoG et du facteur de régulation myogénique MRF4. Ces événements surviennent en parallèle avec le changement de phénotype des macrophages de M0 au pro-inflammatoire (M1) qui, à leur tour, expriment des taux élevés de TNF α , IFN γ et iNOS (98). Au fur et à mesure que la myogenèse progresse, certaines cellules satellites activées reviennent à la quiescence et renouvellent la population de réserve de cellules satellites, tandis que d'autres quittent le cycle cellulaire pour subir une différenciation supplémentaire. Ces myocytes post-mitotiques présentent un changement d'expression génique, fusionnent et forment des myotubes multinucléés capables de subir une différenciation terminale. La régénération musculaire survient en parallèle avec le changement de phénotype de macrophages pro-inflammatoire (M1) vers un profil anti-inflammatoire (M2) qui expriment l'IL-10, l'IL-4, l'arginase 1 (Arg1) et le TGF β . Au fur et à mesure que la régénération et la croissance musculaires progressent pour restaurer l'homéostasie normale, la réponse inflammatoire est lentement résolue (**Figure 6**) (16), (99), (98).

En raison d'une régénérescence récurrente dans le contexte de DMD, la population de cellules satellites s'épuise et les fibres musculaires sont progressivement remplacées par du

tissu conjonctif adipeux et fibreux, donnant lieu à l'apparition clinique d'une pseudo-hypertrophie suivie d'une atrophie (100), (101) . En effet, les cultures primaires de myoblastes des muscles dystrophiques montrent un potentiel de prolifération *in vitro* beaucoup plus faible que les myoblastes sains. De plus, il a été démontré que les cellules satellites dystrophiques possèdent des télomères, répétitions d'ADN qui protègent contre l'instabilité génomique, beaucoup plus courts, ce qui pourrait être responsable de la diminution de leur capacité régénératrice (102), (103). Cependant, le nombre de cellules satellites reste égal ou supérieur dans les muscles dystrophiques par rapport aux muscles sains de même âge même aux stades avancés de la dystrophie, ce qui suggère que l'épuisement des cellules satellites n'est pas la principale cause du défaut de la régénération (104). Les cellules satellites conservent donc leur capacité de régénération, de prolifération et l'expression des marqueurs de différenciation et enfin la formation de nouvelles myofibres. Néanmoins, il a été démontré que ce processus de régénération et de maturation des myofibres est incomplet et n'empêche pas la dégénérescence musculaire subséquente dans les muscles dystrophiques (105). Dans un autre ordre d'idées, il a été démontré que la dystrophine est fortement exprimée dans les cellules satellites et joue un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité cellulaire régulant la génération de progéniteurs myogéniques. Dans la DMD, la perte de polarité dans les cellules satellites déficientes en dystrophine se traduit par une incapacité à établir la polarité cellulaire, l'abrogation des divisions asymétriques des cellules souches satellites et l'incapacité à entrer dans le programme myogénique conduisent à une régénération altérée. Par conséquent, les muscles dystrophiques montrent une hyperplasie des cellules satellites et une réduction des progéniteurs conduisant à un problème de la réparation (106). La régénération subséquente provoque l'apparition des fibres de différentes tailles, de grandes fibres hypertrophiques, des fibres centro-nucléées ainsi que des grappes de petites myofibres en régénération (98). La combinaison de la fibrose progressive et de la perte de fibres musculaires entraînent une atrophie et une faiblesse musculaire. L'amélioration de ces changements pathologiques représente une stratégie thérapeutique importante pour améliorer la fonction musculaire dans la DMD.

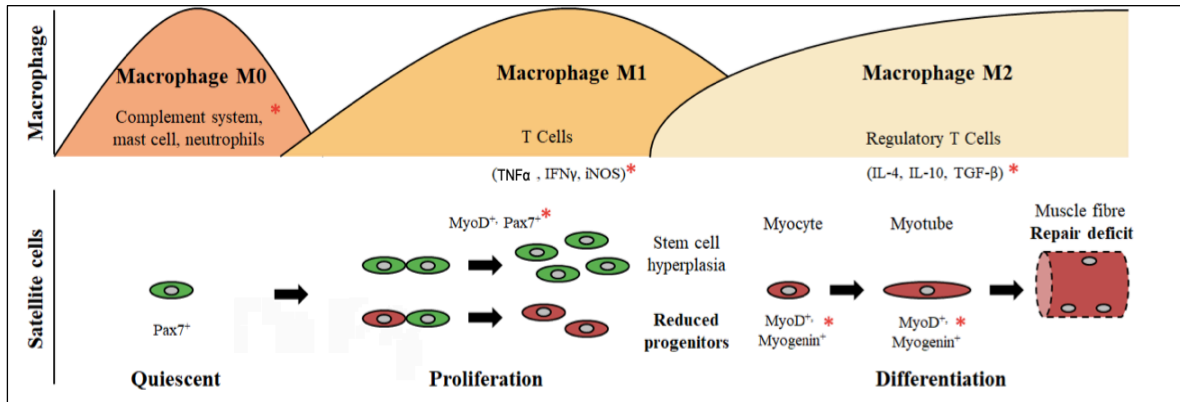


Figure 6: Nécrose du muscle squelettique dystrophique et événements cellulaires associés à la régénération subséquente. Adaptée de (98)

Le recrutement de diverses cellules immunitaires régule l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites. Au cours des premiers stades de l'inflammation, les cellules satellites Pax7⁺ sont activées, prolifèrent et expriment le facteur MyoD. Ces événements coïncident avec l'activation des macrophages du phénotype M0 au phénotype M1, lorsqu'ils expriment des niveaux élevés de TNF α , IFN γ et iNOS. Au fur et à mesure que la myogenèse progresse, certaines cellules satellites activées reviennent au repos et renouvellent la population de réserve, tandis que d'autres quittent le cycle cellulaire pour subir une différenciation supplémentaire. La progression des cellules musculaires vers les premiers stades de régénération coïncide avec un passage des macrophages à un phénotype M2 qui exprime l'IL-10, l'IL-4 et le TGF β . Au fur et à mesure que la régénération et la croissance musculaires rétablissent l'homéostasie normale, la réponse inflammatoire est lentement résolue dans les cas physiologiques mais elle est altérée dans le cas de DMD.

3.3. Les modèles murins les plus utilisés pour mimer la pathologie de DMD

Une panoplie d'approches différentes sont adoptées pour le développement de thérapies ciblées pour la DMD dans l'unique but de prévenir la progression ou d'alléger les conséquences néfastes de la maladie. L'utilisation de modèles animaux est essentielle pour comprendre l'efficacité de différentes thérapies potentielles pour la DMD. Afin d'investiguer les effets de différentes approches thérapeutiques et de comprendre la physiopathologie de la DMD, plus de 60 modèles incluant les modèles de rongeurs, canins et porcins ont été développés (107). La souris déficiente en dystrophine (*mdx*) représente le modèle du DMD le plus utilisé en recherche. La souris a une mutation ponctuelle sur l'exon 23 du gène DMD introduisant un codon d'arrêt prématuré dans le cadre de lecture, ce qui conduit à l'absence complète de la dystrophine (108). Ce modèle développe des nécroses et des faiblesses musculaires à partir de la troisième semaine de vie (109). Une nécrose étendue des fibres

musculaires en régénération avec des noyaux centraux et des niveaux élevés de CK en circulation sont atteints à environ 4 à 6 semaines puis diminuent de manière significative et se stabilisent de 8 à 12 semaines (110). Les souris *mdx* adultes développent une hypertrophie musculaire compensatoire constituée de tissu non contractile, conjonctif et fibreux tandis que les fibres endommagées ou les fibres en régénération développent moins de force et de puissance par unité de surface. La production de force absolue est ainsi équivalente aux souris sauvages, cependant, la force spécifique normalisée reste considérablement réduite (111). Les muscles des souris *mdx* présentent une sensibilité accrue aux dommages causés par les contractions excentriques en particulier les muscles à contraction rapide (112), (113). Les cycles de dégénérescence et régénération successifs dans les muscles dystrophiques impliquent un nombre élevé de noyaux centraux dans les myofibres, indice de régénération musculaire, une hétérogénéité de la taille des myofibres et un grand nombre de myofibres atrophiées (114), (115).

Bien que, sur le plan biochimique les souris *mdx* sont un bon modèle mimant la pathologie de DMD, l'espérance de vie de ces souris reste légèrement raccourcie comparées aux souris sauvages. De plus, les patients atteints de la DMD développent une fibrose sévère qu'on ne retrouve pas chez les souris *mdx* qui présentent des cycles de dégénérescence et régénération, à l'exception du diaphragme qui perd progressivement sa capacité à produire une force (107), (116). Les souris *mdx* arrivent à compenser l'absence de la dystrophine grâce à de multiples mécanismes compensatoires, y compris le non-épuiement des cellules satellites et des télomères, une régulation positive d'autres protéines structurelles ou une surexpression de son homologue autosomique « utrophine » (117), (118). Un effet compensatoire similaire est également retrouvé chez les patients dystrophiques qui possèdent un niveau plus élevé d'utrophine dans leurs tissus musculaires (119). L'utrophine et la dystrophine ont des similitudes de structure et de partenaires de liaison impliquant une certaine redondance fonctionnelle entre les deux protéines (46). L'utrophine est localisée au sarcolemme des myofibres en développement ou en régénération. Elle est cependant remplacée par la dystrophine dans les myofibres matures et reste concentrée aux jonctions neuromusculaires, aux costamères et aux jonctions myotendineuses (120). Cependant, l'utrophine peut rester présente sur le sarcolemme des fibres musculaires des souris *mdx* et

ce indépendamment de l'activité régénératrice du tissu musculaire (121). Un exemple concret sur l'importance de l'expression de l'utrophine comme protéine structurale compensatoire, est que l'on retrouve une atteinte des muscles extraoculaires des souris ayant une double déficience de dystrophine et d'utrophine alors que ceux-ci sont préservés chez la souris *mdx* (122). Les souris *mdx* exprimant un transgène tronqué de l'utrophine montrent une amélioration du phénotype dystrophique (123), (124). Le modèle de souris déficiente en dystrophine et utrophine *mdx/utrn^{-/-}* présente donc un phénotype plus sévère que les souris *mdx*. Cependant, les souris de ce modèle sont sévèrement atteintes et meurent entre 6 à 20 semaines, rendant impossibles les études sur les effets à long terme de composés potentiellement thérapeutiques (125). Cependant, ce modèle de souris est largement utilisé dans les études basées sur la thérapie génique, où le phénotype peut être renversé par l'expression musculaire spécifique de l'utrophine, de la mini-utrophine ou de la mini ou micro-dystrophine (126), (127). Les souris déficientes en dystrophine et haplo-insuffisantes en utrophine *mdx/utrn^{+/-}* présentent donc un phénotype intermédiaire avec une durée de vie de deux ans et une pathologie musculaire un peu plus sévère que les souris *mdx* (128). Des études réalisées au sein de notre laboratoire ont démontrées que les souris *mdx/utrn^{+/-}* ne se distinguent pas des souris *mdx* en ce qui concerne la taille, la pathologie musculaire sur le plan histologique, morphologique, fonctionnelle et contractile (129). Cependant, plusieurs études ont montré que l'inflammation et la fibrose des muscles squelettiques sont plus prononcées chez les souris *mdx/utrn^{+/-}* (130), (131). Par exemple, il a été démontré que le diaphragme et les muscles quadriceps des souris *mdx/utrn^{+/-}* développent une inflammation plus sévère et une fibrose précoce dès l'âge de 3 et 6 mois (132). La souris dystrophique *mdx/utrn^{+/-}* apparaît donc comme un modèle potentiellement intéressant pour l'étude de l'efficacité à long terme de traitements anti-fibrotiques et anti-inflammatoires chroniques.

4. La dysfonction synchrone os-muscle dans la DMD

4.1. Le remodelage et la régulation de la densité osseuse

4.1.1. La physiologie osseuse

Les os constituent une structure rigide qui a, entre autres, pour fonction de protéger et de soutenir les organes vitaux internes. Ils constituent également un point d'ancrage essentiel pour les tendons et les muscles permettant la locomotion. Les os ont également une fonction métabolique essentielle servant de réservoir de minéraux, dont les plus importants sont le calcium et le phosphate nécessaires au maintien de l'homéostasie. Le tissu osseux se maintient grâce à la communication entre des cellules d'origines diverses telles que les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes. Les ostéoclastes, seules cellules capables de résorber l'os, sont des cellules géantes multinucléées dérivées de cellules souches hématopoïétiques et issues de la différenciation des précurseurs des monocytes et des macrophages, tandis que les ostéoblastes et les ostéocytes proviennent de cellules souches mésenchymateuses. Le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF), et le RANKL sécrétée par les ostéoblastes et les cellules stromales sont des facteurs nécessaires pour induire l'expression de gènes impliqués dans la maturation des ostéoclastes, y compris ceux codant pour la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP), la cathepsine K (CATK), conduisant au développement d'ostéoclastes matures. D'autre part, un autre facteur appelé OPG, qui est produit par un large éventail de cellules, y compris les ostéoblastes, permet d'inhiber l'ostéoclastogénèse. Les ostéoblastes, quant à elles, représentent 4 à 6% du nombre total des cellules résidentes dans l'os et jouent un rôle important dans la formation et le maintien de la densité osseuse grâce, en majeure partie, à la communication étroite avec les autres cellules osseuses (133). Les ostéocytes sont les cellules osseuses les plus abondantes, représentant jusqu'à 90 à 95% du nombre total, impliqués dans la traduction des stimuli mécaniques en signaux biochimiques. Compte tenu de la masse totale des ostéocytes et de leurs processus de transduction des stimuli mécaniques, ces cellules sont probablement à l'origine de la majorité des facteurs libérés dans la circulation du système osseux adulte.

A l'âge adulte, le tissu osseux est renouvelé grâce à un processus complexe appelé « remodelage osseux ». Ce processus survient dans une unité atomique, l'unité multicellulaire de base, dans laquelle les ostéoclastes et les ostéoblastes vont avoir une activité opposée et séquentielle. Le remodelage osseux est régulé par des facteurs locaux et systémiques qui maintiennent l'homéostasie osseuse, en remplaçant la matrice endommagée par une nouvelle matrice. Habituellement, il existe un équilibre entre la résorption osseuse des ostéoclastes et la formation osseuse des ostéoblastes. Dans le cas d'ostéoporose, cet équilibre est rompu accompagné d'une détérioration de l'architecture microscopique osseuse conduisant à une augmentation de la fragilité osseuse impliquant un risque élevé de fracture. Le cycle du remodelage osseux débute par une phase d'activation où les précurseurs des ostéoclastes seront recrutés, différenciés et fusionnés pour donner naissance aux ostéoclastes multinucléés matures. Les ostéoclastes se fixent à la surface osseuse, scellant une zone étanche de résorption qu'ils acidifient en sécrétant des ions H^+ , facilitant la dissolution du minéral osseux et exposant ainsi la matrice organique aux enzymes protéolytiques qui la dégradent. Cette phase dure environ trois semaines chez l'homme. La phase d'activation est inhibée durant la phase de transition où les ostéoclastes meurent par apoptose et sont remplacés par les ostéoblastes. La surface résorbée est ainsi préparée pour la formation osseuse qui comprend la formation de l'ostéoïde, la matrice extracellulaire osseuse non minéralisée, la minéralisation et l'entrée en quiescence. Cette phase est beaucoup plus longue que la phase d'activation, formation osseuse ostéoblastique, durant environ trois mois chez l'homme. Les ostéoblastes se mettent au repos et deviennent des cellules bordantes et tapissent la surface de l'os adulte ou peuvent être piégés dans la matrice osseuse pour devenir des ostéocytes, ou être activées si elles sont stimulées (134) (**Figure 7**). Contrairement à l'homme, la croissance osseuse longitudinale se poursuit chez la souris après la maturité sexuelle, qui survient à l'âge de 6 à 8 semaines pour atteindre un pic de masse osseuse à l'âge de 4 à 6 mois (135), (136).

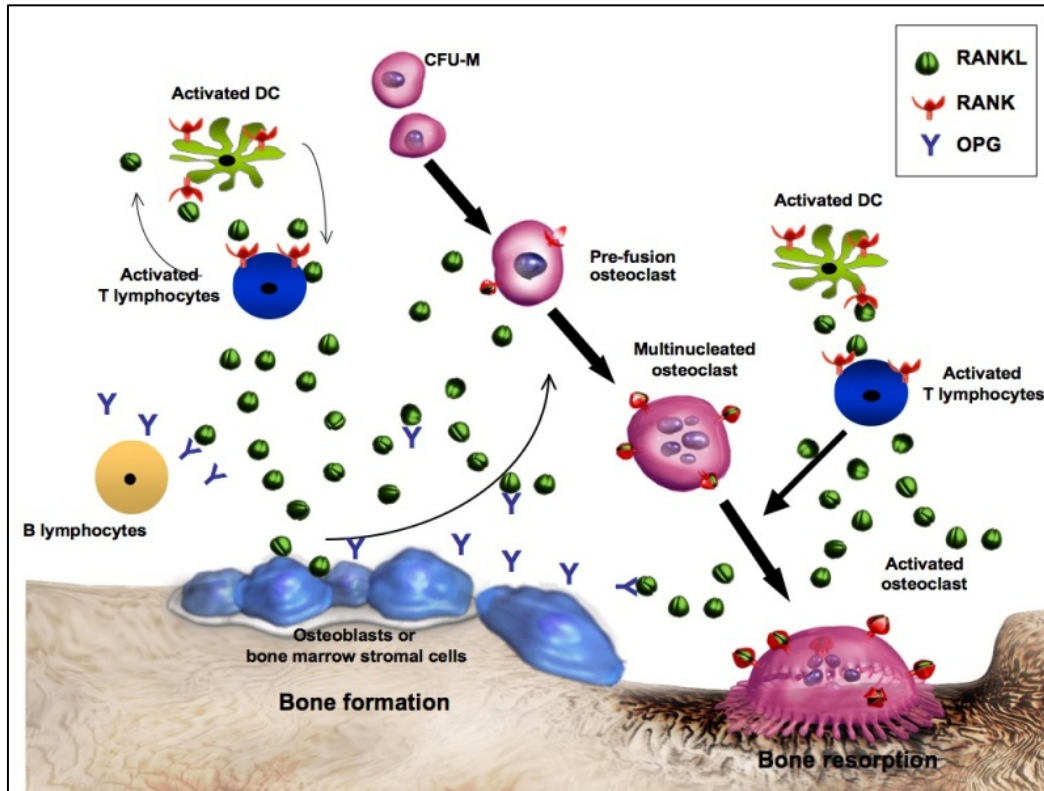


Figure 7: Remodelage osseux et ses voies moléculaires associées. Tirée de (137).

RANKL se lie à RANK sur la membrane des pré ostéoclastes, ce qui entraîne la résorption de la matrice osseuse par les ostéoclastes matures. L'OPG se lie à RANKL, inhibant ainsi la signalisation RANK et la résorption osseuse. RANK/RANKL joue également un rôle dans la régulation des cellules immunitaires et la diaphonie entre les deux systèmes (appelée ostéo-immunologie). Les cellules T peuvent également exprimer RANKL, qui peut à la fois agir sur les pré-ostéoclastes, mais également sur les cellules dendritiques (DC) pour favoriser leur survie et prolonger les interactions T-DC. Les DC peuvent présenter des effets modulateurs sur l'ostéoclastogénèse médiée par RANK via la sécrétion d'OPG. CFU-M, cellule souche hématopoïétique.

4.1.2. La voie OPG/RANK/RANKL dans l'os

La découverte de la triade OPG/RANK/RANKL a été parmi les plus importants progrès dans le domaine de la biologie et pathologie osseuse. Au début des années 1990, la compagnie Amgen a montré un grand intérêt au développement et l'identification de nouveaux gènes et protéines impliqués dans la physiopathologie osseuse (138). La triade RANK/RANKL/OPG forme un système clé de cytokines membres de la superfamille du *tumor necrosis factor* (TNF) et responsable de la régulation de l'homéostasie osseuse.

L'interaction entre le récepteur RANK et son ligand RANKL, à la surface des précurseurs des ostéoclastes, active une panoplie de voies de signalisation intracellulaires incluant la voie NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase-1 (JNK1) et p38MAPK qui participent à la différenciation et à la survie des ostéoclastes (139). RANKL est une protéine transmembranaire homotrimérique de type II exprimée à la fois en tant que protéine liée à la membrane, sécrétée ou intracellulaire (140). RANKL est fortement exprimé dans les ganglions lymphatiques, le thymus et les poumons et à de faibles niveaux dans une variété d'autres tissus, y compris la rate et la moelle osseuse (141). RANK, comme d'autres membres de la superfamille des récepteurs du TNF, n'a pas d'activité kinase intrinsèque pour la signalisation en aval et nécessite des molécules adaptatrices dont le *tumor necrosis factor associated factor-6* (TRAF-6), une E3 ubiquitine ligase, qui est nécessaire pour la différenciation des ostéoclastes (142). En effet, les souris déficientes en TRAF-6 ou deux sous-unités p50 et p52 de NF- κ B présentent une ostéopétrose sévère (hypercondensation de l'os) en raison de l'inhibition de la différenciation des ostéoclastes (143), (144). L'autre composante importante de cette triade est l'OPG, un récepteur soluble de RANKL qui inhibe la dégradation osseuse prévenant ainsi l'ostéoporose (139). L'OPG peut également agir comme un facteur anti-apoptotique et pro-prolifératif de par sa liaison au ligand de mort cellulaire TRAIL (145). Le rapport RANKL/OPG est considéré comme un déterminant majeur de la résorption osseuse et de la masse osseuse. Ainsi, les souris déficientes en RANKL démontrent une augmentation marquée de la masse osseuse et la suppression ciblée de l'OPG chez les souris entraîne une ostéoporose sévère et précoce (146). Les souris déficientes en OPG développent une dérégulation de la production d'ostéoclastes avec 22% à 28% de mortalité après le sevrage. Outre les domaines se liant au RANKL et TRAIL, l'OPG possède un domaine de liaison à l'héparine qui serait impliqué dans des interactions avec les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, l'héparine, l'héparane sulfate et le syndécane-1 (147),(148),(149). L'OPG est donc une molécule à plusieurs domaines qui pourrait avoir d'autres fonctions physiologiques que celle d'inhiber la voie RANK/RANKL dans le tissu osseux.

Bien que de nombreux médicaments soient approuvés pour le traitement et la prévention de l'ostéoporose, de nombreux patients à risque élevé de fracture ne sont pas encore traités. L'histoire du développement du denosumab, un anticorps monoclonal humain contre

RANKL sous le nom commercial « Prolia » ou « XGEVA », approuvé en 2010 par la FDA, a commencé par l'identification de l'OPG. En effet, malgré l'efficacité de l'OPG *in vitro*, de larges doses sont nécessaires pour diminuer la résorption osseuse chez l'animal (150). Une étude clinique de phase I sur des femmes ménopausées a démontré l'efficacité d'une version améliorée couplée avec un fragment Fc sous forme de Fc-OPG dérivé d'*Escherichia coli* qui a été par la suite remplacé par l'OPG-Fc, une protéine recombinante exprimée dans des cellules de mammifères dotée d'une demi vie 10 fois plus longue (138), (151), (152). Une réponse immunitaire à l'encontre de l'OPG chez un seul individu a engendré un arrêt du développement biomédical de l'OPG-Fc en faveur d'une approche par anticorps anti-RANKL (denosumab) qui est plus stable dans la circulation et possédant une demi vie plus longue que celle de l'OPG-Fc (138).

4.2. La communication entre le muscle squelettique et l'os dans la DMD

Le système musculo-squelettique est composé de muscles squelettiques, d'os, de tendons, de ligaments et d'autres tissus conjonctifs qui interagissent physiquement et mécaniquement pour fournir aux organismes vivants la capacité essentielle de locomotion. Les muscles squelettiques et les os sont étroitement liés et se développent ensemble tôt dans la vie et sont maintenus et adaptés pour répondre aux besoins métaboliques et mécaniques dans les conditions physiologiques (153). Cependant, en tant qu'unité fonctionnelle, ces deux tissus sont influencés par divers facteurs, tels que l'alimentation, la génétique, les hormones, les facteurs de croissance et les stimuli mécaniques (154). Par exemple, une augmentation de l'activité physique affecte positivement et sélectivement la masse osseuse et musculaire. En effet, des études démontrent que le bras dominant des joueurs de tennis a une masse musculaire et osseuse plus importante que le bras non dominant (155). De plus, il a été démontré que la masse et la densité osseuse des joueurs de baseball professionnels est préservée au cours du vieillissement (156). La charge mécanique durant l'exercice physique régule la synthèse du collagène pendant la formation osseuse (157). La tension musculaire est transférée aux os et provoque une prolifération des ostéoblastes (158). À l'inverse, le vieillissement, les glucocorticoïdes, l'hypogravité et certaines maladies neuromusculaires comme la DMD provoquent une diminution de la densité osseuse et de la masse musculaire

(159), (160), (161). La libération de cytokines dans la circulation sanguine est probablement le moyen le plus évident de communication entre les deux tissus qui sont hautement vascularisés (162). Le fait que certaines cytokines spécifiquement produites dans le muscle puissent atteindre des concentrations élevées dans la circulation sanguine après l'exercice est une preuve solide que les myokines et les ostéokines sont libérées directement dans la circulation. L'IL-6, une myokine sécrétée en grande quantité pendant l'exercice, améliore la capacité d'exercice en partie grâce à son action sur la résorption osseuse (163),(164), (165),(166). De plus, la myostatine, exprimée principalement dans le muscle et retrouvée dans la circulation sanguine, est impliquée à la fois dans la perte de masse musculaire et osseuse. En effet, les souris présentant une délétion en myostatine présentent environ le double de la masse musculaire squelettique et une plus grande teneur en minéraux osseux que les souris du groupe contrôle (167). De plus, le traitement avec un récepteur soluble dirigé contre la myostatine (ActRIIB-Fc) augmente à la fois la masse musculaire et osseuse dans un modèle murin d'ostéogenèse imparfaite (168). Un autre mécanisme de communication de cellule à cellule, est l'excrétion de composants cellulaires sous forme de microvésicules, exosomes ou vésicules extracellulaires par libération autocrines ou paracrines. En effet, des microvésicules sécrétés par les ostéoblastes contenant le RANKL influencent l'ostéoclastogenèse (169). En raison de l'étroite proximité des os et des muscles, des molécules (inférieures à 40 kDa) telles que la prostaglandine E2 (PGE₂), le NO, l'acide β -aminoisobutyrique (BAIBA) et l'irisine peuvent facilement atteindre le tissu adjacent par diffusion passive, alors que les ostéokines ou myokines dont la taille est supérieur à 40 kDa sont les plus susceptibles d'être transportées par la circulation ou par les microvésicules (170) **(Figure 8)**.

Plusieurs études ont attribué la faiblesse osseuse au manque de stimuli mécaniques chez les patients atteints de la DMD. En effet, il a été démontré que les souris dystrophiques présentent une faible densité minérale osseuse et une fragilité osseuse plus prononcée avec le vieillissement ou en fonction de la sévérité de la pathologie (171), (172), (173). Le traitement des souris dystrophiques avec les bisphosphonates, un agent anti-résorbant, améliore de 15% les propriétés biomécaniques et réduit de 90% les taux sériques de CK (174). Cependant, d'autres études suggèrent que la détérioration du tissu osseux est due à

d'autres facteurs inhérents à la maladie ou à d'autres propriétés intrinsèques. En effet, au-delà de cette relation mécanique qui les unit, la proximité anatomique entre les muscles et les os soutient également l'existence d'interactions moléculaires bidirectionnelles (175). Il a été démontré que les souris *mdx* de 21 jours présentent des propriétés mécaniques et biochimiques osseuses altérées avant même qu'une dégénérescence importante des fibres musculaires soit apparente, suggérant que l'environnement inflammatoire des muscles dystrophiques (libération de facteurs de croissance, interleukines ou autres cytokines pro-inflammatoires) peut contribuer au découplage des ostéoclastes et l'activité ostéoblastique, conduisant éventuellement à l'ostéopénie et l'ostéoporose (176), (173). La diapasonie os-muscle implique des ostéokines dérivées des os, des myokines dérivées des muscles et des cytokines d'origine double qui agissent sur les voies de signalisation communes, y compris l'inflammation, la fibrose, le catabolisme, l'anabolisme, l'angiogenèse et l'homéostasie calcique (177). Par exemple, l'IL-6 est significativement augmenté en circulation et dans les muscles des patients et des souris dystrophiques comparées aux groupes contrôles (173). Le traitement avec un anticorps dirigé contre le récepteur de l'IL-6 (IL-6R), réduit les dommages musculaires et améliore la régénération du muscle quadriceps, mais n'engendre aucun effet sur le diaphragme ou encore le muscle cardiaque (178). L'inhibition de la voie activine/myostatine a récemment émergé comme un potentiel thérapeutique pour augmenter la masse musculaire et la force osseuse. Fait intéressant, l'administration de la follistatine, une protéine inhibitrice de la myostatine chez les souris *mdx* améliore la fonction et l'intégrité musculaire (179). En effet, un anticorps neutralisant humanisé contre la myostatine, le domagrozumab, a été développé par la compagnie Pfizer et a fait l'objet d'essais cliniques pour traiter des patients atteints de DMD (180). Cependant, l'essai a été arrêté en phase II car les patients n'ont pas montré d'amélioration en regard aux résultats attendus après 1 an de traitement (162), (180). Outre les cellules musculaires, les cellules osseuses libèrent des ostéokines impliquées dans la physiopathologie de la DMD. Les niveaux d'expression des transcrits et les taux sériques de l'ostéopontine (OPN), un inhibiteur bien connu de la minéralisation osseuse, sont significativement augmentés dans les muscles dystrophiques en réponse à l'environnement inflammatoire (181), (182). Notre laboratoire suggère que la voie RANK/RANKL/OPG pourrait être impliquée à la fois dans la dégénérescence musculaire et osseuse suivant la progression de la DMD (183). Il est donc nécessaire d'accorder plus

d'importance à la communication biochimique et direct entre l'os et le muscle afin de comprendre cette interdépendance dans la DMD.

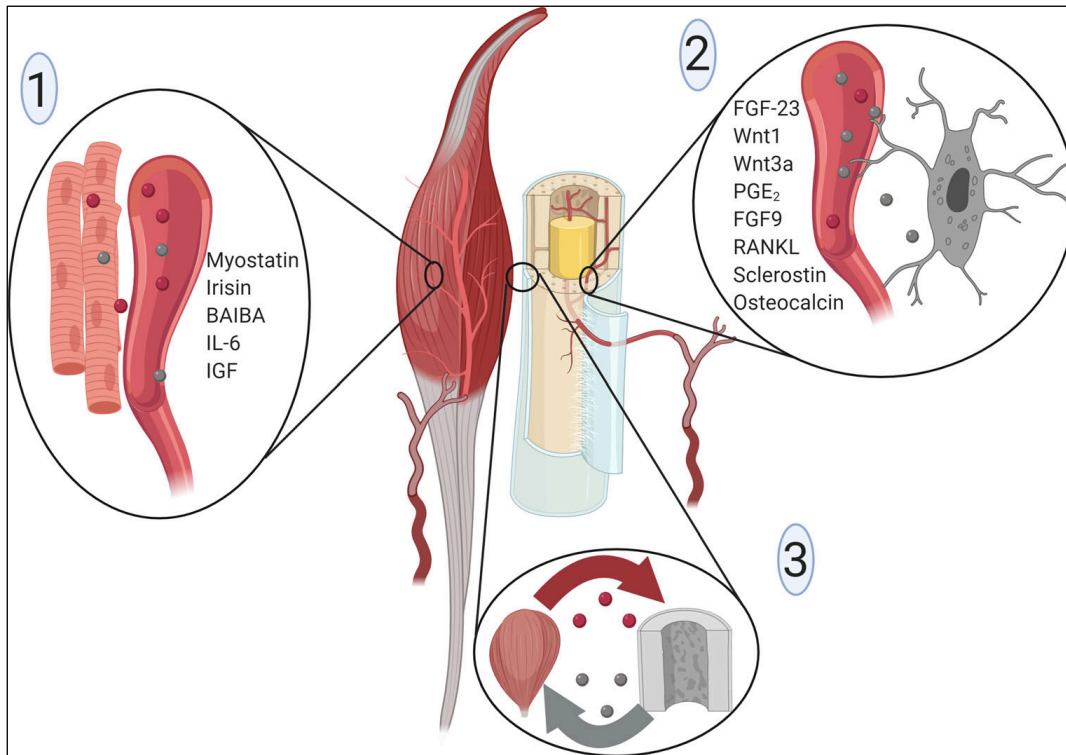


Figure 8: Voies d'interactions moléculaires potentielles entre les os et les muscles. Tirée de (162).

Dans le muscle squelettique, les molécules sécrétées peuvent entrer en circulation à travers le liquide extracellulaire présent dans l'endomysium (1). Dans l'os, les ostéocytes à travers le système lacuno-canaliculaire sont à proximité immédiate des vaisseaux sanguins (2). Il a été observé que les ostéocytes peuvent étendre leurs dendrites dans les vaisseaux sanguins. En raison de la proximité de l'os et du muscle, des molécules (inférieures à 40 kDa) peuvent traverser le périoste par diffusion alors que les ostéokines ou myokines dont la taille est supérieure à 40 kDa sont les plus susceptibles d'être transportées par la circulation ou par les microvésicules (3).

4.3. OPG/RANK/RANKL dans le muscle et la DMD

Diverses études ont montré qu'en plus d'être exprimés par les ostéoblastes, les muscles cardiaques et squelettiques expriment également l'ARNm de RANK, RANKL et de l'OPG mais leurs rôles dans la physiopathologie musculaire restent encore mal connus (184), (185). En utilisant une approche *in vitro*, il a été démontré que les cellules musculaires C₂C₁₂ en

culture stimulées mécaniquement sécrètent des facteurs solubles qui inhibent la formation des ostéoclastes en influençant le rapport RANKL/OPG (186). Les travaux de notre laboratoire ont également montré que des myotubes C₂C₁₂ totalement différenciés et stimulés sécrètent l'OPG, soutenant la signalisation bidirectionnelle entre l'os et le muscle (187). Une récente étude a également montré que l'OPG sécrété par les myofibres rapides de type II exerce potentiellement un effet anti-inflammatoire et protège les cellules bêta pancréatiques contre la résistance à l'insuline induite par le TNF- α (188). Plusieurs études cliniques et précliniques ont montré que l'exercice et les activités physiques favorisent la santé osseuse en augmentant l'OPG et en diminuant les niveaux de RANKL (189). Fait intéressant, notre laboratoire a montré que RANK est exprimé à la membrane des fibres musculaires et peut donc potentiellement interagir avec RANKL dérivé des os (190). Nous avons précédemment montré que la suppression de RANK spécifique au muscle a des effets inotropes sur les muscles EDL dénervés, largement composés de myofibres de type rapide IIA, IIX et IIB, prévenant la perte de force spécifique maximale et augmentant la proportion de fibres à contraction rapide (190). De plus, les traitements pharmacologiques à court terme des souris dystrophiques avec une OPG recombinante de pleine longueur fusionnée à un fragment Fc (FL-OPG-Fc) et, dans une moindre mesure, OPG-Fc tronquée (TR-OPG-Fc) ou l'anti-RANKL protègent contre la dystrophie musculaire, suggérant que la voie RANK/RANKL/OPG peut être impliquée dans les maladies musculaires (187),(190), (191). Au-delà des études faites par notre laboratoire, plusieurs évidences stipulent que la voie RANK/RANKL/OPG peut également influencer positivement la fonction musculaire en plus de son rôle dans la régulation de la formation des ostéoclastes et de la résorption osseuse. En effet, des travaux récents ont montré que le denosumab, administré pendant 3 ans améliore la masse maigre et la force de préhension de femmes ostéoporotiques. De plus, ils ont démontré que les souris surexprimant le RANKL présentent une atrophie musculaire, une infiltration de graisse, une inflammation et une nécrose associée avec une faiblesse musculaire. De plus un traitement avec le TR-OPG-Fc augmente la masse musculaire des souris ostéo/sarcopéniques (192). Par ailleurs, cette triade de cytokines a été associée à un rôle dans la modulation de l'inflammation lors de la régénération du muscle squelettique en réponse aux dommages excentriques (193). Il est bon de se rappeler que la voie NF- κ B, joue un rôle central dans l'atrophie musculaire et l'activation de l'inflammation dans la DMD, et

que cette voie est activée par l'interaction de RANK/RANKL dans l'os et également dans d'autres types cellulaires. En effet il a été démontré que RANKL, via l'activation de la voie NF- κ B, stimule l'expression du TNF- α , IL-1 α et IL-1 β dans un modèle d'hypertrophie cardiaque et module l'inflammation dans un modèle d'arthrite (194), (195). Différentes études ont démontré que TRAF-6, une protéine adaptatrice de RANK, est surexprimé dans le muscle suite à la dénervation, la cachexie induite par le cancer ou une privation nutritionnelle (196), (197), (198). Dans le contexte du DMD, la délétion de TRAF-6 diminue les dommages, l'inflammation, l'activité de NF- κ B et améliore l'intégrité musculaire et la régénération chez les jeunes souris *mdx* suggérant que l'interaction RANK/RANKL pourrait potentiellement avoir un rôle pro-inflammatoire dans les maladies musculaires (199). Bien que RANKL et OPG soient d'importants modulateurs de l'inflammation et de la fonction dans plusieurs tissus, l'impact de la suppression de l'OPG sur la structure et la fonction des muscles squelettiques reste, de façon surprenante, un mystère.

4.4. La norme de soin pour la DMD

Bien que des progrès majeurs se soient multipliés récemment concernant la génétique et la pathogenèse du DMD, aucun traitement curatif efficace n'a encore été trouvé. Parmi les normes de soins qui existent, on retrouve les glucocorticoïdes oraux (GCs), la prise en charge cardiaque, pulmonaire et la physiothérapie. L'objectif étant d'augmenter l'espérance de vie, de maintenir la mobilité et l'indépendance et d'améliorer la qualité de vie (200), (201). Bien que le mécanisme d'action des GCs dans la DMD ne soit pas complètement compris, leurs propriétés anti-inflammatoires, l'inhibition de la protéolyse musculaire, la stimulation de la prolifération des myoblastes et la régulation différentielle des gènes permettent de ralentir la progression de la pathologie et le début de la cardiomyopathie chez les patients atteints de DMD (202), (203), (204). La prednisolone ou son métabolite actif la prednisone sont les GCs les plus couramment utilisés en Amérique du Nord, tandis que le deflazacort (DFZ), un dérivé oxazolidine de prednisone, est utilisé principalement en Europe et en Asie. Le traitement à la prednisolone à court terme chez les patients DMD ralentit la progression de la pathologie et augmente la force musculaire au cours des six premiers mois de traitement, suivi d'une période de stabilisation de deux ans, avec une baisse ultérieure plus lente que chez les patients non traités (205), (206). Chez la souris *mdx*, le traitement à la prednisolone pendant 8

semaines augmente la force spécifique et améliore l'intégrité musculaire, mais n'engendre aucun effet sur la force isométrique et ne prévient pas la perte de force associée aux contractions excentriques (207). Cependant, la prednisolone est associée avec une prise de poids poussant certains patients à arrêter le traitement (208). Dans l'espoir de diminuer les effets secondaires d'une administration prolongée de prednisone, son dérivé le DFZ doté propriétés pharmacocinétique et pharmacodynamiques supérieures, a également été testé (209). Le DFZ de son nom commercial « Emflaza » a été approuvé en 2017 par la FDA pour le traitement des patients atteints de DMD. Bien que les avantages du DFZ soient similaires à ceux de la prednisone, il est souvent prescrit en raison d'une réduction perçue des effets secondaires tels que la prise de poids, améliorant ainsi sa tolérabilité (210). De plus, plusieurs études cliniques ont montré que le DFZ augmente la durée de la marche de plus de 2 ans comparativement à la prednisone (211), (212), (213). Un traitement à long terme de 15 mois au DFZ réduit de 40 % la fibrose et de 80% l'inflammation cardiaque chez la souris *mdx* (214). Bien que le traitement à court terme aux GCs pour la DMD soit bénéfique, les effets du traitement chronique sur la force et la fonction musculaire ne sont pas bien compris et souvent associés avec l'apparition de diverses complications secondaires (215). Les effets négatifs chez les enfants comprennent une diminution de la taille, une prise de poids, des changements de comportement et une altération du métabolisme du glucose (210), (216). Chez la souris *mdx*, un traitement à long terme engendre une perte de poids, une diminution de la force, atrophie musculaire et une augmentation de la fibrose cardiaque, ce qui suggère qu'une administration chronique peut être problématique (217), (218). De plus, le traitement aux GCs engendre une réduction drastique de la masse et de la densité osseuse, augmente l'incidence de fractures des os longs de près de trois fois et provoque des compressions vertébrales qui ne se produisent pas chez les patients DMD non traités (219),(220), (221). L'utilisation des GCs est la cause la plus fréquente d'ostéoporose secondaire et la forme la plus courante d'ostéoporose due à la prise de médicaments. Ces altérations surviennent suite à l'augmentation de l'apoptose des cellules formatrices de l'os ainsi qu'une augmentation de la durée de vie des ostéoclastes, responsable de la résorption osseuse (222). Ceci est soutenu par des études démontrant que les bisphosphonates, qui inhibent l'activité des ostéoclastes, préviennent l'ostéoporose induite par les GCs (223). De plus, il a été démontré que les GCs favorisent l'ostéoclastogenèse *in vitro* en inhibant l'OPG et en stimulant simultanément la

production de RANKL (224). Cependant, le DFZ démontre une faible capacité d'inhibition de la production de l'OPG et stimule l'expression de RANKL de 1,2 fois seulement comparé à 6 fois plus de stimulation avec le traitement à la prednisolone (225). Des études cliniques et précliniques proposent de changer la fréquence du traitement et suggèrent que l'administration intermittente des GCs pourrait avoir un effet comparable à une administration quotidienne avec moins d'effets indésirables notamment l'atrophie musculaire (226), (227), (217). Concernant l'ostéoporose induite, plusieurs études précliniques suggèrent que des traitements combinés aux GCs avec des thérapies anti-résorptives comme les bisphosphonates, anaboliques comme les traitements intermittents à la parathormone (PTH) ou une supplémentation à la vitamine D pourraient non seulement améliorer la fonction musculaire, mais aussi la densité et la microarchitecture osseuses (228), (229), (230). La communauté scientifique internationale recommande l'utilisation des bisphosphonates par voie intraveineuse lors de l'apparition des premiers signes de fragilité et de fractures chez les patients DMD (231). Son utilisation est associée avec une amélioration des maux de dos et une stabilisation de la fracture vertébrale. Cependant, une telle thérapie ne semble pas empêcher complètement le développement de nouvelles fractures vertébrales dans ce contexte (232). De plus, l'utilisation des bisphosphonates par voie intraveineuse est associée avec l'apparition d'effets indésirables tels que la fièvre, des douleurs musculaires, des nausées et des vomissements, en particulier à la première dose. Des effets secondaires plus rares, y compris la rhabdomyolyse, ont été signalés dans la DMD (233).

Le denosumab est approuvé pour le traitement de l'ostéoporose chez les femmes en ménopause souffrant d'ostéoporose, les hommes atteints d'ostéoporose ou de cancer de la prostate non métastatique à risque élevé de fractures ou les femmes atteintes d'un cancer du sein non métastatique qui reçoivent un inhibiteur de l'aromatase (234), (235), (236). Plusieurs études ont démontré l'efficacité et la supériorité du traitement au denosumab comparé aux bisphosphonates sur l'ostéoporose induite par les GCs (237). Ainsi, le denosumab, qui est approuvé en 2018 par la FDA pour le traitement de l'ostéoporose induite par les GCs, peut être bénéfique pour les patients atteints de DMD, comme le montre un récent rapport où 18 mois de traitements avec le denosumab ont amélioré la densité minérale osseuse et le renouvellement osseux chez un garçon avec DMD traité par les GCs sans événements

indésirables significatifs (238), (239). La capacité d'un médicament approuvé d'améliorer à la fois la fonction musculaire et de prévenir la perte osseuse chez les personnes atteintes de DMD traitées par GC pourrait conduire à un changement radical dans la gestion clinique.

Objectifs et hypothèses

Plusieurs études cliniques et précliniques ont démontré que la perte osseuse et l'atrophie musculaire se produisent de manière simultanée suite au repos prolongé, au vieillissement et aux maladies neuromusculaires telles que la DMD (240),(241),(242). Néanmoins, peu d'études ont été menées pour parvenir à des conclusions définitives sur la manière dont les interactions muscle-os et les molécules d'origine musculaire (myokines) et d'origine osseuse (ostéokines) influencent l'évolution de la dystrophie musculaire. Notre laboratoire s'intéresse aux impacts du système RANK/RANKL/OPG sur la physiologie et la fonction des muscles sains et pathologiques. Le but de la présente thèse est d'investiguer cette voie afin de comprendre les mécanismes d'action de ces cytokines sur la physiopathologie musculaire et d'établir une stratégie thérapeutique pour la DMD en traitement unique ou combiné aux GCs. De plus, il est important de souligner que les patients atteints de DMD souffrent de fragilité osseuse et développent des fractures osseuses exacerbées par les GCs qui altèrent leurs qualités de vie. Le premier objectif présenté dans le chapitre 1 traite de l'importance de la communication bidirectionnelle entre le muscle et l'os dans la DMD. Ce chapitre passe en revue les recherches récentes visant à déterminer les interactions muscle-os qui pourraient éventuellement conduire au développement de thérapies multifonctionnelles et efficaces pour traiter les troubles musculaires et osseux dans la DMD incluant la voie RANK/RANKL/OPG. **Notre hypothèse stipule que les stratégies visant à cibler les voies de signalisation communes impliquées dans les maladies musculaires et osseuses sont une approche importante à court terme pour le traitement de DMD.**

Nos travaux antérieurs indiquent que le récepteur RANK est présent à la surface des myotubes différenciés et l'expression de son ARNm est 4 fois plus élevée dans les muscles de souris dystrophiques comparativement aux muscles sains (190). Il est connu que la liaison RANK/RANKL dans l'os mène, entre autres, à l'activation de la voie NF- κ B qui joue un rôle crucial dans l'activation de l'inflammation et l'atrophie musculaire. Ces évidences et la revue de littérature présentée au chapitre 1 ont conduit à l'établissement de l'objectif du chapitre 2 qui vise à investiguer l'impact de la neutralisation systémique à long terme de RANKL sur l'intégrité et la fonction musculaire et osseuse dans un modèle un peu plus sévère de

dystrophie musculaire *mdx/utrn*^{+/-}. **Notre hypothèse étant que RANK/RANKL est impliquée dans le dysfonctionnement musculaire et osseux dans la DMD et qu'une inhibition systémique de RANKL améliore à la fois la fonction musculaire et osseuse.** Ainsi, nous avons démontré que le taux d'expression de RANK et RANKL est significativement élevé dans le microenvironnement des muscles dystrophiques et que l'inhibition prolongée de cette interaction avec l'anti-RANKL diminue l'activation de la voie NF- κ B et l'infiltration par les cellules inflammatoires ainsi que la fibrose cellulaire tout en améliorant la fonction musculaire et osseuse des souris *mdx/utrn*^{+/-}.

Nos résultats précédents au sein du laboratoire ont montré que le traitement à l'OPG-Fc préserve complètement la force des muscles dystrophiques (187). De plus il a été démontré que les souris surexprimant RANKL présentent une atrophie musculaire, une infiltration de graisse, une inflammation, une nécrose et une diminution de la production de force musculaire (192). Il est bien connu que les souris déficientes en OPG présentent des niveaux élevés de RANKL en circulation et que les résultats du chapitre 2 de cette thèse ont montré que RANK/RANKL est impliquée dans le dysfonctionnement musculaire et osseux dans la DMD. Suite à ses évidences, nous avons donc étudié, au chapitre 3 le rôle physiologique de l'OPG sur la fonction et le phénotype des muscles à contraction rapide et lente. **L'hypothèse de cet objectif, est que le déséquilibre du ratio RANKL/OPG engendre un dysfonctionnement osseux et musculaire synchrone.** Nos résultats ont montré que la délétion de l'OPG et la perturbation de l'équilibre RANKL/OPG engendre non seulement une réduction des propriétés biomécaniques des os, mais, également une faiblesse musculaire et une atrophie sélective des myofibres de type IIb, à contraction rapide. Nos résultats *in vitro* et *in vivo* soutiennent la conclusion que RANKL induit une atrophie musculaire et l'existence d'un lien entre le déséquilibre RANKL/OPG et les dysfonctionnements osseux et musculaires synchrones.

Les GCs, tels que la prednisone et le DFZ représente la norme de soin de DMD. À l'issue des évidences de la revue de littérature du chapitre 1 et des résultats de l'objectif 2, nous avons étudié l'effet d'un traitement combiné d'anti-RANKL et du DFZ sur les fonctions musculaires et osseuses des souris dystrophiques. **Ainsi, l'hypothèse associée à cet objectif**

est que l'anti-RANKL agit en synergie avec le DFZ afin d'améliorer l'intégrité et la force musculaire des souris dystrophiques et protège contre l'ostéoporose induite par le DFZ. Les résultats de cette étude sont encore préliminaires et sont donc présentés en annexe à cette thèse.

Chapitre 1 : 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 atteints de DMD, augmentent le risque d'ostéoporose. 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 la signalisation cellulaire 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) qui sont des régulateurs du remodelage/homéostasie de la matrice osseuse et contributeurs potentiels de la physiopathologie de la DMD. Cette revue discute des interactions muscle-os qui pourraient éventuellement conduire au développement de thérapies multifonctionnelles et efficaces pour traiter les troubles musculaires et osseux dans la DMD incluant la voie RANK/RANKL/OPG.

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.

1.1. 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].

1.2. 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 have 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].

1.3. 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.

1.4. 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-κB 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.

1.5. Osteokines and Their Effects on Muscle Tissue in DMD

Like muscle cells which release myokines, 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-like 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.

1.6. 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 its production 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 Dia damage, fibrosis, and weakness with no effect on fatigue resistance [146]. Sildenafil also acts on the expression of the profibrotic 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.

1.7. 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 antiapoptotic 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- κB 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 FLOPG-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 Ca²⁺ 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].

1.8. 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 bidirectional 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

1.9. 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/biomedicines5040062>.
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; 36:17. <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;27:214779.
<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, Guldberg RE, Baltgalvis KA, Lowe DA. Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. *Neuromuscul Disord NMD*. 2011;21:183–93. <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. *CellMetab.* 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 Periodontal Res.* 2004;39:1948. <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. Puolakkainen 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>. Systemic inhibition of the activin/myostatin pathway with soluble activin type IIB receptor in mdx mice positively affects muscle mass and increases bone volume.
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;28:14969. <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-beta. *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 Musculoskeletal Dis.* 2017; 9:263–70. <https://doi.org/10.1177/1759720X17726744>.
117. Phillips EG, Beggs LA, Ye F, Conover CF, Beck DT, OztelDM, 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 Klothomediated 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-I 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, GroundsMD, 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, Grynepas 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, Thiagarajan 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, Gao W, 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. *Pharm Res.* 2007; 24:328–35. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-91529>.
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 FKRK 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, Brecht 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. Nelson MD, Rader F, Tang X, Tavyev J, Nelson SF, Miceli MC, 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. Toğral G, Arıkan M, Korkusuz P, Hesar RH, Ekşioğlu MF. Positive effect of tadalafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on fracture healing in rat femur. *Eklem 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.0000000000004570>.
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- κ B 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/s00109-008-03738>.
155. Jackman RW, Cornwell EW, Wu C-L, Kandarian SC. Nuclear factor- κ B 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; ajpgcell.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. 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; 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 glucocorticoid-induced 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, Grosman 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. Dankworth 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. *MolGenet Metab Rep.* 2014;1:85–97. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2013.12.005>.

1.10. Figures and Legends

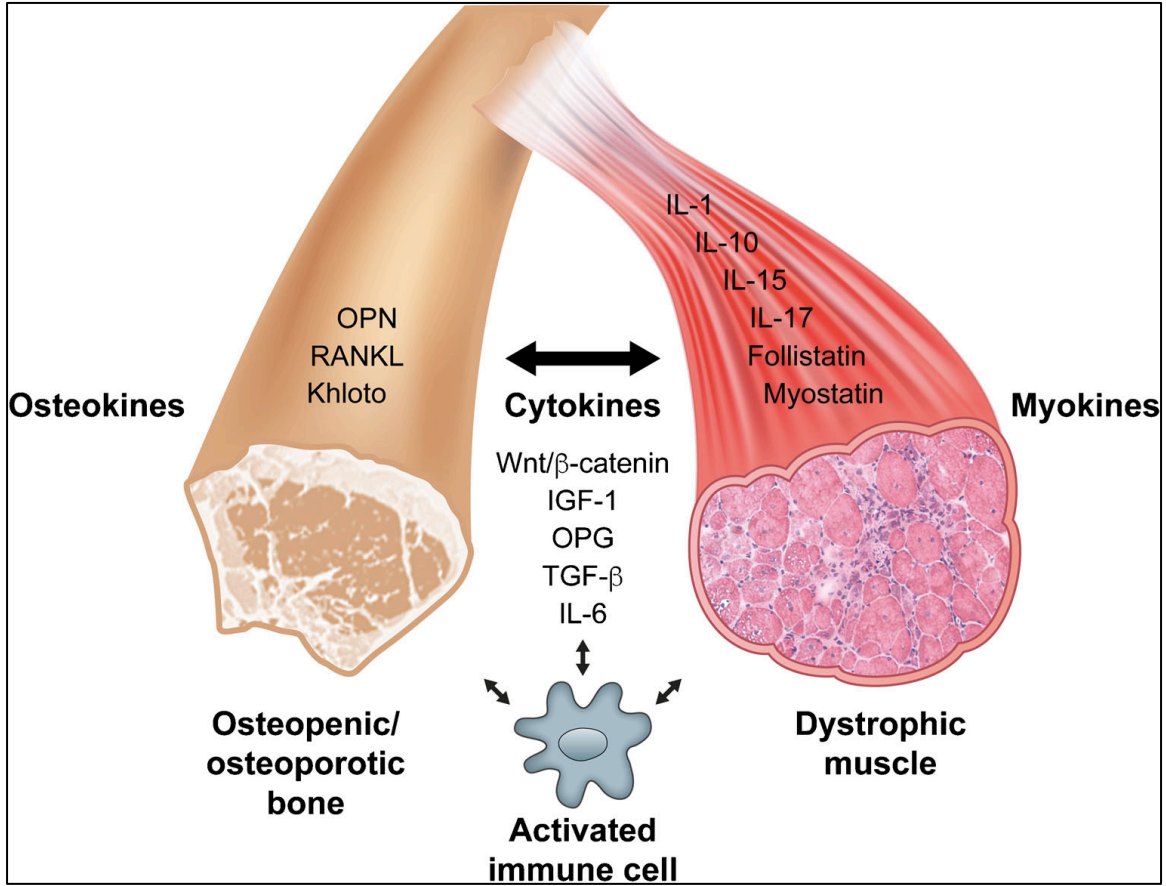


Figure 1. 1: Myokines, osteokines, and dual-origin cytokines involved in Duchenne muscular dystrophy

Chapitre 2 : Un traitement à l'anti-RANKL réduit l'inflammation et le dysfonctionnement musculaire et renforce les os chez les souris dystrophiques

Titre original de l'article

An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice

Authors' full names

Dounia Hamoudi¹, Laetitia Marcadet¹, Antoine Boulanger Piette¹, Hideo Yagita², Zineb Bouredji¹, Anteneh Argaw¹, and Jérôme Frenette^{1,3}

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 -Department of Immunology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan.

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

Published in: Human Molecular Genetics. 10 June 2019; Vol. 28, No. 18

Copyright: © Hamoudi et al 2019. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Funding: This work was supported by grants to JF from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2016-05845) and two important foundations, Ryan's Quest and Jesse's Journey.

Conflict of interest statement: The authors declare that they have no competing interests.

Abbreviations

Ab, antibody; ANOVA, analysis of variance; BSA, bovine serum albumin; BW, body weight; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMD, Duchenne muscular dystrophy; CK, creatine kinase; EDL, extensor digitorum longus; H&E, hematoxylin and eosin; i.p., intraperitoneal; mAb, monoclonal Ab; L₀, optimal length; NF-κB, nuclear factor κB; Pax 7, protein paired box 7; P₀, maximum absolute force; PCR, polymerase chain reaction; Pt, twitch force; RANK, receptor activator of NF-κB; RANKL, RANK ligand; sP₀, maximum specific force; TA, tibialis anterior; Utrn, utrophin; WT, wild-type

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la forme la plus sévère de dystrophie musculaire qui entraîne une dégénérescence et une inflammation musculaires progressives. Le récepteur-activateur du facteur nucléaire κ B (RANK) et son ligand (RANKL), qui sont exprimés dans les os et les muscles squelettiques et cardiaques forment un réseau de signalisation en amont du facteur nucléaire-kappa B (NF- κ B). Nous avons démontré dans cette étude que les taux de protéines RANK et RANKL étaient augmentés dans le microenvironnement des myofibres de souris dystrophiques *mdx/utrn*^{+/-}. Une dose de 4 mg/kg d'anticorps anti-RANKL tous les 3 jours pendant 28 jours est optimale et plus efficace que 1 mg/kg pour améliorer la force spécifique maximale *ex vivo* des muscles EDL dystrophiques. De plus, le traitement à l'anti-RANKL réduit l'œdème, les dommages, la fibrose et l'inflammation musculaire et améliore les propriétés mécaniques de l'os des souris *mdx/utrn*^{+/-}.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most severe form of muscular dystrophy which leads to progressive muscle degeneration and inflammation. The receptor activator of nuclear factor NF- κ B ligand (RANKL) and its receptor (RANK), which are expressed in bone and skeletal and cardiac muscles, form a signaling network upstream from nuclear factor-kappa B (NF- κ B). We thus hypothesized that prolonged silencing RANKL/RANK signaling would significantly improve DMD. We showed that RANK and RANKL protein levels were increased in the microenvironment of myofibers of 5-month-old utrophin haploinsufficient *mdx* (*mdx/utrn*^{+/-}) mice and that a 4 mg/kg dose of anti-RANKL antibody every 3 d for 28 days is optimal and more effective than 1 mg/kg every 3 d for improving the *ex vivo* maximum specific force (sP₀) of dystrophic EDL muscles from *mdx/utrn*^{+/-} mice. This functional improvement was associated with a reduction in muscle edema, damage, and fibrosis and a marked reduction in serum CK levels. The anti-RANKL treatment inhibited the NF- κ B pathway, increased the proportion of anti-inflammatory and non-cytotoxic M2 macrophages, and reduced the number of centrally nucleated myofibers and the frequency of small myofibers, suggesting that anti-RANKL inhibits the cycle of degeneration/regeneration in dystrophic mice. A three-point bending test showed that a 28-d anti-RANKL treatment increases the mechanical properties of bone in *mdx/utrn*^{+/-} dystrophic mice. In conclusion, the anti-RANKL treatment protected against skeletal muscle dysfunctions while enhancing bone mechanical properties, filling two needs with one deed in the context of muscular dystrophy.

2.1. Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD), an X-linked recessive disorder, is the most common form of muscular dystrophy, with an incidence of 1 in 5000 male births (1). Patients with DMD suffer from progressive muscle degeneration and weakness and die prematurely due to respiratory and/or cardiac failure (2). DMD is caused by lack of functional dystrophin, which is essential for myofiber integrity and signaling (3). The dystrophin-deficient *mdx* mouse is the most common animal model for DMD. The mice exhibit increased susceptibility to mechanical stress, leading to progressive muscle degeneration, chronic inflammatory cell recruitment (e.g., T lymphocytes and macrophages), release of oxygen-free radicals and proteases, and ultimately the formation of fibrotic and non-functional tissues (4), (5), (6), (7). Glucocorticoids, which inhibit inflammation, are generally prescribed for DMD to theoretically break the vicious cycle of damage and scarring in dystrophic muscles.

The expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B), a key transcription factor required for the induction of a large number of pro-inflammatory genes, is upregulated in muscular dystrophy. The specific inhibition of NF- κ B activity reduces damage, inflammation, and fibrosis in dystrophic muscles (8), (9), (10), (11). The receptor activator of nuclear factor NF- κ B ligand (RANKL) and its receptor (RANK) are one of the upstream signaling pathways for NF- κ B. In bone, the RANKL/RANK interaction activates NF- κ B, which induces the formation of multinucleated mature osteoclasts and causes bone resorption (12). Interestingly, RANK and/or RANKL are also expressed in skeletal and cardiac muscles (13), (14), (15), (16). Our overarching hypothesis is that the RANK/RANKL/OPG triad is synchronously involved in bone-muscle deconditioning or diseases. We showed that muscle RANK plays a role in Ca^{2+} storage and muscle performance during denervation (17). In addition, the genetic deletion of muscle RANK in dystrophic muscles and a short-term treatment to selectively inhibit RANKL [anti-RANKL 1mg/kg/3d for 10d] significantly improve the force and integrity of the muscles of young dystrophic *mdx* mice (16). We also showed that a pharmacologic treatment of young dystrophic *mdx* mice with recombinant full-length osteoprotegerin fused with Fc [OPG-Fc 1mg/kg/d for 10d], a decoy receptor for RANKL, mitigated the loss of muscle force, markedly increased the expression and activity

of a key sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA), and preserved muscle integrity, particularly in fast-twitch skeletal muscles (15). The upregulation of the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β caused by a cardiac muscle pressure overload induced by NF- κ B was significantly reduced following an anti-RANKL treatment (18). Most importantly, a very recent study showed that denosumab, a human anti-RANKL monoclonal antibody, given for 3 years improves the appendicular lean mass and handgrip strength of osteoporotic women; that mice overexpressing RANKL present muscle atrophy, fat infiltration, inflammation, necrosis, and lower force production; and that a truncated-OPG-Fc treatment increases muscle mass in osteo/sarcopenic mice (19). All of these results strongly indicate that the RANK/RANKL/OPG pathway is not limited to bone, organogenesis, immunity, and cancer, but also plays a very important role in cardiac and skeletal muscle diseases and aging-associated diseases.

Since denosumab has already been approved as a treatment for osteoporosis and bone metastases in adults and has undergone testing as a treatment for osteogenesis imperfecta in children (20), (21), (22), the present study aimed to determine the most effective dose of an anti-RANKL treatment in adult dystrophic mice. We tested the effectiveness of various doses of anti-RANKL on *mdx* mice with haploinsufficiency of utrophin (*mdx/utrⁿ+/-*). Our findings showed that [4mg/kg/3d] of anti-RANKL was the optimal dose and that this dose significantly improved the specific force of dystrophic *extensor digitorum longus* (EDL) and soleus (Sol) muscles relative to control PBS-treated *mdx/utrⁿ+/-* mice. However, the treatments did not protect dystrophic muscles from repeated eccentric contraction-induced force loss. The anti-RANKL treatments also significantly reduced the area affected by muscle damage, serum creatine kinase activity, fibrotic areas, and muscle inflammation and promoted muscle regeneration. Anti-RANKL may thus be an effective single-agent treatment option for protecting the bone and skeletal muscles of patients with DMD.

2.2. Results

RANK/RANKL levels were elevated in the microenvironment of dystrophic skeletal muscles

We previously showed that RANK mRNA levels were 5.5-fold higher in EDL muscles from dystrophic *mdx* mice compared with WT mice (16). To investigate the contribution of the RANK pathway to dystrophic skeletal muscle contractile dysfunction, we first evaluated RANK and RANKL levels in dystrophic muscles. Western blotting analyses showed that RANK (Fig. 1A) and RANKL (Fig. 1B) protein levels are 2-fold higher in EDL muscles isolated from dystrophic *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with WT mice. RANK and RANKL protein levels were also significantly higher in the fast-twitch TA and slow-twitch soleus (Sol) muscles from *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with WT mice (data not shown). We next assessed RANK and RANKL expression in the muscle membrane. The immunohistochemistry results showed that RANK and RANKL were present on the myofiber cell membranes of EDL muscles (Fig. 1C) and translocate from the cytoplasm to the muscle membrane in *mdx/utrn*^{+/-} mice.

The anti-RANKL treatment improved the function of dystrophic muscles

To investigate the long-term effects of the anti-RANKL treatment on dystrophic muscle pathology, 4-month-old *mdx/utrn*^{+/-} adult mice were given i.p. injections of anti-mouse RANKL [1 or 4mg/kg/3d] for 28 days. We first assessed the *ex vivo* contractile properties of the muscles, which is the gold standard for evaluating isolated muscle function. The anti-RANKL treatment [4mg/kg/3d] had the tendency to increase the absolute tetanic forces of dystrophic EDL muscles (#p=0.08; Table 1) but significantly improved the maximum specific force of dystrophic EDL (14.1 ± 0.5 vs. 10.9 ± 0.6 N/cm²; Fig. 2A) and dystrophic Sol muscles (20.9 ± 0.6 N/cm² vs. 17.0 ± 1.2 ; Fig. 2D) compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. There were no differences in the maximum specific force of muscles from *mdx/utrn*^{+/-} mice treated with a low dose of anti-RANKL [1mg/kg/3d] compared with PBS-treated mice. The muscles were then subjected to repeated eccentric contractions, which are known to decrease the isometric force, particularly of fast twitch muscles. As expected, fast-twitch EDL muscles from PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice lost up to 68% of their initial force

while muscles from WT mice only lost 10% of their initial force (Fig. 2B). The anti-RANKL treatment did not prevent the eccentric contraction-induced loss of force of EDL muscles (Fig. 2E). As previously reported (23) eccentric contractions do not cause a loss of force of slow-twitch Sol muscles. The muscles were then weighed, and the wet mass was normalized to the body weight to evaluate the effect of the anti-RANKL treatment on muscle mass. As expected, the EDL and Sol muscles of PBS-injected 5-month-old *mdx/utrn*^{+/-} mice had higher muscle mass to body weight ratios (65%; Fig. 2C, and 48%; Fig. 2F, respectively). Interestingly, a 28-day treatment of dystrophic mice with [4mg/kg/3d] but not [1mg/kg/3d] of anti-RANKL significantly decreased this ratio by 10% in the EDL muscles (Fig. 2C) and by 8 % in the Sol muscles (Fig. 2F) compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. To determine whether the anti-RANKL treatment reduced muscle edema, the EDL and Sol muscles were dried, and their water content was determined. The dry masses of the EDL and Sol muscles of the anti-RANKL-treated and PBS-treated dystrophic mice were similar. However, the water content increased by 6% in the EDL muscles and 4% in the Sol muscles of PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} compared with the WT mice, and the higher dose of anti-RANKL [4mg/kg/3d] reduced the water content by 3% in the EDL muscles (Table 2).

The anti-RANKL treatment preserved muscle integrity and reduced damage and fibrosis in dystrophic muscles

Since the anti-RANKL [4mg/kg/3d] treatment improved the force production of dystrophic muscles, we determined whether or not the treatment had an effect on the structural and biochemical parameters of dystrophic EDL muscles. Hematoxylin and eosin staining revealed a marked reduction in the damaged areas of dystrophic EDL muscles from anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice ($3.1 \pm 1.1\%$) compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice ($12.4 \pm 5.8\%$) (Fig. 3A and B). We then assessed muscle fibrosis by quantifying the Masson trichrome-stained area and by measuring the hydroxyproline content of the muscles. The two approaches revealed the presence of elevated fibrosis in dystrophic EDL muscles from PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with WT mice. The fibrotic area was significantly lower in anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice (2% vs. 7%, respectively; Fig. 3C). The hydroxyproline content also decreased by approximately 50% following the anti-RANKL treatment (Fig. 3D). We then

measured serum CK levels, an indirect indicator of muscle damage. As expected, CK levels were 6-fold higher in PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with WT mice. The anti-RANKL treatment significantly reduced serum CK levels by approximately 35% compared with the PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice (Fig. 3E).

The anti-RANKL treatment shifted the macrophage phenotype and reduced p-NF-κB levels in dystrophic muscles.

We hypothesized that an anti-RANKL treatment would slow down the progression of the dystrophic pathology by counteracting excessive inflammation and promoting a shift in macrophage phenotype. To test our hypothesis, we analyzed the effect of the anti-RANKL treatment on M1 and M2 macrophages by immunohistochemistry. EDL cross-sections were double-labelled with F4/80, a pan macrophage marker, and CD206, an M2-specific macrophage antibody (Fig. 4A). The anti-RANKL treatment had no effect on total number of macrophages (F4/80+ cells; Fig. 4B) but significantly reduced the number of M1-macrophages (F4/80+/CD206- cells) by 62% (Fig. 4C) and increased the number of M2-macrophages (F4/80+/CD206+ cells) by 132% compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice (Fig. 4D). To determine the mechanism by which anti-RANKL reduces muscle inflammation in *mdx/utrn*^{+/-} mice, we studied the activation of the NF-κB pathway in dystrophic TA muscles. The phosphorylated NF-κB (p-NF-κB-p65 on Ser536) to the total NF-κB ratio was ~ 2-fold higher in PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice than in WT mice, and a 28-day anti-RANKL treatment significantly reduced this ratio in dystrophic *mdx/utrn*^{+/-} muscles (Fig. 4E-G).

The anti-RANKL treatment reduced myofiber regeneration and promoted a shift in fiber size distribution.

Previous studies have shown that macrophage phenotype switching promotes muscle regeneration and reduces muscle membrane damage (24), (25). We first determined whether the anti-RANKL treatment affected the number of satellite cells responsible for the repair of damaged myofibers. EDL muscle sections from WT, PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} and anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice were labeled with anti-Pax-7, a marker for satellite cells (Fig. 5A). The number of satellite cells was significantly lower in dystrophic EDL muscles from anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice, suggesting that the cycle of muscle degeneration/regeneration is attenuated and is closer to

healthy muscles following the anti-RANKL treatment (Fig. 5B). We next assessed the number of centrally nucleated myofibers as an index of muscle regeneration. Consistent with the lower number of satellite cells, the proportion of centrally nucleated myofibers was also significantly reduced in dystrophic EDL muscles from anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice (Fig. 5C). An analysis of CSA distribution frequency revealed roughly a 3-fold reduction in the number of small myofibers (<500 μm^2) accompanied by a significant increase in the number of medium-sized myofibers (2500 μm^2) (Fig. 5D). Differences in muscle fiber size distribution were also quantified by calculating the variance coefficient of muscle fiber cross sectional area, which indicate the heterogeneity of muscle fiber size. The variance coefficient, determined with the minimal 'Feret's diameter' method, was significantly increased in dystrophic EDL muscles from PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with WT mice. The anti-RANKL treatment significantly reduced the variance coefficient compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice (249 \pm 15 vs 330 \pm 26, respectively; Fig. 5E).

The anti-RANKL treatment increased the mechanical properties of bone from dystrophic mice.

Three-point bending tests were performed at the tibia and femur mid-diaphysis to determine whether the mechanical properties of the bones were affected by a 28-day anti-RANKL treatment. The ultimate loads, stiffness, and lengths of the tibial and femur bones were similar for the anti-RANKL-treated [1mg/kg/3d] *mdx/utrn*^{+/-}, PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-}, and WT mice. Although a 28-day treatment is relatively short to induce changes in the mechanical properties of bone, the anti-RANKL treatment [4mg/kg/3d] significantly increased the stiffness of the tibial bone but not that of the femoral bone compared with PBS-treated mice and did not affect other mechanical parameters of the bone (Table 3).

2.3. Discussion

We previously showed that EDL muscles and fully differentiated C2C12 myotubes express the RANK protein and that RANK mRNA levels are 5.5-fold higher in EDL muscles from dystrophic mice compared with WT mice (17), (16). Furthermore, short-term treatment with a low dose of anti-RANKL [1mg/kg/3d] improved the function of fast-twitch dystrophic muscles in 5-week-old juvenile *mdx* mice (16). Since the anti-RANKL antibody denosumab had already been approved and prescribed for osteoporosis and bone metastases, pre-clinical studies are essential for determining the optimal dose of anti-RANKL for new therapeutic applications such as for DMD.

In the present study, we showed that RANK and RANKL protein levels are highly elevated in the microenvironment of adult dystrophic EDL muscles compared with healthy muscles. We treated dystrophic *mdx/utrn*^{+/-} mice with increasing doses of anti-RANKL antibody. Our results showed that a 28-day treatment with anti-RANKL [4mg/kg/3d] is more effective than [1mg/kg/3d] at improving the *ex vivo* maximum specific force (sP₀) of EDL muscles from 5-month-old *mdx/utrn*^{+/-} mice. A treatment with a higher dose of anti-RANKL [8 mg/kg/3d] did not produce any additional gain of force (data not shown). In addition, despite the pathology, there were no differences in the absolute isometric force (P₀) of EDL and Sol muscles from *mdx/utrn*^{+/-} and WT mice, suggesting, as reported by previous studies, that compensatory hypertrophy mechanisms could in part account for the maintenance of the absolute force of dystrophic EDL and Sol muscles (26). The prolonged treatment with anti-RANKL at any dose failed to significantly increase the absolute force (P₀) of dystrophic EDL and Sol muscles or to protect dystrophic EDL muscles from a loss of force following repeated eccentric contractions. However, an anti-RANKL [4mg/kg/3d] treatment reduced the water content of the muscles, suggesting that the gain in specific force can most likely be attributed to a reduction in muscle mass, i.e., muscle edema, fibrosis, or fat cells. These improvements were associated with a significant reduction in serum CK levels, suggesting that the integrity of the dystrophic muscles had improved. Collectively, these findings support our hypothesis that a prolonged anti-RANKL treatment is effective in preventing muscle edema and loss of integrity and in improving the specific force production of dystrophic muscles.

Although the inflammatory and damaging roles of RANKL in dystrophic muscles are certainly not fully understood, inflammatory arthritis models have shown that the role of RANKL is not limited to the induction of osteoclastogenesis and bone resorption and indicate that RANKL may be an underestimated proinflammatory modulator (27). RANKL is a chemotactic molecule for monocytes/macrophages (28), and its presence increases the expression of pro-inflammatory cytokines and the M1 macrophage phenotype (29). The present findings show that the anti-RANKL treatment significantly reduced the number of M1 macrophages (F4/80+/CD206-) and increased the number of M2 macrophages (F4/80+/CD206+). Since M1 macrophages are associated with muscle degeneration and M2 macrophages are associated with muscle growth, repair, and regeneration (30), this shift in macrophage phenotype following the anti-RANKL treatment should prevent further muscle degeneration and/or promote muscle repair. Our results also showed that the anti-RANKL treatment significantly reduce the number of centrally nucleated myofibers, the frequency of small myofibers <500 μ m, the heterogeneity of myofiber size and the number of satellite cells, suggesting that anti-RANKL prevents the vicious cycle of muscle degeneration/regeneration in dystrophic mice. It is interesting to note that RANKL is a member of TNF superfamily and that TNF- α , a related molecule, is an important activator of satellite cells and inhibitor of myogenic differentiation (31), (32). Our observation that the anti-RANKL treatment reduced the number of satellite cells suggests that RANKL may play similar role in muscular dystrophy. Furthermore, the specific deletion of TNF-receptor associated factor-6 (TRAF-6), an essential RANK adaptor for relaying downstream pathways, including NF- κ B and the c-Jun N terminal kinase, improves muscle strength, reduces fiber necrosis and the infiltration of macrophages, and suppresses the NF- κ B pathway in dystrophic *mdx* mice, supporting a pro-inflammatory role for the RANKL/RANK interaction in muscle diseases (33). Additionally, RANKL expression increases in response to a pressure overload in a model of transverse aortic constriction (TAC) and stimulates the expression of TNF- α , IL-1 α and IL-1 β in cultured cardiomyocytes (18). Interestingly, a single anti-RANKL injection is sufficient to attenuate the expression of pro-inflammatory cytokines following TAC (18). Our findings indicated that anti-RANKL inhibits the NF- κ B signaling pathway and inflammation, a validated target for DMD and a key controller of

many genes involved in inflammatory cell recruitment. This observation is of the utmost importance since NF- κ B is aberrantly activated and its inhibition markedly improves the functions of dystrophic skeletal and cardiac muscles (34), (35), (36). Taken together, these results showed that the anti-RANKL treatment favors anti-inflammatory and non-cytotoxic M2 macrophage proliferation and inhibits the NF- κ B pathway and muscle damage, thus improving the function of dystrophic muscles.

Our findings showed that a 28-day anti-RANKL treatment significantly increases tibial stiffness but does not modify other bone biomechanical parameters. The limited changes in bone mechanical properties are not surprising since bone is not metabolically as active as skeletal muscle and since muscular dystrophy mainly affects skeletal muscle, not bone at early ages. In humans, a prolonged 18-month anti-RANKL treatment improved lumbar bone mineral density and bone turnover markers in a glucocorticoid-treated boy with DMD (37). In addition, a 2-year treatment with anti-RANKL improved bone mineral density, normalized the vertebral shape, and mobility, and reduced the fracture rate in children with osteogenesis imperfecta (38). The possibility that anti-RANKL may have a dual effect on skeletal muscle and bone is best exemplified by recent work by Ferrari *et al.*, who reported that a 3-year treatment with denosumab, but not bisphosphonate, improved the appendicular lean mass and handgrip strength of osteoporotic women while mice overexpressing RANKL presented muscle atrophy, fat infiltration, inflammation, necrosis, and lower force production (19). Evidence from the present study and others thus support the notion that anti-RANKL preserves both bone and skeletal muscle functions in the context of osteoporosis and DMD.

In conclusion, we showed for the first time that RANK/RANKL protein levels are higher in the microenvironment of dystrophic muscles and that inhibiting their interaction with anti-RANKL antibody results in less muscle damage, fibrosis, edema, and inflammation and inhibits NF- κ B activity. The anti-RANKL treatment was also effective in preserving muscle function and increasing bone stiffness in dystrophic *mdx/utrn*^{+/-} mice. The ultimate goal of the present study was to extrapolate an effective dose of anti-RANKL for mice to humans. The extrapolation of a dose from mice to humans is based on the body surface area where 4mg/kg/3d for mice would be divided by 12.3 to give 0.3 mg/kg/3d for humans or

3mg/kg/month of human monoclonal anti-RANKL (39). A 1 mg/kg of body weight dose of denosumab every 12 weeks in children with osteogenesis imperfecta is safe and effective and should be helpful in guiding any dose escalation trial in DMD patients.

2.4. Materials and Methods

Animals

The animal experiments were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee based on Canadian Council on Animal Care guidelines. Male wildtype (WT) (C57BL/10ScSnJ) and *mdx/utrn*^{+/-} mice were initially purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and subsequently bred in our animal facility. *Mdx/utrn*^{+/-} mice were used because they present significant more inflammation and fibrosis than *mdx* mice (40). The genotypes were determined from tail biopsy specimens using real-time PCR with specific probes. The mice were housed under a 12:12-h light/dark cycle. Food and water were provided ad libitum.

The mice were injected i.p. with phosphate-buffered saline (PBS) or 1 or 4 mg/kg of anti-mouse RANKL mAbs (IK22-5) every 3 days (41) from 16 to 20 weeks of age, i.e., for 28 days. Age-matched dystrophic and WT mice received an equivalent volume of PBS. EDL and Sol muscles were removed to assess their contractile properties. *Tibialis anterior* (TA) muscles were snap frozen and were stored at -80 °C for further analysis. At the end of the experimental procedures, the mice were euthanized by cervical dislocation under anesthesia

Assessment of skeletal muscle contractile properties

Contractile properties were determined at the end of the 28-d treatment. The mice were injected s.c. with 0.1 mg/kg of buprenorphine to alleviate pain and were anesthetized i.p. with 50 mg/kg of pentobarbital sodium 15 min later. The EDL and Sol muscles were gently removed, and their contractile properties were measured using a 305B-LR dual-mode muscle arm system controlled by a dynamic muscle data acquisition and analysis system (Aurora Scientific Inc., Aurora, ON, Canada). The muscles were incubated in a controlled physiological environment (Krebs-Ringer supplemented with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4)

at 25°C and were attached to an electrode and a force sensor. A single twitch contraction was obtained, and tetanic contractions were elicited at frequencies of 10, 20, 50, 80, and 100 Hz. The muscles were then subjected to seven consecutive 700-ms isometric eccentric contractions at 150 Hz separated by 1-min rest periods. The muscles were stretched for 200 ms to 110% L_0 at 0.5 L_0/s 500 ms after the start of each isometric contraction. Maximum specific tetanic tension sP_0 (in N/cm^2) values were obtained by normalizing the absolute force P_0 with the cross-sectional area (CSA) using the following equation: $sP_0 = P_0/CSA$. CSA was determined by dividing the muscle mass by the product of the optimum fiber length (L_f) corresponding to the result of multiplying L_0 with the fiber length ratio (0.44 for EDL muscles and 0.71 for Sol muscles) and the muscle density (1.06 mg/mm^3). Muscle contractility measurements were analyzed using Dynamic Muscle Data Analysis software (Aurora Scientific Inc.). At the end of experiment, the EDL and Sol muscles were weighed to determine their wet mass, were dried overnight at 65°C, and were weighed once again to determine their dry mass. The percentage of water content was calculated using the following equation: $100 \times (\text{wet mass} - \text{dry mass}) / \text{wet mass}$.

Immunofluorescence and staining

Transversal EDL muscle sections (10 μm) were cut using a refrigerated (-20°C) cryostat (Leica Microsystems CM1850). Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin using the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich) to assess muscle damage, the cross-sectional areas (CSA) of the fibers and central nucleation. The variance coefficient of CSA was calculated using Feret's diameter method as follows: variance coefficient = (standard deviation of the muscle fiber size/mean muscle fiber size) \times 1000 (42). Masson's trichrome staining was used to assess collagen infiltration. Digital photographs were acquired from at least five different sections at 400x magnification with a digital camera and were examined with an inverted microscope (Nikon). The damaged area was defined as the area occupied by infiltrating cells and devoid of normal or regenerating muscle fibers. The nuclei of the infiltrating cells were used to delineate manually the damaged area. Empty spaces devoid of infiltrating cells resulting from tissue preparation were not considered. Data are expressed as the percentage of damaged and fibrotic areas with respect to the total area using ImageJ (software version 1.41). Other sections were incubated overnight at 4°C with primary anti-

RANK (Abcam, 1:200) and anti-RANKL (IK22-5, 1:10) antibodies diluted in blocking solution composed of PBS supplemented with 1% horse serum and 2% bovine serum albumin (BSA). In other preparations for double-labeling, the sections were incubated overnight at 4°C with anti-F4/80 (Bio-Rad, 1:100) and anti-CD206 (Santa Cruz, 1:50) or anti-Pax-7 (R&D systems, 1:100) and anti-laminin (Sigma-Aldrich, 1:1000) antibodies in blocking solution. The sections were washed briefly with PBS, incubated with Alexa Fluor 488 or 594-conjugated secondary antibody (Invitrogen, 1:500) for 1 h at room temperature, and washed three times for 15 min with PBS. The slides were then mounted with Fluoromount-G™, with DAPI immunofluorescent stain and were analyzed with an Axio Imager M2 microscope connected to an AxioCam camera using ZEN2 software (Zeiss, Germany).

Serum creatine kinase assay

Blood collected from the mice by cardiac puncture was allowed to clot and was centrifuged at 10,000 xg for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to a clean tube for a second round of centrifugation. The serum was then collected and was stored at -80°C until used. Serum creatine kinase (CK) levels, an indicator of muscle damage and sarcolemma membrane fragility in dystrophic mice, were determined using a commercially available kit according to the manufacturer's instructions (Pointe Scientific Creatine Kinase CK10 reagent, Fisher Scientific) and a modified protocol from Treat NMD_M.2.2.001. Serum CK activities were measured using a microplate reader (Infinite F200, TECAN) and were expressed as U/L.

Hydroxyproline content

Collagen content was quantified in EDL muscles using a protocol adapted from Treat NMD SOP DMD_M.1.2.006. The muscles were dried for 16-18 h at 56°C, weighed, and hydrolyzed for 3 h with 6 N HCl at 130°C in a heat block. The hydrolysates were suspended in a mixture composed of 1 mL of distilled water, 0.1 mL of red methyl, 0.15 mL of 2.5 N NaOH, completed with distilled water up to 2 mL and were centrifuged at 125 x g for 5 min. A hydroxyproline standard curve was prepared using known concentrations of L-hydroxyproline [0 to 6 µg] (Sigma-Aldrich). Next, 0.2 mL of supernatant and standard were mixed with 0.1 mL of 0.05 M chloramine-T in citrate buffer and was oxidized at RT for 20

min. The standard mixtures were then mixed with 0.1 mL of perchloric acid at RT for 5 min. Lastly, 0.1 mL of preheated 20% p-dimethylaminobenzaldehyde was added, and the mixtures incubated for 45 min at 60°C. Hydroxyproline values ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were determined by measuring the absorbance at 560 nm and were expressed as μg of hydroxyproline/mg muscle wet weight.

Western blotting

The muscles were frozen immediately after dissection and were homogenized (PowerGen 125 homogenizer: Fisher Scientific) for 45 s on ice in RIPA lysis buffer. The protein content was measured using a BCA protein assay kit (EMD Chemical). The homogenates were dissolved in Laemmli buffer, heated to 95°C for 2 min, separated by SDS-PAGE, and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF; Bio-Rad). The membrane was blocked in 5% skim milk and was incubated overnight at 4°C with anti-RANK (Abcam, 1:1000), anti-RANKL (Novus Biologicals, 1:500), and anti-NF- κ B-p65 and anti-phospho-NF- κ B-p65 (Ser536) (Cell Signaling, 1:1000 and 1:500, respectively) primary antibodies. The membranes were washed and were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies, and protein bands were visualized by chemiluminescent detection using the ECL-Plus imaging system (PerkinElmer). Band densities were analyzed using Quantity One software (v4.6.6, Bio-Rad) and were normalized to the GAPDH band of the appropriate sample. Protein levels were expressed in arbitrary units relative to GAPDH content. The p-NF- κ B-p65 to total NF- κ B-p65 ratio was calculated using band densities normalized to GAPDH.

Three-point bending testing of the tibia and femur mid-diaphysis

The functional properties of bone were assessed by performing a three-point bending test at mid-diaphysis using an MTS Bionix[®] servohydraulic test system (MTS Systems Corporation). The tibia and femur were collected at the end of the anti-RANKL treatment and were placed on a set of supports separated by 1 cm. The rate of displacement was 2 mm/min until failure. The load displacement curve for each bone was analyzed, and the functional properties of the bone were quantified as ultimate load and stiffness. Ultimate load

was determined as the highest load obtained prior to failure, and stiffness corresponded to the highest slope along the linear portion of the curve prior to reaching the ultimate load (43).

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software (version) using a one-way ANOVA or a two-way ANOVA for fiber size frequency. All analyses of variance were followed by Bonferroni's multiple comparisons test (a posteriori) to determine significant differences between groups (Instats Graph software version 3.1). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

2.5. Acknowledgements

This work was supported by grants to JF from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2016-05845) and two important foundations, Ryan's Quest and Jesse's Journey.

2.6. References

1. Bladen,C.L., Salgado,D., Monges,S., Foncuberta,M.E., Kekou,K., Kosma,K., Dawkins,H., Lamont,L., Roy,A.J., Chamova,T., *et al.* (2015) The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Hum. Mutat.*, **36**, 395–402.
2. McDonald,C.M., Henricson,E.K., Abresch,R.T., Han,J.J., Escolar,D.M., Florence,J.M., Duong,T., Arrieta,A., Clemens,P.R., Hoffman,E.P., *et al.* (2013) the cooperative international neuromuscular research group duchenne natural history study—a longitudinal investigation in the era of glucocorticoid therapy: design of protocol and the methods used. *Muscle Nerve*, **48**, 32–54.
3. Constantin,B. (2014) Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **1838**, 635–642.
4. Nowak,K.J. and Davies,K.E. (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.*, **5**, 872–876.
5. Whitehead,N.P., Yeung,E.W. and Allen,D.G. (2006) Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 657–662.
6. Evans,N.P., Misyak,S.A., Robertson,J.L., Bassaganya-riera,J. and Grange,R.W. (2009) Dysregulated Intracellular Signaling and Inflammatory Gene Expression During Initial Disease Onset in Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, **88**, 502–522.
7. Tidball,J.G. and Wehling-Henricks,M. (2007) The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol.*, **102**, 1677–1686.
8. Kumar,A. and Boriek,A.M. (2003) Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **17**, 386–396.
9. Mourkioti,F., Kratsios,P., Luedde,T., Song,Y.-H., Delafontaine,P., Adami,R., Parente,V., Bottinelli,R., Pasparakis,M. and Rosenthal,N. (2006) Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J. Clin. Invest.*, **116**, 2945–2954.
10. Acharyya,S., Villalta,S.A., Bakkar,N., Bupha-Intr,T., Janssen,P.M.L., Carathers,M., Li,Z.-W., Beg,A.A., Ghosh,S., Sahenk,Z., *et al.* (2007) Interplay of IKK/NF-κB signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.*, **117**, 889–901.
11. Yin,X., Tang,Y., Li,J., Dzuricky,A.T., Pu,C., Fu,F. and Wang,B. (2017) Genetic ablation of P65 subunit of NF-κB in mdx mice to improve muscle physiological function. *Muscle Nerve*, **56**, 759–767.
12. Boyce,B.F., Xiu,Y., Li,J., Xing,L. and Yao,Z. (2015) NF-κB-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinol. Metab.*, **30**, 35–44.
13. Bernardi,S., Fabris,B., Thomas,M., Toffoli,B., Tikellis,C., Candido,R., Catena,C., Mulatero,P., Barbone,F., Radillo,O., *et al.* (2014) Osteoprotegerin increases in metabolic

syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **394**, 13–20.

14. Tisato,V., Secchiero,P., Rimondi,E., Giancesini,S., Menegatti,E., Casciano,F., Zamboni,P. and Zauli,G. (2013) GM-CSF Exhibits Anti-Inflammatory Activity on Endothelial Cells Derived from Chronic Venous Disease Patients. *Mediators Inflamm.*, **2013**.

15. Dufresne,S.S., Dumont,N.A., Bouchard,P., Lavergne,É., Penninger,J.M. and Frenette,J. (2015) Osteoprotegerin Protects against Muscular Dystrophy. *Am. J. Pathol.*, **185**, 920–926.

16. Dufresne,S.S., Boulanger-Piette,A., Bossé,S., Argaw,A., Hamoudi,D., Marcadet,L., Gamu,D., Fajardo,V.A., Yagita,H., Penninger,J.M., *et al.* (2018) 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**.

17. Dufresne,S.S., Dumont,N.A., Boulanger-Piette,A., Fajardo,V.A., Gamu,D., Kake-Guena,S.-A., David,R.O., Bouchard,P., Lavergne,É., Penninger,J.M., *et al.* (2016) Muscle RANK is a key regulator of Ca²⁺ storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, **310**, C663–C672.

18. Ock,S., Ahn,J., Lee,S.H., Park,H., Son,J.W., Oh,J.G., Yang,D.K., Lee,W.S., Kim,H.-S., Rho,J., *et al.* (2012) Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand is a novel inducer of myocardial inflammation. *Cardiovasc. Res.*, **94**, 105–114.

19. 2018 Abstracts - American Society for Bone and Mineral Research.

20. Smith,M.R., Egerdie,B., Toriz,N.H., Feldman,R., Tammela,T.L.J., Saad,F., Heracek,J., Szwedowski,M., Ke,C., Kupic,A., *et al.* (2009) Denosumab in Men Receiving Androgen-Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **361**, 745–755.

21. Cummings,S.R., Martin,J.S., McClung,M.R., Siris,E.S., Eastell,R., Reid,I.R., Delmas,P., Zoog,H.B., Austin,M., Wang,A., *et al.* (2009) Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, **361**, 756–765.

22. Hoyer-Kuhn,H., Franklin,J., Allo,G., Kron,M., Netzer,C., Eysel,P., Hero,B., Schoenau,E. and Semler,O. (2016) Safety and efficacy of denosumab in children with osteogenesis imperfect--a first prospective trial. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, **16**, 24–32.

23. Moens,P., Baatsen,P.H. and Maréchal,G. (1993) Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **14**, 446–451.

24. Villalta,S.A., Nguyen,H.X., Deng,B., Gotoh,T. and Tidball,J.G. (2009) Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 482–496.

25. Villalta,S.A., Rinaldi,C., Deng,B., Liu,G., Fedor,B. and Tidball,J.G. (2011) Interleukin-10 reduces the pathology of mdx muscular dystrophy by deactivating M1 macrophages and modulating macrophage phenotype. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 790–805.

26. Lynch,G.S., Hinkle,R.T., Chamberlain,J.S., Brooks,S.V. and Faulkner,J.A. (2001) Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6–28 months old. *J. Physiol.*, **535**, 591–600.

27. Papadaki,M., Rinotas,V., Violitzi,F., Thireou,T., Panayotou,G., Samiotaki,M. and Douni,E. (2019) New Insights for RANKL as a Proinflammatory Modulator in Modeled Inflammatory Arthritis. *Front. Immunol.*, **10**, 97.

28. Breuil,V., Schmid-Antomarchi,H., Schmid-Alliana,A., Rezzonico,R., Euller-Ziegler,L. and Rossi,B. (2003) The receptor activator of nuclear factor (NF)- κ B ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **17**, 1751–1753.

29. Huang,R., Wang,X., Zhou,Y. and Xiao,Y. (2017) RANKL-induced M1 macrophages are involved in bone formation. *Bone Res.*, **5**, 17019.
30. Dumont,N.A. and Frenette,J. (2013) Macrophage colony-stimulating factor-induced macrophage differentiation promotes regrowth in atrophied skeletal muscles and C2C12 myotubes. *Am. J. Pathol.*, **182**, 505–515.
31. Li,Y.-P. (2003) TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, C370-376.
32. Zhao,Q., Yang,S.T., Wang,J.J., Zhou,J., Xing,S.S., Shen,C.C., Wang,X.X., Yue,Y.X., Song,J., Chen,M., *et al.* (2015) TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF- κ B activation and impairment of IGF-1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **458**, 790–795.
33. Hindi,S.M., Sato,S., Choi,Y. and Kumar,A. (2014) Distinct roles of TRAF6 at early and late stages of muscle pathology in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 1492–1505.
34. Peterson,J.M., Kline,W., Canan,B.D., Ricca,D.J., Kaspar,B., Delfin,D.A., DiRienzo,K., Clemens,P.R., Robbins,P.D., Baldwin,A.S., *et al.* (2011) Peptide-Based Inhibition of NF- κ B Rescues Diaphragm Muscle Contractile Dysfunction in a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Med.*, **17**, 508–515.
35. Yang,Q., Tang,Y., Imbrogno,K., Lu,A., Proto,J.D., Chen,A., Guo,F., Fu,F.H., Huard,J. and Wang,B. (2012) AAV-based shRNA silencing of NF- κ B ameliorates muscle pathologies in *mdx* mice. *Gene Ther.*, **19**, 1196–1204.
36. Peterson,J.M., Wang,D.J., Shettigar,V., Roof,S.R., Canan,B.D., Bakkar,N., Shintaku,J., Gu,J.-M., Little,S.C., Ratnam,N.M., *et al.* (2018) NF- κ B inhibition rescues cardiac function by remodeling calcium genes in a Duchenne muscular dystrophy model. *Nat. Commun.*, **9**, 3431.
37. Kumaki,D., Nakamura,Y., Sakai,N., Kosho,T., Nakamura,A., Hirabayashi,S., Suzuki,T., Kamimura,M. and Kato,H. (2018) Efficacy of Denosumab for Glucocorticoid-Induced Osteoporosis in an Adolescent Patient with Duchenne Muscular Dystrophy: A Case Report. *JBJS Case Connect.*, **8**, e22.
38. Hoyer-Kuhn,H., Netzer,C., Koerber,F., Schoenau,E. and Semler,O. (2014) Two years' experience with denosumab for children with Osteogenesis imperfecta type VI. *Orphanet J. Rare Dis.*, **9**, 145.
39. Nair,A.B. and Jacob,S. (2016) A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic Clin. Pharm.*, **7**, 27–31.
40. Zhou,L., Rafael-Fortney,J.A., Huang,P., Zhao,X.S., Cheng,G., Zhou,X., Kaminski,H.J., Liu,L. and Ransohoff,R.M. (2008) Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in *mdx* mice. *J. Neurol. Sci.*, **264**, 106–111.
41. Kamijo,S., Nakajima,A., Ikeda,K., Aoki,K., Ohya,K., Akiba,H., Yagita,H. and Okumura,K. (2006) Amelioration of bone loss in collagen-induced arthritis by neutralizing anti-RANKL monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 124–132.
42. Briguët,A., Courdier-Fruh,I., Foster,M., Meier,T. and Magyar,J.P. (2004) Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. *Neuromuscul. Disord.*, **14**, 675–682.
43. Novotny,S.A., Warren,G.L., Lin,A.S., Guldberg,R.E., Baltgalvis,K.A. and Lowe,D.A. (2011) Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **21**, 183–193.

2.7. Figures, Legends and tables

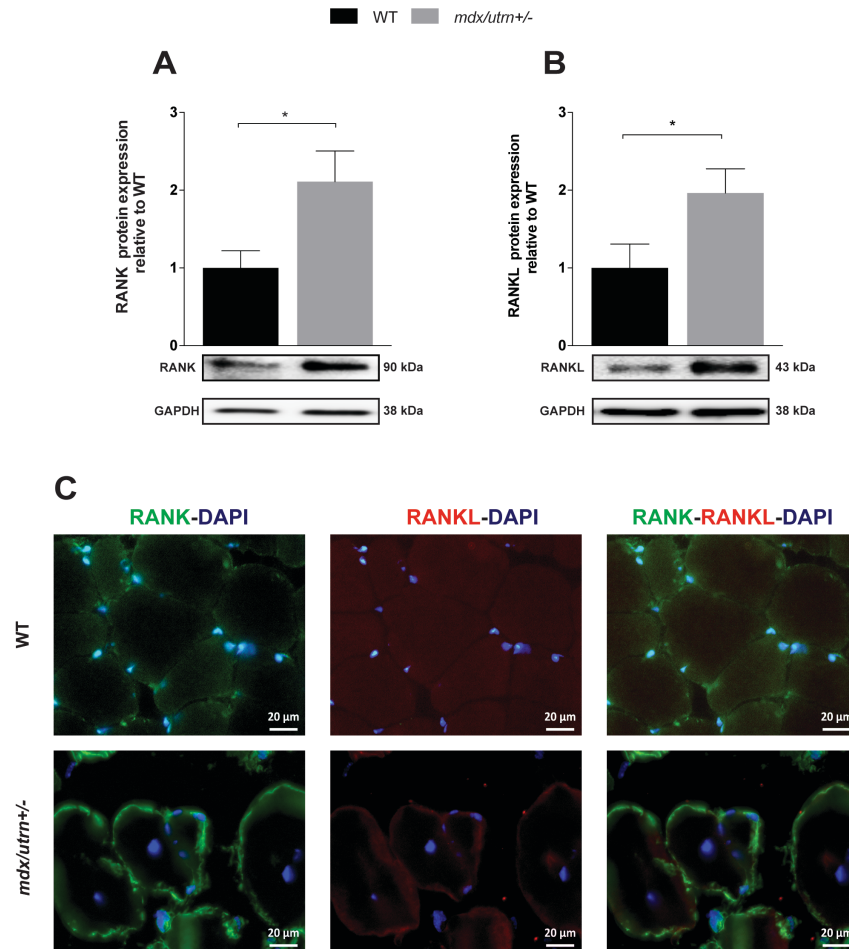


Figure 2. 1: RANK/RANKL expression is elevated in the microenvironment of dystrophic muscles.

Muscles from 5-month-old WT C57BL/10J and dystrophic mice with one functional allele for the utrophin gene (*mdx/utrn*^{+/-}) were used. RANK (A) and RANKL (B) expression in fast-twitch EDL muscles from WT and dystrophic *mdx/utrn*^{+/-} mice was analyzed by Western blotting. RANK and RANKL levels were normalized to GAPDH levels. RANK (green), RANKL (red), and DAPI (blue) staining of EDL muscle sections from dystrophic *mdx/utrn*^{+/-} and WT mice (C). RANK and, to a lesser extent, RANKL are highly expressed in the cell membrane of dystrophic EDL muscles. Data are expressed as means ± SEM. **p* < 0.05 indicates a significant difference between WT and dystrophic *mdx/utrn*^{+/-} mice; T test analysis (n=5). Scale bar = 20 μm.

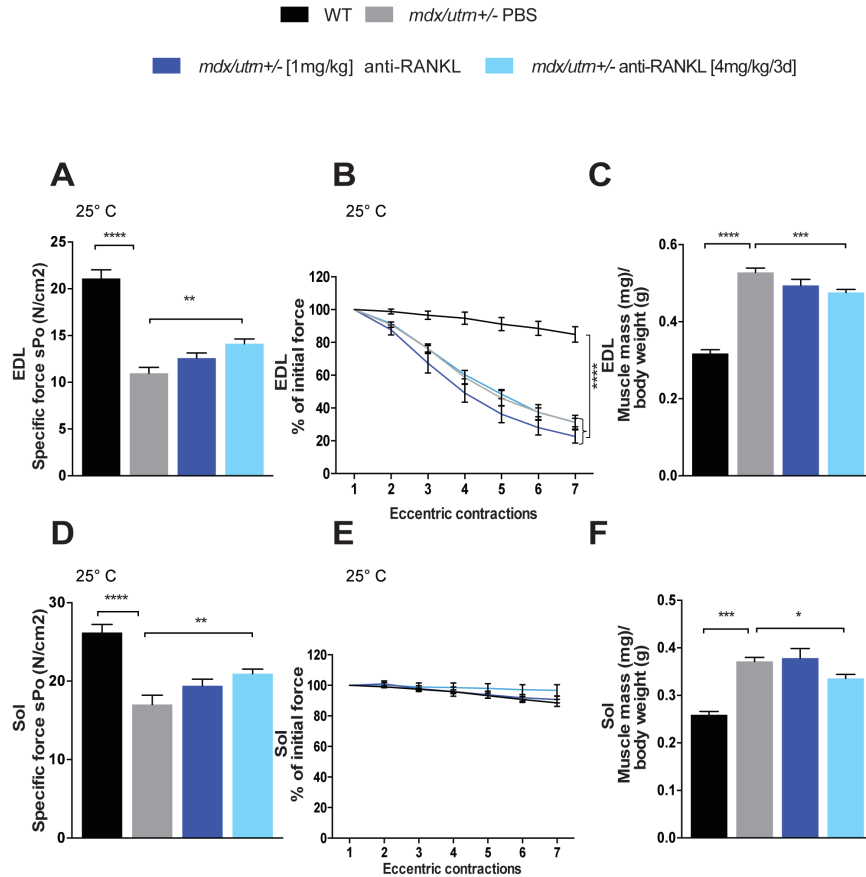


Figure 2. 2: The anti-RANKL treatment significantly improved the specific force of dystrophic muscles but failed to prevent the loss of specific force following 7 consecutive eccentric contractions.

Four-month-old dystrophic *mdx/utrn*^{+/-} mice were treated with either vehicle (PBS; phosphate-buffered saline) or with [1mg/kg/3d or 4mg/kg/3d] of anti-RANKL for 28 days. The contractile properties of the EDL and Sol muscles were evaluated *ex vivo*. The [4mg/kg/3d] of anti-RANKL treatment significantly improved the specific force (sP₀) of dystrophic EDL (A) and Sol (D) muscles compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. The EDL muscles were then subjected to 7 consecutive eccentric contractions. The anti-RANKL treatment did not protect dystrophic EDL and Sol muscles from repeated eccentric contraction-induced force loss (B and E). The [4mg/kg/3D] anti-RANKL treatment significantly decreased the muscle mass to body weight ratio of EDL (C) and Sol (F) muscles compared with PBS -treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. Muscles isolated from WT C57BL/10J mice served as controls. Data are expressed as means ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, and *****p* < 0.0001 indicate significantly different from the PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. Analysis of variance with Bonferroni's multiple comparisons test (n=6-12).

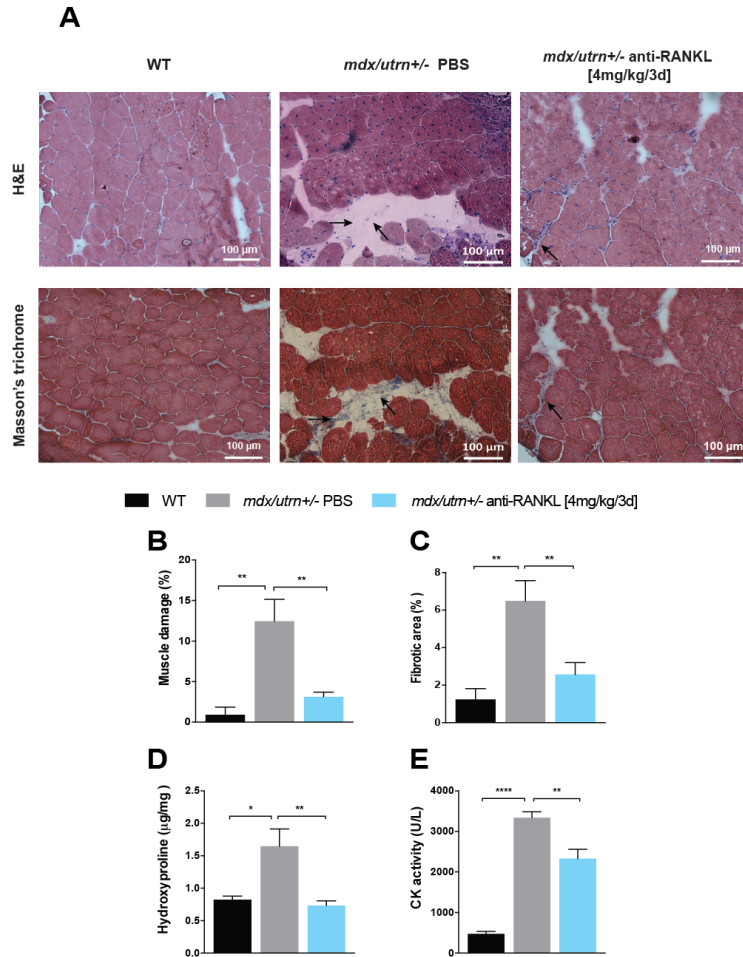


Figure 2. 3: The anti-RANKL treatment reduced the muscle damage observed in dystrophic EDL muscles.

Representative hematoxylin/eosin and Masson's trichrome-stained histological sections of EDL muscles from WT C57BL/10J and *mdx/utrn*^{+/-} mice treated with either PBS or [4 mg/kg/3d] of anti-RANKL for 28 days (A). Compared with the control PBS treatment, the anti-RANKL treatment significantly reduced the area of muscle damage indicated by the black arrows (A and B), fibrotic areas (A and C), hydroxyproline content normalized to wet muscle (D), and serum creatine kinase activity, a biomarker of muscle damage (E). Healthy EDL muscles from age-matched WT C57BL6/10J mice served as controls. Muscle damage was quantified using ImageJ software. Data are expressed as means ± SEM. Significantly different from PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and *****p* < 0.0001 indicate significantly different from PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. Analysis of variance with Bonferroni's multiple comparisons test (n=5-7). Scale bar =100 μm.

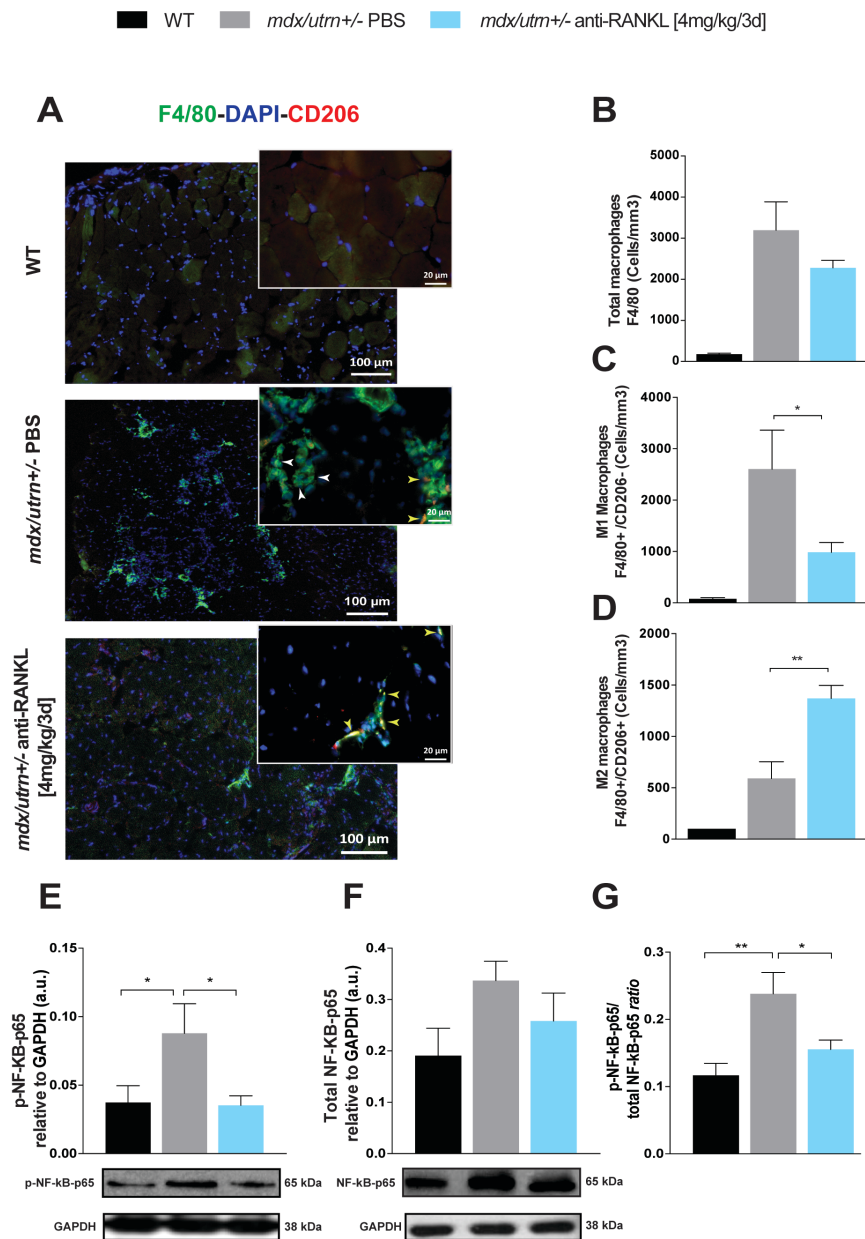


Figure 2. 4: The anti-RANKL treatment reduced inflammation in dystrophic EDL muscles.

Cross-sections of EDL muscle were labeled with anti-F4/80 (green), which binds to all macrophage phenotypes, anti-CD206 (red), which binds to M2 macrophages and satellite cells, and DAPI (blue), which binds to DNA. M1 macrophages are F4/80⁺/CD206⁻ (green) and are indicated by white arrows. M2 macrophages are F4/80⁺/CD206⁺ (orange) and are indicated by yellow arrows (A). A quantification of the total number macrophages revealed

no difference between PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice and anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice ([4mg/kg/3d] for 28 days) **(B)**. The number of M1 macrophages was significantly lower **(C)** while the number of M2 macrophages was significantly higher **(D)** in EDL muscles from anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. The expression of total NF-κB (NF-κB-p65) and phosphorylated NF-κB (p-NF-κB-p65) in the TA muscles from PBS-treated C57BL/10J, PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-}, and anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice was measured by Western blotting. Twenty-eight days anti-RANKL [4mg/kg/3d] treatment markedly reduced the level of active phosphorylated p-NF-κB-p65 and slightly reduced total NF-κB-p65 protein levels compared with PBS-treated mice **(E-F)**. The ratio of active phosphorylated p-NF-κB-p65 to the total NF-κB-p65 protein levels was significantly reduced with anti-RANKL treatment compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice **(G)**. NF-κB and p-NF-κB protein levels were normalized to GAPDH content and expressed in arbitrary units. The ratio of active p-NF-κB-p65/NF-κB-p65 was calculated from normalized western blot densities. EDL muscles from WT age-matched C57BL6/10J mice served as controls. Data are expressed as means ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and *****p* < 0.0001 indicate significantly different from PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. Analysis of variance with Bonferroni's multiple comparisons test (n=5). Scale bar =100 μm or 20 μm.

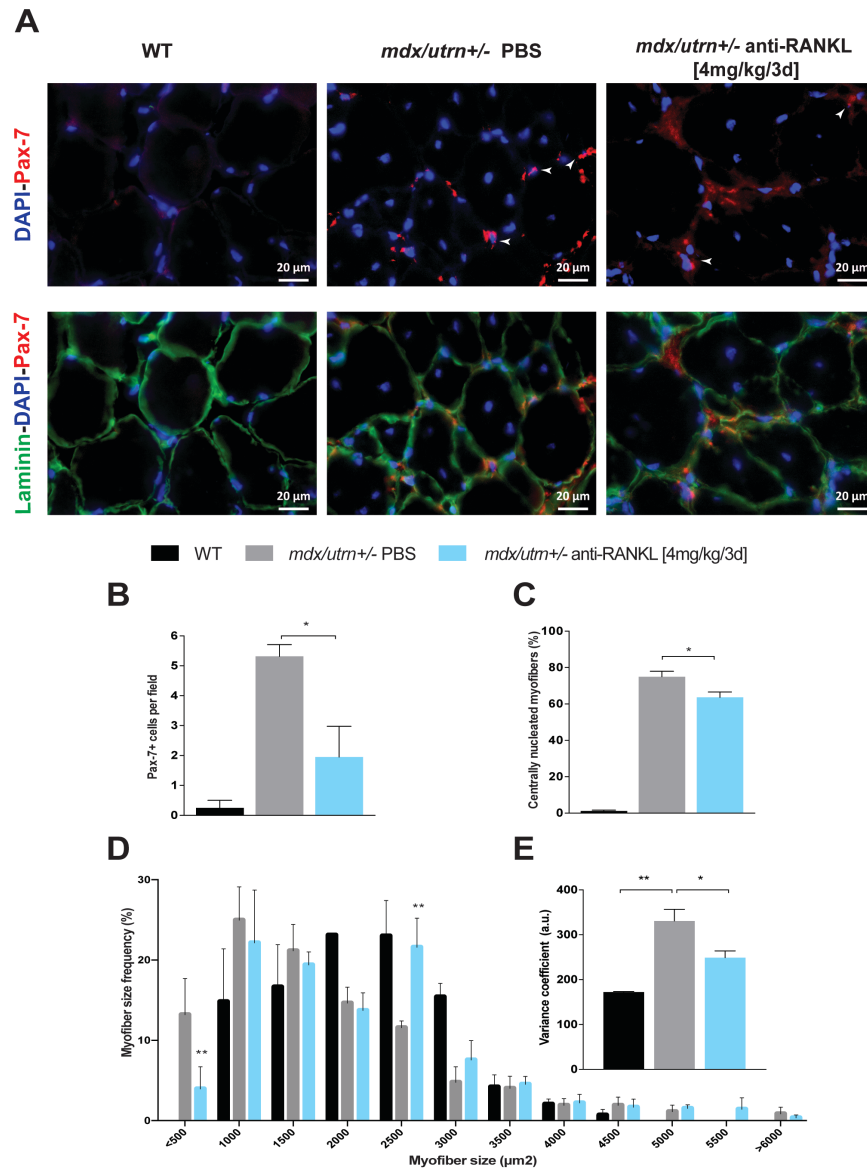


Figure 2. 5: The anti-RANKL treatment reduced satellite cell activation and promoted a more effective reconstitution of muscle fiber size.

Cross-sections of EDL muscle were labeled with anti-Pax-7 (red), which binds to satellite cells, anti-laminin (green), and DAPI (blue) (A). The arrows indicate Pax7⁺ cells. A [4mg/kg/3d] anti-RANKL treatment for 28 days significantly reduced the average number of Pax7⁺ cells (magnification 200x) (B) and centrally nucleated fibers (C) per field compared with PBS-treated EDL muscles. The fiber cross-sectional area distribution showed a slight shift toward medium-sized fibers, with a significantly reduced number of small-sized fibers in EDL muscles from anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with PBS-treated

mdx/utrn^{+/-} mice **(D)**. Variance coefficient of the muscle fiber cross-sectional area determined using the minimal 'Feret's diameter' method showed a reduced heterogeneity of muscle fiber size in EDL muscles from anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice compared with PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice **(E)** Muscles from WT C57BL/10J mice served as controls. Data are expressed as means ± SEM. **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 indicate significantly different from the PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. Analysis of variance with Bonferroni's multiple comparisons test (n=4-6). Scale bar = 20µm.

Table 2. 1: Contractile properties of EDL and Sol muscles.

Groups	EDL					Sol				
	L ₀ (mm) ± SEM	Pt (g) ± SEM	P ₀ (g) ± SEM	½ RT (ms) ± SEM	TPT (ms) ± SEM	L ₀ (mm) ± SEM	Pt (g) ± SEM	P ₀ (g) ± SEM	½ RT (ms) ± SEM	TPT (ms) ± SEM
C57BL/10J PBS	12.7 ± 0.1	8.5 ± 0.3	39.4 ± 1.3 (#)	20.5 ± 2.1	24.8 ± 2.2	11.5 ± 0.1	5.5 ± 0.6	27.4 ± 1.9	54.3 ± 4.1	49.2 ± 3.1
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} PBS	12.5 ± 0.1	9.4 ± 0.5	31.7 ± 2.3	24.4 ± 1.7	24.2 ± 1.0	10.9 ± 0.3	5.2 ± 0.3	26.1 ± 1.2	57.5 ± 3.3	50.6 ± 4.8
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} 1mg/kg/3d	13.0 ± 0.2	11.1 ± 1.1	31.6 ± 2.0	24.3 ± 0.7	24.0 ± 0.5	11.1 ± 0.3	5.5 ± 0.3	27.2 ± 1.7	47.8 ± 3.4	44.6 ± 3.1
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} 4mg/kg/3d	13.2 ± 0.1	10.2 ± 0.8	36.8 ± 2.0 (#)	22.0 ± 2.3	24.9 ± 2.1	11.8 ± 0.2	6.4 ± 0.5	26.4 ± 0.9	56.5 ± 4.2	50.0 ± 3.6

The EDL and Sol muscles were incubated *ex vivo* and their L₀ were determined. They were then electrically stimulated, and their maximal absolute force (P₀), twitch tension (Pt), half-relaxation time (½ RT), and time to peak tension (TPT) were measured. The absolute force of the EDL muscles following a [4mg/kg/3d] anti-RANKL treatment tended to be higher than that of the PBS-treated EDL muscles (#p = 0.08). No differences in other muscle contraction parameters were observed among the three groups of mice. Data are expressed as means ± SEM. Analysis of variance with Bonferroni's multiple comparisons test (n=5-12).

Table 2. 2: Dry and wet muscle mass of EDL and Sol muscles from anti-RANKL-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice.

Groups	EDL			SOL		
	Wet mass (mg) ± SEM	Dry mass (mg) ± SEM	% of water ± SEM	Wet mass (mg) ± SEM	Dry mass (mg) ± SEM	% water ± SEM
C57BL/10J PBS	10.4 ± 0.7 (****)	2.5 ± 0.1 (***)	75.4 ± 0.9 (***)	8.6 ± 0.3 (****)	2.0 ± 0.3	75.3 ± 0.6
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} PBS	17.4 ± 0.5	3.5 ± 0.2	79.6 ± 0.7	12.2 ± 0.3	2.6 ± 0.1	77.9 ± 0.7
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} 1mg/kg/3d	15.7 ± 0.8	3.3 ± 0.1	78.2 ± 1.1	11.9 ± 0.8	2.5 ± 0.3	77.4 ± 1.1
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} 4mg/kg/3d	16.0 ± 0.3 (*)	3.6 ± 0.9	77.3 ± 0.2 (*)	11.4 ± 0.3	2.8 ± 0.2	76.4 ± 1.2

EDL and Sol muscles from *mdx/utrn*^{+/-} mice have a higher muscle wet mass than those from WT mice. A [4mg/kg/3d] anti-RANKL treatment for 28 days significantly reduced the wet mass and percentage of water in EDL muscles compared with PBS. There was no difference in the dry muscle masses of EDL and Sol muscles from *mdx/utrn*^{+/-} mice. There were no differences in the Sol wet and dry muscle masses or percentages of water content between the anti-RANKL and PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice. Data are expressed as means ± SEM. Significantly different from PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice, *p<0.05, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001. Analysis of variance with Bonferroni's multiple comparisons test (n=5-12).

Table 2. 3: The mechanical properties of tibial and femoral bones.

Groups	Tibia			Femur		
	Ultimate load (N) ± SEM	Stiffness (N/mm) ± SEM	Length (mm) ± SEM	Ultimate load (N) ± SEM	Stiffness (N/mm) ± SEM	Length (mm) ± SEM
C57BL/10J PBS	17.8 ± 0.9	70.2 ± 4.1	17.9 ± 0.2	15.1 ± 0.7	64.6 ± 4.9	15.2 ± 0.1
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} PBS	16.1 ± 0.3	63.6 ± 3.1	17.8 ± 0.1	15.8 ± 0.5	62.1 ± 7.2	15.4 ± 0.1
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} 1mg/kg/3d	17.3 ± 0.7	68 ± 5.7	17.5 ± 0.3	17.1 ± 1.1	75.6 ± 9.1	17.5 ± 0.3
<i>mdx/utrn</i> ^{+/-} 4mg/kg/3d	17.6 ± 0.6	76.7 ± 4.8 (*)	18.2 ± 0.1	17.4 ± 0.6	73.5 ± 6.2	18.2 ± 0.1

The bone mechanical properties assessed using a three-point bending test at tibia and femur mid-diaphysis were similar for the PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} and WT mice. A [4mg/kg/3d] anti-RANKL treatment for 28 days significantly increased tibial stiffness compared with PBS-treated mice. Data are expressed as means ± SEM. Significantly different from PBS-treated *mdx/utrn*^{+/-} mice, **p* < 0.05. Analysis of variance with Bonferroni's multiple comparisons test (n=7-16).

Chapitre 3 : La faiblesse et l'atrophie musculaire sélective chez des souris déficientes en ostéoprotégérine

Titre original de l'article

Muscle weakness and selective muscle atrophy in osteoprotegerin-deficient mice

Authors' full names

Dounia Hamoudi¹, Zineb Bouredji¹, Laetitia Marcadet¹, Hideo Yagita² Louis-Bénédict Landry¹, Anteneh Argaw¹, and Jérôme Frenette^{1,3}

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 -Department of Immunology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan.

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

Published in: Human Molecular Genetics. 15 January 2020; Vol. 29, No. 3

Copyright: © Hamoudi et al 2020. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Funding: Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2016-05845) to JF; Jesse's Journey.

Conflict of interest statement: The authors declare that they have no competing interests.

Abbreviations

Ab, antibody; ANOVA, analysis of variance; BSA, bovine serum albumin; CSA, mean fiber cross-sectional area; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; EDL, extensor digitorum longus FL-OPG-Fc, full-length OPG fused to a Fc fragment; i.p., intraperitoneal; mAb, monoclonal Ab; MyHC, myosin heavy chain; L₀, optimal length; NF-κB, nuclear factor κB; P₀, maximum absolute force; Pt, twitch force; RANK, receptor activator of NF-κB; RANKL, RANK ligand; sP₀, maximum specific force; SPF, specific-pathogen-free; TA, tibialis anterior; TNF, tumor necrosis factor; TR-OPG-Fc, truncated OPG-Fc; WT, wild type

Résumé

La triade RANK/RANKL/OPG joue un rôle crucial dans le remodelage osseux mais peut aussi influencer la physiologie et la fonction des muscles sains et pathologiques. L'inhibition de RANKL par l'OPG prévient l'ostéoporose tandis que l'absence d'OPG entraîne une élévation du RANKL sérique et une ostéoporose précoce. Nos résultats ont montré que la suppression d'OPG et la perturbation de l'équilibre RANKL/OPG induisait une ostéoporose et une faiblesse sélective des muscles à contraction rapide à l'âge de 5 mois. Plus précisément, les souris *Opg*^{-/-} âgées de 5 mois présentaient une atrophie des myofibres de type IIb à contraction rapide, avec une surexpression de protéines impliquées dans l'atrophie telles que NF- κ B, atrogine-1 et MuRF-1. Ces dysfonctions musculaires étaient en partie atténuées par un traitement à l'anti-RANKL durant 2 mois. Le traitement de myotubes C2C12 en culture et stimulés par RANKL provoquait également une atrophie musculaire et augmentait l'expression de NF- κ B, d'atrogine-1 et de MuRF-1.

Abstract

Bone and muscle are tightly coupled and form a functional unit under normal conditions. The RANK/RANKL/OPG triad plays a crucial role in bone remodeling. RANKL inhibition by OPG prevents osteoporosis. In contrast, the absence of OPG results in elevated serum RANKL and early onset osteoporosis. However, the impacts of OPG deletion on muscle structure and function are unknown. Our results showed that 1-, 3-, and 5-month-old *Opg*^{-/-} mice have reduced tibial and femoral bone biomechanical properties and higher levels of circulating RANKL. OPG-deficient mice displayed reduced locomotor activity and signs of muscle weakness at 5 months of age. Furthermore, OPG deficiency did not affect the skeletal muscles in 1- and 3-month-old mice. However, it impaired fast-twitch EDL but not slow-twitch Sol muscles in 5-month-old *Opg*^{-/-} mice. Moreover, 5-month-old *Opg*^{-/-} mice exhibited selective atrophy of fast-twitch type IIb myofibers, with increased expression of atrophic proteins such as NF- κ B, atrogin-1, and MuRF-1. We used an *in vitro* model to show that RANKL-stimulated C2C12 myotubes significantly increased the expression of NF- κ B, atrogin-1 and MuRF-1. A two-month anti-RANKL treatment starting at 3 months of age in *Opg*^{-/-} mice improved voluntary activity, the *ex vivo* maximum specific force (sP0) of EDL muscles, and whole limb grip force performance and rescued the biomechanical properties of bone. In conclusion, the deletion of OPG and the disruption of the RANKL/OPG balance induced osteoporosis as well as the selective weakness and atrophy of the powerful fast-twitch IIb myofibers, which was partly alleviated by an anti-RANKL treatment.

3.1. Introduction

Skeletal muscle and bone mass are altered by various factors, including diet, genetics, hormones, growth factors, and mechanical stimuli to name few (1), (2), (3). Cumulative evidence suggests that skeletal muscles and bones are directly linked via paracrine and endocrine signaling (4). That is, bone resorption causes the release of growth factors such as activin A, TGF- β , and bone morphogenic protein 2 (BMP-2), which are stored in the mineralized bone matrix and which can systemically induce muscle atrophy and weakness (5), (6). However, the cellular and molecular mechanisms linking these two tissues are poorly understood.

The receptor-activator of nuclear factor κ B (RANK), the receptor-activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), and osteoprotegerin (OPG) members of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily are key regulators of bone homeostasis and remodeling (7). By binding to RANKL and preventing its interaction with RANK, OPG inhibits osteoclast development and subsequent bone resorption (8). The dynamic equilibrium in the RANKL/OPG balance is a major determinant of bone mass and density and skeletal integrity (9), (10). For example, RANKL-deficient mice present a marked increase in bone mass while targeted suppression of OPG leads to severe osteoporosis (11). In addition to bone, skeletal and cardiac muscles express RANK and/or RANKL and/or OPG (12), (13), (14), (15). We have previously shown that muscle-specific RANK deletion has inotropic effects in denervated *extensor digitorum longus* (EDL) muscles, which are largely composed of fast type IIA, IIX, and IIB myofibers, preventing the loss of maximum specific force and increasing the proportion of fast-twitch fibers (16). Moreover, pharmacological treatments of dystrophic mice with recombinant full-length OPG fused to an Fc fragment (FL-OPG-Fc) and, to a lesser extent, truncated OPG-Fc (TR-OPG-Fc) or anti-RANKL antibody protect against muscular dystrophy, suggesting that the RANK/RANKL/OPG pathway may be involved in muscle diseases (14), (15), (17).

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B), a key transcription factor required for the induction of a large number of pro-inflammatory genes, plays a critical role in the regulation of cell survival. NF- κ B is also considered as one of the most important signaling complexes linked to the loss of skeletal muscle mass in various physiological and pathophysiological

conditions (18). The activation of NF- κ B causes profound muscle wasting through an increase in the expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle (19). The RANKL/RANK interaction is one of the upstream activators of NF- κ B (7). RANKL, via the activation of NF- κ B, stimulates the expression of TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β in cardiac muscle (20) and modulates inflammation in a model of arthritis (21). Moreover, we recently demonstrated that the anti-RANKL treatment inhibits the NF- κ B pathway in dystrophic mice and reduces the frequency of small myofibers (17). Inversely, OPG secreted by type II fast myofibers potentially has an anti-inflammatory effect and protects pancreatic beta cells against TNF- α induced insulin resistance (22). Recent work has shown that 1) denosumab, an anti-RANKL, given for 3 years improves the appendicular lean mass and handgrip strength of osteoporotic women, 2) mice overexpressing RANKL present muscle atrophy, fat infiltration, inflammation, necrosis, and lower force production, 3) a TR-OPG-Fc treatment increases muscle mass in osteo/sarcopenic mice, and 4) anti-RANKL and TR-OPG-Fc treatments markedly improve glucose uptake in mice overexpressing RANKL (23). Although RANKL and OPG are important modulators of inflammation and function in several tissues, the impact of OPG deletion on skeletal muscle structure and function, surprisingly, remains a mystery.

In the present study, we investigated the effects of OPG deletion on the morphological, histological, biochemical, and functional properties of fast and slow-twitch skeletal muscles. Our findings showed that the absence of OPG does not affect the muscle function of 1- and 3-month-old OPG-deficient (*Opg*^{-/-}) mice. However, 5-month-old *Opg*^{-/-} mice exhibited significantly reduced muscle contractility and selective atrophy of type IIb myofibers, with an increased expression of atrophic proteins such as NF- κ B, atrogin-1, and MuRF-1. The treatment of 3-month-old *Opg*^{-/-} mice, which had 20 times more serum RANKL than the WT mice (C57BL/6J), with an anti-RANKL for two months significantly improved muscle function *in vivo* and *ex vivo* and rescued biomechanical bone properties. *In vitro*, RANKL stimulation of C2C12 myotubes significantly increased the expression of NF- κ B, atrogin-1, and MuRF-1. These findings indicated that the absence of OPG and the resulting increase in circulating RANKL and associated bone resorption induce skeletal muscle weakness and atrophy of the most powerful type IIb myofibers, which an anti-RANKL treatment partly alleviates.

3.2.Results

Osteoprotegerin-deficient mice have weaker bones and higher levels of circulating RANKL.

Three-point bending tests were performed at the femur mid-diaphysis and tibia to characterize the biomechanical properties of the bones. Force displacement curves obtained from the biomechanical testing (Fig. 1A) showed that the femur ultimate load (Fig. 1B), stiffness (Fig. 1C), and energy to failure (Fig. 1D) were significantly lower in 3- and 5-month-old *Opg*^{-/-} mice than in their age-matched WT counterparts. The biomechanical properties of the tibia were also significantly reduced at all ages in *Opg*^{-/-} mice compared to their age-matched WT counterparts (data not shown). As expected, the circulating levels of RANKL increased 27-, 16-, and 10-fold in 1-, 3-, and 5-month-old *Opg*^{-/-} mice compared to their age-matched WT counterparts, respectively.

Osteoprotegerin-deficient mice exhibit reduced locomotor activity and signs of muscle weakness at 5 months of age.

To characterize the locomotor activity of *Opg*^{-/-} mice, their voluntary activity was monitored in an open field using a video tracking system. The cumulative distance traveled over 180 min was significantly reduced by 28%, 47%, and 30% in 1-, 3-, and 5-month-old *Opg*^{-/-} mice compared to their age-matched WT counterparts, respectively (Fig. 2 A-C). The whole limb grip force in gram of force normalized to body mass (gF/gBM) performance of 1- and 3-month-old *Opg*^{-/-} mice and age-matched WT mice were similar. However, 5-month-old *Opg*^{-/-} mice displayed significantly lower performances (4.8 ± 0.2 gF/gBM, $p < 0.0001$) than age-matched WT mice (7.45 ± 0.4 gF/gBM) (Fig. 2D).

Osteoprotegerin deficiency reduces the contractile properties of fast-twitch EDL muscles but not slow-twitch Sol muscles at 5 months of age.

To further investigate the effect of OPG deficiency on muscle function, we assessed the *ex vivo* contractile properties of 1-, 3-, and 5-month-old *Opg*^{-/-} mice. OPG deficiency had no

effect on the *ex vivo* contractile properties of the slow-twitch Sol muscles (Fig. 3A-C). There were no differences in the *ex vivo* contractile properties of fast-twitch EDL muscles from 1- and 3-month-old *Opg*^{-/-} and age-matched WT mice. However, the twitch, the maximum isometric, and the maximum specific forces of the EDL muscles from *Opg*^{-/-} mice were significantly lower (29%, 28%, and 15%, respectively) than those of age-matched WT mice (Fig. 3A and B). The force-frequency curves of EDL muscles from *Opg*^{-/-} mice were significantly lower than those of EDL muscles from WT mice at various stimulation frequencies above 35 Hz (Fig. 3E). The EDL muscle mass was also significantly lower (10%, $p < 0.05$) in 5-month-old *Opg*^{-/-} mice compared to age-matched WT mice (Table 1).

Osteoprotegerin deficiency induces fast-twitch type IIb fiber atrophy.

Since the maximum and specific forces of EDL muscles were lower in 5-month-old *Opg*^{-/-} mice, we investigated whether OPG deficiency affects muscle morphology and phenotype. The CSA of EDL myofibers was significantly lower (21%, $p < 0.05$) in *Opg*^{-/-} mice than in WT mice (Fig. 4A). The CSA of myofibers were shifted toward lower values, with a 2- and 1.5-fold increase in the number of small myofibers (<500 and <1000 μm^2 , respectively) and a significant decrease in the number of large myofibers (2500 μm^2) (Fig. 4B). To further analyze the proportions of myofiber types, sections of EDL muscles were immunolabeled with antibodies against specific myosin heavy chain isoforms. There were no differences in the proportions of myofiber types in EDL muscles from *Opg*^{-/-} and WT mice (Fig. 4C). However, the CSA of IIb myofibers was significantly decreased, while the CSA of IIx and IIa myofibers were unchanged (Fig. 4D-E). To determine the mechanism by which OPG deficiency induces muscle atrophy, we studied the activation of the NF- κ B pathway and muscle-specific E3 ubiquitin ligases, MuRF-1, and atrogin-1 in TA muscles from *Opg*^{-/-} and WT mice. The phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B-p65 on Ser536) to total NF- κ B ratio was ~2-fold higher in *Opg*^{-/-} mice than in WT mice (Fig. 4F). MuRF-1 and atrogin-1 levels were ~1.6- and 2-fold higher in muscles from *Opg*^{-/-} mice than in muscles from WT mice (Fig. 4G and H).

The anti-RANKL treatment improves muscle function and the mechanical properties of bone in *Opg*^{-/-} mice.

We found that circulating levels of RANKL were markedly higher in *Opg*^{-/-} mice than in age-matched WT mice. We hypothesized that the higher circulating RANKL levels could account for the muscle weakness observed in *Opg*^{-/-} mice. Given that the decrease in muscle force only occurred at 5 months of age and that a prolonged treatment with mouse FL-OPG fused to a human Fc fragment (R&D systems) may cause an immune reaction, we treated the *Opg*^{-/-} mice with anti-mouse RANKL [4mg/kg/3d] for 2 months (from 3 to 5 months of age). The anti-RANKL treatment significantly increased the distance travelled over 160 and 180 min compared to PBS-treated *Opg*^{-/-} mice (30-35%, $p < 0.05$) (Fig. 5A). The whole limb grip force of anti-RANKL-treated *Opg*^{-/-} mice (7.4 ± 0.4 gF/ gBM, $p < 0.001$) was also significantly higher than that of PBS-treated *Opg*^{-/-} mice (5.25 ± 0.2 gF/ gBM) (Fig. 5B). To further investigate the effect of a two-month anti-RANKL treatment on muscle function in *Opg*^{-/-} mice, we measured the contractile properties of EDL muscles *ex vivo*. There were no differences in the twitch and maximum isometric forces of EDL muscles when *Opg*^{-/-} mice were treated with anti-RANKL (Table 2). However, the anti-RANKL treatment significantly improved the maximum specific force of EDL muscles (20.53 ± 0.5 vs. 17.73 ± 0.7 N/cm²) compared with EDL muscles from PBS-treated *Opg*^{-/-} mice (Fig. 5C). Moreover, the anti-RANKL treatment significantly reduced the time to peak tension (10%, $p < 0.05$), suggesting that modest changes in muscle fiber phenotype had occurred (Table 2). We then performed three-point bending tests at the femur mid-diaphysis to determine whether the mechanical properties of the bones were restored by the two-month anti-RANKL treatment. The ultimate load, stiffness, and energy to failure of the femur bones were significantly increased (37%, 81%, and 44%, respectively) while the circulating levels of RANKL were significantly reduced following two months of anti-RANKL injections (Fig. 5 D, E, F and G).

RANKL induces C₂C₁₂ myotube atrophy and increases the expression of the atrophic signaling pathway.

We have previously shown that the RANK receptor is expressed in differentiated C₂C₁₂ myotubes but not in proliferating C₂C₁₂ myoblasts (16). To determine whether RANKL is involved in muscle atrophy, we exposed C₂C₁₂ myotubes to 100 ng/mL of exogenous RANKL for 48 h. RANKL induced significant atrophy in treated myotubes, as shown by the reduction (11%, $p < 0.05$) in myotube CSA following a 48-h treatment (Fig. 6A). Moreover, the number of small myotubes (5-10 μm^2 and 10-15 μm^2) increased significantly by 100% and 30%, respectively, while the number of large myotubes ($>15 \mu\text{m}^2$) increased significantly (Fig. 6 B). We next treated C₂C₁₂ myotubes with 100 ng/mL RANKL for 5, 15, and 60 min and 6 h and determined the expression of atrophic signaling pathways. Our results showed that total NF- κ B (p65) content did not change while the activated form of NF- κ B (p-NF- κ B-p65 on Ser536) increased ~1.5-fold following a 15-min RANKL treatment (Fig. 6C). The protein levels of muscle-specific E3 ubiquitin-ligase, atrogin-1, and MuRF-1 also increased ~2-fold at 60 min and 6 h post-stimulation (Fig. 6D).

3.3. Discussion

Understanding the molecular link between muscle and bone is of great interest for the development of novel and dual therapeutic approaches for muscle and bone diseases. While the biomechanical and physiological linkage between the two tissues is evident and well described, the bi-directional molecular interactions are poorly understood and under-investigated. We previously showed that muscle-specific RANK deletion prevents the loss of specific force (sP0) and increases the number of fast-twitch type II fibers (16). The systemic injection of FL-OPG-Fc or anti-RANKL is effective at preventing or treating muscular dystrophy (15), (17).

In the present study, we showed that the mechanical properties of the tibial and femoral bones of 1-, 3-, and 5-month-old *Opg*^{-/-} mice are reduced compared to those of age-matched WT mice. In addition, serum RANKL levels are markedly elevated in *Opg*^{-/-} mice, which is consistent with results reported in the literature (24). The skeletal defects are associated with a significant reduction in voluntary movement observed in the open field test. Although the absence of OPG leads to reductions in bone strength and open field performances at an early age, i.e., 1 and 3 months of age, the whole limb grip force of *Opg*^{-/-} and WT mice was similar. However, 5-month-old *Opg*^{-/-} mice displayed both a significant reduction in physical performance and in whole limb grip force. Based on these observations, functional and strength testing indicate that open field testing, which solicits all skeletal and heart muscles, may be more sensitive than the whole limb grip force test for detecting early skeletal muscle changes in *Opg*^{-/-} mice.

Surprisingly, no differences in the contractile properties of slow-twitch Sol muscles from *Opg*^{-/-} and WT mice of all ages were observed. However, the contractile properties of the fast-twitch EDL muscles of 5-month-old *Opg*^{-/-} mice were significantly reduced compared to age-matched WT mice. These results are consistent with the observations that osteoporosis, osteoarthritis, and aging preferentially affect fast-twitch muscles, while cast immobilization and mechanical loading deprivation have a significant impact on slow-twitch muscles (25), (26), (27), (28). The fact that the twitch, absolute, and specific maximal forces

of EDL muscles from 1- and 3-month-old *Opg*^{-/-} mice were not affected and were similar to those of EDL muscles from WT mice suggests that intrinsic changes in contractile, morphological, and phenotypic properties occur slowly and progressively in the absence of OPG.

The present findings show that the average CSA and frequency of large myofibers (>2500 μm) in EDL muscles were significantly lower, while the frequency of small myofibers (<1000 μm) was higher in 5-month-old *Opg*^{-/-} mice than in WT mice, indicating the presence of fast-twitch muscle atrophy. Consistent with these results, we found that 5-month-old *Opg*^{-/-} mice displayed a selective reduction in the average CSA of fast-twitch type IIb fibers, the most powerful fibers, which may in part explain the weakness of EDL muscles in 5-month-old *Opg*^{-/-} mice. Interestingly, RANK/RANKL are members of the tumor necrosis factor superfamily (TNF- α), and their interaction leads to the activation of different downstream signaling pathways, including NF- κ B (29). Our findings indicated that the NF- κ B pathway, atrogin-1, and MuRF-1 are significantly upregulated in fast-twitch muscles from *Opg*^{-/-} mice compared to WT mice. NF- κ B and TNF- α are important signaling proteins that regulate skeletal muscle atrophy by increasing the expression of MuRF1 and atrogin-1 in various physiological and pathophysiological conditions (18), (30). In addition, the RANK/RANKL/OPG triad plays a key role in muscle metabolism and the development of sarcopenia (23). Mice overexpressing RANKL present muscle atrophy, fat infiltration, inflammation, necrosis, lower force production, and impairment of glucose metabolism, which are markedly improved with anti-RANKL or TR-OPG-Fc treatments (23). Furthermore, a TR-OPG-Fc treatment increased muscle mass in a model of osteo/sarcopenic mice (23). Although the authors did not precisely look at differences between slow and fast-twitch muscles in the mice overexpressing RANKL or the osteo/sarcopenic mouse model, their general results show that both phenotypes are affected and that, to some extent, slow-twitch Sol muscle express higher levels of RANKL than fast-twitch EDL muscles (23). These results contradict our recent observations on mice that are specifically deficient in muscle RANK. Indeed, muscle RANK deletion does not prevent denervation-induced muscle atrophy but significantly enhances the specific muscle force production (sP0; N/cm²) of fast-twitch EDL but not slow-twitch Sol muscles (16). In the same vein, the absence of OPG has

a significant impact on muscle mass, with selective atrophy of fast-twitch fibers in *Opg*^{-/-} mice. The discrepancy between our results and those of Bonnet *et al.* (23) may be attributable to the different mouse models used.

Bone remodeling depends on several synergistic processes (e.g., hormones, cytokines, proteases, etc.) that are responsible for bone quality control (31). Disturbances in any of these processes lead to bone dysfunction. The RANKL/OPG balance is of the utmost importance for bone health. In the present study, we treated 3-month-old *Opg*^{-/-} mice with mouse anti-RANKL antibody for two months to restore the RANKL/OPG balance. As expected, the anti-RANKL treatment significantly improved voluntary activity, the *ex vivo* maximum specific force (sP0) of EDL muscles, and whole limb grip force performances and rescued the biomechanical properties of bone. To provide additional support for a role for RANKL in muscle atrophy and dysfunction and given that myotubes express RANK, we evaluated the effect of a RANKL treatment in fully differentiated myotubes *in vitro*. Our findings showed that the RANKL treatment induces myotube atrophy (11%), rapidly activates the NF- κ B pathway, and increases the expression of atrogin-1, and MuRF-1. RANKL expression has been shown to increase in response to myocardial inflammation and to stimulate the expression of NF- κ B and TNF- α in cultured cardiomyocytes, which is in agreement with our results (20). Conversely, our previous work showed that an anti-RANKL treatment protects against skeletal muscle dysfunctions while enhancing the mechanical properties of bone in dystrophic mice (17). RANKL can directly bind to muscle cells and can influence the ubiquitin proteasome system, in particular atrogin-1 and MuRF1, two major players in muscle atrophy.

Overall, the deletion of OPG and the disruption of the RANKL/OPG balance have a major impact not only on bone but also on skeletal muscle inducing selective muscle weakness and atrophy of the powerful fast-twitch IIB myofibers. Our experimental data *in vitro* and *in vivo* support the conclusion that the RANKL cytokine induces muscle atrophy and provides a link between RANKL/OPG imbalance and synchronous bone and muscle dysfunctions.

3.4. Materials and Methods

Animals

All animal experiments were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee based on The Canadian Council on Animal Care guidelines. Male WT (C57BL/6J) and homozygote *Opg*^{-/-} (Tnfrsf11btm1Eac) mice were initially purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and were bred in our specific-pathogen-free (SPF) animal facility. The mice were housed under a 12:12-h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. The genotypes were determined by PCR using genomic DNA isolated from tail biopsies.

Muscle function was characterized in 1-, 3-, and 5-month-old *Opg*^{-/-} and WT mice using *in vivo*, and *ex vivo* approaches. *Opg*^{-/-} mice received intraperitoneal (i.p.) injections of phosphate-buffered saline (PBS) or 4 mg/kg of anti-mouse RANKL mAbs (IK22-5) every 3 days (32) from 3 to 5 months of age. EDL muscles were removed to assess their contractile properties. *Tibialis anterior* (TA) muscles were snap frozen and were stored at -80 °C for Western blot analyses. At the end of the experimental procedures, the mice were euthanized by cervical dislocation under anesthesia.

Three-point bending test

The functional properties of bone were assessed by performing a three-point bending test at mid-diaphysis using an MTS Bionix[®] servohydraulic test system (MTS Systems Corporation). The femurs and tibiae were collected at 1, 3, and 5 months of age or at the end of the anti-RANKL treatment and were placed on a set of supports 1 cm apart. The rate of displacement was 2 mm/min until failure. The load displacement curve for each bone was analyzed, and the functional properties of the bone were quantified as ultimate load, stiffness, and energy to failure. The load-displacement curve for each bone was analyzed, and the functional properties were quantified according to Novotny *et al.* (33).

Enzyme-linked immunosorbent assay

Blood collected by cardiac puncture was allowed to clot and was centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to a clean tube for a second round of centrifugation. The serum was then collected and was stored at -80°C until further analysis. The levels of circulating RANKL were assessed in the sera of 1-, 3-, and 5-month-old *Opg^{-/-}* and WT mice using a mouse TRANCE/RANKL/TNFSF11 quantikine ELISA kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

Grip force test

The whole limb grip force test was performed on 1-, 3-, and 5-month-old mice by taking advantage of their tendency to grasp a horizontal metal bar while suspended by their tails. The grid was attached to a force transducer, and the highest force produced during pulling was measured (Columbus Instruments). The test was repeated three times with at least a 1-min rest between measurements. Maximum grip force was normalized to body mass.

Open field behavioral activity measurements

Voluntary locomotor activity was measured using the ANY-maze video tracking system (Stoelting Co.) in a 50 x 50 cm open field for 180 min. The cumulative distance travelled (in meters) was recorded in the entire open field.

Assessment of skeletal muscle contractile properties

The mice were subcutaneously (s.c.) injected with 0.1 mg/kg of buprenorphine to alleviate pain and were anesthetized 15 min later with an i.p. injection of 50 mg/kg of pentobarbital sodium. The EDL muscles were gently excised, incubated in a controlled physiological environment (Krebs-Ringer supplemented with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4) at 25°C, and attached to an electrode and a force sensor. Contractile properties were measured using a 305B-LR dual-mode muscle arm system controlled by a dynamic muscle data acquisition and analysis system (Aurora Scientific Inc.). Maximum specific tetanic tension (sP₀ in N/cm²) values were obtained by normalizing the absolute force (P₀) with the CSA

using the following equation: $sP_0 = P_0/CSA$. CSA was determined by dividing the muscle mass by the product of the optimum fiber length (Lf) corresponding to the result of multiplying L_0 by the fiber length ratio (0.44 for EDL muscles and 0.71 for Sol muscles) and the muscle density (1.06 mg/mm^3). The muscle contractility results were analyzed using Dynamic Muscle Data Analysis software (Aurora Scientific Inc.).

Immunohistofluorescence analysis

EDL muscle cross-sections ($10 \mu\text{m}$) from 5-month-old mice were incubated overnight at 4°C with anti-MyHC IIa (SC-71; DSHB, undiluted), anti-MyHC IIb (BF-F3; DSHB, $5 \mu\text{g/mL}$), anti-MyHC IIx (6H1; DSHB, $5 \mu\text{g/mL}$), and anti-laminin (Sigma-Aldrich, 1:1000) antibodies diluted in blocking solution composed of PBS supplemented with 1% horse serum and 2% bovine serum albumin (BSA). The sections were washed briefly with PBS, incubated with Alexa Fluor 488 or 594-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, 1:500) for 1 h at room temperature, and washed three times for 15 min with PBS. The sections were then mounted on slides with Fluoromount-GTM and were analyzed for DAPI immunofluorescence staining using ZEN2 software and an Axio Imager M2 microscope connected to an AxioCam camera (Zeiss). Data are expressed as fiber cross-sectional area (CSA; μm^2) and percentage of fiber size frequency from up to 600 myofibers per tissue section using ImageJ (software version 1.41).

Cell cultures

C2C12 myoblasts (ATCC) were cultured in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (HyClone) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone) and 1% antibiotic-antimycotic (Life Technologies) in a 5% CO_2 and 37°C environment. When the myoblasts reached 90% confluence, the medium was replaced by high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1% fetal horse serum and 1% ITS for 5 days to allow the myoblasts to differentiate into myotubes. Mature myotubes were then treated with PBS or with 100 ng/mL of RANKL (R&D system) for 5, 15, or 60 min, 6 h or 48 h. Digital photographs were acquired from at least five different fields covering a total of 300 myotubes, and their CSA and CSA distributions were determined using ImageJ (software version 1.41).

Western blotting

TA muscles were immediately frozen after dissection. The muscles were then homogenized for 45 s on ice in RIPA lysis buffer containing a protease inhibitor cocktail (P8340; Sigma-Aldrich (Sigma-Aldric) and phosphatase inhibitors (2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, and 0.2 mM PMSF) using a PowerGen™ model 125 homogenizer (Fisher Scientific). C2C12 whole-cell lysates were also prepared using RIPA buffer. The protein content was measured using a BCA protein assay kit (EMD Chemical). Homogenates were suspended in Laemmli buffer, heated to 95°C for 2 min, separated by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Bio-Rad), blocked in 5% skim milk, and incubated overnight at 4°C with anti-NF-κB-p65 and anti-phospho-NF-κB-p65 (Ser536) (1:1000 and 1:500, respectively; Cell Signaling), atrogin-1 (1:1000; Cedarlane), and MuRF-1 (1:1000; Novusbio) primary antibodies. The membranes were washed, incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody, and visualized using an ECL-Plus imaging system (PerkinElmer). Band densities were analyzed using Quantity One software (v4.6.6, Bio-Rad) and were normalized to GAPDH.

Statistical analyses

All values are expressed as means ± SEM. The data were analyzed using a Student's t-test for comparisons with age-matched controls or a one-way ANOVA or two-way ANOVA with the Bonferroni correction for multiple comparisons (Instats Graph software version 3.1).

3.5. Acknowledgements

This work was supported by grants to JF from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2016-05845) and one important foundation, Jesse's Journey.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interests.

3.6. References

1. Joyce, N. C., Hache, L. P. and Clemens, P. R. (2012) Bone Health and Associated Metabolic Complications in Neuromuscular Diseases. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, **23**, 773–799.
2. Hamrick, M.W., Ding, K.-H., Pennington, C., Chao, Y.J., Wu, Y.-D., Howard, B., Immel, D., Borlongan, C., McNeil, P.L., Bollag, W.B., et al. (2006) Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and serum leptin. *Bone*, **39**, 845–853.
3. Owen, H.C., Vanhees, I., Solie, L., Roberts, S.J., Wauters, A., Luyten, F.P., Van Cromphaut, S., Van den Berghe, G. (2012) Critical illness-related bone loss is associated with osteoclastic and angiogenic abnormalities. *J. Bone Miner. Res.*, **27**, 1541–1552.
4. Hamrick, M. W. (2012) The skeletal muscle secretome: an emerging player in muscle–bone crosstalk. *BoneKEy Rep.*, **1**, 60.
5. Waning, D. L. and Guise, T. A. (2014) Molecular mechanisms of bone metastasis and associated muscle weakness. *Clin. Cancer Res.*, **20**, 3071–3077.
6. Waning, D. L. and Guise, T. A. (2015) Cancer-associated muscle weakness: What's bone got to do with it?. *BoneKEy Reports*, **4**, 691.
7. Boyce, B.F., Xiu, Y., Li, J., Xing, L., Yao, Z. (2015) NF- κ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinol. Metab.*, **30**, 35–44.
8. Martin, T. J. and Sims, N. A. (2015) RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **16**, 131–139.
9. Wright, H.L., McCarthy, H.S., Middleton, J., Marshall, M.J. (2009) RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.*, **2**, 56–64.
10. Boyce, B. F. and Xing, L. (2008) Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.*, **473**, 139–146.
11. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., et al. (1998) osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.*, **12**, 1260–1268.
12. Bernardi, S., Fabris, B., Thomas, M., Toffoli, B., Tikellis, C., Candido, R., Catena, C., Mulatero, P., Barbone, F., Radillo, O., et al. (2014) Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **394**, 13–20.
13. Tisato, V., Secchiero, P., Rimondi, E., Giancesini, S., Menegatti, E., Casciano, F., Zamboni, P., Zauli, G. (2013) GM-CSF Exhibits Anti-Inflammatory Activity on

- Endothelial Cells Derived from Chronic Venous Disease Patients. *Mediators Inflamm.*, **2013**, 561689.
14. Dufresne, S.S., Dumont, N.A., Bouchard, P., Lavergne, É., Penninger, J.M., Frenette, J. (2015) Osteoprotegerin Protects against Muscular Dystrophy. *Am. J. Pathol.*, **185**, 920–926.
 15. Dufresne, S.S., Boulanger-Piette, A., Bossé, S., Argaw, A., Hamoudi, D., Marcadet, L., Gamu, D., Fajardo, V.A., Yagita, H., Penninger, J.M., et al. (2018) 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.
 16. Dufresne, S.S., Dumont, N.A., Boulanger-Piette, A., Fajardo, V.A., Gamu, D., Kake-Guena, S.-A., David, R.O., Bouchard, P., Lavergne, É., Penninger, J.M., et al. (2016) Muscle RANK is a key regulator of Ca²⁺ storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, **310**, C663–C672.
 17. Hamoudi, D., Marcadet, L., Piette, A.B., Yagita, H., Bouredji, Z., Argaw, A., Frenette, J. (2019) An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice. *Hum. Mol. Genet.*, **28**, 3101–3112.
 18. Li, H., Malhotra, S. and Kumar, A. (2008) Nuclear Factor-kappa B Signaling in Skeletal Muscle Atrophy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, **86**, 1113–1126.
 19. Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Melendez, P.A., Oh, B.-C., Lidov, H.G.W., Hasselgren, P.-O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J., et al. (2004) IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, **119**, 285–298.
 20. Ock, S., Ahn, J., Lee, S.H., Park, H., Son, J.W., Oh, J.G., Yang, D.K., Lee, W.S., Kim, H.-S., Rho, J., et al. (2012) Receptor activator of nuclear factor-κB ligand is a novel inducer of myocardial inflammation. *Cardiovasc. Res.*, **94**, 105–114.
 21. Papadaki, M., Rinotas, V., Violitzi, F., Thireou, T., Panayotou, G., Samiotaki, M., Douni, E. (2019) New Insights for RANKL as a Proinflammatory Modulator in Modeled Inflammatory Arthritis. *Front. Immunol.*, **10**, 97.
 22. Rutti, S., Dusaulcy, R., Hansen, J.S., Howald, C., Dermitzakis, E.T., Pedersen, B.K., Pinget, M., Plomgaard, P., Bouzakri, K. (2018) Angiogenin and Osteoprotegerin are type II muscle specific myokines protecting pancreatic beta-cells against proinflammatory cytokines. *Sci. Rep.*, **8**, 10072.
 23. Bonnet, N., Bourgoin, L., Biver, E., Douni, E., Ferrari, S. (2019) RANKL inhibition improves muscle strength and insulin sensitivity and restores bone mass. *J. Clin. Invest.*, **129**, 3214–3223.
 24. Nakamichi, Y., Udagawa, N., Kobayashi, Y., Nakamura, M., Yamamoto, Y., Yamashita, T., Mizoguchi, T., Sato, M., Mogi, M., Penninger, J.M., et al. (2007) Osteoprotegerin Reduces the Serum Level of Receptor Activator of NF-κB Ligand Derived from Osteoblasts. *The J. Immunol.*, **178**, 192–200.
 25. Terracciano, C., Celi, M., Lecce, D., Baldi, J., Rastelli, E., Lena, E., Massa, R., Tarantino, U. (2013) Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos Int.*, **24**, 1095–1100.
 26. Novotny, S.A., Warren, G.L., Lin, A.S., Guldberg, R.E., Baltgalvis, K.A., Lowe, D.A. (2015) Aging and the Muscle-Bone Relationship. *Physiology*, **30**, 8–16.
 27. Usuki, F., Fujimura, M., Nakamura, A., Nakano, J., Okita, M., Higuchi, I. (2019) Local Vibration Stimuli Induce Mechanical Stress-Induced Factors and Facilitate

- Recovery From Immobilization-Induced Oxidative Myofiber Atrophy in Rats. *Front. Physiol.*, **10**, 759.
28. Gao, Y., Arfat, Y., Wang, H., Goswami, N. (2018) Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and Potential Countermeasures. *Front. Physiol.*, **9**, 253.
 29. Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, **423**, 337–342.
 30. Yuan, L., Han, J., Meng, Q., Xi, Q., Zhuang, Q., Jiang, Y., Han, Y., Zhang, B., Fang, J., Wu, G. (2015) Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: an in vitro and in vivo study. *Oncol. Rep.*, **33**, 2261–2268.
 31. Raggatt, L. J. and Partridge, N. C. (2010) Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J. Biol. Chem.*, **285**, 25103–25108.
 32. Kamijo, S., Nakajima, A., Ikeda, K., Aoki, K., Ohya, K., Akiba, H., Yagita, H., Okumura, K. (2006) Amelioration of bone loss in collagen-induced arthritis by neutralizing anti-RANKL monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 124–132.
 33. Novotny, S.A., Warren, G.L., Lin, A.S., Guldberg, R.E., Baltgalvis, K.A., Lowe, D.A. (2011) Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord.*, **21**, 183–193.

3.7. Figures, legends and tables

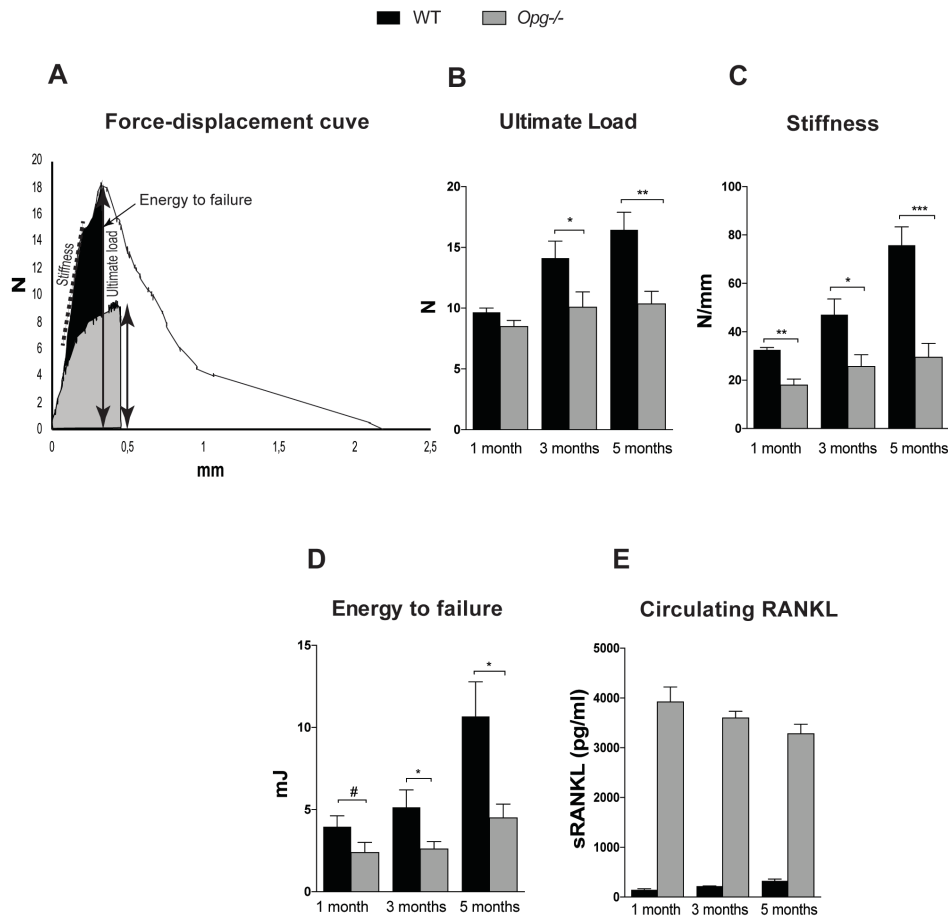


Figure 3. 1: A three-point bending test at the femur mid-diaphysis and measurements of circulating RANKL confirmed that *Opg*^{-/-} mice are osteoporotic.

Force-displacement curves obtained by three-point bending mechanical testing on the femur mid-diaphysis from wild-type (WT) and *Opg*^{-/-} mice (A). The ultimate load corresponding to the height of the curve is indicated by the red arrows, the stiffness which represents the highest slope along the linear portion prior to ultimate load is indicated by the dotted line, and the energy to failure is represented by the area under curve (A). One-, 3, and 5-month-old *Opg*^{-/-} mice exhibited lower ultimate loads (B), stiffness (C), and energy to failure (D) than WT mice. In addition, *Opg*^{-/-} mice exhibited a 15-fold increase in circulating RANKL at all ages (E). Data are expressed as means \pm SEM. # $p < 0.10$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ indicate significantly different from the age-matched control group using Student's t-test (n=5-8).

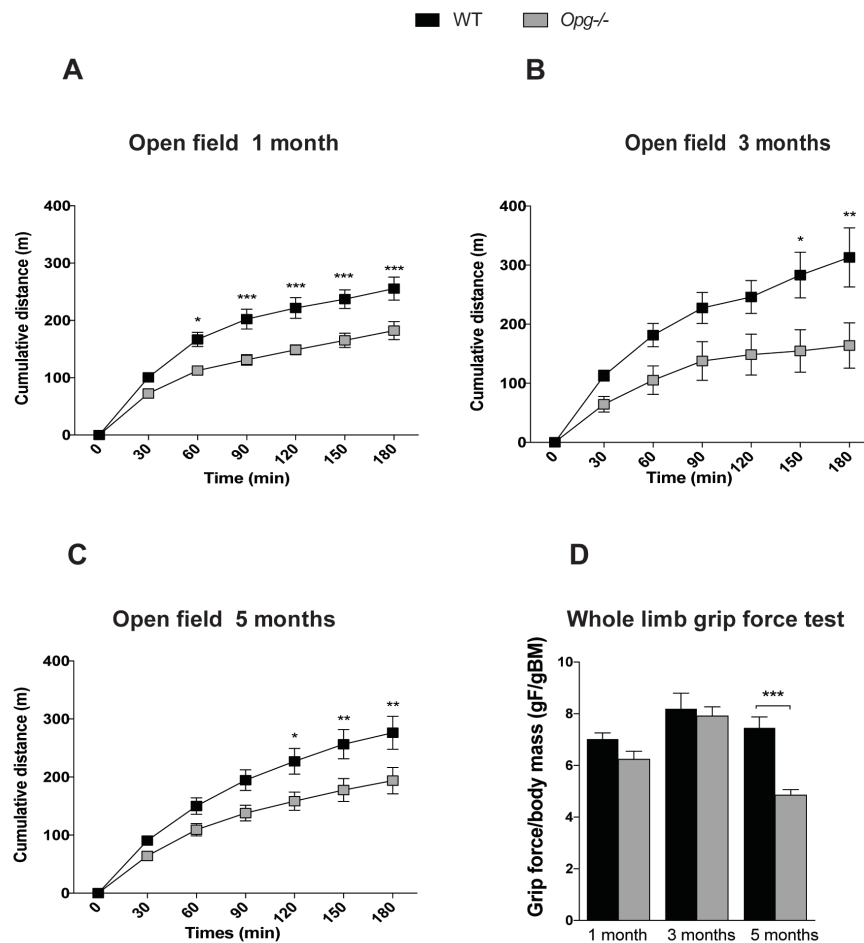


Figure 3. 1: *Opg*^{-/-} mice travelled shorter distances and were weaker than WT mice at 5 months of age.

Opg^{-/-} mice travelled significantly lower cumulative distances over 180 min in an open field chamber at 1 (A), 3 (B), and 5 months of age (C) compared to their age-matched WT counterparts. Whole limb grip force performances were similar for the 1- and 3-month-old *Opg*^{-/-} and WT mice. However, the 5-month-old *Opg*^{-/-} mice exhibited significantly lower limb force than their age-matched WT counterparts (D). Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ indicate significantly different from the age-matched control group using Student's t-test or a two-way ANOVA with the Bonferroni correction for multiple comparisons (n=5-8).

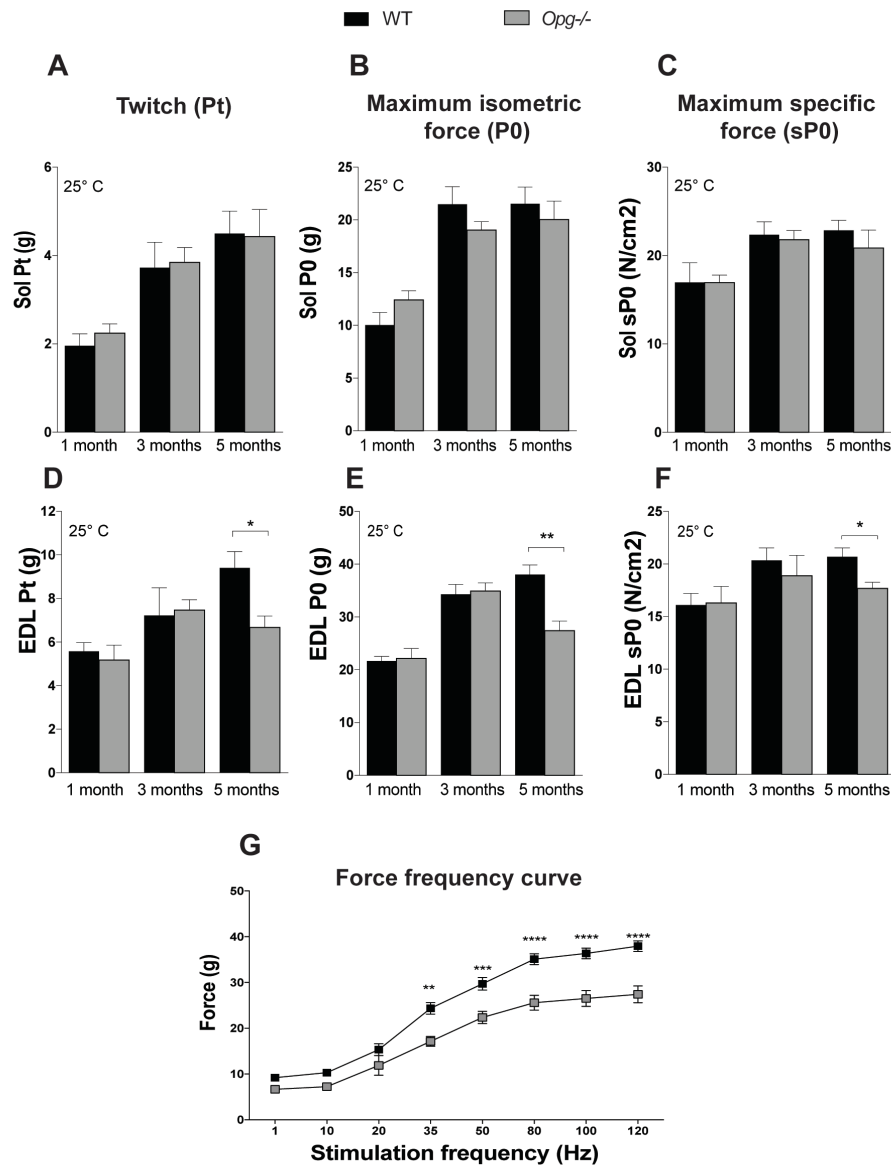


Figure 3. 2: Ex vivo contractile properties of fast and slow-twitch muscles from *Opg*^{-/-} and WT mice.

The contractile properties of the fast-twitch *extensor digitorum longus* (EDL) and slow twitch soleus (Sol) muscles from 1-, 3-, and 5-month old *Opg*^{-/-} and WT mice were evaluated *ex vivo*. The twitch (A), maximum isometric (B), and specific forces (C) of the Sol muscles from *Opg*^{-/-} and WT mice were similar at all ages. However, the twitch (D), maximum isometric (E), and specific forces (F) of the EDL muscles from 5-month-old *Opg*^{-/-} mice were significantly lower than those of 5-month-old WT mice. There were no differences in the contractile properties of EDL muscles from 1- and 3- month-old *Opg*^{-/-} and WT mice. In

addition, the force frequency curves of the EDL muscles from 5-month-old *Opg*^{-/-} mice exhibited a marked decrease in force production compared to their age-matched WT counterparts (**G**). Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ indicate significantly different from controls using Student's t-test or two-way ANOVA with the Bonferroni correction for multiple comparisons (n=5-8).

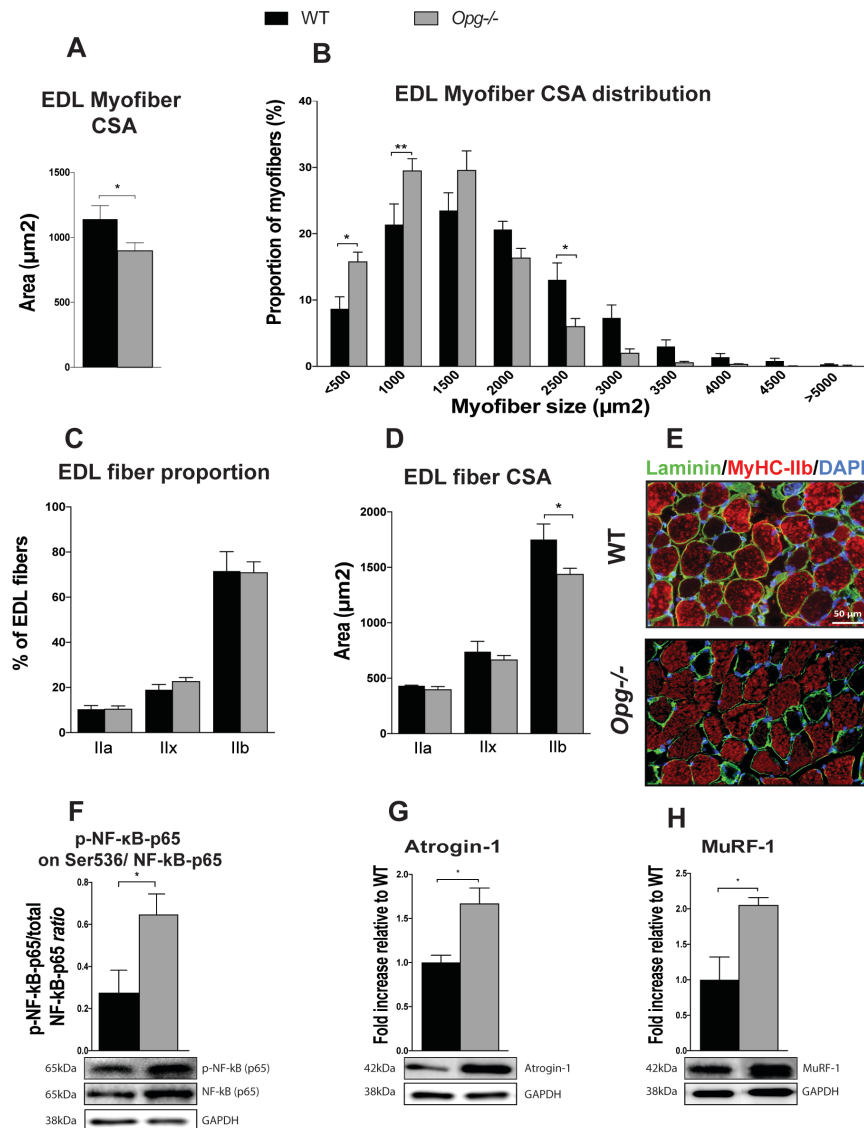


Figure 3. 3: OPG deficiency impacted extensor digitorum longus myofiber morphology and phenotype.

Fiber cross-sectional area measurements of EDL muscles showed that myofibers from *Opg*^{-/-} mice are atrophied compared to those of WT mice (A). The myofiber cross-sectional area distribution showed a reduced number of large fibers (2500 μm^2) and a significantly increased number of small fibers (<1000 μm^2) in EDL muscles from *Opg*^{-/-} mice compared to EDL muscles from WT mice (B). Cross-sections of EDL muscles from 5-month-old *Opg*^{-/-} and WT mice were immunostained using monoclonal antibodies specific for the different fast-twitch myosin heavy chain isoforms (MyHC IIa, MyHC IIx, and MyHC IIb). The proportions of IIa, IIb, and IIx fibers in the EDL muscles of *Opg*^{-/-} and WT mice were similar

(C). The cross-sectional area of type IIB fibers in the EDL muscles of *Opg*^{-/-} mice was significantly lower than that of WT mice (D) as confirmed by immunofluorescence staining of cross-sections of EDL muscle labeled with anti-MyHC IIB (red), anti-laminin (green), and DAPI (blue) (E). Scale bar = 50 μm. The cross-sectional areas of type IIA and IIB fibers were the same for EDL muscles from *Opg*^{-/-} and WT mice. Western blots of fast-twitch *tibialis anterior* (TA) muscles showed that the ratio of active phosphorylated p-NF-κB-p65 to total NF-κB-p65 protein levels was significantly higher in *Opg*^{-/-} TA muscles than in WT TA muscles (F). The expression of atrogin-1 (G) and MuRF-1 (H) was significantly higher in *Opg*^{-/-} muscles than in WT muscles. Protein expression levels were normalized to GAPDH and were expressed relative to WT controls. The ratio of active p-NF-κB-p65/NF-κB-p65 was calculated from normalized Western blot densities. Data are expressed as means ± SEM. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, and *****p* < 0.0001 indicate significantly different from controls using Student's t-test (n=5-8).

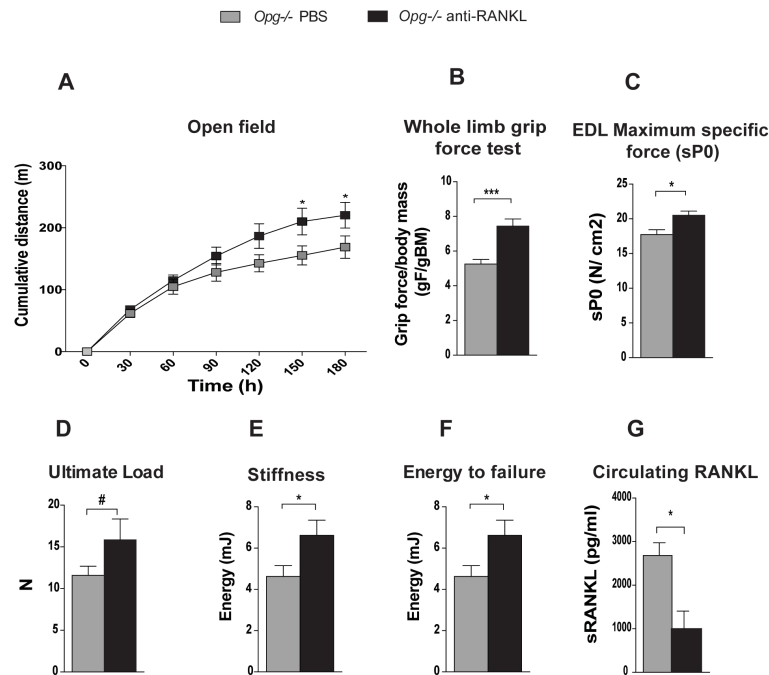


Figure 3. 4: The anti-RANKL treatment significantly improves muscle function and restores the mechanical properties of bone in *Opg*^{-/-} mice.

Three-month-old *Opg*^{-/-} mice were treated with either anti-RANKL [4mg/kg/3d] or vehicle (PBS; phosphate-buffered saline) for two months. The anti-RANKL treatment significantly increased open field activity as indicated by the cumulative distance traveled over 180 min compared with PBS-treated mice (A). Whole limb grip force performances of *Opg*^{-/-} mice were also significantly higher following the anti-RANKL treatment (B). The contractile properties of the EDL muscles were evaluated *ex vivo*. EDL muscles from anti-RANKL-treated *Opg*^{-/-} mice displayed a significant improvement in specific force (sP₀) compared with EDL muscles from PBS-treated *Opg*^{-/-} mice (C) The mechanical properties of bone assessed using a three-point bending at femur mid-diaphysis showed that two months anti-RANKL treatment tended to improve the ultimate load (#p=0.1) (D), and significantly increased stiffness (E) and energy to failure (F) and significantly reduced the circulating RANKL levels (G) compared with PBS-treated *Opg*^{-/-} mice. Data are expressed as means ± SEM. #p < 0.1, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001 indicate significantly different from the PBS-treated *Opg*^{-/-} mice using Student's t-test or a two-way ANOVA with the Bonferroni correction for multiple comparisons (n=7-10).

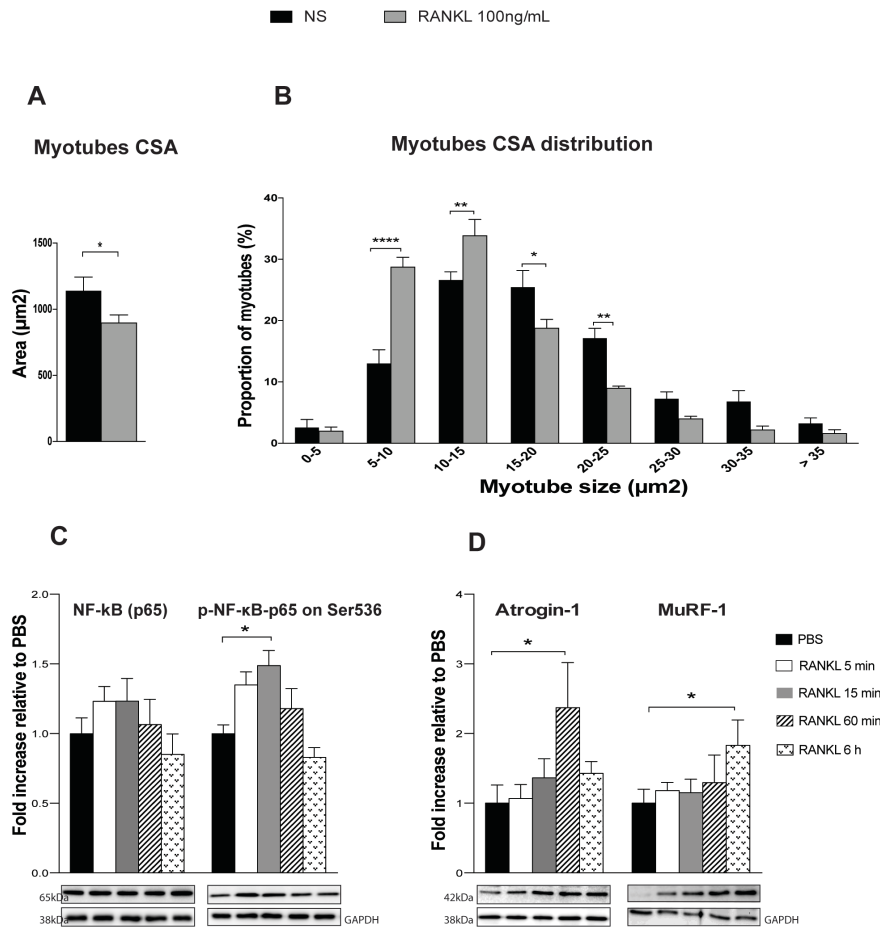


Figure 3. 5: RANKL induced myotube atrophy *in vitro*.

C₂C₁₂ myotubes were treated with either RANKL [100 ng/mL] or PBS for 48 h. The RANKL treatment induced myotube atrophy as indicated by a lower cross-sectional area (CSA) (A). Myotube CSA distributions showed that a 24-h RANKL treatment significantly increased the number of small (5-15 μm^2 CSA) myotubes and reduced the number of large (>15 μm^2 CSA) myotubes (B). A Western blot analysis showed that phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B-p65 on Ser536) levels were significantly higher in C₂C₁₂ myotubes treated with RANKL for 15 min, while total NF- κ B (p65) levels remained the same (C). atrogin-1 and MuRF-1 protein levels were also significantly higher in C₂C₁₂ myotubes treated with RANKL for 60 min and 6 h (D). Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and **** $p < 0.0001$ indicate significantly different from controls using Student's t-test analysis for two groups and a one-way ANOVA analysis of variance with the Bonferroni correction for multiple comparisons (n=5-7).

Table 3. 1: Body mass and morphological characteristics of *extensor digitorum longus* and soleus muscles at 1, 3, and 5 months of age.

	1 Month		3 Months		5 Months	
	WT	<i>Opg</i> ^{-/-}	WT	<i>Opg</i> ^{-/-}	WT	<i>Opg</i> ^{-/-}
Body mass (g)	19.3 ± 0.7	18.1 ± 0.4	26.8 ± 0.5	23.6 ± 0.5 (***)	30 ± 0.8	27.3 ± 0.5 (*)
EDL mass (mg)	7.1 ± 0.3	6.8 ± 0.2	10.19 ± 0.4	9.8 ± 0.1	11.3 ± 0.2	10.2 ± 0.3 (*)
EDL L0 (mm)	11.3 ± 0.2	10.8 ± 0.3	12.6 ± 0.2	12.1 ± 0.2	13.3 ± 0.1	12.7 ± 0.2
Sol mass (mg)	4.9 ± 0.3	5.5 ± 0.2	8.1 ± 0.3	7.2 ± 0.4	9.2 ± 0.3	8.5 ± 0.3
Sol L0 (mm)	10.6 ± 0.3	10.2 ± 0.2	11.4 ± 0.1	11.3 ± 0.1	12.4 ± 0.2	11.7 ± 0.3

The body masses of 3-, and 5-month-old *Opg*^{-/-} mice were significantly lower than those of their age-matched WT counterparts. The EDL muscle masses of 1- and 3-month-old *Opg*^{-/-} and WT mice were similar but were significantly lower in 5-month-old *Opg*^{-/-} mice than in 5-month-old WT mice. Data are expressed as means ± SEM. **p* < 0.05 indicates significantly different from controls using Student's t-test (n=7-11).

Table 3. 2: Morphological and contractile properties of EDL muscles.

Groups	EDL					
	Muscle mass (mg) ± SEM	L ₀ (mm) ± SEM	Pt (g) ± SEM	P ₀ (g) ± SEM	½ RT (ms) ± SEM	TPT (ms) ± SEM
C57BL/6J PBS	11.3 ± 0.2 (*)	13.3 ± 0.1	9.2 ± 0.5	37.9 ± 1.1	21.4 ± 1.1	22.1 ± 0.4 (#)
<i>Opg</i> ^{-/-} PBS	10.2 ± 0.3	12.7 ± 0.2	7.7 ± 0.5	30.6 ± 1.8	19.8 ± 1.0	23.5 ± 0.5
<i>Opg</i> ^{-/-} anti-RANKL	9.4 ± 0.3	12.8 ± 0.1	7.7 ± 0.3	32.5 ± 1.2	19.5 ± 1.3	21.2 ± 0.6 (*)

The EDL muscles were incubated *ex vivo* in a controlled physiological environment (Krebs-Ringer supplemented with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4) at 25°C, and their L₀ were determined. The EDL muscles were then electrically stimulated, and the twitch tension (Pt), maximal absolute force (P₀), half-relaxation time (½ RT), and time to peak tension (TPT) were recorded. The anti-RANKL treatment significantly reduced the TPT of the anti-RANKL-treated EDL muscles compared to the PBS-treated EDL muscles. No differences in other muscle contraction parameters were observed. Data are expressed as means ± SEM. #*p* < 0.1, **p* < 0.05, indicate significantly different from PBS-treated *Opg*^{-/-} mice using one-way ANOVA with the Bonferroni correction for multiple comparisons (n=7-10).

Discussion

1. Cibler l'unité muscle-os, faire d'une pierre deux coups dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne

La proximité physique et la communication moléculaire bidirectionnelle entre les muscles squelettiques et les os suscite un intérêt grandissant de la part de la communauté scientifique. Néanmoins, peu d'études ont été menées pour parvenir à des conclusions définitives sur la manière dont les interactions muscle-os et les molécules d'origine musculaire (myokines) et d'origine osseuse (ostéokines) impactent la physiopathologie de ces deux tissus. La DMD est l'un des meilleurs exemples de synchronicité où la dégénérescence/atrophie musculaire et la perte osseuse se produisent simultanément tout au long de la progression de la maladie. Bien qu'il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour la DMD, le traitement aux GCs représente aujourd'hui la norme de soins qui permet d'améliorer la qualité de vie des patients. Par contre, les cliniciens sont très conscients de la forte ostéotoxicité de ces médicaments. La voie RANK/RANKL/OPG est au centre de l'intrigante communication moléculaire os-muscle dans les conditions physiopathologiques. Ainsi, l'objectif principal de la présente thèse est d'exploiter cette voie afin de comprendre les mécanismes d'action de ces cytokines sur la physiopathologie musculaire et d'établir une stratégie thérapeutique pour la DMD en traitement unique ou combiné aux GCs.

2. Un traitement à l'anti-RANKL réduit l'inflammation et le dysfonctionnement musculaire et renforce les os chez les souris dystrophiques

Nous avons précédemment montré que les muscles EDL et les myotubes dérivés des C₂C₁₂ expriment la protéine RANK et que les taux d'ARNm de RANK sont 5 fois plus élevés dans les muscles EDL dystrophiques comparativement aux muscle contrôles (190), (243). Pour étudier la contribution de la voie RANK/RANKL dans la dysfonction musculaire, nous avons d'abord évalué l'expression des protéines RANK et de RANKL dans les muscles de souris *mdx/utrn*^{+/-}, décrit comme un modèle plus sévère de DMD. En effet, plusieurs études ont démontré que l'inflammation et la fibrose des muscles squelettiques des souris *mdx/utrn*^{+/-} sont plus prononcées comparativement au modèle classique des souris *mdx* (130),(131). Nous avons montré, dans le chapitre 2, que les niveaux protéiques de RANK et RANKL sont très

élevés dans le microenvironnement des muscles EDL dystrophiques par rapport aux muscles contrôles. De ce fait, nous avons investigué l'impact de la neutralisation systémique à long terme de RANKL sur l'intégrité et la fonction musculaire et osseuse des souris *mdx/utrn*^{+/-}. Nous avons donc traité par injections intrapéritonéales les souris *mdx/utrn*^{+/-} adultes âgées de 4 mois, avec des doses croissantes d'anticorps anti-RANKL (IK22-5) chaque 3 jours (244)(243)(242)(241)(240)(239)(244). Nous avons fait la démonstration qu'un traitement de 28 jours avec une dose de [4 mg/kg/3j] d'anti-RANKL est plus efficace que la dose de [1 mg/kg/3j] pour améliorer la force spécifique maximale *ex vivo* (sP0) des muscles dystrophiques EDL et Sol. Une 3^e dose de [8 mg/kg/ 3j] d'anti-RANKL a été également testée et les résultats n'ont pas été présentés parce que cette dose n'a pas produit un gain de force supplémentaire. Nous avons constaté que malgré la pathologie, il n'y avait aucune différence dans la force isométrique absolue (P0) des muscles EDL et Sol des souris *mdx/utrn*^{+/-} par rapport à leurs contrôles respectifs. Ceci suggère, comme montré par des études précédentes, que les mécanismes d'hypertrophie compensatoire pourraient en partie expliquer le maintien de la force absolue des souris *mdx/utrn*^{+/-} (245). Le traitement à l'anti-RANKL n'a pas réussi à augmenter significativement la force absolue (P0) des muscles EDL et Sol dystrophiques ou à protéger les muscles EDL dystrophiques d'une perte de force suite aux contractions excentriques répétées. Cependant, nous avons montré que le traitement avec une dose de [4 mg/kg/3j] d'anti-RANKL réduit la teneur en eau des muscles, suggérant que le gain de la force spécifique pourrait être attribuable à une réduction de la masse musculaire, c'est-à-dire une diminution de l'œdème musculaire, une fibrose ou une infiltration de gras. Nous nous sommes donc concentrés sur les muscles EDL de souris *mdx/utrn*^{+/-} traités avec une dose de [4 mg/kg/3j] d'anti-RANKL pour la suite des investigations. Effectivement, nous avons montré que les gains de force spécifique avec le traitement à l'anti-RANKL, étaient accompagnés d'une réduction significative des dommages musculaires, des taux sériques de CK, et de la fibrose musculaire suggérant que l'intégrité des muscles dystrophiques était améliorée. Collectivement, ces résultats confirment notre hypothèse, selon laquelle RANK/RANKL serait impliquée dans le dysfonctionnement musculaire dans la DMD et qu'une inhibition systémique de RANKL réduit l'œdème musculaire, améliore l'intégrité et augmente ainsi de manière indirecte la force spécifique des muscles dystrophiques.

Bien que l'implication de RANKL dans l'inflammation et le dysfonctionnement dans les muscles dystrophiques ne soit pas encore entièrement comprise, des modèles d'arthrite inflammatoire ont montré que le rôle de RANKL ne se limite pas qu'à l'induction de l'ostéoclastogenèse et de la résorption osseuse et indiquent que RANKL peut être un modulateur pro-inflammatoire sous-estimé (195). De plus, il est documenté que RANKL est une molécule chimiotactique des monocytes/macrophages (246), et sa présence augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires et du phénotype des macrophages pro-inflammatoires M1 (247). Nous avons donc émis l'hypothèse que le traitement anti-RANKL pourrait ralentir la progression de la pathologie en réduisant l'inflammation excessive et en activant le changement du phénotype des macrophages. Nos résultats ont montré que le traitement à l'anti-RANKL réduit significativement le nombre de macrophages M1 (F4/80⁺/CD206⁻) et augmente le nombre de macrophages M2 (F4/80⁺/CD206⁺) dans les muscles EDL dystrophiques. Les macrophages M1 sont associés à la dégénérescence musculaire et les macrophages M2 sont associés à la croissance, la réparation et à la régénération musculaire, ce changement de phénotype des macrophages après le traitement à l'anti-RANKL devrait empêcher une dégénérescence musculaire supplémentaire et/ou favoriser la réparation musculaire. En effet, nous avons montré que le traitement anti-RANKL réduit significativement le pourcentage de noyaux centraux, la fréquence des petites myofibrilles <500 µm, l'hétérogénéité de la taille des myofibrilles et le nombre de cellules satellites, suggérant que l'anti-RANKL réduit l'étendue des dégâts provoqués par le cercle vicieux de dégénérescence/régénération musculaire caractéristique des souris dystrophiques. Il est bien connu que RANKL fait partie de la superfamille du TNF et que TNF- α , est un activateur important des cellules satellites et un inhibiteur de la différenciation myogénique (248), (249). Nos résultats, selon lesquels le traitement anti-RANKL réduit le nombre de cellules satellites suggèrent que RANKL pourrait jouer un rôle similaire que celui de TNF- α dans le contexte de la dystrophie musculaire. De plus, la suppression spécifique de TRAF-6, une protéine essentielle à la signalisation de RANK/RANKL en aval, améliore la force musculaire, réduit la nécrose des fibres et l'infiltration des macrophages et inhibe la voie NF- κ B chez les souris dystrophiques *mdx* (199). Cette étude soutient notre hypothèse sur le rôle potentiel de l'interaction RANKL/RANK dans l'activation de l'inflammation des souris dystrophiques. De plus, une étude a démontré que l'expression de RANKL augmente à la

suite d'une surcharge de pression dans un modèle de constriction aortique transversale (TAC) et stimule l'expression de TNF- α , IL-1 α et IL-1 β dans les cardiomyocytes en culture (194). Fait intéressant, une seule injection d'anti-RANKL est suffisante pour réduire l'expression des cytokines pro-inflammatoires après la TAC (194). Pour déterminer le mécanisme par lequel l'anti-RANKL réduit l'inflammation musculaire chez les souris *mdx/utrn*^{+/-}, nous avons étudié l'effet du traitement sur l'activation de la voie NF- κ B dans les muscles *tibialis anterior* (TA) dystrophiques. Nous avons montré que le traitement à l'anti-RANKL inhibe la voie NF- κ B en réduisant son activation par phosphorylation de la sous-unité p65. Notre choix de cibler celle-ci repose essentiellement sur les études qui ont montré que la voie NF- κ B est fortement activée et son inhibition pharmacologique ou la délétion de la sous unité p65 améliore les fonctions des muscles squelettiques et cardiaques dystrophiques (250), (251), (252). Globalement, ces résultats ont montré que le traitement à l'anti-RANKL favorise le changement de phénotype des macrophages vers un profil M2 anti-inflammatoires et non cytotoxiques et inhibe la voie NF- κ B et les dommages musculaires, améliorant ainsi la fonction des muscles dystrophiques.

Plusieurs études ont montré que les souris dystrophiques présentent une faible densité minérale osseuse et une fragilité osseuse en fonction de la sévérité de la pathologie (171), (172), (173). Basé sur ces études et sur le fait que l'anti-RANKL soit prescrit pour le traitement de l'ostéoporose, nous avons émis l'hypothèse que le traitement à l'anti-RANKL pourrait préserver les os des souris dystrophiques. Nos résultats ont démontré que le traitement à l'anti-RANKL durant 28 jours augmente significativement la rigidité mécanique des *tibiae*, mais ne modifie pas les autres paramètres biomécaniques osseuses. Les modifications limitées des propriétés mécaniques des os ne sont pas surprenantes puisque l'os n'est pas aussi actif métaboliquement que le muscle squelettique. De plus, il n'y a pas de consensus dans la littérature sur l'âge précis de l'apparition des premiers signes de faiblesse osseuse chez la souris dystrophique. Par contre, un traitement prolongé de 18 mois à l'anti-RANKL améliore la densité minérale osseuse, réduit le taux circulant des marqueurs de la résorption et augmente le taux circulant des marqueurs de la formation osseuse chez un garçon atteint de DMD et traité aux GCs (239). De plus, une autre étude a montré que le traitement durant 2 ans à l'anti-RANKL améliore la densité minérale osseuse, la mobilité, et réduit le taux de fracture chez des enfants atteints d'ostéogenèse imparfaite (253).

L'éventualité que l'anti-RANKL puisse avoir un double effet sur les muscles squelettiques et les os a été évoquée et illustrée par les travaux récents du laboratoire de Ferrari et ces collaborateurs qui ont rapporté qu'un traitement de 3 ans au denosumab, mais pas aux bisphosphonates, augmente la masse maigre et la force de préhension des femmes ostéoporotiques en postménopause (254). En utilisant un modèle de souris surexprimant RANKL ils ont montré que les souris présentaient une atrophie musculaire, une infiltration de graisse, une inflammation, une nécrose et une diminution de la fonction musculaire (254). Les évidences de la présente étude et d'autres soutiennent ainsi notre hypothèse principale que l'anti-RANKL puisse préserver à la fois les fonctions osseuses et musculaires squelettiques dans le contexte de l'ostéoporose et du DMD.

3. La faiblesse et l'atrophie musculaire sélective chez des souris déficientes en ostéoprotégérine

Dans le chapitre 3 de cette thèse, nous avons voulu étudier le rôle physiologique de l'OPG sur la fonction et le phénotype des fibres musculaires. Cette étude est justifiée par les résultats précédents qui ont montré que : la délétion de RANK musculaire protège contre la perte de force spécifique (sP0) et augmente le nombre des fibres de type II à contraction rapide (190), que l'injection systémique de FL-OPG-Fc ou l'anti-RANKL présenté au chapitre 2, est efficace pour prévenir ou traiter la dystrophie musculaire (243), (255). Nous avons donc caractérisé l'effet de la délétion de l'OPG sur la morphologie, le phénotype et la fonction des muscles à contraction rapide et lente des souris. Puisque les souris *Opg*^{-/-} mâles et femelles ne survivent pas au-delà de 5 à 6 mois (146), nous avons choisi d'utiliser des souris *Opg*^{-/-} âgées de 1, 3 et 5 mois. Les souris mâles ont été également préférées dans cette étude dans le but de comprendre et d'extrapoler nos résultats avec ceux obtenus sur les souris dystrophiques. Nous avons ainsi montré que les propriétés mécaniques des os des souris *Opg*^{-/-} âgées de 1, 3 et 5 mois étaient réduites par rapport à celles des souris contrôles du même âge. En outre, les taux sériques de RANKL étaient nettement élevés chez les souris *Opg*^{-/-}, ce qui est cohérent avec les résultats rapportés dans la littérature (256). Cette faiblesse osseuse était associée à une réduction significative de l'activité volontaire à tous les âges étudiés. L'activité volontaire reflète la fonction locomotrice et celle-ci est régulièrement utilisée comme indicateur fonctionnel. Cependant, les forces de préhension des quatre pattes

des souris *Opg^{-/-}* âgées de 1 et 3 mois étaient similaires à celles des souris contrôles du même âge. Par contre, les souris *Opg^{-/-}* âgées de 5 mois présentaient à la fois une réduction significative de la performance physique et de la force de préhension des quatre pattes. Sur la base de ces observations, les tests fonctionnels et de force indiquent que l'activité volontaire qui sollicite tous les muscles squelettiques et cardiaques est plus sensible que le test de force de préhension des pattes pour détecter les changements précoces des muscles squelettiques chez des souris *Opg^{-/-}*.

Pour étudier plus en détails les effets de la délétion de l'OPG sur la fonction musculaire, nous avons évalué les propriétés contractiles *ex vivo* des muscles EDL à contraction rapide et Sol à contraction lente des souris *Opg^{-/-}* âgées de 1, 3 et 5 mois. La délétion de l'OPG n'a eu aucun effet sur les propriétés contractiles *ex vivo* des muscles Sol. Et ce à n'importe quel âge étudié. Cependant, les propriétés contractiles des muscles EDL à contraction rapide des souris *Opg^{-/-}* âgées de 5 mois étaient significativement réduites par rapport aux souris contrôles du même âge. Ces résultats sont cohérents avec les observations selon lesquelles l'ostéoporose, l'arthrose et le vieillissement affectent préférentiellement les muscles à contraction rapide, tandis que l'immobilisation et le manque de stimuli mécanique ont un impact significatif sur les muscles à contraction lente (257), (29), (30), (258). Finalement, l'absence de perte de force des souris *Opg^{-/-}* de moins de 3 mois suggère que les changements intrinsèques dans la contractilité et les propriétés morphologiques et phénotypiques du muscle se produisent lentement et progressivement en l'absence d'OPG.

Pour la suite, nous avons investigué plus en détails les muscles EDL de souris âgées de 5 mois *Opg^{-/-}*. Nous avons montré que l'aire de surface moyenne des fibres musculaires (CSA), qui inclut les fibres de dimension moyenne, hypertrophiées et des petites myofibres est significativement réduite chez les souris *Opg^{-/-}* par rapport aux les souris sauvages (WT). Cela s'explique par la diminution de la fréquence des grosses myofibres (> 2500 μm) dans les muscles EDL, tandis que la fréquence des petites myofibres (<1000 μm) était plus élevée chez les souris *Opg^{-/-}* par rapport aux souris WT. Ces résultats indiquent que les EDL des souris *Opg^{-/-}* âgées de 5 mois présentaient une atrophie musculaire. Pour analyser plus en détails l'atrophie musculaire, nous avons étudié l'impact de la délétion de l'OPG sur

l'atrophie des différents types de fibres musculaires. Nous avons constaté que les souris *Opg*^{-/-} âgées de 5 mois présentaient une réduction sélective de la CSA moyenne des myofibres à contraction rapide de type IIb, les myofibres les plus puissantes, ce qui peut en partie expliquer la faiblesse des muscles EDL des souris *Opg*^{-/-} âgées de 5 mois.

Il est documenté que l'OPG, RANK et RANKL font partie de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale (TNF- α), et que l'interaction RANK/RANKL conduit à l'activation de différentes voies de signalisation en aval, y compris NF- κ B (139). Il est important de noter que NF- κ B et TNF- α sont impliqués dans l'atrophie musculaire en augmentant l'expression de MuRF-1 et d'atrogine-1 dans diverses conditions physiologiques et physiopathologiques (10), (37). De plus, l'étude de Bonnet et collaborateurs (2019) apporte des évidences sur l'implication de la voie RANK/RANKL/OPG dans le métabolisme musculaire et le développement de la sarcopénie (259). Du coup pour déterminer le mécanisme par lequel la délétion de l'OPG induit une atrophie musculaire, nous avons investigué l'activation de la voie NF- κ B et le taux d'expression ubiquitine ligases E3 spécifiques au muscle, MuRF-1 et atrogine-1. Nos résultats ont montré que la voie NF- κ B est rapidement activée suivie de l'augmentation de l'expression d'atrogine-1 et de MuRF-1 dans les EDL, muscles à contraction rapide des souris *Opg*^{-/-} par rapport aux souris WT. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bonnet et al; (2019) où les souris qui surexpriment RANKL présentaient une atrophie musculaire, une inflammation, une nécrose et une faiblesse musculaire, qui ont été nettement améliorées par des traitements à l'anti-RANKL ou encore l'OPG-Fc (259). De plus, dans cette même étude, le traitement à l'OPG-Fc augmentait la masse musculaire dans un modèle de souris ostéo/sarcopénique (259). Bien que les auteurs n'aient pas examiné précisément les différences entre les muscles à contraction lente et rapide des souris surexprimant RANKL ou le modèle de souris ostéo/sarcopénique, leurs résultats généraux démontraient que les deux phénotypes étaient affectés et que, dans une certaine mesure, le muscle Sol à contraction lente exprime des niveaux plus élevés de RANKL que les muscles EDL à contraction rapides (259). Ces résultats contredisent nos observations antérieures sur des souris déficientes en RANK musculaire. En effet, la suppression du RANK musculaire n'empêche pas l'atrophie musculaire induite par la dénervation, mais améliore significativement la production de force

musculaire spécifique de l'EDL à contraction rapide, mais pas celle des muscles Sol à contraction lente (190). Cette divergence entre nos résultats et ceux de Bonnet et al (2019) peut être attribuée aux différents modèles de souris utilisés dans nos études respectives.

L'équilibre RANKL/OPG est considéré comme un déterminant majeur pour la santé osseuse. Nous avons montré que les niveaux circulants de RANKL étaient 20 fois plus élevés chez les souris *Opg*^{-/-} que chez les souris WT. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette augmentation de RANKL circulant pourrait expliquer la faiblesse musculaire observée chez les souris *Opg*^{-/-}. Sachant que la diminution de la force musculaire ne s'est produite qu'à l'âge de 5 mois et qu'un traitement prolongé avec l'OPG pleine longueur de souris fusionnée à un fragment Fc humain peut provoquer une réaction immunitaire, nous avons traité les souris *Opg*^{-/-} avec l'anti-RANKL de souris [4 mg/kg/3j] pendant deux mois (de 3 à 5 mois) pour restaurer l'équilibre RANKL/OPG. Le choix de la dose a été fait en fonction des résultats du chapitre 2, où le traitement anti-RANKL [4 mg/kg/3j] permettait de réduire significativement le taux circulant de RANKL chez la souris dystrophique (données non publiées). Conformément à notre hypothèse, le traitement à l'anti-RANKL a permis d'augmenter l'activité volontaire, la force spécifique maximale *ex vivo* (sP0) des muscles EDL et la force de préhension des quatre pattes et restaurer les propriétés biomécaniques des os. Cela appuie également nos résultats présentés dans le chapitre 2, où le traitement anti-RANKL protège des dysfonctionnements des muscles squelettiques tout en améliorant les propriétés mécaniques de l'os chez les souris dystrophiques (255). Basé sur nos études antérieures qui démontrent que les myotubes en culture expriment RANK à leurs membranes, nous avons évalué l'effet d'un traitement au RANKL sur les myotubes C₂C₁₂ différenciés *in vitro*, dans le but de tester notre hypothèse selon laquelle RANKL jouerait un rôle dans l'atrophie et le dysfonctionnement musculaire. Nos résultats ont montré que le traitement au RANKL induisait une atrophie des myotubes, activait rapidement la voie NF-κB et augmentait l'expression d'atrogine-1 et MuRF-1. En accord avec nos résultats, une étude a démontré que l'expression de RANKL augmente en réponse à l'inflammation myocardique et stimule l'expression de NF-κB et de TNF-α dans des cardiomyocytes en culture (194). Ceci nous permet de conclure la perturbation de l'équilibre RANKL/OPG causé par la suppression de l'OPG a un impact majeur non seulement sur l'os, mais sur le muscle squelettique et que

RANKL peut se lier directement aux cellules musculaires et influencer le système ubiquitine-protéasome, en particulier l'atrogine-1 et le MuRF1, deux acteurs majeurs de l'atrophie musculaire.

4. Le traitement anti-RANKL améliore la fonction musculaire et l'ostéoporose induite chez les souris *mdx* traitées aux glucocorticoïdes

Dans l'étude présentée en annexe 1 nous avons investigué l'effet d'un traitement combiné d'anti-RANKL avec le DFZ sur la fonction des muscles dystrophiques et l'ostéoporose induite par les GCs sur la pathologie de DMD. Les résultats du chapitre 2 et les évidences d'études antérieures nous ont permis de constater que la neutralisation systémique de RANKL est en mesure de restaurer la fonction musculaire et de prévenir la perte osseuse chez les souris dystrophiques. Bien qu'aucun traitement curatif n'existe pour la DMD, le traitement aux GCs de par leurs propriétés anti-inflammatoires, représente aujourd'hui la norme de soin. Bien que les GCs soient bénéfiques pour les patients atteints de la DMD, le traitement chronique augmente le risque d'ostéoporose (215). Ainsi, l'anti-RANKL étant déjà prescrit pour contrer l'ostéoporose induite par les GCs, nous avons émis l'hypothèse que le traitement anti-RANKL combiné aux GCs pourrait préserver la fonction musculaire et protéger contre l'ostéoporose induite par les GCs chez la souris *mdx*. Nos résultats préliminaires ont ainsi montré qu'un traitement de 8 semaines avec l'anti-RANKL est aussi efficace qu'un traitement au DFZ, un GC dérivé de la prednisone pour améliorer la performance fonctionnelle des muscles des souris *mdx*. Nous avons également étudié les propriétés contractiles *ex vivo* de l'EDL et du Sol pour investiguer plus en détails l'effet des traitements sur la contractilité musculaire. Sans surprise, nos résultats préliminaires ont montré que le traitement à l'anti-RANKL améliore la force spécifique des muscles dystrophiques EDL et Sol, ce qui est cohérent avec les résultats obtenus dans le chapitre 2 (260). En revanche, le traitement au DFZ n'a pas augmenté la sP0 des muscles EDL, tandis que celle des muscles Sol a été significativement augmentée, suggérant un effet sélectif du DFZ selon le phénotype des fibres musculaires. En fait, il a été démontré que le traitement aux GCs a un effet sur la distribution des types de fibres musculaires des souris *mdx*, augmentant la proportion des fibres à contraction lente de type 1 (228). Fait intéressant, nos résultats préliminaires n'ont montré aucun effet synergique entre l'anti-RANKL et le DFZ sur la fonction musculaire *ex vivo*. En effet, la sP0 des muscles dystrophiques EDL et Sol des souris traitées à l'anti-RANKL+DFZ est augmentée, mais n'est pas supérieure à celle de l'anti-RANKL seul. Le fait que l'anti-RANKL seul ou en co-traitement soit largement

supérieur au traitement au DFZ seul dans l'augmentation de sP0 suggère peut-être l'existence d'un effet antagoniste. Il faut savoir que le mécanisme par lequel l'anti-RANKL et le DFZ peuvent agir sur les muscles dystrophiques demeure inconnu et la présente étude se veut descriptive, exploratoire et pour le moment incomplète. Cependant, le traitement à l'anti-RANKL, DFZ ou le co-traitement n'a pas engendré d'effet significatif sur la force absolue (P0) des muscles EDL et Sol dystrophiques. En outre, il est particulièrement important de souligner que la masse des EDL normalisée à la masse de la souris est diminuée après un traitement à l'anti-RANKL et dans une moindre mesure avec le co-traitement, ce qui suggère que le gain de force spécifique peut être attribué à une réduction de l'œdème musculaire, fibrose et inflammation.

Dans le chapitre 2, nous avons montré que les niveaux de protéines RANK/RANKL sont plus élevés dans le microenvironnement des muscles dystrophiques et que l'inhibition de leur interaction avec l'anti-RANKL réduit les dommages, fibrose, l'œdème et l'inflammation et inhibe l'activité de la voie NF- κ B (260). Nos résultats préliminaires ont montré que les améliorations de la fonction musculaire avec l'anti-RANKL et le co-traitement étaient associées à une réduction significative des dommages musculaires, des taux sériques de CK et de la fibrose musculaire. L'intégrité musculaire a également été améliorée après le traitement au DFZ seul, ce qui est conforme aux études faites sur les patients atteints de la DMD et les souris dystrophiques traités aux GCs (261), (217). Par contre, nos résultats démontrent que le traitement au DFZ n'améliore pas la fonction des muscles dystrophiques EDL. Nos résultats sont toutefois cohérents avec d'autres études démontrant que le traitement quotidien aux GCs améliore l'intégrité musculaire, mais engendre une atrophie musculaire, par conséquent, n'améliore pas la force ou la fonction musculaire des souris dystrophiques (217). En parallèle, nous avons évalué l'effet des traitements sur l'infiltration par les cellules inflammatoires dans les muscles dystrophiques. En effet, l'inflammation chronique et le recrutement des leucocytes sont une caractéristique importante de la progression du DMD et la déplétion des cellules inflammatoires réduit la nécrose musculaire et l'inflammation chez les souris *mdx* (80), (81). Nos résultats préliminaires ont indiqué que l'anti-RANKL, le DFZ et le co-traitement réduisaient considérablement la densité des neutrophiles sans effet additionnel avec le traitement combiné. Cette observation est de la plus haute importance

puisque les neutrophiles sont les premières cellules à envahir les muscles endommagés (262). Conformément, nous avons précédemment constaté que le traitement anti-RANKL permettait de réduire l'inflammation et les dommages musculaires, améliorant ainsi la fonction musculaire des souris dystrophiques (260). En outre, les GCs sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires et prescrits aux patients atteints de DMD. Dans l'ensemble, les traitements anti-RANKL et DFZ seuls ou en combinaison protègent l'intégrité des myofibrilles en réduisant le nombre de cellules inflammatoires et l'étendue des dommages musculaires, améliorant ainsi la fonction musculaire des souris dystrophiques.

Finalement, le résultat le plus important de cette étude est que les effets négatifs engendrés par le traitement au DFZ sur l'os des souris *mdx* illustrée par une diminution drastique de la section transversale des *tibiae* ont été prévenus avec le traitement à l'anti-RANKL. Ces résultats ont été obtenus grâce à une collaboration en cours avec un groupe de recherche en Écosse qui va investiguer de plus près les changements histomorphométriques, biochimiques et la microarchitecture osseuse suivant des traitements au DFZ, anti-RANKL ou une combinaison des 2. De notre côté, nous avons pu mesurer les propriétés biomécaniques osseuses et nous avons montré que 8 semaines de traitement à l'anti-RANKL augmentaient significativement la rigidité fémorale des souris dystrophiques avec ou sans traitement au DFZ. Il est particulièrement important de souligner que l'anti-RANKL a démontré son efficacité en clinique, où 18 mois de traitement amélioreraient la densité minérale osseuse lombaire et les marqueurs du remodelage osseux chez un garçon atteint de DMD et traité aux GCs, sans événements indésirables significatifs (239). Ainsi, la capacité d'un médicament déjà approuvé par la FDA pour le traitement de l'ostéoporose à améliorer à la fois la fonction musculaire et à prévenir la perte osseuse chez les patients atteints de DMD traités par GC pourrait conduire à un changement radical dans la gestion clinique.

Conclusion

L'objectif principal de la présente thèse était d'exploiter la voie RANK/RANKL/OPG afin de comprendre les mécanismes d'action de ces cytokines sur la physiopathologie musculaire et d'établir une stratégie thérapeutique pour la DMD en traitement unique ou combiné aux GCs. Les travaux découlant de cette thèse apportent une contribution importante à la compréhension de l'implication de la voie RANK/RANKL/OPG dans la physiopathologie musculaire. Ainsi, le traitement anti-RANKL pourrait combler deux besoins thérapeutiques en traitement unique ou en combinaison avec les GCs, protégeant des dysfonctionnements musculaires et osseux de DMD. De plus, nos travaux mettent la lumière sur l'implication de RANKL dans l'atrophie et la dysfonction musculaire et apportent plus de réponses sur l'impact du déséquilibre RANKL/OPG sur les dysfonctionnements osseux et musculaires synchrones. Toutefois, chaque fin annonce un début d'une autre phase, cette thèse soulève encore de nombreuses questions qui nous permettront de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et éventuellement aboutir à un essai clinique sur le denosumab chez les patients atteints la DMD.

Perspectives

Plusieurs perspectives découlent des différents objectifs présentés dans cette thèse. Les résultats précliniques présentés dans le chapitre 2 et en annexe 1 sur le potentiel thérapeutique de l'anti-RANKL sur la fonction musculaire et osseuse des souris dystrophiques avec ou sans GC, ouvrent potentiellement de nouvelles avenues vers un projet pilote sur les patients atteints de DMD. Néanmoins, plusieurs études cliniques ont rapporté un « rebound effect » suite à l'arrêt du traitement au denosumab. En fait, les patientes ménopausées qui cessent drastiquement la prise de denosumab voient leur risque de fracture osseuse et vertébrale augmenter en flèche. Ces patientes doivent être traitées avec des bisphosphonates intraveineux pour réduire l'accélération du remodelage osseux et le risque de fractures vertébrales. Cependant, l'impact de l'arrêt d'un traitement au denosumab chez les patients atteints de la DMD et traités aux GCs reste inconnue et devra être mieux compris. Il serait donc intéressant de déterminer l'impact de l'arrêt de l'anti-RANKL, suivi de l'administration d'un bisphosphonate sur la perte osseuse, le remodelage osseux et la résistance osseuse chez les souris *mdx* dystrophiques traitées par les GCs. Par ailleurs, les résultats présentés au chapitre 3 montraient que les souris *Opg*^{-/-} présentaient une faiblesse musculaire avec une atrophie sélective des fibres rapides de type IIb associées à une faiblesse osseuse. Néanmoins, les effets de la délétion de l'OPG chez les souris dystrophiques restent inconnus. Plusieurs investigations dans ce sens sont en cours au laboratoire dans le but caractériser l'impact de la double délétion de l'OPG et dystrophine sur la fonction musculaire et osseuse. De plus, en utilisant des approches génétiques et pharmacologiques, des résultats antérieurs ont montré que le traitement avec l'OPG pleine longueur fusionnée à un fragment Fc (FL-OPG-Fc), est supérieur à la délétion de RANK musculaire ou encore aux traitements à l'anti-RANKL ou à la forme tronquée de l'OPG (TR-OPG-Fc ; contient uniquement les domaines de liaison à RANKL), en regard aux gains de force contractile des muscles dystrophiques (243). Des résultats préliminaires au laboratoire montraient que les taux de FL-OPG-Fc en circulation augmentaient 30 min suivant une injection intrapéritonéale (i.p.) et que l'OPG se liait aux fibres musculaires en moins de 6 h. Outre les domaines RANKL et TRAIL, FL-OPG-Fc possède un domaine héparine qui serait impliqué dans la liaison avec les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$, l'héparine, l'héparane sulfate et le syndécane-1 dans les cellules non musculaires qui

induirait la phosphorylation d'AKT^{Ser 4734}, un inducteur clé de la synthèse protéique (147). Nos résultats préliminaires montrent que FL-OPG-Fc active les voies en aval des intégrines FAK/Akt/CaMKII modulant ainsi l'activité de la pompe ATP-asiqque SERCA impliquée dans la recapture du calcium dans les muscles dystrophiques. FL-OPG-Fc est donc une molécule à plusieurs domaines qui pourrait potentiellement avoir d'autres fonctions physiologiques que celle d'inhiber les voies RANK/RANKL et TRAIL. Je m'arrête ici pour donner le flambeau aux prochains étudiants qui poursuivront ces recherches sur les fonctions de RANK/RANKL/OPG dans les tissus musculaires sains et pathologiques.

Bibliographie

1. McDonald Denise G M, Kinali Maria, Gallagher Andrew C, et al. (2007) Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.*, **44**, 695–698.
2. Bach, J. R., O'Brien, J., Krotenberg, R., et al. (1987) Management of end stage respiratory failure in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, **10**, 177–182.
3. Larkindale, J., Yang, W., Hogan, P. F., et al. (2014) Cost of illness for neuromuscular diseases in the United States. *Muscle Nerve*, **49**, 431–438.
4. Ryder, S., Leadley, R. M., Armstrong, N., et al. (2017) The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet J. Rare Dis.*, **12**.
5. Bladen, C. L., Salgado, D., Monges, S., et al. (2015) The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Hum. Mutat.*, **36**, 395–402.
6. Min, Y.-L., Bassel-Duby, R. and Olson, E. N. (2019) CRISPR Correction of Duchenne Muscular Dystrophy. *Annu. Rev. Med.*, **70**, 239–255.
7. Pini, V., Morgan, J. E., Muntoni, F., et al. (2017) Genome Editing and Muscle Stem Cells as a Therapeutic Tool for Muscular Dystrophies. *Curr. Stem Cell Rep.*, **3**, 137–148.
8. Sun, C., Serra, C., Lee, G., et al. (2020) Stem cell-based therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Exp. Neurol.*, **323**, 113086.
9. Mah, J. K. (2016) Current and emerging treatment strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **12**, 1795–1807.
10. Li, H., Malhotra, S. and Kumar, A. (2008) Nuclear Factor-kappa B Signaling in Skeletal Muscle Atrophy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, **86**, 1113–1126.
11. Matthews, E., Brassington, R., Kuntzer, T., et al. (2016) Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD003725.
12. Frontera, W. R. and Ochala, J. (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.*, **96**, 183–195.
13. Mukund, K. and Subramaniam, S. (2020) Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, **12**, e1462.
14. Gillies, A. R. and Lieber, R. L. (2011) Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. *Muscle Nerve*, **44**, 318–331.
15. Lapidos Karen A., Kakkar Rahul, and McNally Elizabeth M. (2004) The Dystrophin Glycoprotein Complex. *Circ. Res.*, **94**, 1023–1031.
16. Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M.-C., et al. (2015) Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr. Physiol.*, **5**, 1027–1059.
17. Calderón, J. C., Bolaños, P. and Caputo, C. (2014) The excitation–contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophys. Rev.*, **6**, 133–160.
18. Baylor, S. M. and Hollingworth, S. (2011) CALCIUM INDICATORS AND CALCIUM SIGNALLING IN SKELETAL MUSCLE FIBRES DURING EXCITATION-CONTRACTION COUPLING. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **105**, 162–179.
19. Schiaffino, S. and Reggiani, C. (2011) Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol. Rev.*, **91**, 1447–1531.
20. Talbot, J. and Maves, L. (2016) Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle

- disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.*, **5**, 518–534.
21. Scott, W., Stevens, J. and Binder–Macleod, S. A. (2001) Human Skeletal Muscle Fiber Type Classifications. *Phys. Ther.*, **81**, 1810–1816.
 22. Sandonà, D., Desaphy, J.-F., Camerino, G. M., et al. (2012) Adaptation of Mouse Skeletal Muscle to Long-Term Microgravity in the MDS Mission. *PLoS ONE*, **7**.
 23. Johnson, M. A., Polgar, J., Weightman, D., et al. (1973) Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles: An autopsy study. *J. Neurol. Sci.*, **18**, 111–129.
 24. Sultana, N., Dienes, B., Benedetti, A., et al. (2016) Restricting calcium currents is required for correct fiber type specification in skeletal muscle. *Dev. Camb. Engl.*, **143**, 1547–1559.
 25. Webster, C., Silberstein, L., Hays, A. P., et al. (1988) Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, **52**, 503–513.
 26. Dekhuijzen, P. N., Gayan-Ramirez, G., Bisschop, A., et al. (1995) Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, **78**, 629–637.
 27. Fournier, M., Huang, Z.-S., Li, H., et al. (2003) Insulin-like growth factor I prevents corticosteroid-induced diaphragm muscle atrophy in emphysematous hamsters. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **285**, R34–43.
 28. Terracciano, C., Celi, M., Lecce, D., et al. (2013) Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos. Int.*, **24**, 1095–1100.
 29. Novotny, S. A., Warren, G. L. and Hamrick, M. W. (2015) Aging and the Muscle-Bone Relationship. *Physiology*, **30**, 8–16.
 30. Usuki, F., Fujimura, M., Nakamura, A., et al. (2019) Local Vibration Stimuli Induce Mechanical Stress-Induced Factors and Facilitate Recovery From Immobilization-Induced Oxidative Myofiber Atrophy in Rats. *Front. Physiol.*, **10**.
 31. Schiaffino, S. and Mammucari, C. (2011) Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet. Muscle*, **1**, 4.
 32. Braun, T. P. and Marks, D. L. (2015) The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Front. Physiol.*, **6**.
 33. Doucet, M., Russell, A. P., Léger, B., et al. (2007) Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **176**, 261–269.
 34. Boonyarom, O. and Inui, K. (2006) Atrophy and hypertrophy of skeletal muscles: structural and functional aspects. *Acta Physiol. Oxf. Engl.*, **188**, 77–89.
 35. Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., et al. (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, **294**, 1704–1708.
 36. Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., et al. (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 14440–14445.
 37. Yuan, L., Han, J., Meng, Q., et al. (2015) Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: an in vitro and in vivo study. *Oncol. Rep.*, **33**, 2261–2268.
 38. Passey, S. L., Hansen, M. J., Bozinovski, S., et al. (2016) Emerging therapies for the treatment of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Ther.*, **166**, 56–70.
 39. McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S.-J. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, **387**, 83–90.

40. Li, Y.-P., Chen, Y., John, J., et al. (2005) TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **19**, 362–370.
41. Jackman, R. W., Cornwell, E. W., Wu, C.-L., et al. (2013) Nuclear factor-κB signalling and transcriptional regulation in skeletal muscle atrophy. *Exp. Physiol.*, **98**, 19–24.
42. Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., et al. (2004) The IGF-1/PI3K/Akt Pathway Prevents Expression of Muscle Atrophy-Induced Ubiquitin Ligases by Inhibiting FOXO Transcription Factors. *Mol. Cell*, **14**, 395–403.
43. Kornegay, J. N., Childers, M. K., Bogan, D. J., et al. (2012) The paradox of muscle hypertrophy in muscular dystrophy. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, **23**, 149–172, xii.
44. Mendell, J. R. and Lloyd-Puryear, M. (2013) Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve*, **48**, 21–26.
45. Allen, D. G., Whitehead, N. P. and Froehner, S. C. (2016) Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. *Physiol. Rev.*, **96**, 253–305.
46. Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., et al. (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.*, **82**, 291–329.
47. Pratt, S. J. P., Valencia, A. P., Le, G. K., et al. (2015) Pre- and postsynaptic changes in the neuromuscular junction in dystrophic mice. *Front. Physiol.*, **6**, 252.
48. Judge, D. P., Kass, D. A., Thompson, W. R., et al. (2011) Pathophysiology and Therapy of Cardiac Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, **11**, 287–294.
49. Larson, C. M. and Henderson, R. C. (2000) Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr. Orthop.*, **20**, 71–74.
50. Muntoni, F., Torelli, S. and Ferlini, A. (2003) Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.*, **2**, 731–740.
51. Doorenweerd, N., Mahfouz, A., van Putten, M., et al. (2017) Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Rep.*, **7**, 12575.
52. Taylor, P. J., Betts, G. A., Maroulis, S., et al. (2010) Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*, **5**, e8803.
53. Ervasti, J. M. (2007) Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, **1772**, 108–117.
54. Constantin, B. (2014) Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, **1838**, 635–642.
55. Gumerson, J. D. and Michele, D. E. (2011) The Dystrophin-Glycoprotein Complex in the Prevention of Muscle Damage. The Dystrophin-Glycoprotein Complex in the Prevention of Muscle Damage <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/210797/> (accessed May 6, 2020).
56. Lai, Y., Thomas, G. D., Yue, Y., et al. (2009) Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.*, **119**, 624–635.
57. Peter, A. K., Cheng, H., Ross, R. S., et al. (2011) The costamere bridges sarcomeres

- to the sarcolemma in striated muscle. *Prog. Pediatr. Cardiol.*, **31**, 83–88.
58. Whitehead, N. P., Yeung, E. W. and Allen, D. G. (2006) Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 657–662.
 59. Nowak, K. J. and Davies, K. E. (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.*, **5**, 872–876.
 60. Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., et al. (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, **82**, 743–752.
 61. Sander, M., Chavoshan, B., Harris, S. A., et al. (2000) Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 13818–13823.
 62. Brancaccio, P., Maffulli, N. and Limongelli, F. M. (2007) Creatine kinase monitoring in sport medicine. *Br. Med. Bull.*, **81–82**, 209–230.
 63. Zatz, M., Rapaport, D., Vainzof, M., et al. (1991) Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.*, **102**, 190–196.
 64. Matsuda, R., Nishikawa, A. and Tanaka, H. (1995) Visualization of dystrophic muscle fibers in mdx mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *J. Biochem. (Tokyo)*, **118**, 959–964.
 65. Houang, E. M., Sham, Y. Y., Bates, F. S., et al. (2018) Muscle membrane integrity in Duchenne muscular dystrophy: recent advances in copolymer-based muscle membrane stabilizers. *Skelet. Muscle*, **8**, 31.
 66. Wang, X., Weisleder, N., Collet, C., et al. (2005) Uncontrolled calcium sparks act as a dystrophic signal for mammalian skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.*, **7**, ncb1254.
 67. Bellinger, A. M., Reiken, S., Carlson, C., et al. (2009) Hypernitrosylated ryanodine receptor/calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. *Nat. Med.*, **15**, 325–330.
 68. Divet, A. and Huchet-Cadiou, C. (2002) Sarcoplasmic reticulum function in slow- and fast-twitch skeletal muscles from mdx mice. *Pflüg. Arch.*, **444**, 634–643.
 69. Kargacin, M. E. and Kargacin, G. J. (1996) The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered in dystrophic muscle. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, **1290**, 4–8.
 70. Goonasekera, S. A., Lam, C. K., Millay, D. P., et al. (2011) Mitigation of muscular dystrophy in mice by SERCA overexpression in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.*, **121**, 1044–1052.
 71. Edwards, J. N., Friedrich, O., Cully, T. R., et al. (2010) Upregulation of store-operated Ca²⁺ entry in dystrophic mdx mouse muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **299**, C42–50.
 72. Vandebrouck, C., Martin, D., Schoor, M. C.-V., et al. (2002) Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.*, **158**, 1089–1096.
 73. Alderton, J. M. and Steinhardt, R. A. (2000) Calcium Influx through Calcium Leak Channels Is Responsible for the Elevated Levels of Calcium-dependent Proteolysis in Dystrophic Myotubes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 9452–9460.
 74. Whitehead, N. P., Yeung, E. W. and Allen, D. G. (2006) Muscle Damage in Mdx (dystrophic) Mice: Role of Calcium and Reactive Oxygen Species. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 657–662.

75. Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., et al. (2003) Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*, **423**, 168–172.
76. Allen, D. G. and Whitehead, N. P. (2011) Duchenne muscular dystrophy--what causes the increased membrane permeability in skeletal muscle? *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **43**, 290–294.
77. Hirn, C., Shapovalov, G., Petermann, O., et al. (2008) Nav1.4 deregulation in dystrophic skeletal muscle leads to Na⁺ overload and enhanced cell death. *J. Gen. Physiol.*, **132**, 199–208.
78. Weber, M.-A., Nagel, A. M., Wolf, M. B., et al. (2012) Permanent muscular sodium overload and persistent muscle edema in Duchenne muscular dystrophy: a possible contributor of progressive muscle degeneration. *J. Neurol.*, **259**, 2385–2392.
79. Wehling-Henricks, M., Sokolow, S., Lee, J. J., et al. (2008) Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 2280–2292.
80. Hodgetts, S., Radley, H., Davies, M., et al. (2006) Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **16**, 591–602.
81. Radley, H. G. and Grounds, M. D. (2006) Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol. Dis.*, **23**, 387–397.
82. Spencer, M. J., Walsh, C. M., Dorshkind, K. A., et al. (1997) Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *J. Clin. Invest.*, **99**, 2745–2751.
83. Grounds, M. D., Terrill, J. R., Al-Mshhdani, B. A., et al. (2020) Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress. *Dis. Model. Mech.*, **13**.
84. Wehling, M., Spencer, M. J. and Tidball, J. G. (2001) A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. *J. Cell Biol.*, **155**, 123–132.
85. Dufresne, S. S., Frenette, J. and Dumont, N. A. (2016) Inflammation et régénération musculaire - Une arme à double tranchant. *médecine/sciences*, **32**, 591–597.
86. Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., et al. (2009) Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 482–496.
87. Porreca, E., Guglielmi, M. D., Uncini, A., et al. (1999) Haemostatic abnormalities, cardiac involvement and serum tumor necrosis factor levels in X-linked dystrophic patients. *Thromb. Haemost.*, **81**, 543–546.
88. Piers, A. T., Lavin, T., Radley-Crabb, H. G., et al. (2011) Blockade of TNF in vivo using cV1q antibody reduces contractile dysfunction of skeletal muscle in response to eccentric exercise in dystrophic mdx and normal mice. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **21**, 132–141.
89. Gu, J.-M., Wang, D. J., Peterson, J. M., et al. (2016) An NF-κB – EphrinA5 – Dependent Communication between NG2⁺ Interstitial Cells and Myoblasts Promotes Muscle Growth in Neonates. *Dev. Cell*, **36**, 215–224.
90. He, W. A., Berardi, E., Cardillo, V. M., et al. (2013) NF-κB-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. *J. Clin. Invest.*, **123**, 4821–4835.
91. Peterson, J. M., Bakkar, N. and Guttridge, D. C. (2011) NF-κB signaling in skeletal

- muscle health and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **96**, 85–119.
92. Bakkar, N. and Guttridge, D. C. (2010) NF- κ B Signaling: A Tale of Two Pathways in Skeletal Myogenesis. *Physiol. Rev.*, **90**, 495–511.
 93. Acharyya, S., Villalta, S. A., Bakkar, N., et al. (2007) Interplay of IKK/NF- κ B signaling in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.*, **117**, 889–901.
 94. Mourkioti, F., Kratsios, P., Luedde, T., et al. (2006) Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J. Clin. Invest.*, **116**, 2945–2954.
 95. Farini, A., Merigalli, M., Belicchi, M., et al. (2007) T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. *J. Pathol.*, **213**, 229–238.
 96. Desguerre, I., Mayer, M., Leturcq, F., et al. (2009) Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **68**, 762–773.
 97. Wang, Y. X. and Rudnicki, M. A. (2012) Satellite cells, the engines of muscle repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 127–133.
 98. Guiraud, S. and Davies, K. E. (2019) Regenerative biomarkers for Duchenne muscular dystrophy. *Neural Regen. Res.*, **14**, 1317–1320.
 99. Tidball, J. G., Dorshkind, K. and Wehling-Henricks, M. (2014) Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration. *Dev. Camb. Engl.*, **141**, 1184–1196.
 100. Heslop, L., Morgan, J. E. and Partridge, T. A. (2000) Evidence for a myogenic stem cell that is exhausted in dystrophic muscle. *J. Cell Sci.*, **113 (Pt 12)**, 2299–2308.
 101. Wallace, G. Q. and McNally, E. M. (2009) Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annu. Rev. Physiol.*, **71**, 37–57.
 102. Decary, S., Hamida, C. B., Mouly, V., et al. (2000) Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **10**, 113–120.
 103. Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., et al. (2010) Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell*, **143**, 1059–1071.
 104. Kottlors, M. and Kirschner, J. (2010) Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Tissue Res.*, **340**, 541–548.
 105. Ribeiro, A. F., Souza, L. S., Almeida, C. F., et al. (2019) Muscle satellite cells and impaired late stage regeneration in different murine models for muscular dystrophies. *Sci. Rep.*, **9**, 11842.
 106. Dumont, N. A., Wang, Y. X., von Maltzahn, J., et al. (2015) Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat. Med.*, **21**, 1455–1463.
 107. McGreevy, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. A., et al. (2015) Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech.*, **8**, 195–213.
 108. Willmann, R., Possekkel, S., Dubach-Powell, J., et al. (2009) Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, **19**, 241–249.
 109. McGreevy, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. A., et al. (2015) Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech.*, **8**, 195–213.
 110. McGeachie, J. K., Grounds, M. D., Partridge, T. A., et al. (1993) Age-related

- changes in replication of myogenic cells in mdx mice: Quantitative autoradiographic studies. *J. Neurol. Sci.*, **119**, 169–179.
111. Lynch, G. S., Hinkle, R. T., Chamberlain, J. S., et al. (2001) Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6–28 months old. *J. Physiol.*, **535**, 591–600.
112. Blaauw, B., Agatea, L., Toniolo, L., et al. (2009) Eccentric contractions lead to myofibrillar dysfunction in muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol.*, **108**, 105–111.
113. Moens, P., Baatsen, P. H. and Maréchal, G. (1993) Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **14**, 446–451.
114. The Mdx Mouse Skeletal Muscle Myopathy: I. A Histological, Morphometric and Biochemical Investigation. The Mdx Mouse Skeletal Muscle Myopathy: I. A Histological, Morphometric and Biochemical Investigation
<https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/2967442/> (accessed Aug 10, 2017).
115. Briguet, A., Courdier-Fruh, I., Foster, M., et al. (2004) Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul. Disord.*, **14**, 675–682.
116. Stedman, H. H., Sweeney, H. L., Shrager, J. B., et al. (1991) The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, **352**, 536–539.
117. Amenta, A. R., Yilmaz, A., Bogdanovich, S., et al. (2011) Biglycan recruits utrophin to the sarcolemma and counters dystrophic pathology in mdx mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, 762–767.
118. Banks, G. B., Combs, A. C., Odom, G. L., et al. (2014) Muscle structure influences utrophin expression in mdx mice. *PLoS Genet.*, **10**, e1004431.
119. Kleopa, K. A., Drousiotou, A., Mavrikiou, E., et al. (2006) Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1623–1628.
120. Ohlendieck, K., Ervasti, J. M., Matsumura, K., et al. (1991) Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron*, **7**, 499–508.
121. Weir, A. P., Morgan, J. E. and Davies, K. E. (2004) A-utrophin up-regulation in mdx skeletal muscle is independent of regeneration. *Neuromuscul. Disord.*, **14**, 19–23.
122. Porter, J. D., Rafael, J. A., Ragusa, R. J., et al. (1998) The sparing of extraocular muscle in dystrophinopathy is lost in mice lacking utrophin and dystrophin. *J. Cell Sci.*, **111**, 1801–1811.
123. Deconinck, N., Tinsley, J., Backer, F. D., et al. (1997) Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat. Med.*, **3**, 1216–1221.
124. Tinsley, J. M., Potter, A. C., Phelps, S. R., et al. (1996) Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature*, **384**, 349–353.
125. Rafael, J. A., Tinsley, J. M., Potter, A. C., et al. (1998) Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nat. Genet.*, **19**, 79–82.
126. Gregorevic, P., Allen, J. M., Minami, E., et al. (2006) rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat. Med.*, **12**,

787–789.

127. Odom, G. L., Gregorevic, P., Allen, J. M., et al. (2008) Microtrophin delivery through rAAV6 increases lifespan and improves muscle function in dystrophic dystrophin/utrophin-deficient mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.*, **16**, 1539–1545.
128. McDonald, A. A., Hebert, S. L., Kunz, M. D., et al. (2015) Disease course in mdx:utrophin+/- mice: comparison of three mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Physiol. Rep.*, **3**.
129. Piette, A. B., Hamoudi, D., Marcadet, L., et al. (2018) Utrophin haploinsufficiency does not worsen the functional performance, resistance to eccentric contractions and force production of dystrophic mice. *PLOS ONE*, **13**, e0198408.
130. Gutpell, K. M., Hrinivich, W. T. and Hoffman, L. M. (2015) Skeletal Muscle Fibrosis in the mdx/utrn+/- Mouse Validates Its Suitability as a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS ONE*, **10**.
131. van Putten, M., Kumar, D., Hulsker, M., et al. (2012) Comparison of skeletal muscle pathology and motor function of dystrophin and utrophin deficient mouse strains. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **22**, 406–417.
132. Zhou, L., Rafael-Fortney, J. A., Huang, P., et al. (2008) Haploinsufficiency of utrophin gene worsens skeletal muscle inflammation and fibrosis in mdx mice. *J. Neurol. Sci.*, **264**, 106–111.
133. Capulli, M., Paone, R. and Rucci, N. (2014) Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch. Biochem. Biophys.*, **561**, 3–12.
134. Matsuo, K. and Irie, N. (2008) Osteoclast–osteoblast communication. *Arch. Biochem. Biophys.*, **473**, 201–209.
135. Ackert-Bicknell C, Beamer WG, Rosen CJ, Sundberg JP With: Juan R, Godfrey D, Coombs HF (2008) Aging study: Bone mineral density and body composition of 32 inbred strains of mice. Aging study: Bone mineral density and body composition of 32 inbred strains of mice <https://phenome.jax.org/projects/Ackert1> (accessed Apr 13, 2020).
136. Jilka, R. L. (2013) The Relevance of Mouse Models for Investigating Age-Related Bone Loss in Humans. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **68**, 1209–1217.
137. Qin, Y.-X. and Hu, M. (2014) Mechanotransduction in Musculoskeletal Tissue Regeneration: Effects of Fluid Flow, Loading, and Cellular-Molecular Pathways. *Mechanotransduction in Musculoskeletal Tissue Regeneration: Effects of Fluid Flow, Loading, and Cellular-Molecular Pathways* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/863421/> (accessed Apr 13, 2020).
138. Lacey, D. L., Boyle, W. J., Simonet, W. S., et al. (2012) Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 401–419.
139. Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, **423**, 337–342.
140. Ikeda, T., Kasai, M., Suzuki, J., et al. (2003) Multimerization of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) Isoforms and Regulation of Osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.*, **278**, 47217–47222.
141. Ono, T., Hayashi, M., Sasaki, F., et al. (2020) RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm. Regen.*, **40**, 2.
142. Armstrong, A. P., Tometsko, M. E., Glaccum, M., et al. (2002) A RANK/TRAF6-dependent Signal Transduction Pathway Is Essential for Osteoclast Cytoskeletal Organization and Resorptive Function. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44347–44356.

143. Lomaga, M. A., Yeh, W.-C., Sarosi, I., et al. (1999) TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.*, **13**, 1015–1024.
144. Iotsova, V., Caamaño, J., Loy, J., et al. (1997) Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2. *Nat. Med.*, **3**, nm1197-1285–1285.
145. Sandra, F., Hendarmin, L. and Nakamura, S. (2006) Osteoprotegerin (OPG) binds with Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL): Suppression of TRAIL-induced apoptosis in ameloblastomas. *Oral Oncol.*, **42**, 415–420.
146. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., et al. (1998) osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.*, **12**, 1260–1268.
147. Lane, D., Matte, I., Laplante, C., et al. (2013) 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.
148. Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Goto, M., et al. (1998) Characterization of Structural Domains of Human Osteoclastogenesis Inhibitory Factor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 5117–5123.
149. Mosheimer, B. A., Kaneider, N. C., Feistritz, C., et al. (2005) Syndecan-1 Is Involved in Osteoprotegerin-Induced Chemotaxis in Human Peripheral Blood Monocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**, 2964–2971.
150. Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H.-L., et al. (1998) Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, **93**, 165–176.
151. Bekker, P. J., Holloway, D., Nakanishi, A., et al. (2001) The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, **16**, 348–360.
152. Body, J.-J., Greipp, P., Coleman, R. E., et al. (2003) A Phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer*, **97**, 887–892.
153. Pourquié, O. (2001) Vertebrate somitogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 311–350.
154. Joyce, N. C., Hache, L. P. and Clemens, P. R. (2012) Bone Health and Associated Metabolic Complications in Neuromuscular Diseases. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.*, **23**, 773–799.
155. Kontulainen, S., Kannus, P., Haapasalo, H., et al. (2001) Good Maintenance of Exercise-Induced Bone Gain with Decreased Training of Female Tennis and Squash Players: A Prospective 5-Year Follow-Up Study of Young and Old Starters and Controls. *J. Bone Miner. Res.*, **16**, 195–201.
156. Warden, S. J., Roosa, S. M. M., Kersh, M. E., et al. (2014) Physical activity when young provides lifelong benefits to cortical bone size and strength in men. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 5337–5342.
157. Huiskes, R., Ruimerman, R., van Lenthe, G. H., et al. (2000) Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature*, **405**, 704–706.
158. Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., et al. (2002) Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *J. Biomech.*, **35**, 873–880.
159. McKay, H. and Smith, E. (2008) Winning the Battle Against Childhood Physical Inactivity: The Key to Bone Strength? *J. Bone Miner. Res.*, **23**, 980–985.
160. Hamrick, M. W., Ding, K.-H., Pennington, C., et al. (2006) Age-related loss of muscle mass and bone strength in mice is associated with a decline in physical activity and

- serum leptin. *Bone*, **39**, 845–853.
161. Sato, A. Y., Richardson, D., Cregor, M., et al. (2017) Glucocorticoids Induce Bone and Muscle Atrophy by Tissue-Specific Mechanisms Upstream of E3 Ubiquitin Ligases. *Endocrinology*, **158**, 664–677.
162. Lara-Castillo, N. and Johnson, M. L. (2020) Bone-Muscle Mutual Interactions. *Curr. Osteoporos. Rep.*, **18**, 408–421.
163. Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., et al. (2000) Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J. Physiol.*, **529**, 237–242.
164. (2009) The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **20**, 19–28.
165. Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., et al. (2008) Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metab.*, **7**, 33–44.
166. Chowdhury, S., Schulz, L., Palmisano, B., et al. (2020) Muscle-derived interleukin 6 increases exercise capacity by signaling in osteoblasts. *J. Clin. Invest.*, **130**, 2888–2902.
167. Hamrick, M. W. (2003) Increased bone mineral density in the femora of GDF8 knockout mice. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, **272**, 388–391.
168. DiGirolamo, D. J., Singhal, V., Chang, X., et al. (2015) Administration of soluble activin receptor 2B increases bone and muscle mass in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Bone Res.*, **3**, boneres201442.
169. Deng, L., Wang, Y., Peng, Y., et al. (2015) Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts. *Bone*, **79**, 37–42.
170. Lai, X., Price, C., Lu, X. L., et al. (2014) Imaging and quantifying solute transport across periosteum: implications for muscle-bone crosstalk. *Bone*, **66**, 82–89.
171. Novotny, S. A., Warren, G. L., Lin, A. S., et al. (2011) Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **21**, 183–193.
172. Isaac, C., Wright, A., Usas, A., et al. (2013) Dystrophin and Utrophin “Double Knockout” Dystrophic Mice Exhibit a Spectrum of Degenerative Musculoskeletal Abnormalities. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, **31**, 343–349.
173. Rufo, A., Del Fattore, A., Capulli, M., et al. (2011) Mechanisms Inducing Low Bone Density in Duchenne Muscular Dystrophy in Mice and Humans. *J. Bone Miner. Res.*, **26**, 1891–1903.
174. Yoon, S.-H., Sugamori, K. S., Grynepas, M. D., et al. (2016) Positive effects of bisphosphonates on bone and muscle in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **26**, 73–84.
175. Goodman, C. A., Hornberger, T. A. and Robling, A. G. (2015) Bone and skeletal muscle: Key players in mechanotransduction and potential overlapping mechanisms. *Bone*, **80**, 24–36.
176. Nakagaki, W. R., Bertran, C. A., Matsumura, C. Y., et al. (2011) Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of mdx mice. *Bone*, **48**, 372–379.
177. Brotto, M. and Bonewald, L. (2015) Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. *Bone*, **80**, 109–114.
178. Wada, E., Tanihata, J., Iwamura, A., et al. (2017) Treatment with the anti-IL-6 receptor antibody attenuates muscular dystrophy via promoting skeletal muscle regeneration in dystrophin-/utrophin-deficient mice. *Skelet. Muscle*, **7**.

179. Haidet, A. M., Rizo, L., Handy, C., et al. (2008) Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 4318–4322.
180. Wagner, K. R., Abdel-Hamid, H. Z., Mah, J. K., et al. (2020) Randomized phase 2 trial and open-label extension of domagrozumab in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.*, **30**, 492–502.
181. Porter, J. D., Khanna, S., Kaminski, H. J., et al. (2002) A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 263–272.
182. Vetrone, S. A., Montecino-Rodriguez, E., Kudryashova, E., et al. (2009) Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF- β . *J. Clin. Invest.*, **119**, 1583–1594.
183. Boulanger Piette, A., Hamoudi, D., Marcadet, L., et al. (2018) Targeting the Muscle-Bone Unit: Filling Two Needs with One Deed in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr. Osteoporos. Rep.*, **16**, 541–553.
184. Bernardi, S., Fabris, B., Thomas, M., et al. (2014) Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **394**, 13–20.
185. Tisato, V., Secchiero, P., Rimondi, E., et al. (2013) GM-CSF Exhibits Anti-Inflammatory Activity on Endothelial Cells Derived from Chronic Venous Disease Patients. *Mediators Inflamm.*, **2013**.
186. Juffer, P., Jaspers, R. T., Klein-Nulend, J., et al. (2014) Mechanically Loaded Myotubes Affect Osteoclast Formation. *Calcif. Tissue Int.*, **94**, 319–326.
187. Dufresne, S. S., Dumont, N. A., Bouchard, P., et al. (2015) Osteoprotegerin Protects against Muscular Dystrophy. *Am. J. Pathol.*, **185**, 920–926.
188. Rutti, S., Dusaulcy, R., Hansen, J. S., et al. (2018) Angiogenin and Osteoprotegerin are type II muscle specific myokines protecting pancreatic beta-cells against proinflammatory cytokines. *Sci. Rep.*, **8**, 10072.
189. Tobeiha, M., Moghadasian, M. H., Amin, N., et al. (2020) RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling. *RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling* <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2020/6910312/> (accessed Jun 10, 2020).
190. Dufresne, S. S., Dumont, N. A., Boulanger-Piette, A., et al. (2016) Muscle RANK is a key regulator of Ca²⁺ storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, **310**, C663–C672.
191. Dufresne, S. S., Boulanger-Piette, A., Bossé, S., et al. (2018) 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**.
192. Bonnet, N., Bourgoin, L., Biver, E., et al. RANKL inhibition improves muscle strength and insulin sensitivity and restores bone mass. *J. Clin. Invest.*, **129**, 3214–3223.
193. Philippou, A., Bogdanis, G., Maridaki, M., et al. (2009) Systemic cytokine response following exercise-induced muscle damage in humans. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **47**, 777–782.
194. Ock, S., Ahn, J., Lee, S. H., et al. (2012) Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand is a novel inducer of myocardial inflammation. *Cardiovasc. Res.*, **94**, 105–114.
195. Papadaki, M., Rinotas, V., Violitzi, F., et al. (2019) New Insights for RANKL as a

- Proinflammatory Modulator in Modeled Inflammatory Arthritis. *Front. Immunol.*, **10**, 97.
196. Hindi, S. M., Paul, P. K., Dahiya, S., et al. (2012) Reciprocal interaction between TRAF6 and notch signaling regulates adult myofiber regeneration upon injury. *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 4833–4845.
197. Paul, P. K., Bhatnagar, S., Mishra, V., et al. (2012) The E3 Ubiquitin Ligase TRAF6 Intercedes in Starvation-Induced Skeletal Muscle Atrophy through Multiple Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, **32**, 1248–1259.
198. Paul, P. K., Gupta, S. K., Bhatnagar, S., et al. (2010) Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J. Cell Biol.*, **191**, 1395–1411.
199. Hindi, S. M., Sato, S., Choi, Y., et al. (2014) Distinct roles of TRAF6 at early and late stages of muscle pathology in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **23**, 1492–1505.
200. St-Pierre, S. J. G., Chakkalakal, J. V., Kolodziejczyk, S. M., et al. (2004) Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **18**, 1937–1939.
201. Angelini, C. (2007) The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal. *Muscle Nerve*, **36**, 424–435.
202. Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., et al. (2010) Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.*, **9**, 77–93.
203. Machado, D. L., Silva, E. C., Resende, M. B. D., et al. (2012) Lung function monitoring in patients with duchenne muscular dystrophy on steroid therapy. *BMC Res. Notes*, **5**, 435.
204. Barber, B. J., Andrews, J. G., Lu, Z., et al. (2013) Oral corticosteroids and onset of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr.*, **163**, 1080-1084.e1.
205. Manzur, A. Y., Kuntzer, T., Pike, M., et al. (2008) Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst. Rev.*, CD003725.
206. Beenakker, E. A. C., Fock, J. M., Tol, M. J. V., et al. (2005) Intermittent Prednisone Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy: A Randomized Controlled Trial. *Arch. Neurol.*, **62**, 128–132.
207. Baltgalvis, K. A., Call, J. A., Nikas, J. B., et al. (2009) The effects of prednisolone on skeletal muscle contractility in mdx mice. *Muscle Nerve*, **40**, 443–454.
208. Griggs, R. C., Miller, J. P., Greenberg, C. R., et al. (2016) Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, **87**, 2123–2131.
209. Parente, L. (2017) Deflazacort: therapeutic index, relative potency and equivalent doses versus other corticosteroids. *BMC Pharmacol. Toxicol.*, **18**.
210. Biggar, W. D., Harris, V. A., Eliasoph, L., et al. (2006) Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **16**, 249–255.
211. Bello, L., Gordish-Dressman, H., Morgenroth, L. P., et al. (2015) Prednisone/prednisolone and deflazacort regimens in the CINRG Duchenne Natural History Study. *Neurology*, **85**, 1048–1055.
212. Shieh, P. B., McIntosh, J., Jin, F., et al. (2018) Deflazacort versus prednisone/prednisolone for maintaining motor function and delaying loss of ambulation: A post HOC analysis from the ACT DMD trial. *Muscle Nerve*, **58**, 639–645.
213. McDonald, C. M., Henricson, E. K., Abresch, R. T., et al. (2018) Long-term effects

- of glucocorticoids on function, quality of life, and survival in patients with Duchenne muscular dystrophy: a prospective cohort study. *Lancet Lond. Engl.*, **391**, 451–461.
214. Marques, M. J., Oggiam, D. S., Barbin, I. C. C., et al. (2009) Long-term therapy with deflazacort decreases myocardial fibrosis in mdx mice. *Muscle Nerve*, **40**, 466–468.
215. Pradhan, S., Ghosh, D., Srivastava, N. K., et al. (2006) Prednisolone in Duchenne muscular dystrophy with imminent loss of ambulation. *J. Neurol.*, **253**, 1309–1316.
216. Gm, F., Jm, F., A, P., et al. (1991) Long-term Benefit From Prednisone Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. Long-term Benefit From Prednisone Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1745340/> (accessed May 19, 2020).
217. Quattrocelli, M., Barefield, D. Y., Warner, J. L., et al. (2017) Intermittent glucocorticoid steroid dosing enhances muscle repair without eliciting muscle atrophy. *J. Clin. Invest.*, **127**, 2418–2432.
218. Guerron, A. D., Rawat, R., Sali, A., et al. (2010) Functional and molecular effects of arginine butyrate and prednisone on muscle and heart in the mdx mouse model of Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS One*, **5**, e11220.
219. Söderpalm, A.-C., Magnusson, P., Ahlander, A.-C., et al. (2007) Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **17**, 919–928.
220. King, W. M., Ruttencutter, R., Nagaraja, H. N., et al. (2007) Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, **68**, 1607–1613.
221. Bothwell, J. E., Gordon, K. E., Dooley, J. M., et al. (2003) Vertebral fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Pediatr. (Phila.)*, **42**, 353–356.
222. Lane, N. E., Yao, W., Balooch, M., et al. (2006) Glucocorticoid-Treated Mice Have Localized Changes in Trabecular Bone Material Properties and Osteocyte Lacunar Size That Are Not Observed in Placebo-Treated or Estrogen-Deficient Mice. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, **21**, 466–476.
223. Compston, J. (2018) Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Endocrine*, **61**, 7–16.
224. Hofbauer, L. C., Gori, F., Riggs, B. L., et al. (1999) Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*, **140**, 4382–4389.
225. Humphrey, E. L., Williams, J. H. H., Davie, M. W. J., et al. (2006) Effects of dissociated glucocorticoids on OPG and RANKL in osteoblastic cells. *Bone*, **38**, 652–661.
226. Connolly, A. M., Schierbecker, J., Renna, R., et al. (2002) High dose weekly oral prednisone improves strength in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **12**, 917–925.
227. Escolar, D. M., Hache, L. P., Clemens, P. R., et al. (2011) Randomized, blinded trial of weekend vs daily prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, **77**, 444–452.
228. Yoon, S.-H., Grynepas, M. and Mitchell, J. (2019) Intermittent PTH treatment improves bone and muscle in glucocorticoid treated Mdx mice: A model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Bone*, **121**, 232–242.
229. Chen, J., Yoon, S.-H., Grynepas, M. D., et al. (2019) Pre-treatment with Pamidronate Improves Bone Mechanical Properties in Mdx Mice Treated with Glucocorticoids. *Calcif. Tissue Int.*, **104**, 182–192.
230. Yoon, S.-H., Sugamori, K. S., Grynepas, M. D., et al. (2018) Effect of 25-

- Hydroxyvitamin D Deficiency and Its Interaction with Prednisone Treatment on Musculoskeletal Health in Growing Mdx Mice. *Calcif. Tissue Int.*, **103**, 311–323.
231. Birnkrant, D. J., Bushby, K., Bann, C. M., et al. (2018) Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.*, **17**, 347–361.
232. Sbrocchi, A. M., Rauch, F., Jacob, P., et al. (2012) 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*, **23**, 2703–2711.
233. Lemon, J., Turner, L., Dharmaraj, P., et al. (2019) Rhabdomyolysis and myoglobinuria following bisphosphonate infusion in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **29**, 567–568.
234. Prolia New FDA Drug Approval | CenterWatch. Prolia New FDA Drug Approval | CenterWatch <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/drug/1104/prolia-denosumab> (accessed Mar 21, 2019).
235. Cummings, S. R., Martin, J. S., McClung, M. R., et al. (2009) Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis. *N. Engl. J. Med.*, **361**, 756–765.
236. Smith, M. R., Egerdie, B., Toriz, N. H., et al. (2009) Denosumab in Men Receiving Androgen-Deprivation Therapy for Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **361**, 745–755.
237. Yanbey, Z. A. and Hansen, K. E. (2019) Denosumab in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.*, **13**, 2843–2852.
238. FDA Approves Prolia Denosumab For GlucocorticoidInduced Osteoporosis. FDA Approves Prolia Denosumab For GlucocorticoidInduced Osteoporosis <http://www.amgen.com/media/news-releases/2018/05/fda-approves-prolia-denosumab-for-glucocorticoidinduced-osteoporosis> (accessed Jun 9, 2020).
239. Kumaki, D., Nakamura, Y., Sakai, N., et al. (2018) Efficacy of Denosumab for Glucocorticoid-Induced Osteoporosis in an Adolescent Patient with Duchenne Muscular Dystrophy: A Case Report. *JBJS Case Connect.*, **8**, e22.
240. Leblanc, A. D., Schneider, V. S., Evans, H. J., et al. (1990) Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, **5**, 843–850.
241. Rutherford, O. M. and Jones, D. A. (1992) The relationship of muscle and bone loss and activity levels with age in women. *Age Ageing*, **21**, 286–293.
242. Perrini, S., Laviola, L., Carreira, M. C., et al. (2010) The GH/IGF1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J. Endocrinol.*, **205**, 201–210.
243. Dufresne, S. S., Boulanger-Piette, A., Bossé, S., et al. (2018) 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**.
244. Kamijo, S., Nakajima, A., Ikeda, K., et al. (2006) Amelioration of bone loss in collagen-induced arthritis by neutralizing anti-RANKL monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 124–132.
245. Lynch, G. S., Hinkle, R. T., Chamberlain, J. S., et al. (2001) Force and power output of fast and slow skeletal muscles from mdx mice 6-28 months old. *J. Physiol.*, **535**, 591–600.

246. Breuil, V., Schmid-Antomarchi, H., Schmid-Alliana, A., et al. (2003) The receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) is a new chemotactic factor for human monocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **17**, 1751–1753.
247. Huang, R., Wang, X., Zhou, Y., et al. (2017) RANKL-induced M1 macrophages are involved in bone formation. *Bone Res.*, **5**, 17019.
248. Li, Y.-P. (2003) TNF-alpha is a mitogen in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **285**, C370-376.
249. Zhao, Q., Yang, S. T., Wang, J. J., et al. (2015) TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF-κB activation and impairment of IGF-1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **458**, 790–795.
250. Peterson, J. M., Kline, W., Canan, B. D., et al. (2011) Peptide-Based Inhibition of NF-κB Rescues Diaphragm Muscle Contractile Dysfunction in a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Med.*, **17**, 508–515.
251. Yang, Q., Tang, Y., Imbrogno, K., et al. (2012) AAV-based shRNA silencing of NF-κB ameliorates muscle pathologies in *mdx* mice. *Gene Ther.*, **19**, 1196–1204.
252. Peterson, J. M., Wang, D. J., Shettigar, V., et al. (2018) NF-κB inhibition rescues cardiac function by remodeling calcium genes in a Duchenne muscular dystrophy model. *Nat. Commun.*, **9**, 3431.
253. Hoyer-Kuhn, H., Netzer, C., Koerber, F., et al. (2014) Two years' experience with denosumab for children with Osteogenesis imperfecta type VI. *Orphanet J. Rare Dis.*, **9**, 145.
254. 2018 Abstracts - American Society for Bone and Mineral Research. 2018 Abstracts - American Society for Bone and Mineral Research <http://www.asbmr.org/education/2018-abstracts> (accessed Mar 16, 2019).
255. Hamoudi, D., Marcadet, L., Piette, A. B., et al. (2019) An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice. *Hum. Mol. Genet.*
256. Nakamichi, Y., Udagawa, N., Kobayashi, Y., et al. (2007) Osteoprotegerin Reduces the Serum Level of Receptor Activator of NF-κB Ligand Derived from Osteoblasts. *J. Immunol.*, **178**, 192–200.
257. Terracciano, C., Celi, M., Lecce, D., et al. (2013) Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA*, **24**, 1095–1100.
258. Gao, Y., Arfat, Y., Wang, H., et al. (2018) Muscle Atrophy Induced by Mechanical Unloading: Mechanisms and Potential Countermeasures. *Front. Physiol.*, **9**.
259. Bonnet, N., Bourgoin, L., Biver, E., et al. (2019) RANKL inhibition improves muscle strength and insulin sensitivity and restores bone mass. *J. Clin. Invest.*, **130**.
260. Hamoudi, D., Marcadet, L., Piette Boulanger, A., et al. (2019) An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice. *Hum. Mol. Genet.*, **28**, 3101–3112.
261. Hussein, M. R., Hamed, S. A., Mostafa, M. G., et al. (2006) The effects of glucocorticoid therapy on the inflammatory and Dendritic cells in muscular dystrophies. *Int. J. Exp. Pathol.*, **87**, 451–461.
262. Rosenberg, A. S., Puig, M., Nagaraju, K., et al. (2015) Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.*, **7**, 299rv4.

Annexe 1 : Le traitement anti-RANKL améliore la fonction musculaire et l'ostéoporose induite chez les souris *mdx* traitées aux glucocorticoïdes.

ARTICLE EN PRÉPARATION

PREMIER ÉBAUCHE

Full title

Anti-RANKL treatment improves muscle and bone in glucocorticoid treated *mdx* mice

Authors' full names

Dounia Hamoudi¹, Zineb Bouredji¹, Laetitia Marcadet¹, Hideo Yagita² Anteneh Argaw¹, and Jérôme Frenette^{1,3}

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 -Department of Immunology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, Japan.

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

Résumé

Les patients atteints de DMD souffrent d'une faiblesse musculaire progressive, accompagnée d'une fragilité osseuse exacerbée par le traitement aux glucocorticoïdes (GCs). Le denosumab, un anticorps monoclonal humain ciblant RANKL, est actuellement prescrit pour l'ostéoporose induite par les GCs. Nous avons donc étudié l'effet à long terme des traitements combinés avec l'anti-RANKL et le deflazacort (DFZ) sur la pathologie musculaire et l'ostéoporose induite par les GCs chez les souris dystrophiques. Les résultats préliminaires de cette étude ont montré que les traitements anti-RANKL et DFZ n'ont pas d'effets synergiques sur les performances des muscles dystrophiques. Cependant, l'anti-RANKL protège contre les effets indésirables du DFZ sur le tissu osseux des souris dystrophiques. Ainsi, le denosumab récemment approuvé par la FDA pour le traitement de l'ostéoporose pourrait être bénéfique pour les patients atteints de DMD qui reçoivent un traitement aux GCs.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an orphan X-linked recessive disease resulting from mutations in the dystrophin gene. Patients with DMD suffer from progressive muscle weakness, cardiac muscle dysfunction, and degeneration accompanied by low bone mineral density and bone fragility. Glucocorticoids (GCs), which remain the standard of care for patients with DMD, increase the risk of developing osteoporosis. Denosumab, a human monoclonal antibody targeting the receptor-activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) to prevent activation of its receptor (RANK) involved in osteoclast differentiation and bone resorption, is currently prescribed for GC-induced osteoporosis. This study examined the effect of long-term combination treatments with anti-RANKL and deflazacort (DFZ) on muscle pathology and GC-induced osteoporosis in dystrophic *mdx* mice. We showed that 8-week treatment with anti-RANKL is as effective as DFZ and the co-treatment at improving muscle function of *mdx* mice. This functional improvement was associated with a reduction in muscle damage, fibrosis, serum CK levels, and the number of inflammatory cells. A three-point bending test showed that an 8-week period of anti-RANKL treatment significantly increased femoral bone stiffness with or without GCs treatment. The DFZ treatment significantly decreased the cross-sectional area of the tibia that was rescued by anti-RANKL treatment. In conclusion, anti-RANKL and DFZ treatments did not have synergistic effects on skeletal muscle performance. However, anti-RANKL is effective in countering the adverse effects of DFZ on bone tissue in dystrophic *mdx* mice. Thus, denosumab recently approved by the FDA for the treatment of osteoporosis may be beneficial for patients with DMD receiving GCs.

A1.1 Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an orphan X-linked recessive disease resulting from mutations in the dystrophin gene. The dystrophin protein connects the cytoskeleton of muscle fibers to the extracellular matrix, thereby acting as an important stabilizer and shock absorber for muscle fibers during contraction. The absence of this protein causes structural fragility, vulnerability to contraction-induced damage, sarcolemmal permeability to macromolecules, persisting elevation of intracellular calcium levels and reactive oxygen species (ROS) leading to progressive inflammation, necrosis, fibrosis, muscle weakness, and ultimately to progressive skeletal and cardiac muscles degeneration and dysfunction (1). Patients with DMD have significantly reduced bone mineral density (BMD) and high prevalence of fractures with a poor prognosis for recovery in the absence of treatments to mitigate osteoporosis (2), (3). Although major advances have recently been made in the genetics and pathogenesis of DMD, no effective cure has yet been found.

Glucocorticoids (GC), such as prednisone (PRED) and deflazacort (DFZ) can delay the progressive loss of muscle strength and function, prolong independent ambulation, improve pulmonary function, delay the onset of cardiomyopathy, and reduce the incidence of scoliosis (4), (5). Although the mechanism of action is not fully understood, cumulative results indicate that PRED and DFZ can inhibit inflammation and muscle proteolysis and stimulate myoblast proliferation slowing down the progression of muscle disease and the onset of cardiomyopathy in patients with DMD (5), (6), (7). However, when compared to PRED, DFZ reduces weight gain associated with GCs intake making it more tolerable and frequently prescribed for patients affected by DMD (8), (9). Nonetheless, GCs are the most common cause of secondary osteoporosis and the most common form of drug-induced osteoporosis. GC therapy results in a drastic reduction in bone mass and density, increases markedly the incidence of long bone and vertebral fractures causing potentially spinal compressions which do not occur in naïve and untreated patients with DMD (10), (11), (12). Current international care consensus in DMD recommends the use of intravenous bisphosphonates upon identification of first fragility fracture (13). Its use is associated with resolution of back pain, stabilization of vertebral fracture, and modest improvement in bone density (14). However, such therapy does not seem to completely prevent the development

of new vertebral fractures and is associated with the appearance of adverse effects such as hypocalcemia, fever, muscle aches, nausea and vomiting, especially with first dose, but rarer side effects including rhabdomyolysis have been reported in DMD (14), (15). Denosumab, a human monoclonal antibody targeting the receptor-activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) to prevent the activation of its receptor (RANK) implicated in osteoclast differentiation and bone resorption, is currently prescribed for osteoporosis, GC-induced osteoporosis, and bone metastases (16), (17), (18), (19). In a recent case report, one adolescent affected by DMD and treated with GCs received denosumab administration for 18 months leading to improvements in lumbar spine bone density and bone turnover markers, with no significant adverse events (20). Denosumab has also recently been shown to improve the lean mass and handgrip strength in osteoporotic women while mice overexpressing RANKL present muscle atrophy and weakness (21). The dystrophin-deficient *mdx* mouse is the most common animal model for DMD. The mice exhibit increased susceptibility to mechanical stress, leading to progressive muscle degeneration, chronic inflammatory cell recruitment (e.g., T lymphocytes and macrophages), release of oxygen-free radicals and proteases, and ultimately the formation of fibrotic and non-functional tissues (22), (23), (24). GCs also decrease cortical bone thickness in *mdx* mice making them weaker and more easily fractured (25). We have previously shown that pharmacological treatments of *mdx* mice with recombinant full-length OPG fused with Fc (FL-OPG-Fc) and, to a lesser extent, truncated OPG-Fc (TR-OPG-Fc) or anti-RANKL antibody protect against muscular dystrophy, suggesting that the RANK/RANKL/OPG pathway may be involved in muscle diseases (26), (27). Interestingly, we recently showed for the first time using dystrophic mice that RANK/RANKL protein levels are increased in the microenvironment of dystrophic muscles and that inhibiting their interaction with anti-RANKL antibody protects against skeletal muscle dysfunctions and inhibits NF- κ B activity while enhancing bone mechanical properties (28). This evidence suggests that anti-RANKL treatment may preserve muscle function and prevent GC-induced bone loss, however its effect on bone has not yet been characterized in a DMD mouse model challenged by GCs.

The present study aimed to assess the long-term effects of combined anti-RANKL and DFZ treatments on muscle pathology and GC-induced osteoporosis in dystrophic *mdx* mice. Our findings show that anti-RANKL and DFZ act without synergy on muscle function,

force production and muscle integrity and reduce inflammation in dystrophic muscles. DFZ-induced bone-side effects are rescued by anti-RANKL treatment in *mdx* mice. Anti-RANKL may thus be effective in preserving muscle function and preventing GC-induced bone loss in dystrophic mice.

A1.2 Results

The anti-RANKL and/or DFZ treatments improve dystrophic muscle function with no additive effect

To assess the long-term effects of combined anti-RANKL and DFZ on dystrophic skeletal muscle function, 5-week-old *mdx* mice were treated with DFZ [1.2mg/kg/day] or anti-RANKL [4mg/kg/3d], or both for 8 weeks. As expected, animal body weight increased over time for all mice (Fig. 1A). Mice from the two experimental groups treated with DFZ and those from the WT group had significantly lower body mass when compared to the placebo IgG-treated mice (Fig. 1A). The whole limb grip force was measured at 5-, at 9- and 13-weeks of age and analysis of the data show a significant age-dependent increase of the grip force normalized to body mass (gF/gBM) in all the mice. The whole limb grip force of IgG-treated *mdx* mice was significantly lower than that of WT mice. Compared with the IgG treated mice, 8 weeks treatment with either anti-RANKL and/or DFZ significantly improved grip strength (Fig. 1B). Although significantly different from the IgG treated mice, the anti-RANKL+DFZ combined treatment did not have synergistic effects on whole limb grip force (Fig.1B). Next, we investigated the effect of combined treatment on the contractile properties of dystrophic soleus (Sol) and *extensor digitorum longus* (EDL) muscles. The anti-RANKL treatment resulted in a moderate but statistically non-significant increase of the absolute tetanic forces (P0) of dystrophic EDL and Sol muscles (#p=0.1; Table 1) but significantly improved the maximum specific force (sP0) of dystrophic EDL and Sol muscles by 30% and 34%, respectively compared to IgG-treated *mdx* mice. DFZ treatment alone only increased the maximum specific force (sP0) of Sol muscles. Anti-RANKL+DFZ slightly increased EDL sP0 while this co-treatment enhanced by up to 39% Sol muscle sP0 (Fig.1 C and D). The combined treatment did not have a synergistic effect on muscle contractility. To evaluate the effect of the treatments on muscle mass, muscles were weighed, and their mass was normalized to the body mass (BM). As expected, the EDL and Sol muscles of IgG-treated-*mdx* mice had higher muscle mass compared to WT (65% and 70%, respectively) and muscle mass/BM ratios (31% and 38%, respectively; table 2). Interestingly, an 8-week treatment with anti-RANKL, but not DFZ, significantly decreased by 10% the muscle mass/BM ratio (Table 2). Co-treatment slightly decreased the EDL muscle mass/BM ratio when compared with the IgG-treated muscles (Table 2).

Anti-RANKL treatment is as effective as deflazacort and co-treatment in reducing dystrophic muscle damage and fibrosis

We next investigated the effects of anti-RANKL treatment and /or DFZ on muscle damage and fibrosis, one of the most distinctive features of dystrophic muscles. As expected, muscle damage and fibrosis were significantly elevated in IgG-treated *mdx* mice compared to WT mice (Fig. 2A). Analysis of hematoxylin and eosin-stained muscle sections revealed a marked reduction in the damaged area of dystrophic EDL muscles from the three experimental treatments (6.29-7.65 %) when compared with IgG-treated *mdx* mice (26.49 %; Fig. 2B). We then assessed muscle fibrosis by quantifying the Masson trichrome-stained area. The fibrotic area was significantly lower in the three experimental treatments compared with IgG-treated *mdx* mice (3-3.5% vs. 12.94%, respectively; Fig. 2C). In terms of muscle damage and fibrosis, the combined treatment of anti-RANKL and DFZ was not superior to anti-RANKL alone (Fig. 2B and C). We then measured serum CK levels, an indirect indicator of muscle damage. As expected, CK levels were 4.7-fold higher in IgG-treated *mdx* mice compared with WT mice. DFZ, anti-RANKL, and co-treatments reduced serum CK levels by roughly 45%, 58% and 46%, respectively, compared with the IgG-treated *mdx* mice (Fig. 2D).

The anti-RANKL is as effective as deflazacort and co-treatment in reducing muscle inflammation

To investigate the possibility that the decrease in the muscle damage area is correlated with low inflammatory cell infiltration, EDL muscle sections were labeled with anti-Ly6-G/C, a marker for neutrophils (Fig. 3A). The anti-RANKL, DFZ, and the co-treatment significantly reduced the number of neutrophils in dystrophic EDL muscles compared to EDL muscles from IgG-treated *mdx* mice (3202 ± 566.4 , 2050 ± 232.8 , 2495 ± 663.3 respectively vs. 5719 ± 530.4 cells/mm³, Fig. 3B).

The anti-RANKL treatment increased bone stiffness and counteracted DFZ-bone side effects of dystrophic mice

Three-point bending tests were performed at the femur mid-diaphysis to determine whether anti-RANKL can counteract the bone side effect of GC treatment. The anti-RANKL treatment [4mg/kg/3d] significantly increased the stiffness of the femoral bone compared with IgG or DFZ-treated *mdx* mice (Fig. 4A). The DFZ treatment did not affect bone mechanical properties, but significantly reduced cross-sectional area in the anterior portion of the tibial bone compared with IgG-treated *mdx* mice. The anti-RANKL treatment significantly increased the cross-sectional area of the tibia and counteracted the negative effects of DFZ in *mdx* mice (Fig. 4B).

A1.3 Discussion

In addition to its role in regulating bone formation and remodelling, evidence is now accumulating that the RANK/RANKL/OPG pathway play a role in muscle function. Denosumab, an anti-human RANKL, has been shown to improve lean body mass and grip strength in osteoporotic women, while mice overexpressing RANKL exhibit muscle atrophy and weakness are the most recent clinical and pre-clinical observations supporting this claim (29). The anti-RANKL therapy may thus restore muscle function and prevent GC-induced bone loss. The present study shows anti-RANKL improves muscle function but anti-RANKL and DFZ treatments did not have synergistic effects on skeletal muscle performance. However, anti-RANKL is effective in countering the adverse effects of DFZ on bone tissue in dystrophic *mdx* mice.

In the present study, we showed that 8-week treatment with anti-RANKL is as effective as DFZ and the co-treatment at improving the whole limb grip force of *mdx* mice. These results are in line with previous reports which highlighted the beneficiary effects of GCs on grip strength in *mdx* mice during the first 7 weeks of treatment (30). When tested *ex vivo* and consistent with previous results, the anti-RANKL treatment improved the maximum specific force (sP_0) of isolated EDL and Sol muscles (31). However, DFZ treatment failed to significantly increase the maximum specific force (sP_0) of fast-twitch EDL muscles, while it had positive effect on the slow-twitch Sol muscles, suggesting a phenotype-specific effect of DFZ. Accordingly, GC treatment was shown to influence muscle fiber type distribution in *mdx* mice, preferentially increasing type-I slow-twitch fibers (32). Moreover, daily GC treatment was found to improve muscle integrity while triggering muscle atrophy, overall, those data showed that GC did not improve muscle strength or function (33). Interestingly, our findings demonstrated no synergistic effect between anti-RANKL and DFZ on muscle function *ex vivo*. The co-treatment increased the force production of dystrophic EDL and Sol muscles to the same extent as anti-RANKL alone. These results are consistent with the reduction of the normalized EDL muscle mass/body mass following anti-RANKL treatment (table I) and to a lesser extent with the co-treatment, suggesting that the gain in specific force is most likely due to a reduction of non-contractile tissues i.e., edema, fibrosis, or fat cells.

Nonetheless, how anti-RANKL and DFZ interact in dystrophic skeletal muscles is very poorly understood and will require further in-depth investigations.

In addition to muscle weakness, muscles from patients with DMD and dystrophic *mdx* mice present an accumulation of muscle inflammation, damage, fibrosis, and high serum CK activity (34), (23). Here we showed that the improvements of muscle function with the anti-RANKL and the co-treatment were associated with a significant reduction in muscle damage, serum CK levels, and muscle fibrosis suggesting that the integrity of the dystrophic muscles had improved. Muscle integrity was improved following DFZ treatment alone as previously shown on DMD patients and dystrophic mice under GC treatment (35), (33). Our findings indicated that anti-RANKL, DFZ, and co-treatment significantly reduced the density of neutrophils. Chronic inflammation and leucocyte recruitment are a prominent feature in DMD and the specific depletion of inflammatory cells reduces muscular necrosis and inflammation in *mdx* mice (36), (37). Our results are of the utmost importance since neutrophils are the first cells to invade damaged muscles (38). The antibody depletion of host neutrophils resulted in a delayed and significantly reduced myofiber necrosis at the acute onset of dystropathology in *mdx* mice (36). Similarly, we previously found that the anti-RANKL treatment alone reduces muscle inflammation and muscle damage thus improving muscle function of dystrophic mice (31). Moreover, GCs are a well-known anti-inflammatory drug, and our results confirm their potent effect on muscle inflammation (39). Overall, anti-RANKL and DFZ treatments may protect the integrity of myofibers by reducing the number of recruited inflammatory cells.

Since bone loss occurs concomitantly with muscular dystrophy, anti-resorptive therapy may be a useful approach to inhibit the negative effects of dystrophic muscle and GC therapy on bone. Our findings showed that an 8-week anti-RANKL treatment significantly increased femoral bone stiffness with or without GCs treatment. Although the biomechanical properties were found to be significantly lower in dystrophic mice, GCs for 8 weeks in growing dystrophic mice did not worsen the biomechanical properties of femoral bone. Since bone loss in GC-induced osteoporosis occurs primarily in the vertebrae in patients with DMD, the lumbar vertebral bones may represent a better site than femur to reverse GC-induced

osteoporosis (12). However, micro-computed tomography (μ CT), which simultaneously quantifies bone volumetric density and geometry at a higher resolution is a more sensitive than biomechanical testing (40). As previously reported, the μ CT analysis showed that DFZ treatment significantly decreased the cross-sectional area of the tibia (32). Interestingly, the anti-RANKL treatment counteracted the negative effects of DFZ on the cross-sectional area of the tibia. Accordingly, previous study showed that denosumab prevented GC-induced femoral and vertebral bone loss and impairment of bone strength in mice (41). Furthermore, a prolonged 18-month anti-RANKL treatment improved lumbar bone mineral density and bone turnover markers in a GC-treated boy with DMD without significant adverse events (20). Thus, denosumab recently approved by FDA for the treatment of GC-induced osteoporosis, may be beneficial for patients with DMD.

In conclusion, we showed that anti-RANKL, DFZ or combined treatment results in less muscle damage, fibrosis, and inflammation increasing muscle function of dystrophic muscles with no additive effect. This study showed, for the first time the therapeutic potential of anti-RANKL treatment on GC-induced osteoporosis in a mouse model of DMD. The possible crosstalk and mechanism of action of both treatments should be investigated to understand some antagonistic effects of the combined treatment. Because anti-RANKL has a beneficial effect on skeletal muscle and bone functions while counteracting the negative effects of GCs on skeletal muscle, we have high hopes that this treatment may open the way for new treatments and radical change in clinical management of patients affected by DMD.

A1.4 Materials and Methods

Animals

All animal experiments were approved by the Université Laval Research Center Animal Care and Use Committee based on The Canadian Council on Animal Care guidelines. Male wild type (WT) (C57BL/6J) and *mdx* (C57BL/10ScSn-Dmdmdx/J) mice were initially purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and were bred in our specific-pathogen-free animal facility. The mice were housed under a 12:12-h light/dark cycle with food *ad libitum*.

The mice received intraperitoneal (i.p.) injections of control IgG [4 mg/kg] every 3 days, anti-mouse RANKL mAbs (IK22-5) [4 mg/kg] every 3 days (244)(243)(242)(241)(240)(239)(42), DFZ [1.2mg/kg/day] in drinking water with IgG injections or the combination of anti-RANKL and DFZ from 5-6 to 13-14 weeks of age, i.e., for 8 weeks. Age-matched WT and dystrophic mice received an equivalent volume of control IgG. Water intake was measured in all experimental groups (mean = 3 mL/day per mouse). The mice were weighed twice weekly to determine the appropriate drug dose and to monitor growth. EDL and sol muscles from the left hindlimbs were removed to assess their contractile properties. Muscles from the right hindlimbs were snap frozen and were stored at -80 °C for Western blot analyses. At the end of the experimental procedures, the mice were euthanized by cervical dislocation under anesthesia.

Grip force test

The whole limb grip force test was performed on mice before and after 4 or 8 weeks of treatment. Each mouse was held by its tail and grasped horizontally with its front paws placed on the metal grid attached to a force meter. The highest force produced during pulling was measured using a digital force meter (Columbus Instruments). The test was repeated three times with at least a 1-min rest between measurements. Maximum grip force was normalized to body mass.

Assessment of skeletal muscle 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 and Sol muscles were incubated at 25°C in oxygenated Krebs-Ringer solution with [2 mg/mL] of added glucose. Once the optimal length (L_0) 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 (P_0 , g) values were recorded and analyzed using Dynamic Muscle Data Analysis software (Aurora Scientific Inc.). Resistance to eccentric contractions-induced muscle dysfunction was tested using 7 tetanic contractions at 150 Hz for 500 ms followed by muscle lengthening at 0.5 L_0/s for 200 ms with a 1-min rest period between contractions. Maximum specific tetanic tension sP_0 (N/cm^2) values were obtained by normalizing the absolute force P_0 with the cross-sectional area (CSA) using the following equation: $sP_0 = P_0/CSA$. CSA was determined by dividing the muscle mass by the product of the optimum fiber length (L_f) corresponding to the result of multiplying L_0 with the fiber length ratio (0.44 for EDL muscles and 0.71 for Sol muscles) and the muscle density (1.06 mg/mm^3).

Immunofluorescence and staining

Transversal EDL muscle sections (10 μm) were cut using a refrigerated ($-20^\circ C$) cryostat (Leica Microsystems CM1850). Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin using the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich) to assess muscle damage. Masson's trichrome staining was used to assess collagen infiltration. The damaged area was defined as the area not occupied by normal or regenerating muscle fibers with the presence of infiltrating cells. Digital photographs were acquired from at least five different sections at 400x magnification with a digital camera and were examined with an inverted microscope (Nikon). Data are expressed as the percentage of damaged and fibrotic areas with respect to the total area using ImageJ (software version 1.41). In other preparations for double-labeling, the sections were washed for 5 min with PBS, fixed for 10 min with 4% PFA and then incubated overnight at 4°C with anti-F4/80 (Bio-Rad, 1:100) and anti-laminin (Sigma-Aldrich, 1:250) antibodies in blocking solution. The sections were washed briefly with PBS, incubated with Alexa Fluor 488 or 594-conjugated secondary antibody (Invitrogen, 1:500)

for 1 h at room temperature, and washed three times for 15 min with PBS. The slides were then mounted with Fluoromount-G™, with DAPI immunofluorescent stain and were analyzed with an Axio Imager M2 microscope connected to an AxioCam camera using ZEN2 software (Zeiss, Germany).

Serum creatine kinase assay

Blood collected from the mice by cardiac puncture was allowed to clot and was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to a clean tube for a second round of centrifugation. The serum was then collected and was stored at –80°C until used. Serum creatine kinase (CK) levels, an indicator of muscle damage and sarcolemma membrane fragility in dystrophic mice, were determined using a commercially available kit according to the manufacturer's instructions (Pointe Scientific Creatine Kinase CK10 reagent, Fisher Scientific) and a modified protocol from Treat NMD_M.2.2.001. Serum CK activities were measured using a microplate reader (Infinite F200, TECAN) and were expressed as U/L.

Three-point bending testing of the tibia and femur mid-diaphysis

The functional properties of bone were assessed by performing a three-point bending test at mid-diaphysis using an MTS Bionix® servohydraulic test system (MTS Systems Corporation). The tibia and femur were collected at the end of the treatment and were placed on a set of supports separated by 1 cm. The rate of displacement was 2 mm/min until failure. The load displacement curve for each bone was analyzed, and the functional properties of the bone were quantified as ultimate load and stiffness. Ultimate load was determined as the highest load obtained prior to failure, and stiffness corresponded to the highest slope along the linear portion of the curve prior to reaching the ultimate load.

Cortical and trabecular bone analysis by microcomputed tomography (μCT)

The changes in trabecular architecture and cortical geometry were assessed by μCT (Skyscan 1172) of the right tibia. For trabecular analysis, high-resolution scans with an isotropic voxel size of 5 μm were acquired (60kV, 0.5mm aluminum filter, 0.6° rotation

angle). Two images were averaged at each rotation angle. Data were reconstructed using Skyscan NRecon software v1.6.9 (Bruker, Belgium). A 250-slice subset of metaphyseal trabecular bone was analyzed using the base of the growth plate as a standard reference point. The whole-bone cortical analysis was completed using the BoneJ image analysis package for Fiji. Reconstructed scans of individual bones were cropped to 10-90% of total bone length to exclude the epiphysis and proximal and distal growth plates. Cortical bone parameters were analyzed using the BoneJ slice geometry function.

Statistical analyses

All values are expressed as means \pm SEM. The data were analyzed using Prism (version 3.1) with either Student's t-test, one-way ANOVA or two-way ANOVA with Dunnett's post hoc test. The levels of significance were set at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$.

A1.5 Acknowledgements

This work was supported by grants to JF from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (RGPIN-2016-05845) and two important foundations, Ryan's Quest and Jesse's Journey.

A1.6 References

1. Deconinck, N. and Dan, B. (2007) Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. *Pediatr. Neurol.*, **36**, 1–7.
2. Larson, C. M. and Henderson, R. C. (2000) Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr. Orthop.*, **20**, 71–74.
3. McDonald Denise G M, Kinali Maria, Gallagher Andrew C, et al. (2007) Fracture prevalence in Duchenne muscular dystrophy. *Dev. Med. Child Neurol.*, **44**, 695–698.
4. Moxley, R. T., Ashwal, S., Pandya, S., et al. (2005) Practice parameter: corticosteroid treatment of Duchenne dystrophy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, **64**, 13–20.
5. Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., et al. (2010) Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.*, **9**, 77–93.
6. Machado, D. L., Silva, E. C., Resende, M. B. D., et al. (2012) Lung function monitoring in patients with duchenne muscular dystrophy on steroid therapy. *BMC Res. Notes*, **5**, 435.
7. Barber, B. J., Andrews, J. G., Lu, Z., et al. (2013) Oral corticosteroids and onset of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *J. Pediatr.*, **163**, 1080-1084.e1.
8. Griggs, R. C., Miller, J. P., Greenberg, C. R., et al. (2016) Efficacy and safety of deflazacort vs prednisone and placebo for Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, **87**, 2123–2131.
9. Biggar, W. D., Harris, V. A., Eliasoph, L., et al. (2006) Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **16**, 249–255.
10. Söderpalm, A.-C., Magnusson, P., Ahlander, A.-C., et al. (2007) Low bone mineral density and decreased bone turnover in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **17**, 919–928.
11. King, W. M., Ruttencutter, R., Nagaraja, H. N., et al. (2007) Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, **68**, 1607–1613.
12. Bothwell, J. E., Gordon, K. E., Dooley, J. M., et al. (2003) Vertebral fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. *Clin. Pediatr. (Phila.)*, **42**, 353–356.
13. Birnkrant, D. J., Bushby, K., Bann, C. M., et al. (2018) Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol.*, **17**, 347–361.
14. Sbrocchi, A. M., Rauch, F., Jacob, P., et al. (2012) 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*, **23**, 2703–2711.

15. Lemon, J., Turner, L., Dharmaraj, P., et al. (2019) Rhabdomyolysis and myoglobinuria following bisphosphonate infusion in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **29**, 567–568.
16. Boyce, B. F., Xiu, Y., Li, J., et al. (2015) NF- κ B-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. *Endocrinol. Metab.*, **30**, 35–44.
17. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., et al. (1998) osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.*, **12**, 1260–1268.
18. Yanbei, Z. A. and Hansen, K. E. (2019) Denosumab in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.*, **13**, 2843–2852.
19. Zaheer, S., LeBoff, M. and Lewiecki, E. M. (2015) Denosumab for the Treatment of Osteoporosis. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **11**, 461–470.
20. Kumaki, D., Nakamura, Y., Sakai, N., et al. (2018) Efficacy of Denosumab for Glucocorticoid-Induced Osteoporosis in an Adolescent Patient with Duchenne Muscular Dystrophy: A Case Report. *JBJS Case Connect.*, **8**, e22.
21. Bonnet, N., Bourgoin, L., Biver, E., et al. RANKL inhibition improves muscle strength and insulin sensitivity and restores bone mass. *J. Clin. Invest.*, **129**, 3214–3223.
22. Whitehead, N. P., Yeung, E. W. and Allen, D. G. (2006) Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 657–662.
23. Evans, N. P., Misyak, S. A., Robertson, J. L., et al. (2009) Dysregulated Intracellular Signaling and Inflammatory Gene Expression During Initial Disease Onset in Duchenne Muscular Dystrophy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, **88**, 502–522.
24. Tidball, J. G. and Wehling-Henricks, M. (2007) The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. *J. Appl. Physiol.*, **102**, 1677–1686.
25. Yoon, S.-H., Chen, J., Grynepas, M. D., et al. (2016) Prophylactic pamidronate partially protects from glucocorticoid-induced bone loss in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Bone*, **90**, 168–180.
26. Dufresne, S. S., Dumont, N. A., Bouchard, P., et al. (2015) Osteoprotegerin Protects against Muscular Dystrophy. *Am. J. Pathol.*, **185**, 920–926.
27. Dufresne, S. S., Boulanger-Piette, A., Bossé, S., et al. (2018) 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**.
28. Hamoudi, D., Marcadet, L., Piette, A. B., et al. (2019) An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice. *Hum. Mol. Genet.*
29. Bonnet, N., Bourgoin, L., Biver, E., et al. (2019) RANKL inhibition improves muscle strength and insulin sensitivity and restores bone mass. *J. Clin. Invest.*, **129**, 3214–3223.
30. Novotny, S. A., Warren, G. L., Lin, A. S., et al. (2012) Prednisolone treatment and restricted physical activity further compromise bone of mdx mice. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, **12**, 16–23.
31. Hamoudi, D., Marcadet, L., Piette Boulanger, A., et al. (2019) An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice. *Hum. Mol. Genet.*, **28**, 3101–3112.
32. Yoon, S.-H., Grynepas, M. and Mitchell, J. (2019) Intermittent PTH treatment improves bone and muscle in glucocorticoid treated Mdx mice: A model of Duchenne

Muscular Dystrophy. *Bone*, **121**, 232–242.

33. Quattrocelli, M., Barefield, D. Y., Warner, J. L., et al. (2017) Intermittent glucocorticoid steroid dosing enhances muscle repair without eliciting muscle atrophy. *J. Clin. Invest.*, **127**, 2418–2432.
34. Nowak, K. J. and Davies, K. E. (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.*, **5**, 872–876.
35. Hussein, M. R., Hamed, S. A., Mostafa, M. G., et al. (2006) The effects of glucocorticoid therapy on the inflammatory and Dendritic cells in muscular dystrophies. *Int. J. Exp. Pathol.*, **87**, 451–461.
36. Hodgetts, S., Radley, H., Davies, M., et al. (2006) Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **16**, 591–602.
37. Radley, H. G. and Grounds, M. D. (2006) Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol. Dis.*, **23**, 387–397.
38. Rosenberg, A. S., Puig, M., Nagaraju, K., et al. (2015) Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.*, **7**, 299rv4.
39. Herbelet, S., Rodenbach, A., De Paepe, B., et al. (2020) Anti-Inflammatory and General Glucocorticoid Physiology in Skeletal Muscles Affected by Duchenne Muscular Dystrophy: Exploration of Steroid-Sparing Agents. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**.
40. Novotny, S. A., Warren, G. L., Lin, A. S., et al. (2011) Bone is functionally impaired in dystrophic mice but less so than skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord. NMD*, **21**, 183–193.
41. Hofbauer, L. C., Zeitz, U., Schoppet, M., et al. (2009) Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL. *Arthritis Rheum.*, **60**, 1427–1437.
42. Kamijo, S., Nakajima, A., Ikeda, K., et al. (2006) Amelioration of bone loss in collagen-induced arthritis by neutralizing anti-RANKL monoclonal antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **347**, 124–132.

A1.7 Figures, legends and tables

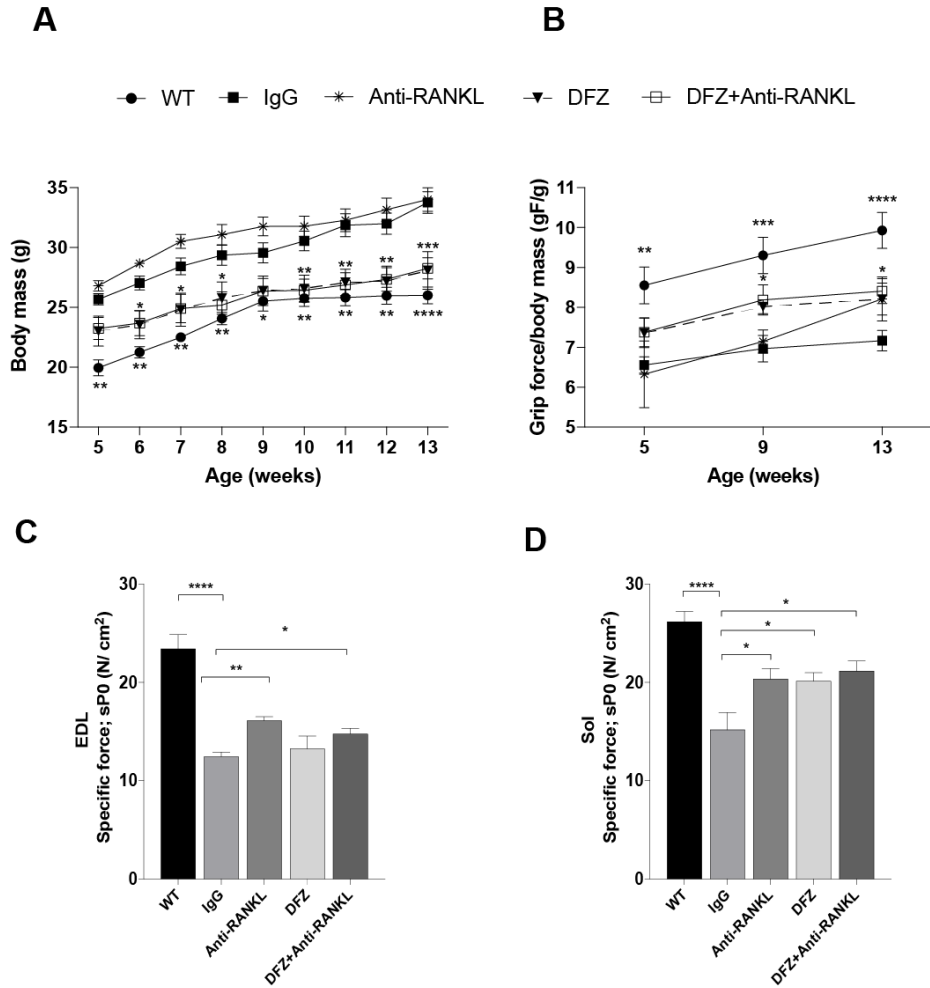


Figure A1. 1: The anti-RANKL and deflazacort treatments significantly improved muscle function *in vivo* and *ex vivo* without any synergetic effects of the combined treatment.

Five-week-old dystrophic *mdx* mice were treated for 8 weeks with either vehicle IgG [4mg/kg/3d], anti-RANKL [4mg/kg/3d], DFZ [1,2mg/kg/d] in drinking water or the combined treatment with anti-RANKL and DFZ. The mice were weighed twice weekly to determine the appropriate drug dose and to monitor growth. As expected, animal body mass increased over time for all treatment groups (A). Glucocorticoid treated *mdx* and WT mice had significantly lower body mass compared to IgG-treated mice (A). Whole limb grip force was measured at 4- and 8-weeks into the treatment. Whole limb grip force increased significantly with age in all groups except for the placebo-IgG treated *mdx* mice (B). The

contractile properties of the EDL and Sol muscles were evaluated *ex vivo*. The anti-RANKL and the co-treatment significantly improved the specific force (sP_0) of dystrophic EDL when compared with IgG-treated *mdx* mice (C). Relative to IgG-treated *mdx* mice, the maximum specific force of the Sol muscle is significantly improved by the anti-RANKL and DFZ treatments alone, but their effects are not additive in the combined treatment (D). Healthy EDL muscles from age-matched WT C57BL6/10J mice served as controls for contractile property recordings. Data are expressed as means \pm SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, and $****p < 0.0001$ indicate significantly different from the IgG-treated mice using One-way ANOVA with the Dunnett correction for multiple comparisons (n=4-8).

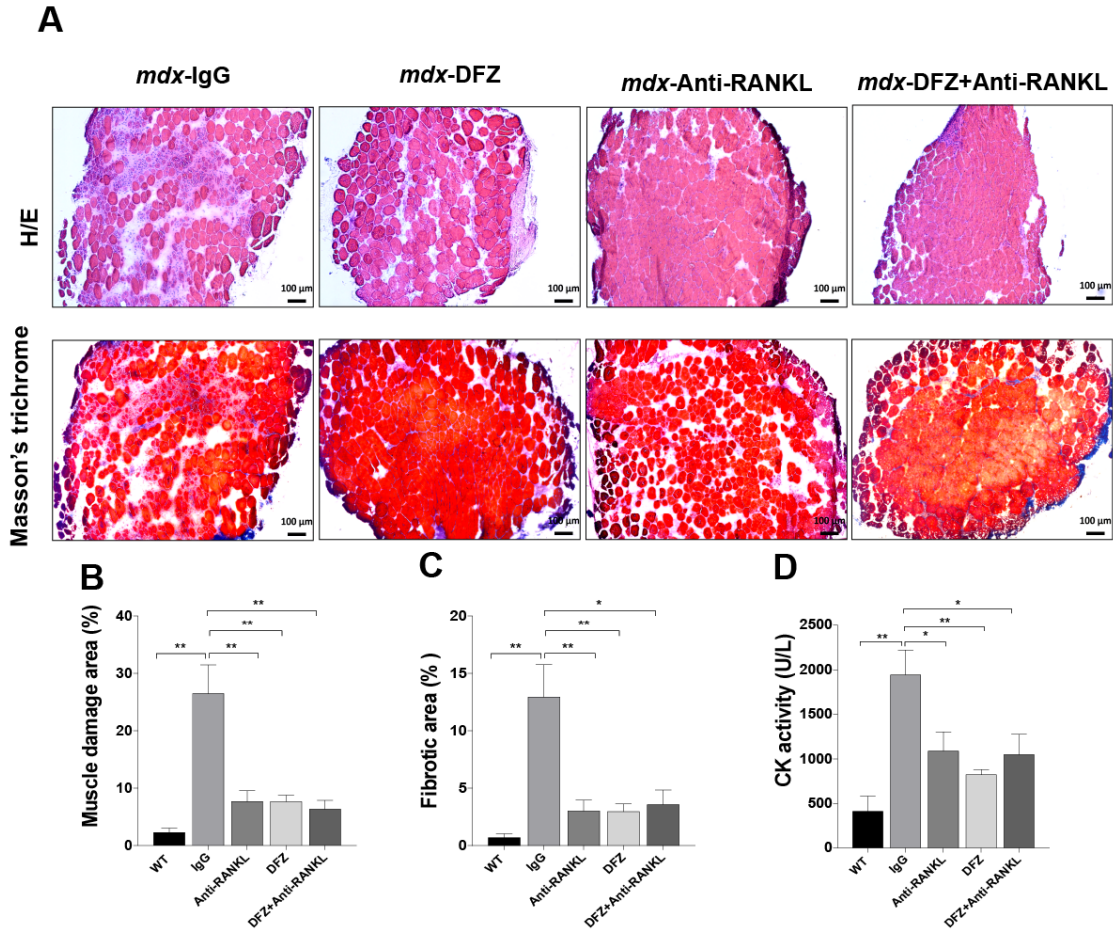


Figure A1. 2: Anti-RANKL and deflazacort or co-treatment significantly improved muscle integrity to the same extent but did not have the same effect on muscle regeneration.

Representative hematoxylin/eosin and Masson's trichrome-stained histological sections of EDL muscles from *mdx* mice treated for 8 weeks with either vehicle IgG [4mg/kg/3d], anti-RANKL[4mg/kg/3d], DFZ [1,2mg/kg/d] in drinking water or the combined treatment with anti-RANKL and DFZ (A). Compared with the IgG treated *mdx* mice, all treated mice displayed a significant reduction of muscle damage and fibrotic areas (B and C, respectively) and serum CK activity (D). Healthy EDL muscles from age-matched WT C57BL6/10J mice served as controls. Muscle damage and fibrosis was quantified using ImageJ software excluding the edges of the sections. Data are expressed as means \pm SEM. Significantly different from IgG-treated *mdx* mice, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, and **** $p < 0.0001$ indicate significantly. Analysis of variance with Dunnett multiple comparisons test (n=4-8). Scale bar =100 μ m.

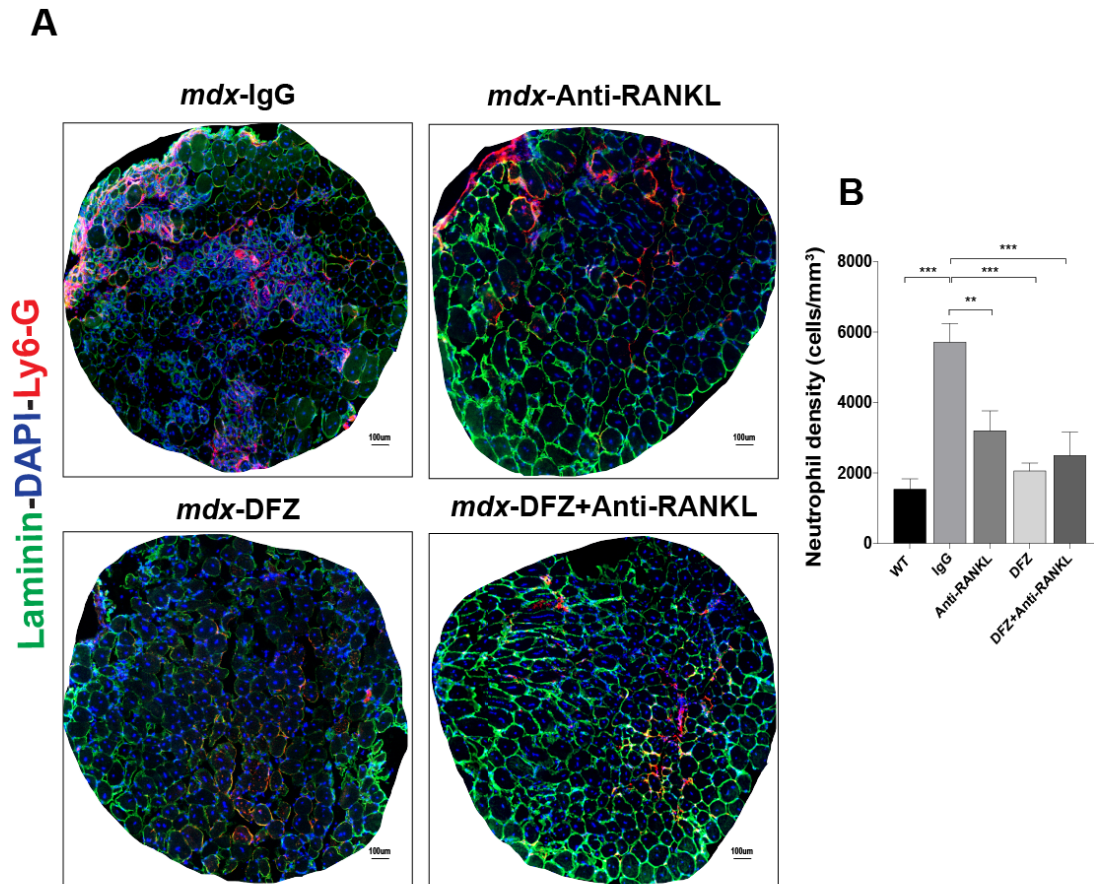


Figure A1. 3: Anti-RANKL and DFZ treatments significantly reduced neutrophil cell infiltration without any additive effect with the combined treatments

Cryosections of EDL muscles from *mdx* mice treated for 8 weeks with either vehicle IgG [4mg/kg/3d], of anti-RANKL[4mg/kg/3d], DFZ [1,2mg/kg/d] in drinking water or the combined treatment with anti-RANKL and DFZ were labeled with anti-Ly6-G/C (to label neutrophils; red), anti-laminin (green), and DAPI (blue) (A). Compared with the IgG treated *mdx* mice, all treatments groups had significantly reduced number of neutrophils (B). Muscles from WT C57BL/10J mice served as controls. Data are expressed as means \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ indicate significantly different from the IgG-treated mice using One-way ANOVA with the Dunnett correction for multiple comparisons (n=4-8). Scale bar = 100 μ m.

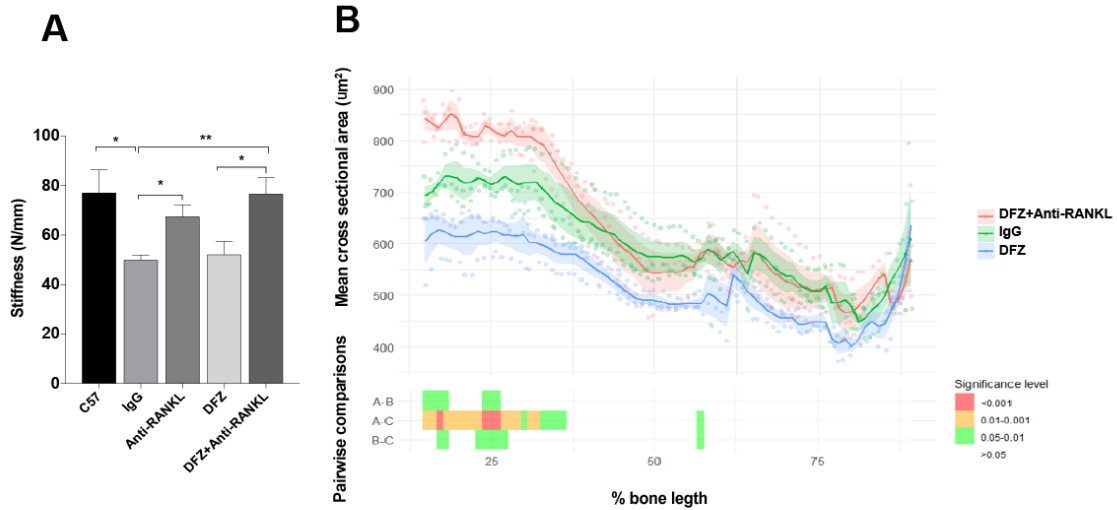


Figure A1. 4: Anti-RANKL treatment significantly increased bone stiffness and counteracted Deflazacort bone-side effects in *mdx* mice.

The bone mechanical properties of bone were assessed using a three-point bending test at the femur mid-diaphysis. The anti-RANKL and DFZ-anti-RANKL treatment for 8 weeks significantly increased femoral stiffness compared with IgG or DFZ-treated *mdx* mice (A). The tibia was scanned by microcomputed tomography (μ CT) to quantify the changes in trabecular architecture and cortical geometry. The cross-sectional area of the tibia was significantly reduced in the anterior portion following DFZ treatment compared to IgG-treated *mdx* mice. The anti-RANKL treatment rescued and significantly increased the cross-sectional area compared to IgG and DFZ-treated *mdx* mice (B). Data are expressed as means \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ indicate significantly different from the IgG or DFZ-treated *mdx* mice using One-way ANOVA with the Dunnett correction for multiple comparisons (n=4-8).

Table A1. 1: Morphological and contractile properties of EDL and Sol muscles.

Groups	EDL					Sol				
	L ₀ (mm) ± SEM	Pt (g) ± SEM	P ₀ (g) ± SEM	½ RT (ms) ± SEM	TPT (ms) ± SEM	L ₀ (mm) ± SEM	Pt (g) ± SEM	P ₀ (g) ± SEM	½ RT (ms) ± SEM	TPT (ms) ± SEM
WT- IgG	12.9 ± 0.3	5.8 ± 0.6	36.5 ± 2.1 (*)	20.8 ± 1.4	20.6 ± 0.4	11.3 ± 0.4 (*)	2.9 ± 0.2	24.8 ± 2.1 (#)	45.7 ± 3.8	40.6 ± 1.2
<i>mdx</i> -IgG	13.3 ± 0.1	8.7 ± 0.4	27.2 ± 0.9	22.9 ± 0.7	21.2 ± 0.4	12.9 ± 0.2	3.8 ± 0.6	18.3 ± 3	44.7 ± 3.7	39.7 ± 2.3
<i>mdx</i> -anti-RANKL	13.3 ± 0.2	8.2 ± 0.6	31.7 ± 1.5 (#)	19.9 ± 1.3	21.8 ± 0.3	12.3 ± 0.3	4.6 ± 0.4	24.3 ± 1.6 (#)	45.3 ± 2.4	38.8 ± 1.6
<i>mdx</i> -DFZ	12.4 ± 0.2	6.6 ± 0.7	25.2 ± 2.4	22.5 ± 0.8	19.7 ± 0.1	12.1 ± 0.3	4.7 ± 0.7	22.4 ± 1.4	40.8 ± 1.9	39.9 ± 1.1
<i>mdx</i> -DFZ+anti-RANKL	12.8 ± 0.1	6.23 ± 0.5	26.3 ± 1.0	20.8 ± 0.9	20.4 ± 0.5	11.3 ± 0.4 (*)	4.2 ± 0.5	25.4 ± 2.4 (#)	40.2 ± 1.8	36.6 ± 0.5

The EDL and Sol muscles were incubated *ex vivo* and their L₀ were determined. They were then electrically stimulated, and their maximal absolute force (P₀), twitch tension (Pt), half-relaxation time (½ RT), and time to peak tension (TPT) were recorded. For the Sol muscles, L₀ is significantly lower in WT and DFZ + anti-RANKL-treated mice than IgG-treated-mice. The absolute force of the EDL muscles following anti-RANKL treatment tended to be higher than that of the IgG-treated EDL muscles (#p = 0.1). The absolute force of the Sol muscles following anti-RANKL treatment and the co-treatment tended to be higher than that of the IgG-treated EDL muscles (#p = 0.1). No differences in other muscle contraction parameters were observed among the four treated experimental groups of mice. Data are expressed as means ± SEM. *p < 0.05 indicate significantly different from the IgG-treated mice using One-way ANOVA with the Dunnett correction for multiple comparisons (n=5-10).

Table A1. 2: Body mass and morphological characteristics of extensor digitorum longus and soleus muscles.

Groups	EDL		Sol	
	Muscle mass (mg) ± SEM	Muscle mass/BM (mg/g) ± SEM	Muscle mass (mg) ± SEM	Muscle mass/BM (mg/g) ± SEM
WT- IgG	8.3 ± 0.7 (****)	0.32 ± 0.02 (****)	6.8± 0.4 (***)	0.26 ± 0.01 (**)
<i>mdx</i>-IgG	13.7 ± 0.3	0.42 ± 0.01	11.6± 0.5	0.36 ± 0.01
<i>mdx-anti-RANKL</i>	12.8 ± 0.3	0.38 ± 0.01 (*)	11.11± 0.4	0.33 ± 0.01
<i>mdx-DFZ</i>	12.2 ± 0.8	0.43 ± 0.006	11.29± 0.5	0.40 ± 0.01
<i>mdx-DFZt+anti-RANKL</i>	11.2 ± 0.6 (**)	0.39 ± 0.001 (#)	10.69±0.5	0.38 ± 0.01

The muscle masses and muscles masses normalized to body masses (BM) of WT mice were significantly lower than those IgG-treated-*mdx* mice. The EDL muscle masses of DFZ+anti-RANKL-treated-*mdx* mice were significantly reduced compared to IgG-treated-*mdx* mice. The normalized muscle mass of the EDL muscles are significantly reduced following anti-RANKL treatment and tended to be reduced with the co-treatment compared to the IgG-treated EDL muscles. Data are expressed as means ± SEM. (#p < 0.1, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001 indicate significantly different from the IgG-treated mice using One-way ANOVA with the Dunnett correction for multiple comparisons (n=5-10).